

CZECH ACADEMY OF AGRICULTURAL SCIENCES

Czech Journal of
FOOD SCIENCES

Potravinářské vědy

INSTITUTE OF AGRICULTURAL AND FOOD INFORMATION

4

VOLUME 17
August 1999
ISSN 1212-1800

Czech Journal of Food Sciences

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

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

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

EDITORIAL BOARD – REDAKČNÍ RADA

J. VELÍŠEK (Praha, Czech Republic) – Chairman

M. BRAUNOVÁ (Editor-in-Chief)

W. BALTES (Berlin, Germany)

R. BATTAGLIA (Zurich, Switzerland)

L. BENEŠOVÁ (Praha, Czech Republic)

D. ČURDA (Praha, Czech Republic)

J. DAVÍDEK (Praha, Czech Republic)

J. DRBOHLAV (Praha, Czech Republic)

S. GROSOVÁ (Praha, Czech Republic)

M. HOLASOVÁ (Praha, Czech Republic)

J. HOUŠOVÁ (Praha, Czech Republic)

I. INGR (Brno, Czech Republic)

M. KOVÁČ (Bratislava, Slovak Republic)

H. KOZŁOWSKA (Olsztyn, Poland)

R. LÁSZTITY (Budapest, Hungary)

W. PFANNHAUSER (Graz, Austria)

J. POKORNÝ (Praha, Czech Republic)

A. PRÍBELA (Bratislava, Slovak Republic)

M. RYCHTERA (Praha, Czech Republic)

Z. ŠIMŮNEK (Praha, Czech Republic)

M. TAKÁCSOVÁ (Bratislava, Slovak Republic)

B. TUREK (Praha, Czech Republic)

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Antioxidant Activities of Rosemary and Sage Extracts in Rapeseed and Sunflower Oils*

HUONG THI THU NGUYEN¹, JAN POKORNÝ¹ and JÓZEF KORCZAK²

¹Institute of Chemical Technology – Department of Food Chemistry and Analysis, Prague, Czech Republic; ²University of Agriculture – Department of Food and Human Nutrition, Poznań, Poland

Abstract

NGUYEN H. T. T., POKORNÝ J., KORCZAK J. (1999): Antioxidant activities of rosemary and sage extracts in rapeseed and sunflower oils. Czech J. Food Sci., 17: 121–126.

The antioxidant activity of rosemary and sage extracts, obtained with different solvents, was tested in zero-erucic rapeseed oil and high-linoleic sunflower oil under conditions of the Schaal oven test at 40 °C. Acetone, ethyl acetate and hexane extracts were found more active than ethanol extracts in both oils. Rosemary extracts were found more active than sage extracts. Rapeseed oil was stabilized more efficiently than sunflower oil. The antioxidant activities rose linearly with the concentration of antioxidants in the range of 0.01–0.10% in rapeseed oil, but the relationship was logarithmical in sunflower oil. Antioxidants inhibited autoxidation reactions during the induction period, proportionally to their concentration. The protection factors showed that the oxidative stability could not be increased more than twice, applying conventional concentrations of 0.01 to 0.02%, but could be increased substantially by increasing the content of extracts to 0.05–0.10%.

Key words: antioxidants; rapeseed oil; rosemary extracts; sage extracts; storage stability; sunflower oil

Natural antioxidants are generally preferred by consumers for the stabilization of edible fats and oils against oxidative rancidity, compared to synthetic antioxidants (POKORNÝ 1999). The most widely applied natural antioxidants are tocopherols (KAMAL-ELDIN & APPELQVIST 1996). Among other natural antioxidants, rosemary and sage extracts have found the most frequent application (NAKATANI 1987; LÖLIGER 1991; RICHHEIMER *et al.* 1996; ZEGARSKA *et al.* 1996; POKORNÝ *et al.* 1998a, b), but other herbs and spices are good sources of antioxidants as well (PLUMB *et al.* 1996; WANG *et al.* 1998; TAKÁCSOVÁ *et al.* 1998). Rosemary and sage extracts are mixtures of several, partially structurally related substances as 24 compounds were detected in rosemary and 8 in sage (CUVELIER *et al.* 1996), and antioxidant activities of some phenolic acids present were compared with those of common synthetic antioxidants (CUVELIER *et al.* 1992). Flavonoids have some antioxidant activity, but lower than synthetic antioxidants (KANDASWAMI & MIDDLETON 1997; WANASUDAR & SHAHIDI 1998).

Edible polyunsaturated oils are food materials particularly difficult to stabilize against autoxidation because of a high rate of chain initiation reactions even under storage conditions. Rosemary oleoresins were found relatively efficient

inhibitors in light-sensitized soybean oil (HALL & CUPPETT 1993). The activity in sunflower oil was better in the case of rosemary than in sage extracts (POKORNÝ *et al.* 1997).

Rapeseed oil is the most widely used edible oil in Central Europe. Commercial rosemary extracts were found less active than TBHQ at high temperatures, but more active than BHT, BHA or tocopherols for the stabilization of rapeseed oil (GORDON & KOUŘIMSKÁ 1995a). Mixtures of rosemary extract and ascorbyl palmitate saved tocopherols under deep fat frying (GORDON & KOUŘIMSKÁ 1995b). Acetone or ethyl acetate extracts from rosemary leaves were found efficient in deep frying of French fries in rapeseed oil and its mixture with palmolein and silicone oil (RÉBLOVÁ *et al.* 1999). Sage extracts were found more active than extracts from thyme, juniper and oregano in rapeseed oil (TAKÁCSOVÁ *et al.* 1995).

The content of active substances in rosemary and sage extracts depends on the solvent used for extraction (POKORNÝ *et al.* 1998a, b). The activity depends on the stabilized system, e. g., activities are very different in bulk oils compared to emulsions (KORCZAK *et al.* 1998) or liposomes (ARUOMA 1997), which is in agreement with similar experiments in other systems (FRANKEL *et al.* 1996).

*The research was supported by grant ERBICI 15CT96/1006, and grant No. OK 282, Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic.

In this paper, we report on the effect of concentration of rosemary and sage extracts in rapeseed and sunflower oils.

calculated as the induction period of a stabilized oil, divided by the induction period of the control.

MATERIAL AND METHODS

Extracts were prepared by extraction of dry leaves of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) and sage (*Salvia officinalis* L.): 100 g of leaves were left with 1 l of the respective solvent (hexane, acetone, ethyl acetate, ethanol) for 24 h at room temperature (KORCZAK *et al.* 1998). The content of active substances was determined by HPLC with an electrochemical detector (RÉBLOVÁ *et al.* 1997), and was higher in rosemary extracts than in sage extracts (POKORNÝ *et al.* 1998a, b). Refined sunflower and rapeseed oils (Table 1) were commercial products.

Table 1. Characteristics of edible oils used in the experiments

Analytical characteristics	Unit	Oil	
		rapeseed	sunflower
Acid value	mg/g	0.07	0.06
Peroxide value	mval/kg	0.58	0.24
α -Tocopherol	mg/kg	294	373
$\beta + \gamma$ -Tocopherols	mg/kg	392	34
δ -Tocopherol	mg/kg	12	14
Sum of tocopherols	%	698	418
Flavour acceptability*	%	71	72
Rancidity*		8	11

*Scales for the sensory assessment: Flavour acceptability: 0% = very bad; 100% = excellent; rancidity: 0% = imperceptible; 100% = very strong

The antioxidant activity was determined using the Schaal Oven Test at 40 °C with gravimetric detection (POKORNÝ *et al.* 1985). The end of the induction period was calculated as the time when the second derivation of the sample weight started to significantly differ from the original value ($p = 0.95$). The results in Tables 2 to 5 are based on three parallel determinations. The protection factor was

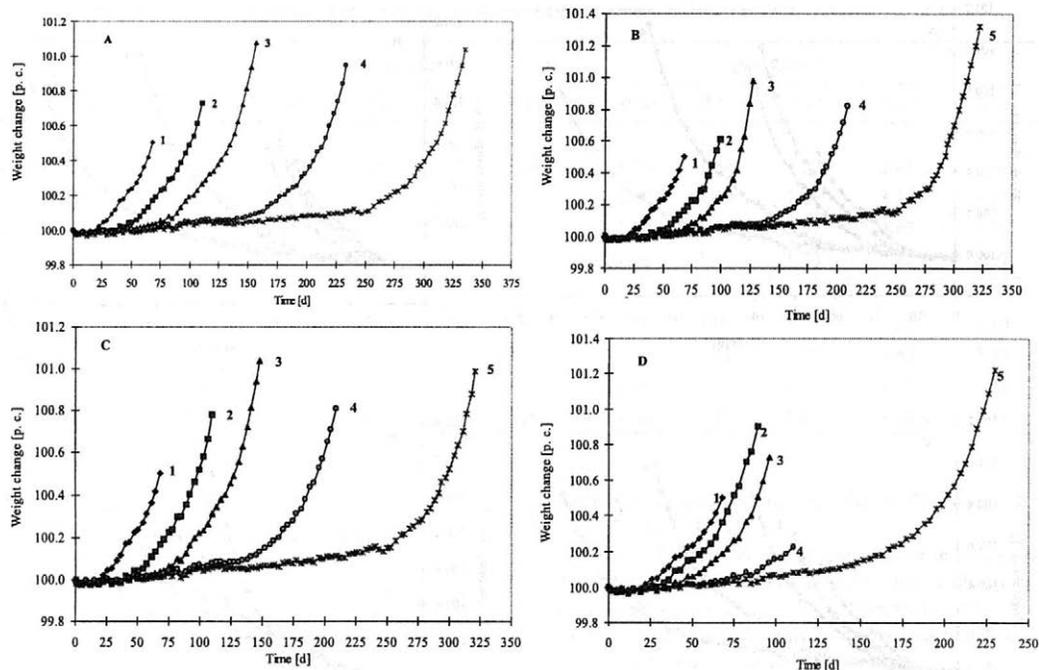
RESULTS AND DISCUSSION

The course of autoxidation in edible oils was determined using the Schaal Oven Test at 40 °C, to approach conditions of the accelerated test the most closely to those of real storage conditions (FRANKE 1993); the difficulty was long duration of the test (up to 1 year). Zero-erucic rapeseed oil and high-linoleic sunflower oil were chosen as they are the mostly frequently consumed edible oils in the Czech Republic. Additions of 0.01%, 0.02%, 0.05% and 0.10% were studied as natural plant extracts contain only much less active substances than synthetic antioxidants (POKORNÝ *et al.* 1998) so that even higher additions would be still acceptable. Hexane, ethyl acetate, acetone and ethanol were used for comparison because the polarity of solvents affects the content of active substances (RÉBLOVÁ *et al.* 1997).

Examples of experiments with rapeseed oil containing rosemary extracts are shown in Fig. 1 (A – hexane extract), (B – acetone extract), (C – ethyl acetate extract) and (D – ethanol extract). The first three extracts obtained with less polar solvents were more active than ethanol extracts because of high levels of carnosic acid and carnosol (RÉBLOVÁ *et al.* 1997). The ethanol extract was less active, especially at low concentrations. In the presence of higher concentrations, the antioxidant activity was, however, satisfactory (Fig. 1D). Induction periods (Table 2) were proportional to the concentration in the whole interval tested. The rate of oxidation during the induction period depended on the concentrations of antioxidants, too (Table 3). The first derivation of weight increase during the induction period was a linear function of reaction time which corresponds to the kinetics of a zeroth order autocatalytic reaction. The antioxidant activity depends on the polarity of reaction medium, also (FRANKEL 1993) as the activity in emulsion differs from that of observed in bulk oil (FRANKEL *et al.* 1996).

Table 2. Effect of rosemary and sage extracts on the induction period in days of rapeseed and sunflower oil

Extract [%]	Rapeseed oil					Sunflower oil				
	0.00	0.01	0.02	0.05	0.10	0.00	0.01	0.02	0.05	0.10
Rosemary										
Hexane	55	98	122	201	283	39	60	77	99	104
Acetone	58	87	108	178	265	40	60	82	127	145
Ethyl acetate	56	65	122	187	268	40	63	82	105	151
Ethanol	52	69	79	120	198	38	52	66	83	113
Sage										
Hexane	55	65	83	128	165	40	43	48	60	84
Acetone	55	64	72	120	175	37	53	65	90	109
Ethyl acetate	50	60	83	130	158	40	50	56	73	93
Ethanol	50	63	70	83	99	41	49	51	55	62



Concentration of extract: 1 = 0.00%; 2 = 0.01%; 3 = 0.02%; 4 = 0.05%; 5 = 0,10%

Fig. 1. Course of oxidation of rapeseed oil stabilized by hexane (A), acetone (B), ethyl acetate (C) and ethanol (D) extract from rosemary at 40 °C under conditions of Schaal Oven Test

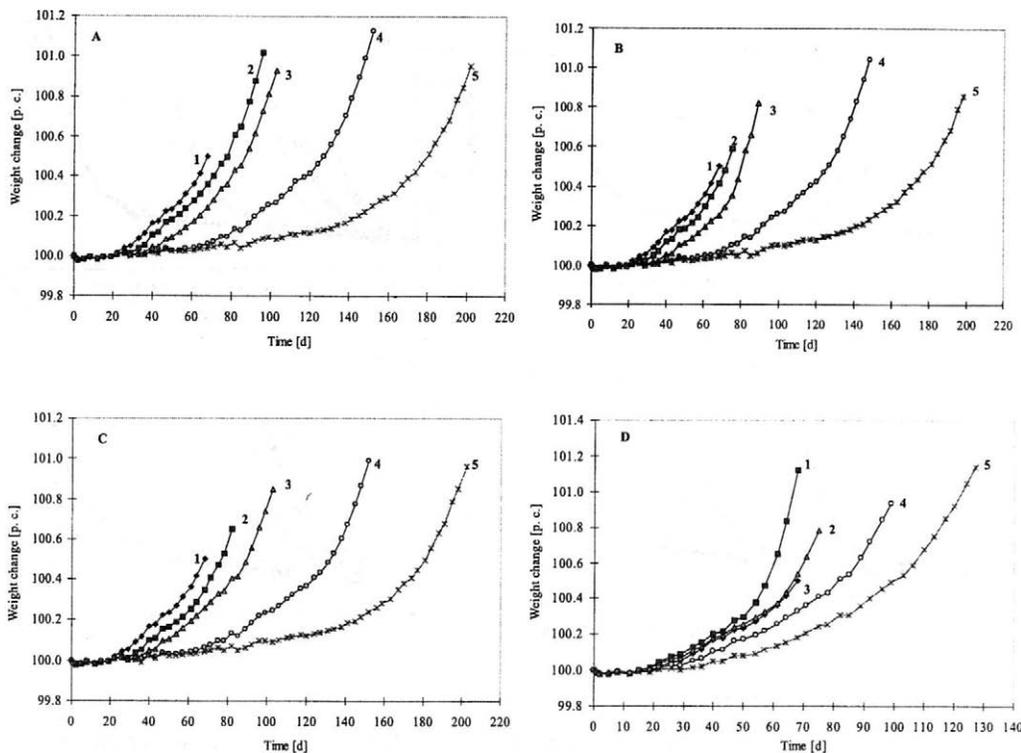
Rapeseed oil was stabilized with sage extracts less efficiently than with rosemary extracts. The reason was lower content of active substances than in the respective rosemary extracts (RÉBLOVÁ *et al.* 1997). The antioxidant levels of 0.01 and 0.02% had no satisfactory activities, even in samples stabilized with extracts obtained with less polar solvents, but additions of 0.05 and 0.10% already

showed substantial prolongation of induction period (Fig. 2). Ethanol extracts were not sufficiently active even at the higher level of antioxidants (Fig. 2D).

Induction periods were also a linear function of concentration even in samples stabilized with sage extracts (Table 2), only slopes of the respective relationships were lower. The inhibition of weight increase during the inducti-

Table 3. Effect of rosemary and sage extracts in rapeseed and sunflower oil on the oxidation rate (expressed as weight increase in mg/g.d) during the induction period

Extract [%]	Rapeseed oil					Sunflower oil				
	0.00	0.01	0.02	0.05	0.10	0.00	0.01	0.02	0.05	0.10
Rosemary										
Hexane	10.0	7.1	5.3	4.3	1.4	14.0	8.50	4.52	3.45	3.01
Acetone	8.6	6.4	4.3	2.1	1.1	12.5	8.03	4.78	2.04	1.45
Ethyl acetate	10.0	6.6	4.6	3.5	2.0	13.5	8.02	5.04	3.50	2.46
Ethanol	7.2	6.7	4.4	2.2	1.1	15.0	12.01	8.00	5.78	3.00
Sage										
Hexane	7.2	6.6	4.4	2.2	1.2	14.2	14.02	13.01	9.47	7.18
Acetone	10.0	8.4	6.6	2.6	1.4	16.04	13.97	11.22	5.10	3.80
Ethyl acetate	8.8	8.4	7.2	3.8	2.0	12.00	10.21	9.00	5.53	4.07
Ethanol	11.2	8.4	6.6	5.6	4.4	15.03	13.10	12.53	11.04	10.10



Concentration of extract: 1 = 0.00%; 2 = 0.01%; 3 = 0.02%; 4 = 0.05%; 5 = 0.10%

Fig. 2. Course of oxidation of rapeseed oil stabilized by hexane (A), acetone (B), ethyl acetate (C) and ethanol (D) extract from sage at 40 °C under conditions of Schaal Oven Test

Table 4. Effect of rosemary and sage extracts on the oxidation rate during the induction period (expressed as weight increase in mg/g.d) in sunflower oil

Extract [%]	0.00	0.01	0.02	0.05	0.10
Rosemary					
Hexane	39	60	77	99	104
Acetone	40	60	82	127	145
Ethyl acetate	40	63	82	105	151
Ethanol	38	52	66	83	113
Sage					
Hexane	40	43	48	60	84
Acetone	37	53	65	90	109
Ethyl acetate	40	50	56	73	93
Ethanol	41	49	51	55	62

on period was also less pronounced than with rosemary extracts (Table 3).

Sunflower oil was less efficiently stabilized with both rosemary and sage extracts than rapeseed oil (Table 4),

which is in agreement with our previous results (POKORNÝ *et al.* 1997). The obvious reason was higher content of polyunsaturated fatty acids and lower content of synergistically active tocopherols (Table 1). Rates of the autoxidation during the induction period were relatively high even in the case of relatively more active extracts (Table 3). The dependence of the induction period on antioxidant concentration was not linear, but logarithmic, contrary to rapeseed oil. Therefore, the highest concentrations of antioxidants were less efficient than expected. However, at the 0.02% level, induction periods were comparable with our previous results (POKORNÝ *et al.* 1997).

Protection factors (Table 5) showed that low concentrations (0.01 or 0.02%) could not increase the stability on storage only more than twice, in the case of ethanol extracts even less. Higher concentrations (0.05 or 0.10%) increased the storage time up to five times in the case of rapeseed oil or about three times in the case of sunflower oil (Table 5). Such efficiencies would be completely satisfactory for the stabilization of polyunsaturated edible oils, which are otherwise very difficult to stabilize.

Table 5. Protection factors of rapeseed and sunflower oil stabilized by rosemary and sage extract

Extract [%]	Rapeseed oil					Sunflower oil				
	0.00	0.01	0.02	0.05	0.10	0.00	0.01	0.02	0.05	0.10
Rosemary										
Hexane	1.00	1.88	2.35	3.87	5.44	1.00	1.54	1.97	2.41	2.67
Acetone	1.00	1.50	1.86	3.07	4.57	1.00	1.50	2.05	3.18	3.63
Ethyl acetate	1.00	1.16	2.18	3.34	4.79	1.00	1.58	2.05	2.63	3.78
Ethanol	1.00	1.33	1.52	2.31	3.81	1.00	1.37	1.74	2.18	2.97
Sage										
Hexane	1.00	1.18	1.51	2.33	3.00	1.00	1.08	1.20	1.50	2.10
Acetone	1.00	1.16	1.31	2.18	3.18	1.00	1.43	1.76	2.43	2.94
Ethyl acetate	1.00	1.20	1.66	2.60	3.16	1.00	1.25	1.40	1.83	2.33
Ethanol	1.00	1.26	1.40	1.66	1.98	1.00	1.19	1.24	1.34	1.51

References

- ARUOMA O. I. (1997): Extracts as antioxidant prophylactic agents. *INFORM*, **8**: 1236–1242.
- CUVELIER M.-E., RICHARD H., BERSET C. (1992): Comparison of the antioxidant activity of some acid-phenols: Structure-activity relationship. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **56**: 324–325.
- CUVELIER M.-E., RICHARD H., BERSET C. (1996): Antioxidative activity and phenolic composition of pilot-plant and commercial extracts of sage and rosemary. *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, **73**: 645–652.
- FRANKEL E. N. (1993): In search of better methods to evaluate natural antioxidants and oxidative stability of lipids. *Trends Food. Sci. Technol.*, **4**: 220–225.
- FRANKEL E. N., HUANG S. W., AESBACH R., PRIOR E. (1996): Antioxidant activity of a rosemary extract and its constituents, carnosic acid and carnosol, and rosmarinic acid, in bulk oil and oil-in-water emulsions. *J. Agric. Food Chem.*, **44**: 131–135.
- GORDON M. H., KOUŘIMSKÁ L. (1995a): The effects of antioxidants on changes in oils during heating and deep frying. *J. Sci. Food Agric.*, **68**: 347–353.
- GORDON M. H., KOUŘIMSKÁ L. (1995b): Effect of antioxidants on losses of tocopherols during deep-fat frying. *Food Chem.*, **52**: 175–177.
- HALL III C., CUPPETT S. (1993): The effects of bleached and unbleached rosemary oleoresins on light-sensitized oxidation of soybean oil. *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, **70**: 477–482.
- KAMAL-ELDIN A., APPELQVIST L.-A. (1996): The chemistry and antioxidant properties of tocopherols and tocotrienols. *Lipids*, **31**: 671–701.
- KANDASWAMI C., MIDDLETON JR. E. (1997): Flavonoids as antioxidants. In: SHAHIDI F. (Ed.): *Natural Antioxidants*. Champaign, IL, AOC Press: 174–203.
- KORCZAK J., JANITZ W., POKORNÝ J., NOGALA-KALUCKA M. (1998): Synergism of natural antioxidants in the stabilization of fats and oils. In: KOSEOGLU S. S., RHEE K. C., WILSON R. F. (Eds.): *Advances in Oils and Fats, Antioxi-*
- dants, and Oilseed By-Products*. Vol. 2. Champaign, IL, AOC Press: 253–255.
- LÖLIGER J. (1991): The use of antioxidants in foods. In: ARUOMA O. I., HALLIWELL B. (Eds.): *Free Radicals and Food Additives*. London, Taylor & Francis: 121–150.
- NAKATANI N. (1987): Antioxidative compounds from spices. *Nippon Nogeikagaku Kaishi*, **62**: 170–173.
- PLUMB G. W., CHAMBRES S. J., LAMBERT N., BARTOLOME B., HEANEY R. K., WANIGATUNGA S., ARUOMA O. I., HALLIWELL B., WILLIAMSON G. (1996): Antioxidant action of fruit, herb, and spice extracts. *J. Food Lipids*, **3**: 171–188.
- POKORNÝ J. (1999): Antioxidants in food preservation. In: RAHMAN M. S. (Ed.): *Handbook of Food Preservation*. New York, Basel, M. Dekker: 309–337.
- POKORNÝ J., DOBIÁŠOVÁ S., DAVIDEK J. (1985): Repeatability of the determination of oxidative stability of vegetable oil using the Schaal test. *Sb. VŠCHT Praze*, **E 58**: 163–173.
- POKORNÝ J., NGUYEN H. T. T., KORCZAK J. (1997): Antioxidant activities of rosemary and sage extracts in sunflower oil. *Nahrung*, **41**: 176–177.
- POKORNÝ J., RĚBLOVÁ Z., JANITZ W. (1998a): Extrakty z romarýny a šalvěje jako přírodní antioxidanty tuků a olejů. *Czech J. Food Sci.*, **16**: 227–234.
- POKORNÝ J., RĚBLOVÁ Z., TROJÁKOVÁ L., NGUYEN H. T. T., KORCZAK J., JANITZ W. (1998b): Antioxidant activities of spices and herbs in rapeseed oil. In: KOSEOGLU S. S., RHEE K. C., WILSON R. F. (Eds.): *Advances in Oils and Fats, Antioxidants, and Oilseed By-Products*. Vol. 2. Champaign, IL, AOC Press: 265–269.
- RĚBLOVÁ Z., KUDRNOVÁ J., TROJÁKOVÁ L., POKORNÝ J. (1999): Effect of rosemary extracts on the stabilization of frying oil during deep fat frying. *J. Food Lipids*, **6**: 13–23.
- RĚBLOVÁ Z., TROJÁKOVÁ L., POKORNÝ J. (1997): Stanovení specifických antioxidantů šalvěje a rozmarýnu. *Zb. Laboralim*, **97**: 222–225.
- RICHEIMER S. L., BERNART M. W., KING G. A., KENT M. C., BAILEY D. T. (1996): Antioxidant activity of lipid-soluble phenolic diterpenes from rosemary. *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, **73**: 507–514.

- TAKÁCSOVÁ M., NHAT D. M., NGUYEN D. V., PRÍBELA A. (1998): Izolácia a identifikácia silíc korenín. Bull. Potravn. Výsk., 37: 109–117.
- TAKÁCSOVÁ M., PRÍBELA A., FAKTOROVÁ M. (1995): Study of the antioxidative effects of thyme, sage, juniper and oregano. Nahrung, 39: 243–245.
- WANASUNDAR U. N., SHAHIDI F. (1998): Stabilization of marine oils with flavonoids. J. Food Lipids, 5: 183–196.
- WANG M., LI J., HO G. S., PENG X., HO C.-T. (1998): Isolation and identification of antioxidative flavonoid glycosides from thyme (*Thymus vulgaris* L.). J. Food Lipids, 5: 313–321.
- ZEGARSKA Z., AMAROWICZ R., KARAMAC M., RAFALOWSKI R. (1996): Antioxidative effect of rosemary ethanolic extract on butter. Milchwissenschaft, 51: 195–198.

Received for publication April 29, 1999

Accepted for publication May 31, 1999

Souhrn

NGUYEN H. T. T., POKORNÝ J., KORCZAK J. (1999): **Antioxidační účinnost extraktů z rozmarýny a šalvěje v řepkovém a slunečnicovém oleji.** Czech J. Food Sci., 17: 121–126.

Listy rozmarýny a šalvěje byly extrahovány různými rozpouštědly a byla zkoušena antioxidační účinnost získaných extraktů v bezerukovém řepkovém oleji a ve slunečnicovém oleji s vysokým obsahem kyseliny linolové. Při Schaalově zkoušce při teplotě 40 °C byly acetonové, ethylacetátové a hexanové extrakty účinnější než extrakty ethanolové. Rozmarýnové přípravky byly v obou olejích účinnější než přípravky šalvějové. Skladovatelnost řepkového oleje se dařilo zvýšit více než oleje slunečnicového. Antioxidační aktivita rostla lineárně s rostoucí koncentrací v intervalu 0,01–0,10 % v řepkovém oleji, ale logaritmičtě v slunečnicovém oleji. Antioxidanty snižovaly rychlost přírůstku hmotnosti během indukční periody úměrně koncentraci. Protekční faktory ukázaly, že stabilita se nezvýší více než na dvojnásobek při přidavku běžně užívaných koncentrací 0,01–0,02 %, ale může se zvýšit velmi podstatní přidavkem vyšších koncentrací (0,05–0,10 %).

Klíčová slova: antioxidanty; rozmarýnový extrakt; řepkový olej; skladovatelnost; slunečnicový olej; šalvějový extrakt

Corresponding author:

Prof. JAN POKORNÝ, DrSc., Vysoká škola chemicko-technologická, Ústav chemie a analýzy potravin, Technická 5, 166 28 Praha 6, Česká republika, tel.: + 420 2 24 35 32 64, fax: + 420 2 31 19 990, e-mail: Jan.Pokorny@vscht.cz

Effect of Processing and Storage Conditions on Patulin Content in Apple Juice Concentrate*

DUŠAN BRŮNA¹, MICHAL VOLDŘICH¹, MIROSLAV MAREK¹ and JIŘÍ KAMARÁD²

¹Institute of Chemical Technology – Department of Food Preservation and Meat Technology, Prague;

²Institute of Physics, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague, Czech Republic

Abstract

BRŮNA D., VOLDŘICH M., MAREK M., KAMARÁD J. (1999): Effect of processing and storage conditions on patulin content in apple juice concentrate. Czech J. Food Sci., 17: 127–132.

During the large scale processing of apples it is impossible to avoid the processing of decayed fruits and apple concentrates that usually contain different levels of mycotoxin patulin. For the risk assessment within the HACCP system implementation or evaluation it is important to predict the course of patulin content changes during the storage and processing of such concentrates. The effects of storage at different temperatures (4 °C, 20 °C, 50 °C, 90 °C) and various high hydrostatic pressure processing (300 MPa, 500 MPa, 800 MPa) on the samples: apple concentrate, sulphited apple concentrate (100 ppm sodium pyrosulphite), distilled water, sulphited distilled water (100 ppm sodium pyrosulphite) all containing 155 mg/kg of patulin were followed. The equations of $D-t$ thermodestruction and $D-p$ barodestruction curves for apple concentrate and sulphited apple concentrate are $t = -24.95 \log D + 146.61$ and $t = -22.52 \log D + 118.41$, respectively. The barodestruction curves are $p = -2311 \log D + 5897$ and $p = -1634 \log D + 3999$ for apple concentrate and sulphited apple concentrate, respectively.

Key words: Patulin; degradation; apple concentrate; high pressure treatment; heat treatment; storage effect

Mycotoxins represent a severe chemical hazard in food production, they should always be considered in hazard analysis procedures within the implementation of the HACCP concept in food processing. The presence of mycotoxins is very important in technological scale processing of fruit and vegetable because rotten fruits can be processed relatively often. Especially apples, but also other fruits (apricots, oranges, grapes), some vegetables (e.g., tomatoes), grains and refrigerated products such as cheese and cured meat can be contaminated or spoiled by various toxicogenic moulds, which can produce the mycotoxin patulin (PRÍBELA & ŠINKOVÁ 1995; HARRISON 1989; BETINA 1990). The most important patulin producers are some species of *Penicillium* (*P. patulum*, *P. griseofulvum*, *P. claviforme*, *P. expansum*, *P. roquerforti*), *Aspergillus* (*A. clavatus*, *A. terreus*, *A. giganteus*), *Byssoschlamys* (*B. fulva*, *B. nivea*) and *Paecilomyces varioti* (LINDROTH 1980; AYTAÇ & ACAR 1994; TANIWAKI *et al.* 1989).

Patulin, 4-hydroxy-4H-furo(3,2-c)pyran-2(6H)-on (Fig. 1), earlier also clavacin, clavitan, claviformin, expansin or penicidin (ADENSAM *et al.* 1989), belongs to lactone type mycotoxins. It is a white crystalline powder with a melting point of 111 °C, soluble well in water, ethanol and chloroform. The substance is relatively heat-resistant. In pH ranging between 3.0 and 6.5, the mycotoxin is stable. If the pH value is higher, the lactone ring is opened and the toxic effect is lost. Another way of patulin degradation is the addition of bisulphite ion (HSO_3^-) to the conjugated system in patulin lactone structure, similar addition reactions are described also for the thiols. It is believed

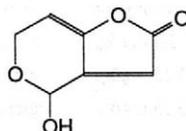


Fig. 1. Chemical structure of patulin

*The experimental part of this work was financially supported by projects of the Ministry of Agriculture of the Czech Republic MZE ČR 05/6258 and MZE ČR 05/6259.

that HSO_3^- would also add to the incipient aldehyde function of the hemiacetal moiety of patulin (POHLAND & ALLEN 1970). The degradation of lactone ring of patulin or adducts formation yields less toxic products in comparison with patulin (WOLLER & MAJERUS 1982). Patulin content in apples correlates well with the degree of mould spoilage of fruits. Rotten parts can contain about 1 g/kg of patulin, the concentrations of patulin in partly decayed fruit are usually not higher than 1–2 mg per kg (SYDENHAM *et al.* 1995; HORUBALA 1992). The reduction of patulin content due to the transfer to the washing water within the initial water treatment step could be up to 80% of the original level. In the case of apples the highest concentrations of patulin are usually found in decayed parts of fruits and the diffusion into remaining flesh of apples is significantly lower than it is in tomatoes, peaches and oranges (HORUBALA 1992). A subsequent decrease of patulin content in apple juice or concentrate is explained by the above addition reactions. The heat treatment (degradation of patulin by pasteurisation) affects the rate of these reactions only, in a model system patulin retains its activity when heated at 100 °C at pH 2 (POHLAND & ALLEN 1970).

The described chemical reactions are probably responsible for the decrease of patulin content during the microwave heating of apricot juice (CASADIO & NIOLA 1993). Another described ways of patulin detoxication are yeast fermentation of fruit juices (OUGH & CORRISSON 1980), γ -irradiation (ZEGOTA 1991), heat treatment, the addition of sulphur dioxide (AYTAC & ACAR 1994; POHLAND & ALLEN 1970; DOYLE *et al.* 1982; FRANK 1980), thiols (WOLLER & MAJERUS 1982) and ascorbic acid (AYTAC & ACAR 1994) which accelerate the decrease of patulin content.

The summarised data on the patulin degradation under different conditions are given in Table 1.

The aim of the presented work was to estimate the course of patulin degradation during the storage of apple juice concentrate at different temperatures and acceleration of this decrease by addition of sulphites and by high hydrostatic pressure treatment.

MATERIAL AND METHODS

Apple juice concentrates (pH 3.4, refractive index 67° Brix), patulin (Aldrich Chem., Co.) were used to prepare the model samples:

- A: apple juice concentrate fortified with patulin ($c = 155 \text{ mg/kg}$)
- B: apple juice concentrate fortified with patulin ($c = 155 \text{ mg/kg}$) and with addition of $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ (100 mg/kg)
- C: patulin solution in distilled water ($c = 155 \text{ mg/kg}$)
- D: patulin solution in distilled water ($c = 155 \text{ mg/kg}$) and with addition of $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ (100 mg/kg)

Patulin determination: A portion of 10 g of apple juice concentrate was diluted with 7 ml distilled water and extracted in a 50ml Erlenmeyer flask with $3 \times 7 \text{ ml}$ ethyl acetate. Organic layers separated by centrifugation combined in a separatory funnel were washed twice with 2 ml of 2% $\text{Na}_2\text{CO}_3 \times 10 \text{ H}_2\text{O}$ solution. Ethyl acetate solutions were dried with anhydrous Na_2SO_4 and evaporated to dryness at 50 °C. The obtained residue was dissolved in chloroform and purified using SEGC on BioBeads® S-X3, the mobile phase was chloroform. The fraction containing patulin was collected and evaporated to dryness at 50 °C. Patulin was derivatized using BSTFA (Fluka Chemicals, Co.) and analysed by gas chromatography on

Table 1. Patulin degradation during various treatments of fruit juices and concentrates

Material	Patulin content before treatment	Treatment	Patulin content reduction	Reference
Fruit	unknown	"common process in fruit juice production"	20%	BARTOLOMÉ <i>et al.</i> (1994)
Apples	0.92 mg/kg	initial water treatment step	80%	SYDENHAM <i>et al.</i> (1995)
Apples	0.19 mg/kg	hand removal of rotten and damaged fruit	71%	SYDENHAM <i>et al.</i> (1995)
Apricot juice	0.8 mg/kg	microwave treatment (3 min)	39%	CASADIO & NIOLA (1993)
Apricot juice	0.8 mg/kg	microwave treatment (15 min)	95%	CASADIO & NIOLA (1993)
Apricot juice	0.35 mg/kg	microwave treatment (3 min)	39%	CASADIO & NIOLA (1993)
Apricot juice	0.35 mg/kg	microwave treatment (15 min)	95%	CASADIO & NIOLA (1993)
Apple juice concentrate	unknown	γ -irradiation (0,35 kGy)	50%	ZEGOTA <i>et al.</i> (1988)
Apple juice	6 000 mg/kg	after clarification	25%	AYTAC & ACAR (1994)
Apple juice	4 500 mg/kg	after evaporation, before pasteurisation	0%	AYTAC & ACAR (1994)
Apple juice	4 500 mg/kg	after pasteurisation	0%	AYTAC & ACAR (1994)

a DB5 capillary column (J&W Scientific) with an EC detector. As an internal standard p,p'-DDT was used.

Storage experiments: Model samples A, B, C, D were stored at temperatures of 4 °C, 20 °C, 50 °C and 90 °C.

Pressure treatment: The samples A and B at the quantities of 0.5–1 g were closed into PE capsules (2 × 2 cm), 5 for each sample and treated in a hydrostatic pressure cell (about 50 ml capacity and maximum pressure of 1000 MPa) to guarantee identical pressure, temperature and time conditions. A mixture of mineral oils was used as a pressure transmitting medium, no contamination of samples was detected.

RESULTS AND DISCUSSION

Effect of Heat Treatment on Patulin Content

During the technological scale production of apple juice concentrate it is hardly possible to avoid the processing of decayed fruits. Sometimes the mould spoilage is not evident, the moulds grow inside the apples in the core. Patulin content in the individual batches of concentrate is usually followed and besides the beginning level of patulin content in the concentrate the data for prediction of the course of patulin reduction are needed.

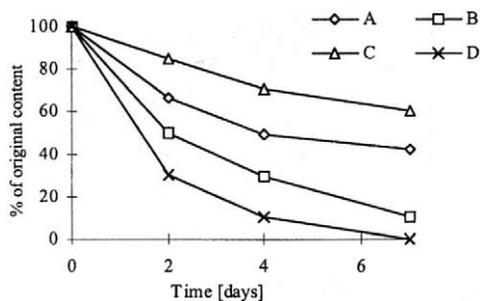


Fig. 2. Patulin content reduction during heat treatment (50 °C), for the legend see Material and Methods

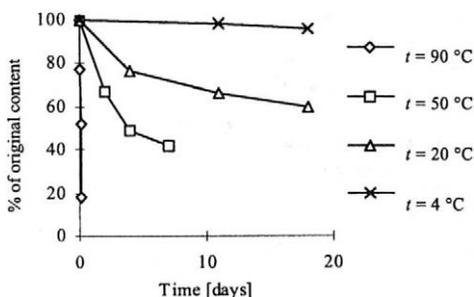


Fig. 3. The effect of storage temperature on patulin content decrease in apple concentrate (model solution A)

The course of patulin degradation in four model solutions stored at 50 °C is given in Fig 2. The addition of sodium bisulphite accelerated the decrease of patulin concentration in both cases, apple juice concentrate and water solution. A slight decrease was found in distilled water solution. It could be explained as the effect of impurities present in the patulin standard. Similar curves were obtained when the model solutions were stored at other storage temperatures as it is obvious from the summarised data for apple concentrate with and without the addition of bisulphite (Fig. 3 and 4, respectively).

The data were processed and the “thermodestruction curve” of patulin (Fig. 5) was drawn. $D-t$ degradation curve is the dependence of exposition time needed to reduce the concentration of patulin by one log cycle on temperature. The thermodestruction curves for patulin in apple concentrate with and without addition of bisulphite are:

$$t = -24.945 \log D + 146.61; z = -24.95$$

(for apple concentrate)

$$t = -22.520 \log D + 118.41; z = -22.52$$

(for sulphited apple concentrate)

The curves or equations could be used to estimate of behaviour of patulin within long term storage or to evaluate the “detoxication” efficiency of heat treatment on

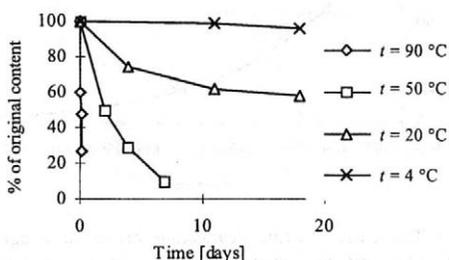


Fig. 4. The effect of storage temperature on patulin content decrease in sulphited apple concentrate (model solution B)

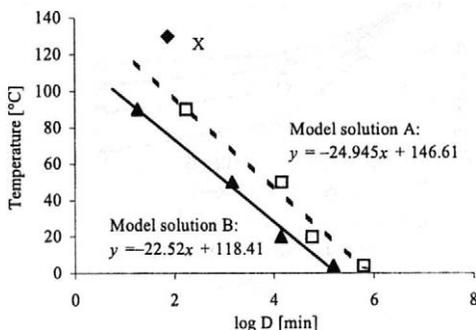


Fig. 5. $D-t$ thermodestruction curve for patulin decrease in apple concentrate (model solution A) and sulphited apple solution (model solution B), X point according to MUTTI and QUINTAVALLA (1989)

apple concentrate. The marked point X in Fig. 5 was calculated according to the results of MUTTI and QUINTAVALLA (1989). It is evident that the stability of patulin in their experiments was higher. It could be explained by a high variability of apple concentrates composition, may be by different content of thiols. Considering this high variability of apple concentrates composition, the data are in a relatively good agreement.

Storage Experiments

In addition to model storage experiments, the course of patulin degradation within the storage of apple concentrate in stainless steel tank (24 m³) placed out of the plant building under the effect of climatic conditions for 7 months of storage was followed in the season 1995/96.

During the storage of concentrate before processing the patulin content decreases. The course of patulin content degradation depends on the composition of apple concentrate, but a rough estimation can be done based on results given in Fig. 6.

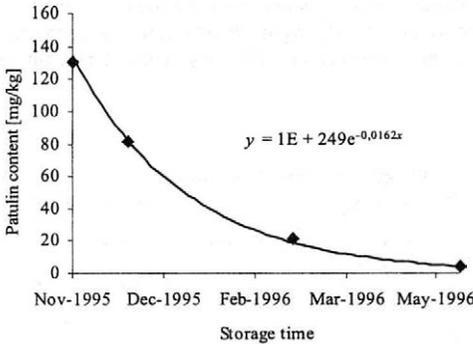


Fig. 6. The course of patulin degradation within the storage of apple concentrate in stainless steel tank (24 m³) in the season 1995/96

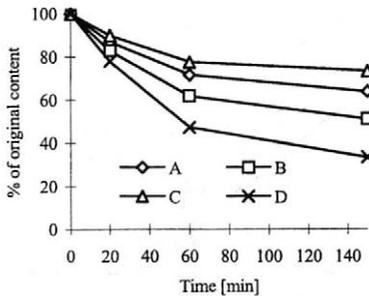


Fig. 7. The effect of time of pressure treatment (500 MPa, 20 °C) on the rate of patulin decrease, for the legend see Material and Methods

Effect of High Pressure Treatment on Patulin Content

Degradation reactions can be affected also by high hydrostatic pressure. The beverage production is a technology in which the future use of this modern technology is expected. In addition to the heat treatment, the effect of high pressure treatment on the rate of patulin degradation was followed.

The rate of patulin degradation in apple concentrate with and without addition of sodium bisulphite (model solutions A and B) under 500 MPa and at 20 °C is given in Fig. 7. It is obvious that high pressure accelerates the degradation, which was faster in the case of sulphited sample. As usual pasteurisation has almost a negligible effect on patulin content in fruit products, any pressure treatment seems to be a useful procedure to reach higher reduction of patulin content.

The course of patulin degradation is pressure dependent (Fig. 8). Higher pressure causes higher decrease of patulin content. In spite of a limited number of data, we constructed *D-p* degradation curve at 20 °C (Fig. 9)

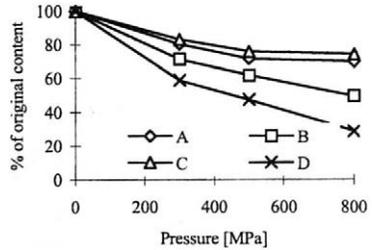


Fig. 8. The effect of pressure on patulin content reduction at 20 °C (60 min), for the legend see Material and Methods

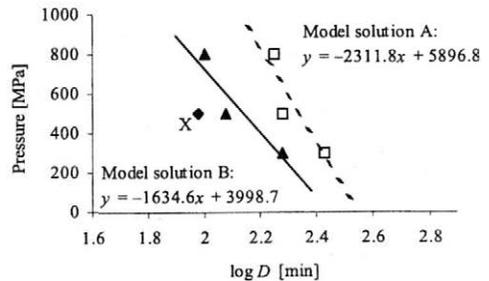


Fig. 9. *D-p* degradation curve for patulin in apple concentrate (model solution A) and sulphited apple concentrate (model solution B) at 20 °C, point X is model solution A at 50 °C, for the legend see Material and Methods

($p = -2311.8 \log D + 5896.8$ for model solution A and $p = -1634.6 \log D + 3998.7$ for model solution B). One point of D - p curve at 50 °C is rather below the D - p curve at 20 °C in Fig. 9. It reflects the more pronounced effect of temperature on $\log D$ in comparison with the effect of pressure. At higher temperatures (at about 50 °C), the reduction of patulin level will be remarkable for a short treatment time used.

In addition to the composition of juice or concentrate (content of thiols, ascorbic acid, sulphites, etc.), the course of patulin degradation within the high pressure treatment is also affected by osmotic pressure. The dependence of relative patulin content reduction on refractive index of the material is given in Fig. 10. We observed a similar protection effect of osmotic pressure as the degradation of patulin in the concentrate was lower than that in juice.

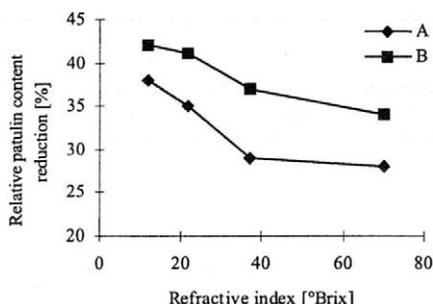


Fig. 10. Dependence of relative patulin content reduction on refractive index of apple concentrate – juice (500 MPa, 60 min, 20 °C), for the legend see Material and Methods

In practice, juice is usually treated before aseptic filling, therefore the reduction of patulin content can be more significant.

Conclusions

Both heat treatment and high pressure treatment accelerate the degradation reactions of patulin in apple concentrates and juices. The effect of high pressure treatment is lower comparing with heating because the differences in the activation volumes of reaction products seem not to be very important. The patulin content reduction is dependent on the used conditions (increase of pressure, temperature). The effect is more significant at lower osmotic pressure.

The regular checking of processed apples, i.e., an implementation of patulin content to the followed qualitative parameters of apple concentrate, is necessary. Generally the concentrate of worse quality must not be processed, but in the case of very low patulin content in concentrate it is possible to reduce its concentrations by subsequent processing.

References

- ADENSAM L., LEBEDOVÁ M., PAVLOSEK J., TUREK B. (1989): Stanovení patulinu v dětských a kojeneckých výživách metodou HPLC. *Prům. Potr.*, **40**: 127–128.
- AYTAC S. A., ACAR J. (1994): The effect of L-ascorbic acid and sulfur dioxide on the stability of patulin in apple juice and buffer solutions. *Nutrition*, **18**: 15–17.
- BARTOLOMÉ B., BENGOCHEA M. L., PÉREZ-ILZARBE F. J., HERNÁNDEZ T., ESTRELLA I., GÓMEZ-COROVÉS C. (1994): Determination of patulin in apple juice by high-performance liquid chromatography with diode-array detection. *J. Chromatogr. A*, **664**: 39–43.
- BETINA V. (1990): *Mykotoxiny chémie – biologie – ekologie*. Bratislava, ALFA.
- CASADIO S., NIOLAS I. (1993): Patulin destabilization in fruit juices using microwaves. *Ind. Bevande*, **22**: 10–11.
- DOYLE M. P., APPLEBAUM R. S., BRACKETT R. E., MARTH E. H. (1982): Physical, chemical and biological degradation of mycotoxins in foods and agricultural commodities. *J. Food Protect.*, **45**: 964–971.
- FRANK H. K. (1980): Patulin in products of vegetable origin. *Confructa*, **25**: 107–118.
- HARRISON M. (1989): Presence and stability of patulin in apple products: A review. *J. Food Safety*, **9**: 147–153.
- HORUBALA A. (1992): Influence of fungal metabolites on the quality of fruit and vegetables and on the quality of resultant products. *Przem. Ferment. i Owoc.-Warz.*, **36**: 11–13.
- LINDROTH S. (1980): Occurrence, formation and detoxification of patulin mycotoxin. *Techn. Res. Centre Finland, Materials and Processing Technology*, No. 24.
- MUTTI P., QUINTAVALLA S. (1989): Occurrence and stability of patulin in fruit products. *Ind. Conserve*, **64**: 251–254.
- OUGH C. S., CORISON C. A. (1980): Measurement of patulin in grapes and wines. *J. Food Sci.*, **45**: 476–478.
- POHLAND A. E., ALLEN R. (1970): Stability studies with patulin. *J. AOAC*, **53**: 688–691.
- PRÍBELA A., ŠINKOVÁ T. (1995): Mycotoxins. In: DAVÍDEK J. (Ed.): *Natural Toxic Compounds of Foods*. CRC Press: 170.
- SYDENHAME W., VISMER H. F., MARASAS W. F. O., BROWN N., SCHLECHTER M., WESTHUIZEN L. VAN DER, RHEEDER J. P. (1995): Reduction of patulin in apple juice samples – influence of initial processing. *Food Control*, **6**: 195–200.
- TANIWAKIM H., BLEINROTH E. W., DE MARTIN Y. E. (1989): Patulin-forming moulds in apples and apple juice. *Coletanea do Instituto de Tecnológica de Alimentos*, **19**: 42–49.
- WOLLER R., MAJERUS P. (1982): Patulin in fruit and fruit products – properties, formation and manifestation. *Flussiges Obst*, **10**: 566–571.
- ZEGOTA H. (1991): Evaluation of the sensory properties of irradiated apple juice concentrate. *Z. Lebensmittel-Unters. Fors.*, **192**: 7–10.
- ZEGOTA H., ZEGOTA A., BACHMANN S. (1988): Effect of irradiation and storage on patulin disappearance and some chemical constituents of apple juice concentrate. *Z. Lebensmittel-Unters. Fors.*, **187**: 321–324.

Received for publication April 7, 1999
Accepted for publication May 24, 1999

Souhrn

BRŮNA D., VOLDŘICH M., MAREK M., KAMARÁD J. (1999): **Vliv podmínek zpracování a skladování na obsah patulinu v jablečném koncentráту.** Czech J. Food Sci., 17: 127–132.

Během velkoobjemového zpracování jablek je téměř nemožné vyloučit zpracování mikrobiálně napadených plodů a jablečný koncentrát obsahuje různá množství mykotoxinu patulinu. Pro analýzu rizik během zavádění systému HACCP je důležité předpovědět změny obsahu patulinu během skladování a zpracování takového koncentráту. Sledován byl vliv skladování za různých teplot (4, 20, 50 a 90 °C) a různě vysokého hydrostatického tlaku (300, 500 a 800 MPa) na obsah patulinu ve vzorcích jablečného koncentráту, zasiřeného jablečného koncentráту (100 ppm pyrosiřičitanu sodného), destilované vody a zasiřené destilované vody (100 ppm pyrosiřičitanu sodného). Ve všech vzorcích byl obsah patulinu 155 mg/kg. Z výsledků byly sestrojeny $D-t$ termodestrukční a $D-p$ barodestrukční čáry pro jablečný koncentrát, resp. zasiřený jablečný koncentrát: $t = -24,95 \log D + 146,61$, resp. $t = -22,52 \log D + 118,41$. Barodestrukční čáry byly pro jablečný koncentrát $p = -2311 \log D + 5897$, resp. $p = -1634 \log D + 3999$ pro zasiřený jablečný koncentrát.

Klíčová slova: patulin; degradace patulinu; jablečný koncentrát; vysokotlaké zpracování; tepelné ošetření; vliv skladování

Corresponding author:

Ing. DUŠAN BRŮNA, Vysoká škola chemicko-technologická, Ústav konzervace potravin a technologie masa, Technická 5, 166 28, Praha 6, Česká republika, tel.: + 420 2 24 35 30 14, fax: + 420 2 31 16 284, e-mail: Dusan.Bruna@vscht.cz

Antioxidant Activity and Synergism of 2,6-Dimethyl-3,5-diethoxycarbonyl-1,4-dihydropyridine (Diludin) with BHT and BHA*

GUNARS TIRZITIS and ILONA KIRULE

Latvian Institute of Organic Synthesis, Riga, Latvia

Abstract

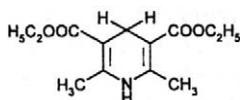
TIRZITIS G., KIRULE I. (1999): **Antioxidant activity and synergism of 2,6-dimethyl-3,5-diethoxycarbonyl-1,4-dihydropyridine (Diludin) with BHT and BHA.** Czech J. Food Sci., 17: 133–135.

Diludin (2,6-dimethyl-3,5-diethoxycarbonyl-1,4-dihydropyridine) possesses a good synergistic activity as an antioxidant with *tert.* dibutylhydroxytoluene (BHT) in methyl oleate, in sunflower oil and in hydrogenated oil, but no such a synergistic activity was observed in the mixture with *tert.* butylhydroxyanisole (BHA).

Key words: antioxidants; Diludin; lipids; synergism

Synergistic mixtures of antioxidants are more preferable for food stabilization than individual antioxidants. BHT (*tert.* butylhydroxytoluene) is widely used as an antioxidant for fats and oils, but in the last years, experimental data have been accumulated demonstrating the possible carcinogenicity of BHT (KAHL & KAPPUS 1993; MALKINSON *et al.* 1997). The DNA damaging effect of BHT metabolites was observed (OIKAWA *et al.* 1998), and the toxicity of these metabolites on liver and lungs (GUYTON *et al.* 1993). These data underlay the requirement to diminish the BHT concentration for food stabilization against oxidative rancidity.

According to our previous investigations, it is known that Diludin (the trade name of 2,6-dimethyl-3,5-diethoxycarbonyl-1,4-dihydropyridine, Formula I) shows a good



Formula I

antioxidant activity in model systems (TIRZITIS *et al.* 1988) as well as in edible oils (KOUŘIMSKÁ *et al.* 1993). Diludin shows a synergistic action with α -tocopherol (TIRZITIS *et al.* 1983) as well as with other natural antioxidants (KOUŘIMSKÁ *et al.* 1993).

The main advantage of Diludin for food stabilization is its practically complete harmlessness. Investigations

into Diludin toxicity showed that this compound was non-toxic for long-term administration to experimental animals (GILLER *et al.* 1973). Diludin does not possess any embryotoxic or mutagenic action. Besides it shows an antimutagenic activity on aflatoxin B₁ mutagenicity (SERGEJEV *et al.* 1986).

MATERIAL AND METHODS

Diludin was synthesized according to modified Hantzsch procedure (GILLER *et al.* 1973), BHT and BHA were produced by Fluka, Germany. Methyl oleate (Reakhim, Moscow, Russia), refined sunflower oil and hydrogenated oil (cooking fat), both commercial products, initially contained lower peroxide values than 5 mmol/kg.

Methyl oleate was autoxidized as previously (TIRZITIS *et al.* 1993) in test tubes provided with air input at the bottom, containing 5 ml of sample; antioxidants or their mixtures were added, dissolved in 1 ml ethanol; the mixture was autoxidized at 60 °C with air flow of 10–12 l/h.

Sunflower oil or cooking fat containing antioxidants or their mixtures (added dissolved in 1 ml ethanol) were placed in Petri dishes (25 g, 2.8 cm²/g), and put in a dark place for autoxidation at room temperature (20 °C ± 2 °C).

The concentration of Diludin in ethanol solution was 1.5 × 10⁻⁴ mol/l, the concentrations of BHT or BHA were 7.5 × 10⁻⁵ mol/l. In control assays, 1 ml of pure ethanol was added to the sample. From time to time, 0.15–0.25 g ± 0.2 mg were weighed for the peroxide value determination, using the standard iodometric method.

*This investigation was supported by INCO-COPERNICUS grant No. ICI 15CT 96/1006.

Table 1. Antioxidant action of Diludin with BHT and BHA

Substrate and temperature	Antioxidant added	Induction period τ^* [h]	Synergism**
Methyl oleate, 60 °C	Control	1.5	–
	Diludin	1.5	–
	BHT	57.0	–
	BHT + Diludin	77.0	20
	BHA	38.0	–
	BHA + Diludin	38.0	0
Sunflower oil, 20 °C	Control	265.0	–
	Diludin	325.0	–
	BHT	380.0	–
	BHT + Diludin	470.0	30
Cooking fat, 20 °C	Control	1 920.0	–
	Diludin	2 352.0	–
	BHT	2 256.0	–
	BHT + Diludin	3 600.0	912

* Time to reach the peroxide value of 6.5 mmol/kg

** Effect of synergism: $\tau_{syn} = (\tau_{Dil + BHT \text{ or } BHA} - \tau_{contr}) - [(\tau_{Dil} - \tau_{contr}) + (\tau_{BHT \text{ or } BHA} - \tau_{contr})]$

RESULTS AND DISCUSSION

Methyl oleate was used as a model system for investigation of the antioxidant activities of mixtures of widely used synthetic antioxidants BHT and BHA with Diludin. Edible lipid products – refined sunflower oil and cooking fat – were autoxidized during storage at room temperature.

The results presented in Table 1 show that Diludin possesses a good synergistic activity with BHT in methyl oleate as well as in lipid products. The highest synergistic activity was found for the molar ratio of Diludin : BHT equal to 2 : 1 (the results shown in Table 1), which was found as the optimum for synergism in mixtures with α -tocopherol (TIRZITIS *et al.* 1986). Better synergistic activity was observed in cooking fat. Unexpectedly, no synergistic action was observed for the mixture of Diludin with BHA.

Conclusion

The results obtained in our experiments reveal that a BHT-Diludin synergistic mixture could be favourable for food stabilization, due to a possibility to decrease the amount of BHT added to food products. The potential negative effect of BHT and its metabolites could thus be diminished.

Acknowledgements

The authors are obliged to Prof. J. POKORNÝ for his helpful advice.

References

- GILLER S. A., DUBUR G. Y., ULDRIKIS Y. R., TIRZIT G. D., VALDMAN A. R., ZAKHARCHENKO I. M., SPRUZ Y. Y., RONIS V. E., MAKAROV A. A. (1973): Improvements in or relating to the stabilization of carotene. U. K. Pat. 1294650; Chem. Abstr., 78: 159 440.
- GUYTON K. Z., THOMPSON J. A., KENSLER T. W. (1993): Role of quinone methide in the *in vivo* toxicity of the skin tumor promoter butylated hydroxytoluene hydroperoxide. Chem. Res. Toxicol., 6: 731–738.
- KAHL R., KAPPUS H. (1993): Toxicology of the synthetic antioxidants BHA and BHT in comparison with the natural antioxidant vitamin E. Z. Lebensm.-Unters. Fors., 196: 329–338.
- KOUŘIMSKÁ L., POKORNÝ J., TIRZITIS G. (1993): The antioxidant activity of 2,6-dimethyl-3,5-diethoxycarbonyl-1,4-dihydropyridine in edible oils. Nahrung, 37: 91–93.
- MALKINSON A. M., KOSKI K. M., EVANS W. A., FESTING M. F. (1997): Butylated hydroxytoluene exposure is necessary to induce lung tumors in BALB mice treated with 3-methylcholanthrene. Cancer Res., 57: 2832–2834.
- OIKAWA S., NISHINO K., OIKAWA S., INOUE S., MIZUTANI T., KAWANISHI S. (1998): Oxidative DNA damage and apoptosis induced by metabolites of butylated hydroxytoluene. Biochem. Pharmacol., 56: 361–370.
- SERGEJEV B., VEIDEBAUM T., TANNER R., BOGOVSKI S., TIRZIT G., DUBUR G. (1986): Influence of some 1,4-dihydropyridine derivatives on the mutagenicity of aflatoxin B₁. Exper. Clin. Oncol. (Tallin), 7: 103–106.

TIRZITIS G., KIRULE I., DUBUR G. (1983): Antioxidant activity of some 1,4-dihydropyridine and 1,4-dihydroindeno[1,2-b]pyridine derivatives and their action as α -tocopherol synergists. In: Fat Sci. Proc. 16th ISF Congr., Budapest: 655–661.

TIRZITIS G., KIRULE I., DUBURS G. (1988): Antioxidationsaktivität der 3,5-dicarbonylderivate des 2,6-dimethyl-1,4-dihydropyridins. Fat Sci. Technol., 90: 411–413.

Received for publication May 18, 1999

Accepted for publication June 2, 1999

Souhrn

TIRZITIS G., KIRULE I. (1999): **Antioxidační aktivita a synergismus 2,5-dimethyl-3,5-diethoxykarbonyl-1,4-dihydropyridinu (Diludinu) s BHT a BHA.** Czech J. Food Sci., 17: 133–135.

Diludin (2,6-dimethyl-3,5-diethoxykarbonyl-1,4-dihydropyridin) vykazuje dobrou synergickou aktivitu jako antioxidant ve směsi s BHT v methyloleatu, ve slunečnicovém oleji a v hydrogenovaném pokrmovém tuku, ale žádný takový synergismus se neprojevil ve směsi s BHA.

Klíčová slova: antioxidanty; Diludin; lipidy; synergismus

Corresponding author:

Dr. GUNARS TIRZITIS, Latvian Institute of Organic Synthesis, Aizkraukles 21, LV-1006 Riga, Latvia, tel.: + 371 75 51 335, fax: + 371 88 21 038, e-mail: tirzitis@osi.lanet.lv

Texture Profile Analysis Applied to Cooked Potato*

JIŘÍ BLAHOVEC¹, AHMED A. S. ESMIR² and JOSEF VACEK³

¹Czech University of Agriculture, Prague; ²Institute of Chemical Technology, Prague;

³Potato Research Institute, Havlíčkův Brod, Czech Republic

Abstract

BLAHOVEC J., ESMIR A. A. S., VACEK J. (1999): Texture profile analysis applied to cooked potato. Czech J. Food Sci., 17: 136–142.

Potato specimens were cooked in vacuumised plastic bags at 95 °C for cooking intervals of 20–40 min. The texture of the specimens was tested using TPA. Each specimen of potato was subjected to two bites. Test parameters were modified into the dimensionless and/or relative forms independent of the specimen dimension. The obtained values are comparable with previous results of the other authors when expressed in modified form. Modulus of elasticity was also measured as an additional parameter. The springiness was found as a measure of potato consistency. It was found that at the same conditions the potato consistency can also be expressed by modulus of elasticity. The hardness and the fracturability decreased similarly like the modulus of elasticity, but they are difficult to serve as measures of potato consistency. Similar conclusions were also made for the parameters based on the hardness and fracturability. The above mentioned TPA-parameters (Ha, Fr, Gu, Che) were inspected in form of ratio to the modulus of elasticity. This ratio decreases with increasing cooking times.

Key words: texture; TPA; potato; cooking; Young's modulus

The texture of potato has been the subject of interest for all this century. The cooked potato texture was classified by SALAMON (1926) into four types: floury, close, waxy and soapy. "Floury" is usually referred to as "mealy" in the literature. Now, five different properties are used for determination of cooked potato texture (LUGT 1959). These are consistency, disintegration, humidity, mealiness and structure. It is generally agreed upon that the consistency and mealiness are the most important quality elements of cooked potatoes.

The texture parameters are usually evaluated using a sensory panel (ANONYMOUS 1977). Several attempts have been made to develop objective methods for measuring the potato texture; these attempts have usually found inspirations in materials science and engineering. The first attempts were done in the fifties (e.g., UNRAU & NYLUND 1957), but since then the number of papers dealing with the objective texture measurement has increased rapidly. Some of the papers describe very complex and/or sophisticated systems of methods for measuring different parameters of cooked potatoes (e.g., JARVIS & DUNCAN 1992a, b); such systems can be used for total substitution of the sensory panel methods. Texture Profile Analysis (TPA) – the method developed by BOURNE (1968) for measurement of some selected texture parameters of fruits and vegetables – has been frequently used

as an objective instrumental method for evaluation of food texture. The TPA was used also for cooked potato tubers many times as an indicator of texture changes caused by different modifications in processing (e.g., SCHMIDT & AHMED 1971; JANOWSKI 1992; MITTAL 1994) or as an alternative method in cooked potato texture studies (e.g., LEUNG *et al.* 1983). Unfortunately, it is difficult to compare the published TPA parameter, because the test conditions (deformation rate, specimen dimensions, deformation extent, etc.) are not the same.

In this paper TPA parameters of cooked potato tubers of four varieties were studied extensively in order to quantify differences between the potato varieties.

MATERIAL AND METHODS

Potato (*Solanum tuberosum* L.) varieties Agria, Javor, Nicola and Panda were grown at the Potato Research Institute in Havlíčkův Brod (Experimental Station Valečov). Agria and Nicola belong to varieties with a lower starch content (about 16–17%). Panda and Javor are varieties with a higher starch content (19–21%). The tubers were harvested in full maturity at the beginning of October 1998. They were healed three weeks after harvest at 20 °C and 95% relative humidity. Only perfect tubers 55–80 mm in diameter were used for experiments. These tubers were

*The paper was supported by Grant 525/96/1398 of the Grant Agency of the Czech Republic.

stored in boxes at 6 °C and 95% humidity until test. They were removed from the box 24 hours before test. Special laboratory cutter and cork borer were used for cutting off the cylindrical specimens 25 mm in diameter and 10 mm in height from central parts of the tested tubers. The specimen axis was approximately parallel to tuber axis. The specimens were vacuum packed in plastic bags (Fatrax, Fatra, a. s., Czech Republic) and some of them were cooked in the water bath at the temperature 95 ± 0.2 °C for desired time. Then the specimens were removed and cooled rapidly in another water bath at the temperature 25 ± 0.5 °C.

The samples were tested approximately 2 hours after cooking. The Instron universal testing machine (model 4464) was used to perform the texture profile analysis in a manner similar to that described by BOURNE (1978). The specimen was placed on a stationary horizontal plate and loaded and unloaded by moving a flat plate. The flat plate was attached to the 2 kN load cell connected with the crossbar of the machine moving repeatedly down and up with the speed 0.167 mm/s in such a manner that maximum deformation was 7.5 mm. This deformation represents 75% of the original height of the sample.

Scheme of the obtained deformation curve is plotted in Fig. 1. Both plates coming into contact with tested specimens were cleaned by ethanol before every test. It will be evaluated in a similar way like it was proposed by BOURNE (1978), but some additions and modifications were performed as given in Table 1.

The experiments were arranged at two dates. The first was at the end of November 1998. TPA tests were performed for raw and cooked (20, 25 and 30 min.) potatoes for all varieties. The second test was made at the beginning of February 1999; only two varieties (Nicola and Panda) were tested for fresh tubers and specimens cooked 20, 25, 30, 35 and 40 min. Every test was replicated 20 times and basic statistical parameters were determined.

RESULTS AND DISCUSSION

Table 2 contains TPA-values obtained in November 1998 and February 1999. This table shows how the test parameters were changed during cooking. The obtained results were comparable to the results of the other authors when the parameters were recalculated under our modified definitions given in Table 1. Table 3 contains

Table 1. TPA-parameters to be used (see Fig. 1)

TPA-parameter	Original definition (BOURNE 1978)		Modified definition	
	method of determination	unit	method of determination	unit
Elasticity modulus (E)	–	–	Slope of the first linear part of the downstroke of the first bite, divided by deformation speed and cross section and multiplied by height of specimen	MPa
Hardness (Ha)	maximum force during first bite (hardness 1 in Fig. 1)	N	maximum stress during first bite (hardness 1 in Fig. 1 divided by specimen cross-section)	MPa
Fracturability (Fr)	force at the first major drop in force curve	N	strength at the first major drop in force (original value divided curve by specimen cross-section)	MPa
Cohesiveness (Co)	the ratio of area 2 to area 1 (see Fig. 1); area 2 – work done during downstroke in the second bite, area 1 – the same in the first stroke	–	the same (not modified)	–
Springiness (Spr)	active deformation length in second bite	mm	active deformation length in second bite divided by the specimen height	–
Gumminess (Gu)	$Ha \times Co$	N	$Ha \times Co$	MPa
Chewiness (Ch)	$Gu \times Spr = Ha \times Co \times Spr$	N.mm	$Gu \times Spr = Ha \times Co \times Spr$	MPa
Stringiness (Str)	distance specimen extends in the first bite upstroke before it breaks away from the compression plate	mm	ratio of the same distance to initial specimen height	–
Adhesiveness (Adh)	work done for overcoming the adhesion forces in the first bite (area 3 in Fig.1 multiplied by deformation speed)	N.mm	ratio of the same quantity and specimen cross-section	J.m ⁻²
Adhesive Force modified	maximum negative force upstroke of the first bite	N	maximum negative force in upstroke of the first bite divided by specimen cross section area	kPa
Adhesive Strength Ads				

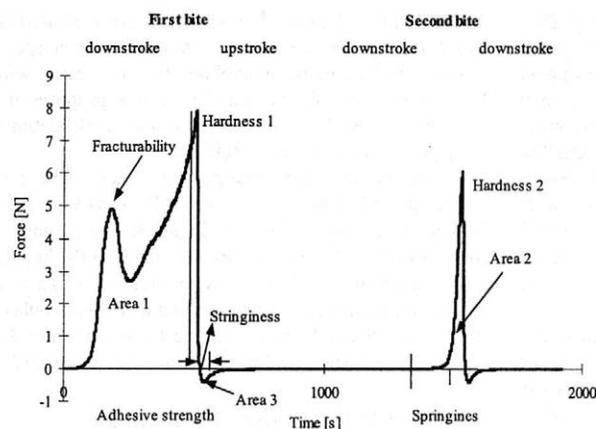


Fig. 1. Scheme of the TPA test. The measured force is plotted against the test time. The TPA test is divided into two bites. These forces are determined: fracturability, hardness (hardness1) and adhesive force (maximum negative force in upstroke of the first bite), deformations: stringiness and springiness (multiplication by deformation speed necessary to be added) and energies as measures of deformation works (areas 1 and 2, and area 3 corresponding to stringiness, that necessary to be multiplied by deformation speed, too)

Table 2. Mean values of TPA-parameters determined in November 1998 and February 1999

Variety	Time [min]	E* [MPa]	Ha* [MPa]	Fr* [MPa]	Co*	Str*	Spr*	Adh* [J.m ⁻²]	Ads* [kPa]	Gu* [MPa]	Che* [MPa]
November 1998											
Agrida	0	4.520	2.640	1.990	0.0505	0.0924	0.1470		1.13	0.13500	0.020100
	25	0.396	0.109	0.0849	0.0861	0.0986	0.0972	5.28	5.62	0.00931	0.000911
	20	0.409	0.104	0.0823	0.0710	0.0760	0.0812	6.03	6.87	0.00745	0.000606
	30	0.476	0.132	0.1040	0.0869	0.1010	0.0999	4.90	5.24	0.01130	0.001130
Javor	0	4.640	2.890	2.1900	0.0598	0.1020			0.41	0.17500	0.027100
	20	0.485	0.096	0.0778	0.0628	0.0874	0.0843	4.92	5.69	0.00609	0.000514
	25	0.326	0.081	0.0657	0.0719	0.1130	0.0907	5.25	6.24	0.00579	0.000526
	30	0.466	0.125	0.0961	0.0647	0.0816	0.0758	5.43	6.99	0.00792	0.000607
Nicola	0	4.550	2.910	2.2500	0.0537	0.0970	0.1490		0.67	0.16100	0.024000
	20	0.704	0.123	0.0963	0.0563	0.0716	0.0774	5.39	6.44	0.00694	0.000536
	25	0.650	0.122	0.0939	0.0667	0.0833	0.0861	5.29	5.75	0.00810	0.000694
	30	0.530	0.125	0.0949	0.0749	0.0757	0.0836	5.74	6.14	0.00958	0.000823
Panda	0	4.420	3.140	2.4000	0.0766	0.1190	0.1690		0.44	0.24300	0.040500
	20	1.090	0.128	0.1050	0.0526	0.0957	0.0925	3.40	3.87	0.00674	0.000628
	25	0.314	0.103	0.0817	0.0757	0.0697	0.0774	3.73	4.84	0.00770	0.000595
	30	0.402	0.133	0.1050	0.0694	0.0772	0.0789	3.84	5.07	0.00937	0.000751
February 1999											
Nicola	0	5.050	3.230	2.450	0.0530	0.0917	0.1360		0	0.17400	0.023600
	20	0.841	0.167	0.132	0.0525	0.1850	0.1070	3.14	5.01	0.00874	0.000924
	25	0.576	0.164	0.129	0.0629	0.1040	0.1180	2.34	5.28	0.01040	0.001190
	30	0.512	0.159	0.125	0.0622	0.2270	0.0917	4.82	8.92	0.01000	0.000932
	35	0.507	0.189	0.146	0.0726	0.1090	0.1240	2.78	6.26	0.01360	0.001600
	40	0.616	0.172	0.138	0.0596	0.1460	0.0907	3.26	6.86	0.01020	0.000920
Panda	0	4.870	4.080	3.070	0.0671	0.0951	0.1470		0.32	0.27400	0.040600
	20	0.492	0.193	0.158	0.0584	0.2200	0.0743	5.09	10.10	0.01110	0.000809
	25	0.388	0.201	0.162	0.0720	0.2760	0.0764	5.99	10.90	0.01370	0.001038
	30	0.401	0.179	0.146	0.0628	0.1490	0.0681	5.39	9.41	0.01300	0.000757
	35	0.426	0.166	0.133	0.0767	0.1460	0.0910	3.93	4.92	0.01250	0.001154
	40	0.438	0.183	0.148	0.071	0.1210	0.0741	5.39	9.29	0.01270	0.000921

*For explanation see Table 1

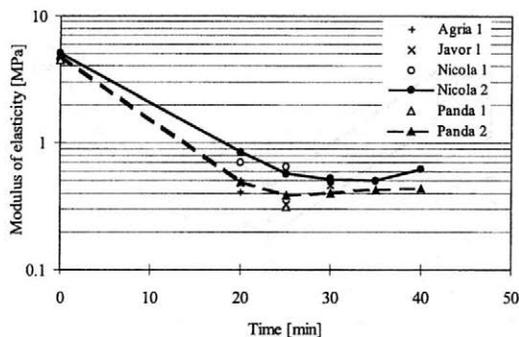


Fig. 2a. Modulus of elasticity of potato tuber plotted against the cooking time in semi-logarithmic scale. The modulus of elasticity at zero cooking time corresponds to the modulus of elasticity of raw potato tissue

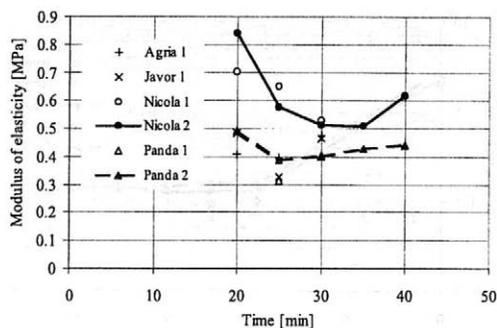


Fig. 2b. The data from Fig. 2a plotted in linear scales. The data for the raw potato tissue were excluded

our TPA-values and the recalculated data of the other authors; all obtained for cooked potatoes processed and tested in similar conditions. The degree of agreement of our data and the data of the other authors is evident; the best one is for cohesiveness. The agreement is generally worse for the other parameters but our results represent rather medium levels among the other corresponding values with higher variation.

Five of the obtained parameters: modulus of elasticity, hardness, fracturability, gumminess and chewiness decreased very steeply in a similar way even at a very short time of cooking. The modulus of elasticity is plotted against cooking time in Fig. 2a, b. These figures show that both test dates gave approximately the same results that are really different for the varieties Nicola and Panda. Fig. 2b indicates that variety Nicola is cooked more slowly than variety Panda. This is in agreement with the

results of previous sensory tests presented by VACEK (1997). This trend is clear even if the modulus of elasticity and other TPA parameters were accompanied by higher dispersion of the measured values (Table 4). The *t*-test confirmed differences in the modulus of elasticity between Panda and Nicola at cooking times: 20, 25 and 40 min. It seems that the modulus of elasticity can serve as a good indicator of the consistency of cooked potato tubers. The obtained values of the modulus of elasticity are in a very good agreement with the values obtained for potato in pure compression in previous papers for raw (e.g., BLAHOVEC *et al.* 1985) and cooked tubers (e.g., BLAHOVEC *et al.* 1987) and with the data of the other authors (e.g., LEUNG *et al.* 1983).

The above mentioned similarity between the modulus elasticity and the original TPA-parameters – hardness, fracturability, gumminess and chewiness – is only partial

Table 3. TPA-parameters of cooked potatoes. Our results (Agria 1 – Panda 2) represent mean values of the data obtained for 20, 25, and 30 min. cooking. MITTAL (1994) – not well defined heating to 90 °C, JANKOWSKI (1992) – 30 min. cooking at 100 °C, SCHMIDT & AHMED (1971) – 23 min. cooking at 121 °C – mean value of 4 values, LEUNG *et al.* (1983) – variable cooking times at 100 °C – mean value of 5 values, TRUONG *et al.* (1997) – sweet potato with variable cooking times at 100 °C – mean value of 10 values

	Hardness [MPa]	Springiness	Gumminess [MPa]	Chewiness	Cohesiveness [MPa]	Fracturability [MPa]	Adhesiveness [J.m ⁻²]
Agria 1	0.115	0.0928	0.0094	0.00088	0.0813	0.0904	5.40
Javor 1	0.101	0.0836	0.0066	0.00055	0.0665	0.0799	5.20
Nicola 1	0.123	0.0824	0.0082	0.00068	0.0660	0.0950	5.47
Nicola 2	0.163	0.1056	0.0097	0.00102	0.0592	0.1287	3.43
Panda 1	0.121	0.0829	0.0079	0.00066	0.0659	0.0972	3.66
Panda2	0.191	0.0729	0.0126	0.00087	0.0644	0.1553	5.49
MITTAL	0.029	0.2085	0.0029	0.00060	–	–	–
JANKOWSKI	0.089	–	0.0050	–	0.0560	0.0557	1.24
SCHMIDT	0.176	0.2116	0.0162	0.00342	0.0915	0.1064	–
LEUNG	0.199	0.0708	0.0160	0.00116	0.0744	0.1776	0.23
TRUONG	0.047	0.1370	0.0029	0.00044	0.0570	0.0004	3.33

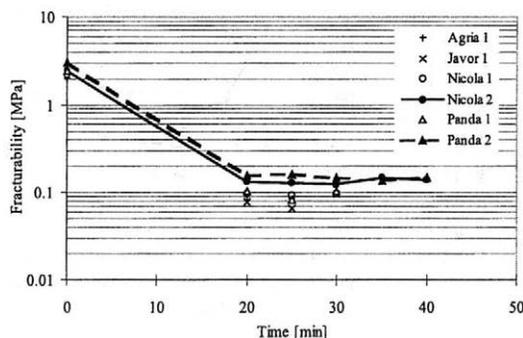


Fig. 3. Fracturability of potato tuber plotted against the time of cooking in semi-logarithmic scale. The fracturability at zero cooking time corresponds to fracturability of raw potato tissue

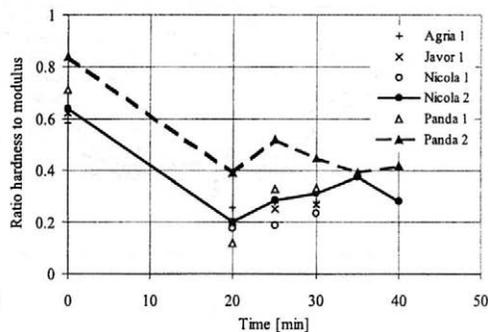


Fig. 4. Ratio of hardness to modulus of elasticity plotted against the time of cooking. The zero cooking time represents raw state of potato tubers

and some very important differences between them were observed. These TPA-parameters really decreased with increasing cooking time very similarly like the modulus of elasticity, but their values were always higher for Panda than for Nicola, so that no of them can serve as a measure of the consistency. Moreover they seem to be more sensitive to storage time prior to testing because the February values were higher than the corresponding November values (Tables 2). These observations are illustrated in Fig. 3 where fracturability is plotted against the cooking time.

The properties of hardness, fracturability, gumminess and chewiness can also be expressed by ratios of these parameters to the modulus of elasticity. The ratio of hardness to modulus of elasticity was plotted against the cooking time in Fig. 4. In the first part of cooking it decreases with increasing time of cooking and was always higher for variety Panda than for variety Nicola. For cooking times higher than 20 min. this ratio increased, especially

for variety Nicola. No important difference between both varieties was observed for about 35 min. cooking. The ratio value seems to depend also on storage time. The observed differences between both tested varieties – the waxy salad variety Nicola with its low starch content and the mealy variety Panda with its high starch content – seem to indicate that this ratio (or ratios) can be used as an indicator (indicators) of potato mealiness. LEUNG *et al.* (1983) reported about a low level of correlation between the cooked potato mealiness and the TPA parameters; only the product of adhesiveness and cohesiveness gave significant values of correlation coefficient. Fig. 5 shows relations between the potential indicators of potato mealiness: the ratio of fracturability and modulus of elasticity and Leung's parameter $Adh \times Co$ as were evaluated from the February tests. Both parameters are lower for Nicola than for Panda and the corresponding values of both parameters are very close to each other, i.e., they are located near the first quadrant axis of Fig. 5.

Table 4. Anova of the data obtained for the modulus of elasticity and hardness in the February test. Variety (Nicola and Panda), time of cooking (20, 25, 30, 35 and 40 min.) * $(\alpha = 0.05)$, *** $(\alpha = 0.005)$, d.f. – degrees of freedom, MS – mean squares, n.s. – number of non-significant pairs $(\alpha = 0.05)$, $n_{0.05}$ – number of significant pairs, LSD – least significant difference, MSD – mean significant difference (HINKELMANN & KEMPTHORNE 1994)

Source of variation	d.f.	MS	F- value	n.s.	$n_{0.05}$	LSD	MSD
Modulus of elasticity							
Grand mean 0.532 MPa							
Variety (V)	1	0.00682	52.87***	2	3	0.2070	0.3030
Time of cooking (T)	4	0.05613	5.60***	13	7	0.1437	0.2440
V × T	4	0.05097	9.22***				
Error	171	0.03376					
Hardness							
Grand mean 0.179 MPa							
Variety (V)	1	0.00208	6.38*	3	2	0.0340	0.0407
Time of cooking (T)	4	0.00394	1.88	16	4	0.0288	0.0357
V × T	4	0.00207	2.71*				
Error	171	0.00191					

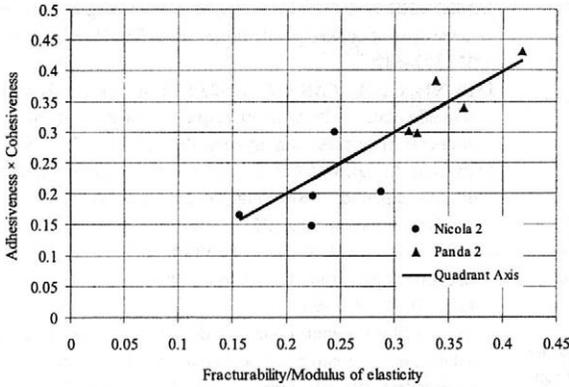


Fig. 5. Product of adhesiveness and cohesiveness plotted against the ratio of fracturability to modulus of elasticity for February tests (Nicola and Panda)

The cohesiveness was observed not to be very sensitive to potato cooking (SCHMIDT & AHMED 1971); a small increase of the cohesiveness was observed with increasing cooking time, but these changes were very small (Table 2) and they were well masked by statistical variability.

Springiness decreased about 40% in the time of cooking, which is in agreement with MITTAL (1994), SCHMIDT and AHMED (1971). Fig. 6 shows the extent of decrease, it is more expressive for both varieties tested in February. The decrease is quicker and steeper for Panda than for Nicola, but differences between these varieties were smaller at longer cooking times. The observed behavior is very similar to the above mentioned changes in the modulus of elasticity during cooking, even if the total observed changes in springiness (appr. 40%) are not so high as the observed changes in the modulus of elasticity (90%). It seems that also springiness could be used as a measure of potato consistency.

The adhesion appearing in upstroke of the fist bite represents a very important part of TPA parameter. The stringiness determines the relative part of the stroke distance that is accompanied by adhesion. Stringiness increased with increasing cooking time in February tests up to the values twice higher than those observed for fresh potatoes. After reaching maximum value the stringiness decreased to 0.1, which is approximately the same for both varieties. But no similar behavior was observed in No-

vember tests where the same value ~ 0.1 was measured for all the tested varieties. It is very difficult to find some rules in the adhesiveness; obtained values oscillate in dependence on cooking time and results obtained in November and February are rather controversial. The most useful adhesive parameter seems to be adhesive strength (Fig. 6). For February tests the adhesive strength increased with cooking time (more rapidly for Panda than for Nicola) and then decreased when the specimen was overcooked. This behavior also indicates some correlation's between the potato consistency and adhesive strength. The higher modulus of elasticity (consistency), the lower the adhesive strength. But this relation needs to be cleared by further investigations.

Conclusions

TPA parameters gave a lot of information on the texture of cooked tubers. The TPA test was improved by modified definitions of the test parameters. The modified parameters were expressed either in dimensionless or physically well defined forms.

The **consistency** can be expressed by springiness and/or by modulus of elasticity. Also the adhesive strength would be very useful for some studies of potato tuber consistency. It seems that the **mealiness** can be expressed as a ratio of a parameter derived from hardness (gumminess and chewiness) or fracturability and modulus of elasticity.

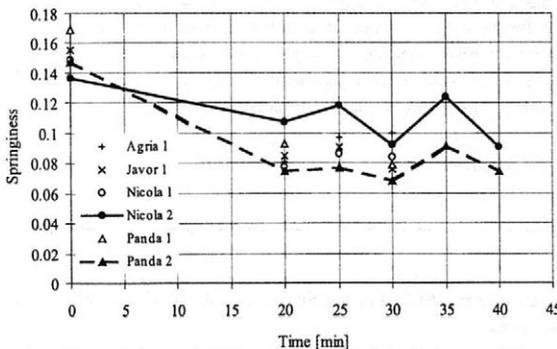


Fig. 6. Springiness of potato tuber plotted against the cooking time. The springiness at zero cooking time corresponds to springiness of raw potato tissue

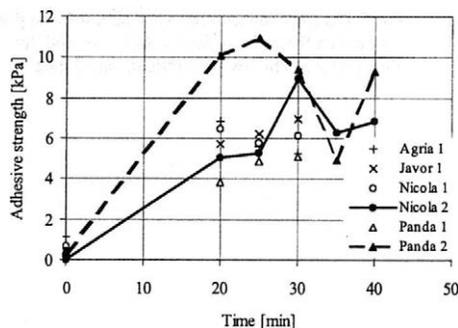


Fig. 7. Adhesive strength of potato tubers plotted against the cooking time. The adhesive strength at zero cooking time represents the raw state of potato tubers

References

- ANONYMOUS (1977): Methods of assessment for potatoes and potato products. EAPR Pudoc, Wageningen.
- BLAHOVEC J., KUBEŠOVÁ A., CELBA J., VOKÁL B. (1987): Penetrační test syrových a vařených brambor. Potravní vědy, 5: 67–74.
- BLAHOVEC J., PATOČKA K., MÍČA B. (1985): Mechanické vlastnosti dužnin zeleniny. Zeměd. Techn., 31: 393–410.
- BOURNE M. C. (1968): Texture profile of ripening pears. J. Food Sci., 33: 223–226.
- BOURNE M. C. (1978): Texture profile analysis. Food Technol., 32: 62–66, 72.
- HINKELMANN K., KEMPTHORNE O. (1994): Design and Analysis of Experiments. Vol. I. Introduction to Experimental Design. New York, Wiley.
- JANKOWSKI T. (1992): Influence of starch retrogradation on the texture of cooked potato tuber. Int. J. Food Sci. Technol., 27: 637–642.
- JARVIS M. C., DUNCAN H. J. (1992a): The textural analysis of cooked potato. 1. Physical principles of the separate measurements of softness and dryness. Potato Res., 35: 83–91.
- JARVIS M. C., DUNCAN H. J. (1992b): The textural analysis of cooked potato. 2. Swelling pressure of starch during gelatinisation. Potato Res., 35: 93–102.
- LEUNG H. K., BARRON F. H., DAVIS D. C. (1983): Textural and rheological properties of cooked potatoes. J. Food Sci., 48: 1470–1474, 1496.
- LUGT C. (1959): Report on the third international meeting on potato quality research held at Zürich-Oerlikon, Switzerland on February 5th–7th, 1959. Eur. Potato J., 2: 84–85.
- MITTAL G. S. (1994): Thermal softening of potatoes and carrots. Lebensm.-Wiss. u. -Technol., 27: 253–258.
- SALAMAN R. N. (1926): Potato Varieties. Cambridge Univ. Press.
- SCHMIDT T. R., AHMED E. M. (1971): Textural and elastic properties of Irish potatoes. J. Text. Stud., 2: 460–474.
- TRUONG V. D., WALTER W. M., HAMMAN D. D. (1997): Relationship between instrumental and sensory parameters of cooked sweetpotato texture. J. Text. Stud., 28: 163–185.
- UNRAU A. M., NYLUND R. E. (1957): The relation of physical properties and chemical composition to mealiness in potato. Amer. Potato J., 34: 245.
- VACEK J. (1997): Study of potato sloughing. In: KUTZBACH H. D. & BLAHOVEC J. (Eds.): Products Quality Assessment of Plant. Czech Univ. Agric. Prague: 29–32. ISBN 80-213-0339-5

Received for publication May 5, 1999
Accepted for publication May 17, 1999

Souhrn

BLAHOVEC J., ESMIR A. A. S., VACEK J. (1999): Analýza texturního profilu vařených brambor. Czech. J. Food Sci., 17: 138–142.

Válcové vzorky vyříznuté ze středů bramborových hlíz byly vařeny ve vakuovaných zatažených sáčcích ze speciální fólie při 95 °C. Doba vaření se pohybovala v rozmezí 20–40 minut. Textura vzorků byla určována objektivně s použitím metody TPA. Každý vzorek byl opakovaně (dvakrát) stlačen mezi dvěma deskami. Parametry testu byly proti původní metodice modifikovány do bezdimenzionálního tvaru nebo do takového relativního tvaru, který vůbec nebo jen slabě závisí na rozměru vzorku a dalších parametrech testu. Dosažené výsledky jsou srovnatelné s výsledky ostatních autorů pokud se upraví do modifikovaného tvaru. Jako doplňkový parametr byl stanovován modul pružnosti. Ukázalo se, že parametr *springiness* se dá využít jako měřítko konzistence vařených hlíz a podobný závěr platí také pro modul pružnosti. Parametry *fracturability* a zejména *hardness* klesají obdobně jako modul pružnosti v průběhu vaření, ale těžko mohou sloužit jako měřítka konzistence vařených hlíz. Podobné závěry se týkají také parametrů z nich odvozených. Některé parametry TPA (*hardness*, *fracturability*, *gumminess* a *chewiness*) byly vyšetřovány také ve formě poměru k modulu pružnosti. Pro krátké časy vaření tento poměr klesal s rostoucí dobou vaření.

Klíčová slova: textura; metoda TPA; brambory; vaření; modul pružnosti

Corresponding author:

Prof. RNDr. Ing. Jiří BLAHOVEC, DrSc., Česká zemědělská univerzita, 165 21 Praha 6-Suchbát, Česká republika, tel.: + 420 2 24 38 42 81, fax: + 420 2 20 92 13 61, e-mail: blahovec@tf.czu.cz

Tvorba CO₂ u bakterií rodu *Leuconostoc* stanovená pomocí nepřímé vodivostní metody*

VLADIMÍR DRÁB, EVA KVASNIČKOVÁ, VLADIMÍR ČERNÝ

Milcom Ltd., Dairy Research Institute, Tábor, Czech Republic

Abstract

DRÁB V., KVASNIČKOVÁ E., ČERNÝ V. (1999): Use of indirect conductometry for measuring CO₂ production by *Leuconostoc*. Czech J. Food Sci., 17: 143–148.

The CO₂ production was tested during fermentation of milk and the defined medium by 14 strains of *Leuconostoc* sp. by the indirect conductimetry. After optimization of the sample preparation and the working procedure this method was suitable for this purpose and complied with the requirement for the repeatability of analysis (coefficient of variation CV = 1.4–4.0%). The differences in citrate utilization were related above all to the strains but less to the species or subspecies studied. All present citrate was used by 8 out of 12 strains during growth at 30 °C in milk and by 9 out of 14 strains in defined medium with 60 mmol per litre of glucose and 10 mmol per litre of citrate.

Key words: *Leuconostoc*; CO₂ analysis; indirect conductometry; RABIT

Souhrn

DRÁB V., KVASNIČKOVÁ E., ČERNÝ V. (1999): Tvorba CO₂ u bakterií rodu *Leuconostoc* stanovená pomocí nepřímé vodivostní metody. Czech J. Food Sci., 17: 143–148.

Tvorba CO₂ během fermentace mléka a živného bujonu definovaného složení byla sledována prostřednictvím nepřímé vodivostní metody u 14 kmenů *Leuconostoc* sp. Po optimalizaci přípravy vzorku a pracovního postupu byla tato metoda vhodná pro tento účel a splňovala požadavky na opakovatelnost analýzy (variační koeficient CV = 1,4–4,0%). Rozdíly ve schopnosti využívatí citrátu byly závislé především na kmenech a méně na studovaném druhu či poddruhu. Veškerý dostupný citrát bylo schopno využít 8 kmenů z 12 během růstu při 30 °C v mléce a 9 kmenů ze 14 v definovaném médiu obsahujícím 60 mmolů glukosy a 10 mmol citrátu na jeden litr média.

Klíčová slova: *Leuconostoc*; analýza CO₂; nepřímá vodivostní metoda; RABIT

Tvorba ok je žádoucí u mnoha typů sýrů a za jejich vznik jsou zodpovědné mikroorganismy tvořící plyn ze substrátů přítomných v sýrech. Požadavky na velikost a počet ok se u jednotlivých typů sýrů poměrně značně liší. U Goudy je požadována přítomnost několika hladkých oček, zatímco nepravidelná oka nebo příliš otevřená struktura jsou nežádoucí. Ementál a podobné typy vysokodohřívavých sýrů jsou charakterizovány přítomností většího množství pravidelných ok o průměru 10 až 20 mm. Mikroflóra zodpovědná za tvorbu CO₂ a substráty, ze kterých je tento plyn tvořen, se také u těchto typů sýrů značně liší. Zatímco u sýrů holandského typu je za tvorbu ok zodpovědné především využívání citrátu citrát fermentujícími laktokoky a leukonostoky, u sýrů švýcarského typu se jedná především o využívání laktátu bakte-

riemi propionového kvašení (MARTLEY, CROW 1996). V sýrech se ale také vyskytují další možné substráty, které za vhodných okolností a při dostatečné koncentraci mohou sloužit jako zdroj CO₂. Za nejvýznamnější lze pokládat zbytkové sacharidy, citrát, volné aminokyseliny a močovinu. Pokud jsou v pozdějších fázích zrání sýrů přítomny mikroorganismy schopné z těchto substrátů produkovat plyn v dostatečném množství, dojde s velkou pravděpodobností ke vzniku trhlin a prasklin místo pravidelných ok. To je zapříčiněno odlišnými reologickými vlastnostmi těsta ovlivněnými především změnou pH, rozkladem bílkovin a nízkou teplotou při skladování. Ve VÚM se již řadu let úspěšně používá kapilární izotachoforéza jako užitečná metoda pro sledování metabolických aktivit různých bakterií v sýrech a pro kon-

*Financováno z grantu NAZV MZE ČR, projekt č. EP 096/0006038.

trolu průběhu fermentace v živných médiích (ŽABKOVÁ, HUŠEK 1988; DRÁB, HOUŠKA 1994; ČERNÝ *et al.* 1997). Stanovení množství CO_2 vznikajícího z různých substrátů se ukazuje jako důležitý parametr při výběru vhodných kultur pro výrobu mléčných výrobků a při zjišťování mikroorganismů zodpovědných za tvorbu ok či prasklin v sýrech, a proto by jednoduchá a přesná metoda stanovení jistě naležla v mlékárenském průmyslu a výzkumu řadu aplikací. V poslední době se v zahraniční literatuře objevilo několik metod, které tyto nároky splňují. Jedná se o metodu založenou na enzymatické reakci (BELLENGIER *et al.* 1993) původně vyvinutou pro stanovení CO_2 v krevním séru (FORRESTER *et al.* 1976), o metodu založenou na chemické reakci CO_2 se specifickou kalibrovanou vrstvou indikátoru (KNEIFEL, BRETTBACHER 1992) a o metody založené na měření změn vodivosti způsobených absorpcí CO_2 v roztoku alkalického hydroxidu (BOLTON 1990; DÉZENCLOS *et al.* 1993). Tuto techniku využívající automatizovaný systém pro měření impedanace (RABIT, Don Whitley Sc. Ltd., Shipley, England) jsme využili pro účely stanovení tvorby CO_2 u řady kmenů významných z hlediska tvorby ok v různých druzích polotvrdých a tvrdých sýrů.

Tato publikace popisuje využití přístroje RABIT pro stanovení tvorby CO_2 při testování vlastností komerčně dostupných kmenů leukonostoků, pocházejících od firmy Texel a ze Sbírký čistých kultur Laktoflora Vokovice, a některých nově izolovaných kmenů.

MATERIÁL A METODY

Chemikálie: Všechny použité chemikálie (HCl, Na_2CO_3 , KOH) byly p. a. kvality (Penta, Praha). Roztok KOH byl skladován v uzavřené nádobě při teplotě 4 °C.

Živné půdy: Pro sledování tvorby CO_2 v definovaném médiu byl použit MRSB bujon následujícího složení: pepton (Imuna) 1 %, Lab lemco (Oxoid) 0,8 %, kvasničný autolyzát (Imuna) 0,2 %, K_2HPO_4 0,2 %, $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ 0,02 %, $\text{MnSO}_4 \times 4\text{H}_2\text{O}$ 0,005 %, D-glukosa 60 mM/l, citrát trisodný 10 mM/l pH před sterilací 6,50; sterilace 20 min při 115 °C.

Pro sledování tvorby CO_2 v mléce bylo používáno 85KA médium, které bylo připraveno ze sušeného odstředěného mléka (Laktino, Promil – PML, a. s., Nový Bydžov) a kvasničného autolyzátu (Imuna, Šarišské Michařany). Mléko bylo rozpuštěno v menším objemu deionizované vody a po úpravě pH na hodnotu 6,60 byla upravena koncentrace na požadovanou hodnotu (85 g/l) a mléko bylo sterilováno 20 min při 110 °C. Kvasničný autolyzát byl přidáván odděleně ve formě sterilního 25% roztoku (110 °C, 20 min) na výslednou koncentraci 0,5 %.

Manipulace s kulturami: Jednotlivé kmeny byly dlouhodobě skladovány v MRSB bujonu obsahujícím 15 % glycerolu při –20 °C. Před vlastním testováním byly přeočkovány do MRSB bujonu a kultivovány při 30 °C do dosažení optické hustoty při 650 nm 1,3–1,8. Po dvojná-

sobním přeočkování (inokulum 1%, 30 °C, 20 h) byly jednotlivé kmeny použity pro vlastní stanovení tvorby CO_2 .

Stanovení organických kyselin metodou kapilární izotachofórey: Fermentace sacharidů a citrátů byla sledována prostřednictvím kapilární izotachofórey. Podmínky analýzy jsou uvedeny v řadě prací VÚM (ŽABKOVÁ, HUŠEK 1988; DRÁB, HOUŠKA 1994; ČERNÝ *et al.* 1997).

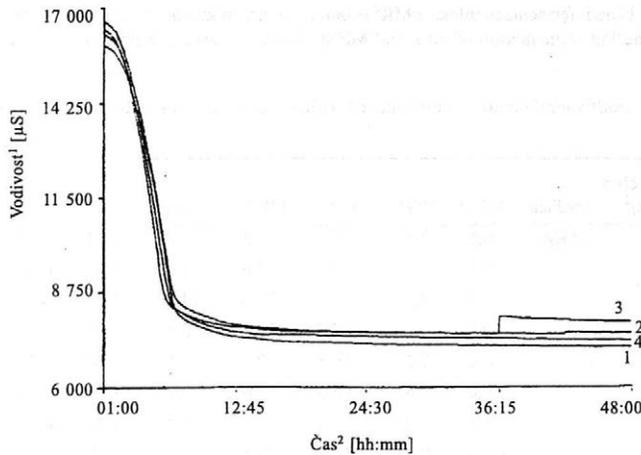
Stanovení tvorby CO_2 nepřímou vodivostní metodou na přístroji RABIT: Tvorba CO_2 u sledovaných kmenů bakterií byla měřena nepřímou impedanční technikou na přístroji RABIT zapůjčeném firmou TRU-TEST. Koncentrace a objem roztoku KOH odpovídaly optimalizovaným experimentálním podmínkám, které uvedli DÉZENCLOS *et al.* (1993). Kalibrace byla provedena vytěsněním CO_2 z 2 ml roztoku Na_2CO_3 (2,68 mM/l) přebytkem HCl. Za předpokladu, že veškerý CO_2 byl absorbován KOH (1 mol CO_2 reagoval s 2 moly KOH) byla průměrná změna vodivosti při 30 °C odpovídající 1 μmolu CO_2 291,8 μS. To odpovídá výsledkům, které uveřejnili DÉZENCLOS *et al.* (1993), kteří zjistili, že tento koeficient byl konstantní pro koncentraci KOH v rozsahu 1 až 8 g/l a byl roven $280 \pm 7 \mu\text{S}/\mu\text{mol CO}_2$ při 27 °C.

Podmínky analýzy: 5 ml zaočkovaného bujonu nebo mléka (2% inokulum) bylo pipetováno do sterilních skleněných zkumavek 12 × 75 mm. Zkumavky byly za sterilních podmínek převedeny do sterilních RABIT cel obsahujících 1 ml roztoku KOH (6 g/l) a celý byly v co nejkratší době uzavřeny silikonovými zátkami. Po hodinové inkubaci cel v inkubačním bloku byly po dobu 48 hodin v šestiminutových intervalech sledovány změny vodivosti roztoku KOH při teplotě 30 °C. Celková změna vodivosti způsobená vznikajícím oxidem uhličitým byla vypočtena jako rozdíl mezi automaticky vypočtenými maximálními rozdíly vodivosti pro testovaný a slepý vzorek a pomocí kalibrace byla převedena na μmoly CO_2 .

VÝSLEDKY A DISKUSE

Během zapůjčení přístroje jsme provedli řadu pokusů zaměřených na zjištění přesnosti a reprodukovatelnosti stanovení CO_2 touto metodou. Delší skladování uzavřených trubíc obsahujících roztok KOH se často projevilo nižší počáteční hodnotou vodivosti roztoku. Tento jev je pravděpodobně způsoben mikroskopickými netěsnostmi, případně propustností RABIT cel (BOLTON 1990). Z tohoto důvodu jsou mezi jednotlivými celami rozdíly v počátečních hodnotách vodivosti (obr. 1 a 2). Zdá se, že tyto rozdíly nemají vliv na rychlost absorpce, ale negativně se projevují na velikosti výsledné změny vodivosti.

Stejně závěry uvedl BOLTON (1990) při testování nepřímé vodivostní metody pro účely detekce přítomnosti některých patogenních bakterií. Protože množství vytvořeného CO_2 je vypočteno pomocí tohoto údaje, nízká hodnota počáteční vodivosti způsobuje zvýšení chyby měření, což je dobře dokumentováno na obr. 1 a 2.



Obr. 1. Paralelní stanovení změn vodivosti roztoku KOH během fermentace MRSB bujonu *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* sbírkové číslo 397 (kultivační teplota 30 °C, inokulum 2%) – Parallel determination of changes in KOH solution conductivity during fermentation of MRSB broth of *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides*, collection no. 397 (cultivation temperature 30 °C, inoculum 2%, broth)

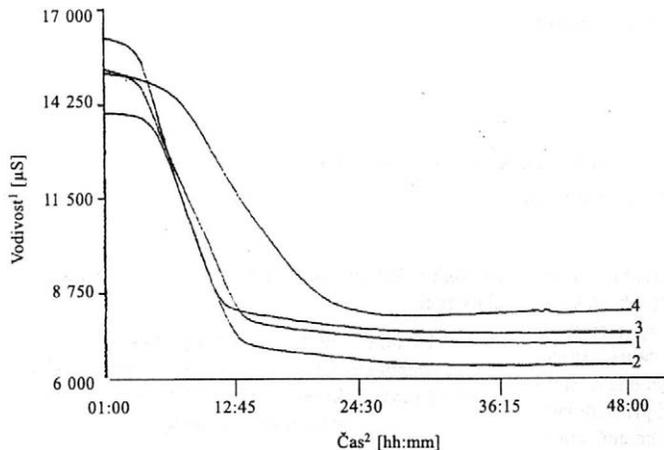
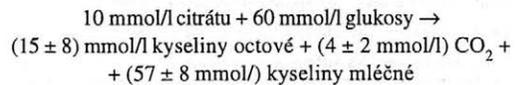
¹conductivity; ²time

Paralelně prováděné měření ve čtyřech celách ukazuje, že při malých rozdílech v počáteční vodivosti (obr. 1) je průběh křivek velice podobný a hodnota směrodatné odchylky je nízká (S.D. = 131) při průměrné hodnotě 8 966 µS. Vyšší rozdíly v počátečních hodnotách vodivosti (obr. 2) se projeví zvýšením hodnot směrodatné odchylky (S.D. = 568) při průměru 8 007 µS. Optimalizace pracovního postupu vedoucí ke snížení variability dosažených výsledků, minimalizace rizika plynoucího z netěsnosti použitých cel a z toho plynoucího možného zkeslení dosažených výsledků únikem plynu nebo naopak získání falešně vysokých hodnot při absorpci CO₂ z okolního prostředí je nezbytnou podmínkou pro získání přesných a reprodukovatelných dat. Použitím ultrazvuku k odplynění živného média po sterilaci, maximálním zkrácením doby kontaktu roztoku KOH se vzduchem a průběžným vyřazováním netěsnících cel se podařilo snížit variabilitu výsledků (variační koeficient CV = 1,4– 4,0%). Každý sledovaný kmen byl měřen paralelně ve čtyřech celách a extrémně se odchylovající vzorky byly vyloučeny.

V případě většího počtu extrémně se odchylovajících vzorků ($n > 1$) byl pokus za stejných podmínek opakován.

Sledované kmeny leukonostoků se značně lišily tvorbou plynu a fermentací citrátů. Výsledky fermentace mléka a MRSB bujonu pro jednotlivé kmeny jsou uvedeny v tab. 1. Při současném využívání glukosy (laktosy) a citrátů vzniká D-laktát, acetat, ethanol, CO₂, α-acetolaktát, diacetyl, acetoin, 2,3-butandiol (STARRENBURG, HUGENHOLTZ 1991).

K tvorbě etanolu z glukosy dochází až po využití citrátů přítomného v médiu. Teoreticky z 1 mmolu glukosy vznikne 1 mmol D-laktátu a 1 mmol ethanolu a ze 2 mmolů citrátů 2 mmoly acetátu + 4 mmoly CO₂ + 1 mmol (diacetyl, acetoin, 2,3-butandiol) (COGAN 1987). Výsledky dosažené VÚM při kultivaci 14 kmenů leukonostoků v MRSB bujonu lze vyjádřit rovnicí:



¹conductivity; ²time

Obr. 2. Paralelní stanovení změn vodivosti roztoku KOH během fermentace MRSB bujonu *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* sbírkové číslo 764 (kultivační teplota 30 °C, inokulum 2%) – Parallel determination of changes in KOH solution conductivity during fermentation of MRSB broth of *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris*, collection no. 764 (cultivation temperature 30 °C, inoculum 2%, broth)

Tab. I. Tvorba CO₂ a organických kyselin [mM/l] během fermentace mléka a MRSB bujonu různými kmeny z rodu *Leuconostoc* – Production of CO₂ and organic acids [mM/l] during fermentation of milk and MRSB broth by various strains of the genus *Leuconostoc*

Očkovací dávka 2%, teplota kultivace 30 °C, doba kultivace 48 hodin – Inoculum 2%, cultivation temperature 30 °C, cultivation time 48 hours

Druh ¹	Sbírkové číslo (označení) ²	Medium ³	MRAV	CITR	FOSF	MLEC	OCT	CO ₂	% ferm. citrátu ⁴
<i>Leuc. mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i>	32	85KA	0,0	7,5	17,6	72,5	3,6	0,34	1,6
<i>Leuc. mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i>	59		9,6	0,0	17,6	82,6	23,7	4,87	100,0
<i>Leuc. mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i>	60		0,0	0,0	17,6	75,5	14,6	5,05	100,0
<i>Leuc. mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i>	114		0,0	7,0	17,6	81,7	2,1	0,84	8,3
<i>Leuc. mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i>	116		0,0	7,5	16,5	77,3	3,6	0,60	1,6
<i>Leuc. mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i>	540		0,0	2,8	16,5	82,6	12,2	3,33	63,1
<i>Leuc. mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i>	611		6,6	0,0	17,6	81,5	18,7	4,96	100,0
<i>Leuc. mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i>	764		0,0	0,0	17,0	89,5	15,3	5,00	100,0
<i>Leuc. mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i>	SE A1P		0,0	0,0	17,0	101,6	19,4	5,11	100,0
<i>Leuc. mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i>	LM057		0,0	0,0	16,4	97,4	17,4	5,46	100,0
<i>Leuc. mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i>	LM058		0,0	0,0	17,0	99,6	18,1	5,53	100,0
<i>Leuc. mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i>	390		0,0	0,0	16,4	97,4	18,1	5,38	100,0
<i>Leuc. mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i>	32	MRSB	0,0	10,3	13,3	48,4	5,8	1,01	0,9
<i>Leuc. mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i>	59		0,0	0,0	12,1	68,5	19,4	4,96	100,0
<i>Leuc. mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i>	60		0,0	3,9	10,6	54,1	13,4	4,71	62,9
<i>Leuc. mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i>	114		0,0	9,3	11,8	62,2	0,0	0,90	10,2
<i>Leuc. mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i>	116		0,0	9,7	12,1	61,1	5,0	0,68	7,1
<i>Leuc. mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i>	540		0,0	8,4	12,0	66,8	5,8	4,49	19,5
<i>Leuc. mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i>	611		0,0	0,0	11,5	76,0	15,8	5,02	100,0
<i>Leuc. mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i>	764		0,0	0,0	11,8	66,8	18,8	4,42	100,0
<i>Leuc. mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i>	SE A1P		0,0	0,0	9,7	65,7	22,4	4,95	100,0
<i>Leuconostoc</i> sp.	392		0,0	0,0	9,7	54,1	23,1	5,01	100,0
<i>Leuc. mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i>	LM057		0,0	0,0	11,8	74,9	20,1	4,79	100,0
<i>Leuc. mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i>	LM058		0,0	0,0	11,2	71,4	19,5	4,27	100,0
<i>Leuc. mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i>	390		0,0	0,0	11,8	72,6	20,1	4,82	100,0
<i>Leuc. mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i>	398		0,0	0,0	9,1	66,2	25,4	4,76	100,0

85KA = obnovené odstředěné mléko (85 g/l) + 0,5% kvasničný autolyzát (ve formě 25% roztoku) – reconstituted skim milk (85 g/l) + 0.5% of yeast autolyzate (in form of 25% solution)

MRSB = bujon definovaného složení – broth of defined composition

MRAV = kyselina mravenčí – formic acid

CITR = kyselina citronová – citric acid

FOSF = fosfát (anion) – phosphate(anion)

MLEC = kyselina mléčná – lactic acid

OCT = kyselina octová – acetic acid

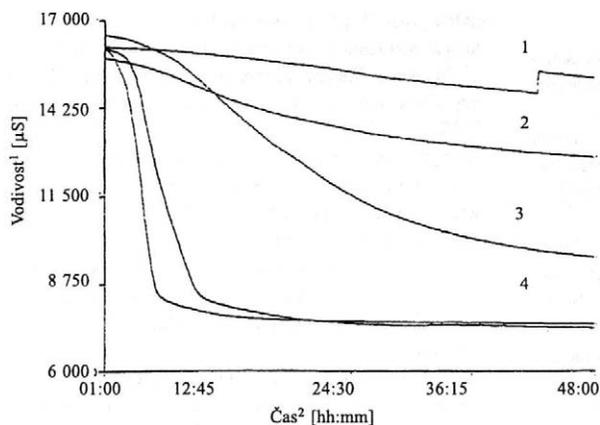
CO₂ = obsah CO₂ stanovený impedanční metodou – CO₂ content determined by impedance method

¹species; ²collection no. (designation); ³medium; ⁴% of fermented citrate

Měření obsahu etanolu, acetoinu, diacetylů a 2,3-butanediolu nebylo předmětem této práce. Vyšší obsah kyseliny mléčné je způsoben fermentací glukosy (teoreticky vzniká z 1 mmolu glukosy 1 mmol D-laktátu). Ostatní dosažené hodnoty jsou srovnatelné s výsledky, které uveřejnili BELLENGIER *et al.* (1993), kteří při sledování fermentace citrátu a glukosy u 20 různých kmenů *leuco-*

nostoků získali výsledky, které jsou vyjádřeny následující rovnicí:

$$10 \text{ mmol/l citrátu} + 2 \text{ mmol/l glukosy} \rightarrow (18 \pm 5) \text{ mmol/l kyseliny octové} + (6 \pm 6 \text{ mmol/l CO}_2 + (6 \pm 2 \text{ mmol/l kyselina mléčná} + (0,2 \pm 1,0 \text{ mmol/l) (diacetyl} + \text{acetoin}))$$



Obr. 3. Změna vodivosti roztoku KOH během fermentace mléka různými kmeny *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* sbírkové číslo 32 (2), 540 (3), 59 (4), 61 (5) a kontrolní vzorek (1) sledovaná přístrojem RABIT (kultivační teplota 30 °C, inokulum 2%, substrát 85KA) – Changes in KOH solution conductivity during milk fermentation by various strains of *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris*, collection no. 32 (2), 540 (3), 59 (4) and 611 (5) and control sample (1), as determined by RABIT apparatus (cultivation temperature 30 °C, inoculum 2%, 85KA substrate)

¹conductivity; ²time

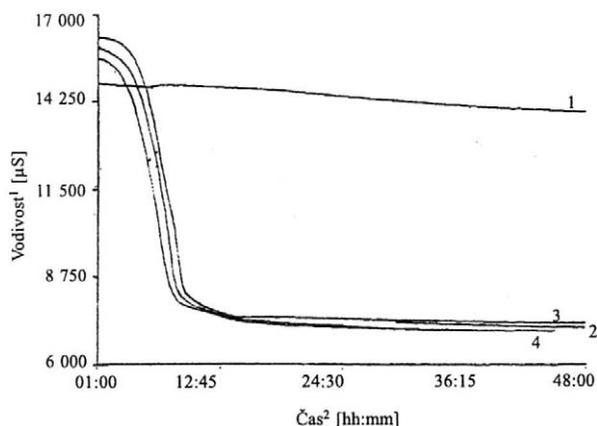
Na obr. 3 a 4 je porovnávána změna vodivosti roztoku KOH během fermentace mléka u kmenů s různou schopností fermentace citrátu. Z obr. 3 je patrné, že vzhled křivek pro jednotlivé kmeny *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* je značně rozdílný a souvisí s množstvím vytvořeného CO₂ a fermentovaného citrátu (tab. 1). Kmeny sbírkového čísla 32, 114 a 116 byly charakteristické nízkou schopností fermentace citrátu a množství vytvořeného CO₂ bylo nižší než 1 mM na litr fermentovaného mléka. Sledované kmeny *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* se vyznačovaly rychlou tvorbou plynu a jejich fermentační profily byly velice podobné (tab. 1 a obr. 4). Obecně lze říci, že kmeny využívající veškerý dostupný citrát byly charakteristické strmým snižováním hodnot vodivosti roztoku KOH během prvních 12 hodin kultivace (maximální rozdíl mezi dvěma následujícími měřeními se pohyboval mezi 200 až 250 µS), zatímco u kmenů využívajících citrát jen zčásti byl průběh křivky znatelně pozvolnější.

Jediný kmen, který tvořil větší množství plynu než by odpovídalo spotřebovanému citrátu, byl kmen sbírkové-

ho čísla 540 při kultivaci v MRSB bujonu (tab. 1). Vytvořený plyn mohl pocházet z jiného zdroje, pravděpodobně z glukosy.

Jak je patrné z obr. 3 a 4, změna vodivosti slepého vzorku (nezaočkované médium) byla výrazně nižší než hodnoty generované převážnou většinou testovaných kmenů. U kmenů tvořících nízké množství plynu je však nutné počítat se zatížením naměřených hodnot větší chybou měření. Možným řešením by pravděpodobně bylo zvýšení očkovací dávky umožňující zkrácení potřebného intervalu sledování.

Dosažené výsledky ukazují, že nepřímá vodivostní metoda je za dodržení určitých podmínek vhodná pro sledování množství CO₂ vytvořeného různými kmeny leuconostoků během fermentace mléka i definovaného živného média. Kinetika fermentace citrátu je důležitá z hlediska průmyslové aplikace jednotlivých kmenů. Vysoká tvorba CO₂ a nízká tvorba aromatických látek předurčuje kmen k použití při výrobě sýrů s plísní v těstě, případně sýrů typu Gouda. Při výrobě zakysaných výrobků je zase důležitější tvorba aromatických látek a příliš vysoká tvorba CO₂ není žádoucí.



¹conductivity; ²time

Obr. 4. Změna vodivosti roztoku KOH během fermentace mléka různými kmeny *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* sbírkové číslo 390 (2), LM 057 (3), LM 058 (4) a kontrolní vzorek (1) sledovaná přístrojem RABIT (kultivační teplota 30 °C, inokulum 2%, substrát 85KA) – Changes in KOH solution conductivity during milk fermentation by various strains of *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides*, collection no. 390 (2), LM 057 (3), LM 058 (4), as determined by RABIT apparatus (cultivation temperature 30 °C, inoculum 2%, 85KA substrate)

Literatura

- BELGUENDOUZ T., CACHON R., DIVIES CH. (1996): Kinetics of citrate uptake in growing cells of *Leuconostoc* spp. FEMS Microbiol. Lett., **139**: 239–244.
- BELLENGIER P., FOUCAUD C., HEMME D. (1993): Carbon dioxide production from citrate and glucose in *Leuconostoc* species determined by an adapted enzymatic method. Milchwissenschaft, **48**: 548–550.
- BELLEGIER P., HEMME D., FOUCAUD C. (1994): Citrate metabolism in 16 *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* and subsp. *dextranicum* strains. J. Appl. Bacteriol., **77**: 54–60.
- BOLTON F. J. (1990): An investigation of indirect conductimetry for detection of some food-borne bacteria. J. Appl. Bacteriol., **69**: 655–661.
- COGAN T. (1987): Co-metabolism of citrate and glucose by *Leuconostoc* spp.: Effects on growth, substrates and products. J. Appl. Bacteriol., **63**: 551–558.
- ČERNÝ V., VEJDOVÁ M., BŮHMOVÁ J., DRÁB V. (1997): Studium proteolýzy bílkovin v průběhu výroby, zrání a skladování sýrů ve vztahu k užitečným vlastnostem zralých sýrů. [Závěrečná zpráva.] Praha, Výzkumný ústav mlékárenský.
- DÉZENCLOS T., ASCON-CABRERA M., ASCON D., LEBEAULT J.-M., PAUSS A. (1993): Optimisation of the indirect impedancemetry technique; a handy technique for microbial growth measurement. Appl. Microbiol. Biotechnol., **42**: 232–238.
- DRÁB V., HOUŠKA M. (1994): Finding of influence of technological interventions and cultures selection on the final cheese quality determined by sensory, physical and chemical methods. [Final report.] Výzkumný ústav mlékárenský, Praha: 9–10.
- FORRESTER R. L., WATAJI L. J., SILVERMAN D. A., PIERRE K. J. (1976): Enzymatic method of determination of CO₂ in serum. Clinical Chem., **22**: 243–245.
- KNEIFEL W., BRETTBACHER S. (1992): A simple method for the detection of fermenting yeasts in fruit mixes, fruit yogurts and dessert products by using CO₂-sensitive gas diffusion tubes. Chem. Mikrobiol. Technol. Lebensm., **14**: 169–176.
- MARTLEY F. G., CROW V. L. (1996): Open texture in cheese: The contributions of gas production by microorganisms and cheese manufacturing practices. J. Dairy Res., **63**: 489–507.
- SCHMITT P., DIVIES C., CARDONA R. (1992): Origin of end-products from co-metabolism of glucose and citrate by *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris*. Appl. Microbiol. Biotechnol., **36**: 679–683.
- STARRENBURG M. J. C., HUGENHOLTZ J. (1991): Citrate fermentation by *Lactococcus* and *Leuconostoc* sp. Appl. Environ. Microbiol. **57**: 3535–3540.
- ŽABKOVÁ J., HUŠEK V. (1988): Fermentační profily zrání v sýrech. In: Sbor. Sýrařské dny 1988. Tábor: 59–64.

Došlo 22. 12. 1998

Přijato k publikování 3. 2. 1999

Kontaktní adresa:

Ing. VLADIMÍR DRÁB, Milcom, a. s., Výzkumný ústav mlékárenský, Soběslavská 841, 390 02 Tábor, Česká republika, tel.: + 420 361 25 27 83, fax: + 420 361 25 27 83, e-mail: VUM@IOL.cz

Hodnocení antimutagenní aktivity tlakově ošetřené (paskalizované) a tepelně ošetřené (pasterované) květákové šťávy*

MARKÉTA SEDMÍKOVÁ¹, BOHUMIL TUREK², IVO BÁRTA¹, JAN STROHALM³, PETR ŠMERÁK¹, MILAN HOUŠKA³, JARMILA MÜLLEROVÁ¹

¹3th Medical School, Charles University, Prague; ²State Institute for Public Health, Prague;

³Food Research Institute Prague, Prague, Czech Republic

Abstract

SEDMÍKOVÁ M., TUREK B., BÁRTA I., STROHALM J., ŠMERÁK P., HOUŠKA M., MÜLLEROVÁ J. (1999): Evaluation of antimutagenic activity of pressurized (pascalized) and pasteurized cauliflower juice. Czech J. Food Sci., 17: 149–152.

This work is dealing with testing of antimutagenic activity of cauliflower juice processed by heat (100 °C for 10 min), by high pressure 400 MPa for 10 min (25 °C) and frozen (mimic the fresh juice). The results showed that the frozen and pressurized juices saved almost their antimutagenic activity against very strong mutagen IQ (2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline) and pasteurized juice decreased the activity sharply. The pressurization seems to be a very important process for prolonging the shelf life of vegetable juices with saved antimutagenic activity capable to decrease the risk of cancer occurrence in the population.

Key words: cauliflower juice; antimutagenic activity; ID₅₀; high pressure processing; pasteurization

Souhrn

SEDMÍKOVÁ M., TUREK B., BÁRTA I., STROHALM J., ŠMERÁK P., HOUŠKA M., MÜLLEROVÁ J. (1999): Hodnocení antimutagenní aktivity tlakově ošetřené (paskalizované) a tepelně ošetřené (pasterované) květákové šťávy. Czech J. Food Sci., 17: 149–152.

Testovali jsme antimutagenní aktivitu květákové šťávy ošetřené působením tepla (100 °C po dobu 10 min), velmi vysokého tlaku 400 MPa po dobu 10 min (25 °C) a zmrazené (napodobující čerstvou). Ukázalo se, že šťáva zmrazená i šťáva ošetřená tlakem si uchovaly svou antimutagenní aktivitu vůči silnému mutagenu IQ (2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]chinolin), zatímco tepelně ošetřená šťáva značně snížila své antimutagenní působení. Technologie prodloužení trvanlivosti zeleninových šťáv velmi vysokým tlakem lze proto považovat za velmi prospěšné. Z hlediska zachování antimutagenní aktivity a tím zachování možnosti snížení rizika vzniku nádorových onemocnění jde o proces velmi významný.

Klíčová slova: květáková šťáva; antimutagenní aktivita; ID₅₀; ošetření vysokým tlakem (paskalizace); ošetření teplem (pasterace)

Incidence nádorových onemocnění je u nás stále poměrně vysoká, zejména se jedná o nádory plic a střev. Především u nádorů střev má vliv výživy významný podíl na zvýšení či snížení rizika vzniku onemocnění. K výraznému snížení rizika vzniku a rozvoje onkogenního procesu přispívá zvýšená spotřeba zeleniny. V různých druzích zeleniny se vyskytuje řada látek, které vykazují antikarcinogenní účinky. Jsou to především α - a β -karoteny, karotenoidy, zejména lutein a lykopen, některé kumariny, flavonoidy a isoflavony, vitaminy C a E, kyselina listová, dále pak indol-3-karbinol, arylisothio-kyanáty (např. sulforafan aj.), fytosteroly, saponiny, inhibitory proteas, dithiothiony a další sulfidické látky.

Tyto látky se podílejí na antikarcinogenním efektu různých druhů zeleniny. Účinky se projevují zejména v ovlivnění diferenciace buněk, ve zvýšení aktivity mnoha enzymů (např. glutathion-S-transferasy, která zaujímá v antikarcinogenní aktivitě významné místo), dále se uplatňují v blokádě nitrozačních reakcí, v ovlivnění metabolismu estrogenů, ovlivnění metabolických procesů ve střevech, v ochraně integrity buněk, v metylaci nukleových kyselin a zlepšení reparace nukleových kyselin, urychlení apoptosy nádorových buněk a snížení rizikové buněčné proliferace (POTTER, STEIMETZ 1996).

V této paletě metabolických funkcí se uplatňují uvedené látky zastoupené v různých druzích zeleniny. Jed-

*Financováno z grantu NAZV MZe, č. EP 096/098 6259.

nou z neaktivnějších skupin zeleniny jsou druhy čeledi brukvovitých (*Brassicaceae*), které mají též významné antimutagenní účinky a je možné je považovat za ukazatel antigenotoxické aktivity. Tyto účinky vykazují také šťávy z těchto druhů zeleniny.

Cílem této studie bylo ověřit, do jaké míry ovlivňuje způsob zpracování zeleninové šťávy její antimutagenní vlastnosti. Srovnávali jsme dva různé pasterizační postupy z hlediska snížení antimutagenního efektu v porovnání s kontrolním vzorkem čerstvé šťávy uchovávané zmrazením.

K ověření antimutagenní aktivity jsme jako testovací látku použili mutagen IQ (2-amino-3-methylimidazol [45]chinolin), který považujeme za velmi silný mutagen. Z výsledků, které uvádějí SUGIMURA a SATO (1986) vyplývá, že v porovnání s jinými látkami tohoto typu předčí použitý mutagen svou mutagenní aktivitou ostatní pyrolyzátů aminokyselin (heterocyklické aminy – azaareny) (tab. 1).

Tyto látky vykazují mutagenní i karcinogenní účinky. Vznikají při tepelném opracování zejména potravin živočišného původu, různých druhů masa jatečných zvířat, ryb a drůbeže, ale i sýrů a potravin rostlinného původu (např. v smažené cibuli). Kombinací s vhodně upravenou zeleninou nebo zeleninovou šťávou může být mutagenní aktivita výrazně potlačena. K tomuto efektu dochází i v experimentu *in vitro* (Amesův test), jak bylo prokázáno u brokolice, květáku, ale i ananasu a jiných šťáv.

MATERIÁL A METODY

Chemikálie: Mutagen IQ-2-amino-3-methylimidazol [45]chinolin byl získán od firmy ICN Pharmaceuticals, Inc. (Costa Mesa, USA),

Glukoso-6-fosfat, NADPH a ostatní chemikálie byly od firmy Sigma-Aldrich s. r. o. (Praha, Česká republika).

Příprava květákové šťávy: Květákové růžice zakoupené v běžné obchodní síti v Praze byly zbaveny listů, oprány v pitné vodě, rozdělány nožem včetně košťálu na

díly vhodné k lisování. Lisování bylo provedeno na odšťavňovači Green Power model GP-E 1503 (dodavatel MIPAM bio, s. r. o.), který velmi šetrným způsobem při 100 ot./min lisuje šnekem přes jemné sítko (otvory o průměru 0,5 mm) šťávu. Získaná zakalená šťáva byla přecezena přes jemné přídavné sítko (otvory 0,3 × 1,3 mm) z příslušenství odšťavňovače a naplněna do lahví o obsahu 0,44 l. Pro tlakování byly zvoleny PET láhve uzavřené šroubovým uzávěrem. Takto byly připraveny vzorky čerstvé šťávy (uchovávané zmrazením) a vzorky pro tlakování. Vzorky šťávy určené k tepelnému ošetření byly naplněny do skleněných obalů s uzávěrem twist-off. Všechny vzorky byly ošetřeny do jedné hodiny po vylisování. Zmrazení bylo provedeno v mrazicím prostoru při teplotě $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$, tepelné ošetření ve vodní lázni teplotou při $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 10 min a ošetření vysokým tlakem po vytemperování vzorku ve vodní lázni na $25\text{ }^{\circ}\text{C}$. Vlastní tlakování bylo provedeno ve vysokotlakém lisu CYX 6/0103 (výrobce ŽĎAS, a. s., Česká republika) tlakem 400 MPa po dobu 10 min (náběh na tlak 25 s, pokles tlaku 8 s). Ošetřené vzorky byly téhož dne dopraveny v termoboxu do laboratoře k testování antimutagenního efektu. Čerstvá šťáva byla uchovávána zmrazená při $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$. Ostatní šťávy byly uchovávány při $4\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Testování antimutagenního efektu: K testování antimutagenního efektu květákové šťávy byl použit modifikovaný Amesův test (MARON, AMES 1983; BUTZ *et al.* 1997; EDERHARDER *et al.* 1994). Principem Amesova testu je sledování spontánních a indukovaných reverzních mutací u bakteriální kultury kmene TA98 *Salmonella typhimurium*. Testování vzorků květákové šťávy ošetřených teplem, tlakem a vzorků čerstvých: množství 10, 20, 40, 60, 80, 100, 150, 200, 300, 400 a 500 μl šťávy bylo doplněno isotonickým roztokem KCl na objem 500 ml. Dále jsme do vzorku přidali 0,1 ml mutagenu (IQ) o koncentraci 250 ng/ml, 0,1 ml bakteriální kultury kmene TA98 *Salmonella typhimurium* (cca 3×10^9 buněk na 1 ml), 500 μl S9-mixu (metabolický aktivací systém savců) a 3 ml vrchního agaru. Z křivky závislosti na dávce byla stanovena

Tab.1. Mutagenní aktivita heterocyklických aminů TA98 a TA100 *Salmonella typhimurium* (s metabolickou aktivací S9) – Mutagenic activity of heterocyclic amines TA98 and TA100 *Salmonella typhimurium* (with metabolic activation S9)

Látka ¹	Počet revertantů na μg^2		Látka	Počet revertantů na μg	
	TA 98	TA 100		TA 98	TA 100
IQ	433 000	7 000	Trp-P-1	39 000	1 700
MeIQ	661 000	30 000	Trp-P-2	104 000	1 800
IQ x	75 000	1 500	Glu-P-1	49 000	3 200
MeIQ x	145 000	14 000	Glu-P-2	1 900	1 200
4,8-DiMeIQ x	183 000	8 000	$\alpha\alpha\text{C}$	300	20
7,8-DiMeIQ x	163 000	9 900	Me A αC	200	120
PhIP	1 800	120	Benzo(a)pyren	320	660
Cre-P-1	19 000	400			

¹substance; ²number of relevants per μg

dávka květákové šťávy, která vedla k 50% snížení mutagenní aktivity (ID_{50}). V každém pokusu byl sledován počet spontánních revertant za přítomnosti 0,5 ml isotoničného roztoku KCl na misku (negativní kontrola – NK). Každá jednotlivá koncentrace (dávka) sledovaných látek byla testována v šesti opakováních.

Statistická analýza výsledků: Antimutagenní aktivita tepelně ošetřené, tlakované a čerstvé květákové šťávy byla hodnocena analýzou variance. Antimutagenní aktivita upravených šťáv se statisticky významně odlišovala u všech způsobů úpravy při hladině významnosti $\alpha = 0,01$.

VÝSLEDKY A DISKUSE

Antimutagenní aktivita čerstvé, tepelně ošetřené (10 min, 100 °C) a vysokým tlakem ošetřené (10 min, 400 MPa, 25 °C) květákové šťávy byla sledována *in vitro* na kmene TA98 *S. typhimurium* s metabolickou aktivací. Použitý mutagen (IQ) bez přídavku šťávy indukoval $1\,912,0 \pm 370,3$ revertant. Průměrná hodnota spontánních revertant u kmene TA98 *S. typhimurium* (negativní kontrola) byla $33,9 \pm 3,53$. Antimutagenní efekt vzorků květákové šťávy je vyjádřen v tab. 2 jako ID_{50} , resp. jako reziduální mutagenní aktivita (%) pro dávku 500 μg (u tepelně ošetřené vzorku nebylo docíleno snížení mutagenní aktivity pod 50 %).

Nejvyšší antimutagenní aktivitu vykazovala čerstvá šťáva uchovávaná mražením. Tepelně ošetřená šťáva měla antimutagenní aktivitu nejnižší. Jak je patrné z obr. 1, u čerstvé (dávky 200, 300, 400 a 500 μl šťávy na misku) a vysokým tlakem ošetřené šťávy (dávky 400 a 500 μl na misku) se nelišil počet indukovaných revertant od hodnoty spontánních revertant (negativní kontrola bez přídavku mutagenu IQ). Uvedené dávky čerstvé, resp. vysokým tlakem ošetřené šťávy zcela potlačily mutagenní efekt tak silného mutagenu, jakým je mutagen IQ.

Květáková šťáva má výrazné antimutagenní účinky, hodnoty ID_{50} jsou jedny z nejnižších (tab. 2). Tyto hodnoty se prakticky nelišily od hodnot udávaných jinými autory (BUTZ *et al.* 1997). Antimutagenní účinky šťávy se výrazně snižují při tepelném opracování zejména vysokou teplotou (100 °C). U stejně tepelně ošetřené šťávy

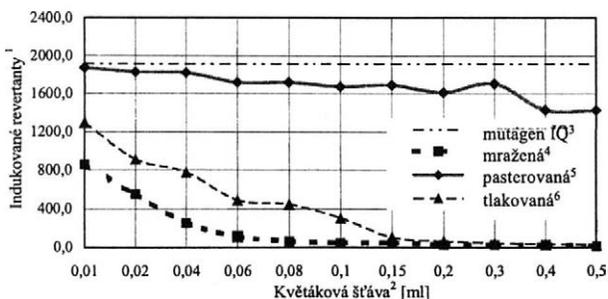
Tab. 2. Antimutagenní aktivita čerstvé, tepelně a tlakově ošetřené květákové šťávy na kmene TA98 *S. typhimurium* ovlivněném mutagenem IQ (2-amino-3-methylimidazol[45a]chinolin) – Antimutagenic activity of fresh, pasteurized and pressurized cauliflower juice in the strain TA98 *S. typhimurium* influenced by the mutagen IQ (2-amino-3-methylimidazol[45a]chinoline)

Květáková šťáva ¹	ID_{50} ($\mu\text{l}/\text{misku}^2$)	Reziduální mutagenní aktivita ³ (%)
Čerstvá – mražená ⁴	7,2	–
Ošetřená tlakem ⁵ 400 MPa, 25 °C, 10 min	19,2	–
Ošetřená teplem ⁶ 100 °C, 10 min	–	75,9

¹cauliflower juice; ²residual mutagenic activity ($\mu\text{l}/\text{dish}$); ³residual mutagenic activity; ⁴raw – frozen; ⁵pressurized; ⁶pasteurized

byla hodnota reziduální mutagenní aktivity zjištěná v našich experimentech o 13 % vyšší než hodnota, kterou uvádějí BUTZ *et al.* (1997).

Na možnost snížení mutagenní aktivity heterocyklických aminů (azaarénů) poukázali KADA *et al.* (1978, 1986), kteří sledovali efekt zeleninových extraktů zeli, papriky, jablek, lopuchu, lilku, zázvoru, ananasu, brokolice a květáku. Květákový extrakt byl účinný zejména vůči derivátu tryptofanu Trp P-2. Uvažují možné mechanismy účinku – chemickou nebo enzymatickou inaktivaci mutagenu, absorpci mutagenu na substrátech s vysokou molekulovou hmotností (fyzikální inaktivace) nebo inhibici mutagenní aktivity promutagenem či inhibici tvorby mutagenu z prekurzorů. Přikládáme se k chemické či enzymatické inaktivaci mutagenu. Jedná se zejména o indukcii glutathion-S-transferasy působením indol-3-karbinolu a aryl-isothiokyanátu. Inhibice aktivity karcinogenních látek vlivem aryl- a arylalkyl-isothiokyanátů byla opakovaně prokázána (KELLOFF *et al.* 1996). Rovněž význam indol-3-karbinolu je nepochybný (POTTER, STEINMETZ 1996). Účinné mohou být též polyfenoly, např. galangin a kvercetin (KANAZAWA *et al.* 1995), ale obsah těchto látek v květáku není významný.



¹induced revertants; ²cauliflower juice; ³mutagen IQ; ⁴frozen; ⁵pasteurized; ⁶pressurized

Obr. 1. Antimutagenní aktivita čerstvé, tepelně a tlakem ošetřené květákové šťávy u kmene TA98 *S. typhimurium* ovlivněného mutagenem IQ (2-amino-3-methylimidazol[45a]chinolin) – Antimutagenic activity of fresh, pasteurized and pressurized cauliflower juice in the strain TA98 *S. typhimurium* influenced by the mutagen IQ (2-amino-3-methylimidazol[45a]chinoline)

Závěry

Základním významným charakterem těchto látek s antimutagení aktivitou je to, že zatímco neodolávají teplotě 100 °C po dobu 10 min, tlak 400 MPa při 25 °C po dobu 10 min je nenaruší.

Proto je nutné považovat technologické postupy pro zvýšení trvanlivosti zeleninových šťáv za použití vysokého tlaku za velmi prospěšné. Z hlediska zachování antimutagení aktivity a tím zachování možnosti snížení rizika vzniku nádorových onemocnění jde o proces velmi významný.

Literatura

- BUTZ P., EDENHARDER R., FISTER H., TAUSCHER B. (1997): The influence of high pressure processing on antimutagenic activities of fruit and vegetable juices. *Food Res. Int.*, **30**: 287–291.
- EDENHARDER R., KURZ P., JOHN K., BURGARD S., SEEGER K. (1994): *In vitro* effect of vegetable and fruit juices on the mutagenicity of 2-amino-3-methylimidazo[4,5-a]-quinoline, 2-amino-3,4-dimethylimidazo[4,5-f]-quinoline and 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-a]-quinoxalin. *Food Chem. Toxic.*, **32**: 443–459.
- KADA T. *et al.* (1978): Antimutagenic action of vegetable factors on the mutagenic principle of tryptophan pyrolysate. *Mutat. Res.*, **53**: 351–353.
- KADA T. *et al.* (1986): Dietary desmutagens. In: KNUDSEN I., LISS A. R. (Eds.): *Genetic Toxicology of the Diet. Progress in Clinical and Biological Research*. Vol. 206. New York.
- KANAZAWA K., KAWASAKI H., SAMEJIMA K., ASHIDA H., DANNO G. (1995): Specific desmutagens (antimutagens) in oregano against a dietary carcinogen, Trp-P-2, are galangin and quercetin. *J. Agric. Food Chem.*, **43**: 404–409.
- KELLOFF G. J., BOONE C. W., STEELE V. E., CROWEL J. A., LUBET R. A., GREENWALD P., HAWK E. T., FAY J. R., SIGMAN C. C. (1996): Mechanistic considerations in the evaluation of chemopreventive data. In: STEWARD B. W., MCGREGOR D., KLEIHUES P. (Eds.): *Principles of Chemoprevention*. IARC Scie. Publ. No. 139. Lyon, Int. Agency for Research on Cancer.
- MARON D. M., AMES B. N. (1983): Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. 1983. *Mutat. Res.*, **113**: 173–215.
- POTTER J. D., STEINMETZ K. (1996): Vegetables, fruit and phytoestrogens as preventive agents. STEWARD B. W., MCGREGOR D., KLEIHUES P. (Eds.): *Principles of Chemoprevention*. IARC Scientific Publications No. 139. Lyon, Int. Agency for Research on Cancer.
- SUGIMURA T., SATO S. (1986): Mutagens and carcinogens in cooked food. In: KNUDSEN I., LISS A. R. (Eds.): *Genetic Toxicology of the Diet. Progress in Clinical and Biological Research*. Vol. 206. New York.

Došlo 16. 12. 1998

Přijato k publikaci 12. 2. 1999

Kontaktní adresa:

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

REVIEW

Historie a současnost mikroskopického vyšetřování masa a masných výrobků

BOHUSLAVA TREMLOVÁ

University of Veterinary and Pharmaceutical Science Brno, Faculty of Veterinary Hygiene and Ecology, Brno, Czech Republic

Abstract

TREMLOVÁ B. (1999): **History and the present of microscopic examination of meat and meat products.** Czech J. Food Sci., 17: 153–160.

Microscopic examination of foods is a specialized analysis that makes it possible to distinguish and identify the separate components of foods. This method of food examination is not defined by any law in this country. Microscopic examination is a routine method in some European countries and is included in food legislation and sets of analytical methods for food examination. The result can be a crucial factor to discover the failure of observation of technological procedure and food adulteration. The objective of this paper is to present a complex description of the historical background of microscopic examination of meat products and to outline its advantages in the present system of analytical methods.

Key words: histology; microscopic methods; food adulteration; meat products

Abstrakt

TREMLOVÁ B. (1999): **Historie a současnost mikroskopického vyšetřování masa a masných výrobků.** Czech J. Food Sci., 17: 153–160.

Mikroskopické vyšetření potravin je specializovaná analýza, která umožňuje rozlišit a identifikovat jednotlivé komponenty v potravinách. U nás není tento způsob vyšetření stanoven žádnými legislativními podklady. V některých evropských zemích je mikroskopické vyšetření běžně používáno a je součástí potravinových předpisů a souborů analytických metod pro vyšetřování potravin. Výsledek může být rozhodujícím faktorem pro posouzení nedodržení technologického postupu a falšování potravin. Cílem tohoto příspěvku je podat ucelený přehled o historickém vývoji mikroskopického vyšetřování masných výrobků a také o možnostech, které nabízí v současném spektru analytických metod.

Klíčová slova: histologie; mikroskopické metody; falšování potravin; masné výrobky

Historický vývoj mikroskopického vyšetřování masa a masných výrobků

Konkrétní poukaz na použití mikroskopického vyšetřování při posuzování masných výrobků existuje minimálně od roku 1910. Histologickým průkazem telecího okruží s ulpělým střechem a sliznicí (JAEGER 1910 – cit. PRÄNDL 1961) mohla být zjištěna příčina stížílosti konzumentů na odchynou chuť jitrnic. ZIEGLER (1941 – cit. PRÄNDL 1961) uvádí, že již v roce 1911 bylo provedeno histologické vyšetření masných výrobků s cílem kvalita-

tivního posouzení. SEEL *et al.* (1919 – cit. PRÄNDL 1961) ve své práci uvedli, že posouzení uzenin musí být ve většině případů, zvláště při nejasných dodacích podmínkách, založeno na chemických a mikroskopických vyšetřeních. Odkaz na tuto práci ale také dokumentuje, že v této době bylo mikroskopické vyšetření používáno jako analytická metoda. V následujících desetiletích se pozornost odborníků postupně zaměřovala na různé problémy potravinářské mikroskopie v oblasti zpracování vzorků, metod a cílů vyšetření.

Příprava a zpracování vzorků

Zpočátku stály v popředí otázky přípravy vzorků a techniky krájení řezů. Jak uvádí GRÄFF (1916 – cit. PRÄNDL 1961), bylo použito zalévání vzorků do želatiny.

BRAUNERT (1921 – cit. PRÄNDL 1961) poprvé použil k zalití vzorku agar ve 4% roztoku. LUND a SCHRÖDER (1928 – cit. PRÄNDL 1961) dávali přednost zalévání do parafinu a celoidinu. PIETRE (1922 – cit. PRÄNDL 1961) doporučoval u vzorků provádět odstranění tuku zahříváním ve směsi éter–alkohol. Někteří autoři vyšetřovali namísto řezů rozmáčkane vzorky (např. játrového salámu) (KLIMMECK 1925; SEEL, 1928 – cit. PRÄNDL 1961). Další autoři hledali různé modifikace použití želatiny pro zalévání vyšetřovaných vzorků potravin (GERGEN 1939; NEUMÜLLER 1940; PAARMAAN 1942 – cit. PRÄNDL 1961). MERCIER (1953 – cit. PRÄNDL 1961) důkladně přezkoušel histologickou techniku pro masné výrobky. Dával přednost zalévání vzorků do parafinu a uváděl postup pro zpracování suchých vzorků.

HINTERSATZ (1931 – cit. PRÄNDL 1961) upozorňoval na nevýhody používání formalinu k fixaci jemně mělněné tkáně. Hledání vhodných rychlých metod, s jejichž pomocí by bylo možné získat první výsledek již v den příchodu vzorku, vedlo k využívání vhodných krájecích technik a výhod zpracování zmrazené tkáně (GLAMSER 1926; ESCHER 1931; SPIEGEL 1941 – cit. PRÄNDL 1961).

KERSTEN (1963) přispěl svými zkušenostmi s fixačními a odtučňovacími prostředky k technice histologického vyšetřování masných výrobků. BENTLER (1968) si všiml fáze zpracování vzorků pro histologické vyšetření mezi řezáním a barvením, která zůstávala mimo hlavní pozornost. Odtučnění vzorků, tvrzení v alginátu a krátkém působení v 70% alkoholu řešilo problém především při zpracování tepelně neopracovaných masných výrobků. BREHMER a WENZEL (1968) srovnávali výsledky vyšetření vzorků zpracovaných klasickou metodou s metodou používající kryostat.

Barvení preparátů

Byla přezkoušena celá paleta histologických barvicích technik (přehledných i speciálních) pro cílené představení jednotlivých tkáňových komponent. Jako základní přehledné barvení doporučili SEEL *et al.* (1919 – cit. PRÄNDL 1961) barvení směsí hematoxylin–eozin. MAYER (1922 – cit. PRÄNDL 1961) použil pro zvýraznění kolagenní vazivové tkáně metodu podle van Giesona, barvení na elastické vazivo podle Weigerta a pro zvýraznění tuku v masných výrobcích barvení Sudanem III. GLAMSER (1926 – cit. PRÄNDL 1961) uvedl, že je možné dobře rozlišit jednotlivé tkáně při barvení podle Giemsy. Dobré zkušenosti s použitím barvicí lázně orcein–metylenová modř popsal ve své práci BREUSCH (1930 – cit. PRÄNDL 1961) který také poprvé uvedl vhodnost barvení podle Callejy pro masné výrobky (umožňuje zejména rozlišení epitelů, příčné pruhovanou svalovinu a vazivovou tkáň). Toto barvení považoval za speciální, které by

mělo být používáno v případě nejistoty při barvení přehledném. SCHÖNBERG (1935 – cit. PRÄNDL 1961) doporučoval pro barvení řezů ze vzorků sekaného masa Löfflerův roztok metylenové modři a barvení podle van Giesona. V dalších letech byly vyzkoušeny pro vzorky z masných výrobků další barvicí metody, např. Malloryho (SKULBERG 1954 – cit. PRÄNDL 1961), modifikace barvení azanem (KOTTER 1955 – cit. PRÄNDL 1961), barvení směsí anilinová modř–oranž (KOTTER, DEGENKOLB 1956 – cit. PRÄNDL 1961), barvení Massonovým trichromem (LOMBARD, GOULARD 1957 – cit. PRÄNDL 1961). Charvátova modifikace Goldnerovy trichromové metody (CHARVÁT 1955), vhodná pro barevné odlišení hladké svaloviny a vaziva, se osvědčila také při průkazu znovuzpracovaných masných výrobků. FLINT a LEWIN (1976) prokazovali barvicí metodou podle Bauer–Callejy karbohydrátové sloučeniny. Byla také aplikována na průkaz sójového proteinu v sójových produktech, masných výrobcích a cereálních produktech obsahujících sóju. HILDEBRANDT *et al.* (1977) doporučovali pro preparáty z tepelně opracovaných masných výrobků barvení azanem, modifikaci podle Heidenhaina, a pro tepelně neopracované výrobky metodu podle van Giesona. FLINT a FIRTH (1981, 1988) uvedli jako metodu vhodnou pro kvalitativní a kvantitativní hodnocení součástí v masných výrobcích barvení toluidinovou modří. Autoři dále navrhli jako specifický histochemický test pro kolagen barvení komplexem pikro–červeně Sirius a použití polarizační mikroskopie. FEIGL (1993) použil pro barvení výrobků obsahujících sójovou moku modifikovanou metodu Bauer–Callejy. WICHMANN–SCHAUER *et al.* (1998) publikovali novou barvicí metodu pro průkaz rybích kostí.

Vyšetřovací metody a techniky

Předmětem zájmu autorů byla také mikroskopická technika. Byly zkoušeny různé modifikace světelné mikroskopie, např. využití polarizovaného a ultrafialového světla. POPP (cit. PRÄNDL 1961) již v roce 1926 uvedl mnohostranné využití ultrafialového světla při vyšetření potravin, zejména při průkazu šlach v tepelně neopracovaných masných výrobcích. BOS (1938 – cit. PRÄNDL 1961) doporučil použití polarizovaného světla zvláště pro zjišťování vad uzenin. RIEVEL (1943 – cit. PRÄNDL 1961) zjistil, že pomocí fluorescenční mikroskopie je možné snadněji odlišit části zeleniny ve vařených masných výrobcích. Vyšetření masných výrobků pomocí polarizovaného světla použil rovněž SINELL (1956a, b – cit. PRÄNDL 1961) pro průkaz koření a lepší diferenciaci kolagenní vazivové tkáně ve výrobcích. BÖHM a POKORNÝ (1953) studovali pomocí fázové kontrastní mikroskopie svalovinu a její změny při mělnění. HINTERSATZ (1939 – cit. BÖHM a PLEVA 1956, 1962) zjišťoval v řezech obarvených fluorochromy rozdílly ve stavbě svalové tkáně ryb, které by bylo možné využít pro průkaz rybiho masa. PITRE (1954 – cit. PRÄNDL 1961) používal vyšetření v ultrafialovém světle jako jednoduchou možnost pro získání

hrubé představy o obsahu vazivové tkáně ve výrobku. SCHÖNBERG a BRANDES (1957 – cit. PRÄNDL 1961) popsali výsledky vyšetření játrových výrobků pomocí různých barvicích metod a také v ultrafialovém světle.

Vedle klasických čistě morfologicky orientovaných zkoušek byly využívány také možnosti histochemických postupů pro určení obsahových látek, ke speciální přípravě vzorků, event. také techniky imunologické. Poprvé uvedl BAUER (1933 – cit. KUSCHFELDT *et al.* 1994) mikroskopicko-chemický průkaz glykogenu a některých dalších polysacharidů. HOLPERT (1965 – cit. KUSCHFELDT *et al.* 1994) publikoval práci o histochemickém a imunohistochemickém průkazu mléčné bílkoviny v tepelně opracovaných masných výrobcích. Formovaný sójový protein, kterému chybí vláknitá struktura a charakteristické morfologické znaky, je možné prokázat pomocí kombinovaného barvení podle Bauer-Callejy (LINKE 1969; COOMARASWAMY, FLINT 1973). LLEWELYN (1979) stanovoval proteiny jiného než živočišného původu v masných výrobcích pomocí histochemické reakce PAS (Periodic Acid Schiff's reagens). V řadě dalších prací byly popsány histochemické metody při kvalitativním i kvantitativním stanovení svaloviny, kolagenního vaziva, sójového proteinu, glutenu a dalších součástí masných výrobků (FLINT, PICKERING 1984; FLINT, FIRTH 1988). Histochemická reakce je také základem pro průkaz sušené krve, která se používala pro přibarvování masných výrobků (HORN 1988). Mikroskopická struktura mletého masa a použití imunohistochemické identifikace svalových proteinů byla tématem práce, kterou uveřejnili ZIJDERVELD a KOOLMEES (1990). FLINTOVÁ (1991) ve své práci shrnuje výsledky studia chemických aspektů potravinářské mikroskopie.

Mikrostruktura různých druhů masných výrobků byla studována pomocí rastrovací a transmisní elektronové mikroskopie a byly diskutovány vlivy mletí, přísadky vody a soli na tvorbu konstrukce bílkovinné sítě, sítě kolagenních fibril a disperze tuku (KATSARAS, STENZEL 1983, 1984; KATSARAS *et al.* 1986; KATSARAS, LINKE 1988; KATSARAS 1991). Další autoři (OELKER 1986, 1987, 1988; OELKER, PEETZ 1988) demonstrovali prostřednictvím elektronové mikroskopie průběh kutrovacího procesu, emulgaci tuku a ultrastrukturu vazby vody. Rastrovací elektronová mikroskopie byla použita při morfologické studii změn v roztrátnosti tepelně neopracovaných výrobků (KATSARAS *et al.* 1990) a dále také při studiu ultrastruktury bramborových a kukuřičných škrobových změn i po tepelném opracování (ZHAO *et al.* 1990). KATSARAS (1991) pomocí elektronové mikroskopie sledoval morfologické změny surovin při výrobě kvalitních masných výrobků. OELKER (1995) a dále CHEONG, FISCHER (1993) studovali emulzi tuku v jemných játrových výrobcích. Na změny mikrostruktury mletého masa během zahřívání se zaměřili KATSARAS a POSPIECH (1988) a podobně tyto změny u formovaného drůbežního a vepřového masa sledovali BÖLLING *et al.* (1992).

HERMANSSON (1992) studoval vliv solení na mikrostrukturu mletého masa a jeho součástí. TRZISZKA *et al.* (1993) testovali mechanicky separované maso (získané za různých podmínek) pomocí elektronového mikroskopu. KÖNIGSMANN *et al.* (1980) ve své práci upozornili na nutnost rozvoje analytických metod a pro určení obsahu kostí v separovaném masu a výrobců z něj použili metodu analýzy obrazu. Moderní metoda obrazové analýzy byla využita pro kvantitativní určení kolagenu, elastického vaziva a kostí (HILDEBRANDT, HIRST 1985) a při studiu disperze tuku v rozmělněném masu (KOOLMEES *et al.* 1986). SCHOLZ *et al.* (1996) a také ALBRECHT *et al.* (1995) považovali obrazovou analýzu za metodu vhodnou k objektivnímu hodnocení mramorování masa, a proto také vhodnou pro stanovení obsahu masa a tuku ve vepřovém masu.

Cíle vyšetřování masných výrobků

Vliv technologického opracování na strukturu tkání

Aby byla zajištěna věcně správná interpretace nálezů, byly studovány a diskutovány různé mechanické, termické nebo chemické vlivy technologického procesu na zpracováváný materiál (BRAUNERT 1921; MAYER 1922; FRICKINGER 1928; HADI 1930 – cit. PRÄNDL 1961). Obsáhle se této problematice věnoval KALLERT (1923a, b, c, 1924a, b, 1928, 1931 – cit. PRÄNDL 1961) – kromě vlivu sušení, solení, uzení, vaření a pečení studoval také změny svaloviny a orgánů při zmrazování a rozmrazování. O vlivu zmrazování, zahřátí, sušení a uzení na příčné pruhožení svalových vláken referovali LUCAM a MATHIEU (1942 – cit. PRÄNDL 1961). CHAMBON (1941 – cit. PRÄNDL 1961) uvedl podobné výsledky získané při studiu vlivu fermentace na svalovou tkáň při výrobě tepelně neopracovaných masných výrobků. Zavedení nových mletých strojů a postupů v masné výrobě přineslo obavy o možnosti využití histologického vyšetření pro určení jednotlivých tkání. MARESCH (1951 – cit. PRÄNDL 1961) a také např. SKULBERG (1954 – cit. PRÄNDL 1961) však prokázali, že vznikající částečky tkání je možné prokázat a určit. SEER (1952 – cit. PRÄNDL 1961) studoval působení polyfosfátových přísadků na strukturu svalových vláken. Změny svalové a vazivové tkáně v průběhu kutrovacích procesů studovala řada autorů a svoje výsledky předložili a diskutovali v odborné literatuře (BÖHM, POKORNÝ 1953; BÖHM 1956, dále také SCHÖNBERG 1957 a KOTTER, PRÄNDL 1956 – oba cit. PRÄNDL 1961). Výsledky studia změn při kutrování pomocí světelné a elektronové mikroskopie byly zpětně využity při automatizaci této fáze technologického procesu (GEISSLER *et al.* 1988). AMBROSIADIS *et al.* (1994) studovali vliv různých rozmrazovacích metod na tvorbu tekutiny, na histologické změny, sensorickou kvalitu a jiné fyzikálně chemické vlastnosti hovězího svalu *m. semitendinosus*.

Stanovení součástí masných výrobků – kvalitativní hodnocení

Od počátku své historie bylo histologické vyšetřování spojeno s problémem falšování a posouzením kvality a zdravotní nezávadnosti výrobků. Také LUND a SCHRÖ-

DER (1928 – cit. PRÄNDL 1961) viděli smysl histologického vyšetření v odkrývání falšovaných masných výrobků nepovolenými přísadami. Tomuto cíli sloužily také srovnávací vzorky s různými přísadami prokazovaných analytů a také s použitím rozličných výrobních technik. Tématem řady prací byl problém průkazu znovuzpracovaných masných výrobků (SINELL, SCHMIDT 1961; THIEL 1962; QUERNHORST 1965). V dalších publikacích byla pozornost věnována průkazu součástí masných výrobků, např. kostních částic ve výrobcích ze separovaného masa (WENZEL *et al.* 1974; ANHALT, WENZEL 1977) nebo podílu prátu ve výrobcích (LINKE, GROSS 1973). Průkazem separovaného drůbežního masa v masných výrobcích se zabývali také PSOTA *et al.* (1982). Podle nich byl tento průkaz možný pouze v případech přidání více než 5 % separovaného materiálu. KOOLMEES *et al.* (1986) prováděli chemickou a histometrickou analýzu separovaného masa a zdůraznili vliv typu separovacího stroje na vlastnosti separátů. KUSCHFELDT (1975) popsal histologický průkaz různých druhů „cizích bílkovin“ a hodnotil jejich přidávání do masných výrobků vzhledem k platným předpisům. HEBEL a KUSCHFELDT (1976) provedli histologický průkaz kvasinek v masných výrobcích.

CAREY *et al.* (1984) referovali mezilaboratorní studii zaměřené na průkaz sójové mouky a dále také např. srdeční svaloviny a škvarků. HORN (1984) a také GISSEL a ANGERSBACH (1987) hodnotili přítomnost kutánní sliznice ve výrobcích vzhledem k druhu výrobku a příslušným předpisům. Histologické vyšetření se uplatnilo při stanovení hub a jiných doplňkových látek v masných výrobcích (LINKE, HILDEBRANDT 1980). Určení podílu vazivové tkáně bylo zásadní pro posouzení kvality použitých surovin při výrobě. Pomocí srovnávacích zkoušek takto vyšetřovali a hodnotili sekané maso STÜRMER a HILDEBRANDT (1986).

Přísadky cereálií a leguminos do masných výrobků začaly nabývat na významu během druhé světové války, a s tím souviselo i hledání odpovídajících metod pro jejich průkaz. Vyšetřovací metody byly založeny na přítomnosti rostlinných buněk charakteristického tvaru (MIERMEISTER 1942; HENNEBERG 1942, 1943, 1947; EHRLICH 1948 – cit. PRÄNDL 1961). Byly nabízeny možnosti využití fluorescenční mikroskopie (RIEVEL 1943 – cit. PRÄNDL 1961) a také modifikaci barvicích postupů, např. barvení podle Calleje (WESSELINOF 1943 – cit. PRÄNDL 1961). Demontrace a identifikace různých forem sójových preparátů byla prováděna v masných výrobcích (COOMARASWAMY, FLINT 1973) i jiných potravinách (FLINT, LEWIN 1976) histochemickými barvicími metodami, také např. pomocí stereologické techniky (FLINT, MEECH 1978) nebo polarizovaného světla (REUSSE 1971). BREHMER (1984) shrnul výsledky vyšetření sójových preparátů v drůbežích masných výrobcích. Bylo vyzkoušeno a srovnáváno několik metod průkazu sójových částí v masných výrobcích z hlediska jejich citli-

vosti a praktického využití v rutinní diagnostice (HECKMANN *et al.* 1992). V modelových vzorcích tepelně opracovaných a tepelně neopracovaných výrobků byl histologicky identifikován sójový koncentrát. KATSARAS a TISCHENDORF (1993a, b) vyšetřovali mikrostrukturu sójových bobů a vztahy mezi ní a zpracováním na sójové bílkovinné produkty. Na modelových vzorcích byly dokumentovány výhody různých forem sójových preparátů a také technologické vlivy při jejich použití v tepelně opracovaných masných výrobcích (KATSARAS, PEETZ 1994).

Kvantitativní hodnocení složení masných výrobků podle výsledku histologického vyšetření (histometrie)

Rozvoj potravinářské histologie s sebou přinesl úvahy o možnosti kvantitativní výpovědi vztahující se k jednotlivým součástem výrobku. KAMMEL (1934 – cit. PRÄNDL 1961) uvedl, že se při vyšetřování většího množství histologických preparátů z různých částí výrobku setkal s podobným obrazem. Tuto skutečnost považoval za základ pro možnost posoudit vztahy mezi množstvím jednotlivých součástí výrobku. KALLERT (1934 – cit. PRÄNDL 1961) používal pro vyjádření množství jednotlivých součástí výrobku obecné označení „velmi mnoho“, „mnoho“, „málo“ a „není“. BODROSSY (1942 – cit. PRÄNDL 1961) navrhl, aby byly pro kvantitativní určení masných výrobků používány stejné principy pro procentuální stanovení jako v jiných disciplínách, a tím dal teprve skutečný podklad pro tzv. histometrii u masných výrobků. Doporučoval použití síťové rozděleného počítacího okuláru nebo projekci histologického obrazu na síťově rozdělenou plochu. Zkušenosti ukázaly, že pro tento způsob hodnocení masných výrobků stačí posouzení šesti řezů, větší počet neznamenal podstatné snížení šířky rozptylu chyby při statistickém vyjádření. Jak uvedl BODROSSY (1942 – cit. PRÄNDL 1961), mohla tato kvantitativní metoda plnit při histologickém vyšetření masných výrobků řadu úkolů (určení podílu a vztahu jednotlivých tkání ve výrobku, např. jaterní tkáň, vazivo, svalovina, tuková tkáň). KOTTER (1955 – cit. PRÄNDL 1961) podrobil histologii masných výrobků podrobné analýze a ukázal nové cesty pro objektivizaci vyšetření v oblasti přípravy vzorků, barvení i hodnocení výsledků. Pro kvantitativní posouzení zavedl používání integračního okuláru a integračního stolku. LINKE (1959 – cit. PRÄNDL 1961) uvedl tzv. bodovou metodu kvantitativního hodnocení masných výrobků, která je jednodušší než integrační metoda.

Kvantitativního vyšetření bylo využito při hodnocení tepelně neopracovaných masných výrobků (GERIGK 1961; KERSTEN 1965), játrových a jiných tepelně opracovaných masných výrobků (GERIGK 1963; KLEMM 1966), masových konzerv (LINKE 1960) a výrobků z drůbežního masa (LINKE 1964). Bylo provedeno i histometrické stanovení obsahu kolagenu (BENTLER 1966; KERSTEN, FRIESS 1960), kosterní svaloviny (KLEIN 1965), kostní a chrupavkové tkáně (LINKE, THUMSER 1964) a srdeční svaloviny (KLEIN *et al.* 1970) v masných výrobcích.

WEISS, HILDEBRANDT (1971a, b, c, 1974) diskutovali matematicko-statistické základy kvantitativní histologie a také mnohotvárné problémy jejího použití. HILDEBRANDT (1979) uvedl, že přes všechny faktory nejistoty přinesla histometrická analýza velmi přesvědčivé výsledky, srovnatelné s výsledky chemických analýz. KOOLMEES a BIJKER (1985) popsali výhody a nevýhody použití histometrických a chemických metod pro stanovení podílu kolagenní vazivové tkáně v masných výrobcích. Podle autorů byly obě metody stejně hodnotné a měly také nedostatky; histometrické vyšetření však poskytovalo kompletnější obraz o složení výrobku. Hodnocení podílu masa, tuku a vaziva (mramorování) ve svalovině jatečných prasat a skotu bylo založeno na subjektivním hodnocení a chemické analýze. Jak uvedli např. SCHOLZ *et al.* (1995) a ALBRECHT *et al.* (1996), objektivní hodnocení umožnila metoda obrazové analýzy.

Významné souhrnné publikace v historii potravinářské mikroskopie

Mezi publikacemi z oblasti potravinářské mikroskopie se nachází několik souhrnných prací, jejichž význam je třeba zvláště vyzdvihnout. Publikace s názvem *Tierärztliche Wurstuntersuchung* (LUND, SCHRÖDER 1930 – cit. PRÄNDL 1961) obsahovala obsáhlou část věnovanou histologii masných výrobků a shrnovala dosud známé znalosti a zkušenosti s tímto druhem vyšetření. Další významnou publikací byla *Mikroskopie masa a surovin živočišného původu* (BÖHM, PLEVA 1956, 1962). Je v ní popsána stavba tkání, se kterými je možné se v masných výrobcích setkat, změny které utrpí při technologickém opracování, mikroskopická stavba jednotlivých druhů masných výrobků, koření a jiných vegetabilii a obsahuje řadu schematických obrázků a fotografií. V publikaci *Atlas für die histologische Wurstuntersuchung* (SCHÖNBERG 1958) byl podán aktualizovaný a velmi obsáhlý soubor vědomostí v této oblasti, který i dnes má svou cenu. V doprovodném textu byla uvedena histologická technika a diagnostické možnosti, včetně zvážení kvantitativního posouzení. Potřeba přesnějšího vyjádření obsahu jednotlivých součástí výrobku tak, aby bylo možné odlišovat kvalitu masných výrobků podle histologického vyšetření, vedla k vypracování přesné mikroskopické integrační metody, která byla demonstrována na určení obsahu kolagenu v masných výrobcích (PRÄNDL 1961). Metoda byla srovnávána s chemickým vyšetřením a podle autora přinesla přehled o struktuře a rozmístění jednotlivých součástí výrobku a možnosti uchování preparátů jako důkazního materiálu. Mikroskopické základy současné výroby potravin rostlinného i živočišného původu zpracovali AQUILERA a STANLEY (1990) a FLINT (1994).

Mikroskopické vyšetřování masa a masných výrobků v současnosti

Legislativní aspekty falšování potravin a tedy i masných výrobků řeší Zákon č. 110/1997 Sb., o potravinách a tabákových výrobcích a jeho prováděcí vyhlášky. Současné právní předpisy neobsahují žádná ustanovení

o provádění histologického vyšetření potravin. Mikroskopické metody se u nás používaly asi do 60. let, později spíše výjimečně.

Právní předpisy některých evropských zemí o potravinách zahrnují v přehledu analytických metod také histologické vyšetření masných výrobků. Rakouský potravinový kodex v části C. 3 uvádí: „Histologické vyšetření slouží k určení obsahu tkání v maso a masných výrobcích. Může být také využito ke zjištění patologických změn v použitém maso a částech orgánů. Pro toto vyšetření se předpokládá znalost histologické stavby živočišných tkání a jejich změn, které utrpí při technologickém zpracování“. Německá Úřední sbírka vyšetřovacích metod podle § 35 Zákona o potravinách obsahuje rutinní zkoušky pro kvalitativní a kvantitativní histologické vyšetřování. Pod pojmem „tkáňové složení“ se zde rozumí souhrn zpracovaných částí jatečných zvířat, které jsou definovány ve Směrnících pro maso a masné výrobky Německého potravinového kodexu. Rovněž může jít v nálezů o součásti rostlinného původu. V histologickém řezu jsou jednotlivé elementy identifikovány podle svých charakteristických struktur a barvitelnosti. Tento kvalitativní nález je srovnáván s předepsaným složením masných výrobků v potravinovém kodexu. V případě podezření na neopovídané složení se provede také kvantitativní určení pomocí bodového hodnocení.

Mikroskopické vyšetřování je v laboratořích pro kontrolu potravin používáno běžně u některých vybraných druhů potravinových výrobků a dále cíleně při podezření na obsah nepovolených nebo nežádoucích součástí. Objem vzorků potravin vyšetřených v histologické laboratoři Státního veterinárního ústavu v Krefeldu (SRN) činil např. v roce 1995 6 % z celkového počtu vyšetřených vzorků. Polovinu vyšetřených vzorků tvořily uzeniny, třetinu další masné výrobky a zbytek polotovary, rybí výrobky, saláty, polévky, omáčky aj.

Využití mikroskopického vyšetření pro průkaz falšování masných výrobků

PIPEK *et al.* (1998) popisují několik způsobů falšování masných výrobků. Výrobce nebo prodejce uvede nepravdivé informace o výrobku, které se mohou týkat výskytu nutričně významných, nebo naopak zdravotně závadných látek. Některé z těchto součástí je možné histologicky stanovit.

Další možností je záměna jiným druhem masa včetně aplikací různých rostlinných bílkovin. Prováděcí vyhláška k Zákonu č. 327/1997 Sb. definuje pojem masné výrobky jako takové výrobky, které obsahují minimálně 50 % masa. Podle této vyhlášky je kritériem pro stanovení podílu masa v některých výrobcích obsah svalových bílkovin. Objektivní stanovení této hodnoty není bez problémů, protože je možné ji manipulovat přidávkem jiných dusíkatých látek, jak uváděli např. HILDEBRANDT *et al.* (1977), KUSCHFELDT (1986) a HORN (1987). Německé Směrnice pro maso a masné výrobky uvádějí u řady masných výrobků hodnotu obsahu čistých svalových bíl-

kovin zjištěnou nejen chemicky, ale i histometricky. Histometrické stanovení této hodnoty je poměrně náročné. Možnost racionalizovat histometrické postupy nabízí programovatelná obrazová analýza (HILDEBRANDT *et al.* 1977; BOUTTEN *et al.* 1997). Při zaměňování druhů masa jde pochopitelně také o náhradu levnějším masem (náhrada koňského masa hovězím i naopak, náhrada zvěřiny hovězím masem), někdy dokonce nepřipustným ke konzumaci. Při rozlišení druhu použitého masa neposkytuje mikroskopické vyšetření téměř žádné uspokojivé výsledky, v literatuře se uvádí možnost odlišení svaloviny savců a ryb pomocí fluorescenční mikroskopie (HINTERATZ 1939 – cit. BÖHM, PLEVA 1962).

Za falšování se rovněž považuje použití separovaného masa (především drůbežního) tam, kde není deklarováno. Průkaz separovaného masa je obvykle založen na chemickém stanovení kostní tkáně. I zde však existuje možnost využití histologické analýzy, jak uvedli ve svých publikacích např. KÖNIGSMANN *et al.* (1980), HILDEBRANDT a HIRST (1985) a KOOLMEES *et al.* (1986).

Dobarvování masných výrobků se provádí krví, játry a přírodními barvivy, přičemž cílem je dosáhnout dojmu o vyšším zastoupení svaloviny. Používání barvicích prostředků je omezeno vzhledem k druhu barviva i výrobku. Pro histologickou diagnostiku krve v masných výrobcích se kromě morfologických kritérií využívá histochemická reakce založená na pseudoperoxidasové aktivitě hemoglobinu (HORN 1988).

Maso bývá nahrazováno z různých důvodů (nutriční, zdravotní, technologické, chuťové, ekonomické) jinými surovinami – jedná se o rozpustné rostlinné bílkoviny, karagenany a vodu. Bílkovinné přídavky rostlinného původu jsou častými surovinami při výrobě masných výrobků. Většina těchto rostlinných součástí vykazuje morfologické zvláštnosti a specifické obsahové látky, které se dají histologicky prokázat (HORN 1987; FEIGL 1993). Průkaz přítomnosti rostlinných bílkovin v masných výrobcích je možný i v případě, že jsou použity ve formě koncentrátů a izolátů, tzn. že neobsahují vůbec nebo v minimální míře doprovodné polysacharidové struktury. V těchto případech se využívají histochemické metody, které popsali COOMARASWAMY, FLINT (1975), FLINT, LEWIN (1976) a CORTESI *et al.* (1977). Podobně mohou být prokázány i další přídavky, např. karagenany, pektiny aj. (FLINT 1990). Odlišit bílkoviny rostlinného a živočišného původu je také možné prostřednictvím citlivých imunohistologických metod. Pro stanovení sójové bílkoviny použili tyto metody BOUTTEN *et al.* (1997) – spojení s obrazovou analýzou umožnilo kvantitativní vyjádření výsledků.

Závěr

Histologické vyšetření je přímou metodou pro určení obsahových součástí masných výrobků, a to nejen jako pomocná, nýbrž v některých souvislostech jako jedinečná možnost pro zjištění odchylky od předepsaného složení výrobku. Pomocí histologické analýzy lze prokázat a identifikovat nejen součásti živočišného původu, ale

i přídavky původu rostlinného (např. vazné a zahušťovací prostředky). Postupně se rozšířilo a také změnilo spektrum technických možností pro mikroskopické vyšetřování a vzhledem ke změnám v technologii potravinářské výroby a používaným surovinám rovněž stanovení cílů vyšetření. Mikroskopické vyšetření umožňuje sledovat kvalitativní a kvantitativní složení výrobku a poskytuje spolehlivé informace o rozmístění všech jeho součástí. V současné době má k dispozici celou řadu možností pro zpracování a přípravu vzorků a také vyšetřovacích metod – od klasických až po ty, které využívají nejmodernějších technických zařízení.

Literatura

- AGUILERA J. M., STANLEY D. W. (1990): Microstructural principles of food processing and engineering. New York, Elsevier Sci. Publ. Ltd.
- ALBRECHT E., WEGNER J., ENDER K. (1996): Eine neue Methode zur objektiven Bewertung der Marmorierung von Rindfleisch. *Fleischwirtschaft*, 76: 95–98.
- AMBROSIADIS I., THEODORAKAKOS N., GEORGAKIS S., LAKKAS S. (1994): Einfluß verschiedener Auftaumethoden auf Fleischqualität und Tausaftbildung. *Fleischwirtschaft*, 74: 320–325.
- ANHALT G., WENZEL S. (1977): Verfahren zum Nachweis von Knochensubstanz in Gewebemengen und Bewertung von Knochengehalten in maschinell und manuell gewonnenem Restfleisch. *Arch. Lebensmittelhyg.*, 28: 161–166.
- BENTLER W. (1966): Die histometrische Auswertung von Leberpasteten, Leberkäse und Leberwürsten. *Fleischwirtschaft*, 46: 1114–1117.
- BENTLER W. (1968): Ein Beitrag zur Technik der histologischen Untersuchung von Rohwürsten. *Arch. Lebensmittelhyg.*, 19: 33–34.
- BÖHM R. (1956): Phasenkontrastmikroskopische Studien am Fleischbrät. *Zbl. Mikroskop. Fors. u. Method.*, 11: 224–230.
- BÖHM R., PLEVA V. (1956): Mikroskopie masa a surovin živočišného původu. Praha, SNTL.
- BÖHM R., PLEVA V. (1962): Mikroskopie masa a surovin živočišného původu. Praha, SNTL.
- BÖHM R., POKORNÝ V. (1953): Příprava prátu v uzenářství. *Prům. Potr.*, 4: 202.
- BÖLLING H., HILDEBRANDT G., KLARE H.-J., BÖHME G. (1992): Licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen an Formfleisch. *Fleischwirtschaft*, 72: 1579–1583.
- BOUTTEN B., HUMBERT C., CHELBI M., DA-RIZ V., PEYRAUD D. (1997): Association of immunohistological methods and image analysis for soy protein quantification in pork products. *Viandes et Produits Carnes*, 18: 145–149.
- BREHMER H. (1984): Nachweis von Sojaeiweiß und Geflügelfleisch in Fleischzeugnissen. Ringversuch-Ergebnisse. *Fleischwirtschaft*, 64: 1260–1261.
- BREHMER H., WENZEL S. (1968): Die Anwendung des Kryostatverfahrens für die histometrische Untersuchung von Rohwurst. *Arch. Lebensm.-Hyg.*, 19: 133–135.
- CAREY A. M., ARCHER J. N., PROIRE J. D., KOTULA A. W. (1984): Histological detection of cardiac musculature, soy flour and partially defatted tissue in ground beef: interlaboratory study. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 67: 16–20.
- COOMARASWAMY M., FLINT O. (1973): The Histochemical Detection of Soya „Novel Proteins“ In: Comminuted Meat Products. *Analyst*, 98: 542–545.
- CORTESI M. L., FARIELLO E., MARZADORI F. (1977): Sulla presenza della proteina di soia incorporata nell'impesto di

- insaccati crudi indagine istologica. *Archivo Veter. Ital.*, **28**: 137.
- FEIGL E. (1993): Histologischer Nachweis erhitzten und unerhitzten Sojamehls in Brühwürsten. *Fleischwirtschaft*, **73**: 1001.
- FLINT F. O. (1991): Chemical Aspects of Food Microscopy. In: *Proc. RMS*, **26**: 207–210.
- FLINT F. O. (1994): *Food Microscopy*. *Microscopy Handbooks* 30. Oxford, Bios Sci. Publ. Ltd.
- FLINT F. O., FIRTH B. M. (1981): A toluidine blue stain mount for the microscopy of comminuted meat products. *Analyst*, **106**: 1242–1243.
- FLINT F. O., FIRTH B. M. (1983): Histochemical demonstration of collagen in comminuted meat products. *Analyst*, **108**: 757–759.
- FLINT F. O., FIRTH B. M. (1988): Improved toluidine blue stain mount for the microscopy of food products. *Analyst*, **113**: 365–366.
- FLINT F. O., LEWIN Y. A. (1976): The histochemical demonstration of soya products in foodstuffs. *J. Fd. Technol.*, **11**: 137–142.
- FLINT F. O., MEECH M. V. (1978): Quantitative determination of texturised soya protein by a stereological technique. *Analyst*, **103**: 252–258.
- FLINT F. O., PICKERING K. (1984): Demonstration of collagen in meat products by an improved picro-sirius red polarisation method. *Analyst*, **109**: 1505–1508.
- GEISSLER A., GRABEN P., RAEUBER H.-J. (1988): Automatisierung des Kutterprozesses. 4. Licht und elektronenmikroskopische Untersuchungen der Veränderungen von Wurstbrät während des Kutterns. *Fleischwirtschaft*, **68**: 665–668.
- GERIGK K. (1961): Beurteilung von Rohwürsten auf Grund histologischer Untersuchungen. *Fleischwirtschaft*, **41**: 206–208.
- GERIGK K. (1963): Histologische Beurteilung von Brühwürsten. *Berliner Münchener Tierärztl. Wiss.*, **75**: 73–75.
- GISSSEL C., ANGERSBACH H. (1987): Nachweis kutaner Schleimhaut in Fleischerzeugnissen (Ursachen und Beurteilung). *Fleischwirtschaft*, **67**: 789–792.
- HEBEL R. D., KUSCHFELDT D. (1976): Histologische Darstellung von „toter“ Hefe in Fleischerzeugnissen. *Fleischwirtschaft*, **56**: 1456–1457.
- HECKMANN T., NEUMANN B., TSCHIRDEWAHN B., BENTLER W. (1992): Sojaprotein. Nachweis in Rohwurst und Brühwurst. *Fleischwirtschaft*, **72**: 1426–1427.
- HERMANSSON A.-M. (1992): The effects of salt on the microstructure of comminuted meat and its components. *Trends in Modern Meat Technology 3*. In: *Proc. Int. Food Technol. Expos. Conf.*, Haag, 15.–18. November 1992: 16–18.
- HILDEBRANDT G. (1979): Stellungnahme zu den „Richtlinien für die einheitliche Durchführung der histologischen Untersuchung von Fleischerzeugnissen“. *Fleischwirtschaft*, **59**: 521–528.
- HILDEBRANDT G., HIRST L. (1985): Determination of the collagen, elastin and bone content in meat products using television image analysis. *J. Food Sci.*, **50**: 568–571.
- HILDEBRANDT G., KÖNIGSMANN R., KRETSCHMER F.-J., RENNER H. (1977): Die Eignung der Fernsbild-Computer-Analyse zur histometrischen Kollagenbestimmung. *Fleischwirtschaft*, **57**: 689–697.
- HORN D. (1984): Kutane Schleimhaut in Fleischerzeugnissen. *Fleischwirtschaft*, **64**: 1321–1322.
- HORN D. (1987): Zum Nachweis pflanzlicher Eiweißzubereitungen in Fleischerzeugnissen mit histologischen Untersuchungsverfahren. *Fleischwirtschaft*, **67**: 616–618.
- HORN D. (1988): Zum histologischen Nachweis von Blutpulver in Fleischerzeugnissen. *Fleischwirtschaft*, **68**: 669–670.
- CHARVÁT Z. (1955): Modifikace Goldnerovy trichromové metody vhodná pro barevné odlišení hladké svaloviny a vazyva. *Českosl. Morfol.*, **3**: 184–185.
- CHEONG S. H., FISCHER A. (1993): Rasterelektronenmikroskopische Deutung der Wirkungsweise von Emulgatoren auf die Fettstabilisierung bei feinerkleinerer Leberwurst. *Fleischwirtschaft*, **73**: 677–683.
- JAHRESBERICHT (1995): Staatliches Veterinäruntersuchungsamt, Krefeld.
- KATSARAS K. (1991): Morphologische Grundlagen der Qualität von Wurstwaren. *Fleischwirtschaft*, **71**: 254–264.
- KATSARAS K., LINKE H. (1988): Deutung der Wirkung von Verarbeitungstechnologien mit dem Rasterelektronenmikroskop. *Fleischwirtschaft*, **68**: 216–218.
- KATSARAS K., PEETZ P. (1994): Sojaproteine. Wirkung auf die technologischen und morphologischen Eigenschaften von Brühwürsten. *Fleischwirtschaft*, **74**: 855–860.
- KATSARAS K., POSPIECH E. (1988): Morphologische Veränderungen der Rindermuskulatur beim Erhitzen. *Fleischwirtschaft*, **68**: 671–674.
- KATSARAS K., STENZEL R. (1983): Verschiedene Präparationsmethoden für Brühwurst zur Beobachtung im Rasterelektronenmikroskop. *Fleischwirtschaft*, **63**: 1061–1064.
- KATSARAS K., STENZEL R. (1984): Beobachtungen der Brühwurst-Mikrostruktur mit dem Raster- und Transmissions-Elektronenmikroskop. *Fleischwirtschaft*, **64**: 955–957.
- KATSARAS K., TISCHENDORF G. (1993a): Elektronenmikroskopie von Sojabohnen. *Fleischwirtschaft*, **73**: 675–676.
- KATSARAS K., TISCHENDORF G. (1993b): Untersuchungen zur Herstellung von proteinreichen Sojaweißprodukten. *Fleischwirtschaft*, **73**: 1076–1078.
- KATSARAS K., BÜSCH W., LINKE H. (1990): Morphologische Studien über die Veränderung der Streckfähigkeit von Rohwürsten. *Fleischwirtschaft*, **70**: 1078–1080.
- KATSARAS K., LINKE H., HAMMER G. (1986): Morphologische Grundlagen der Kochstreichwurst. *Fleischwirtschaft*, **66**: 1430–1432.
- KERSTEN W. (1963): Zur Technik der histologischen Wurstuntersuchung. Erfahrungen mit einer Entfettungs- und Fixierungsflüssigkeit sowie der Filtration. *Fleischwirtschaft*, **43**: 1033–1034.
- KERSTEN W. (1965): Zur Qualitätsbeurteilung von Rohwürsten auf Grund histometrischer Untersuchungen. *Fleischwirtschaft*, **45**: 109–110.
- KERSTEN W., FRIESS H. (1960): Ein Beitrag zur Messung kollagerer Substanzen in Brühwürsten. *Arch. Lebensm.-Hyg.*, **11**: 276–279.
- KLEIN H. (1965): Der histometrisch ermittelte Skelettmuskulaturanteil in Leberwürsten. *Fleischwirtschaft*, **45**: 799–780.
- KLEIN H., FLANDORFFER K., SZABO S. (1970): Untersuchungen zum quantitativen Nachweis von Herzmuskulatur. *Arch. Lebensm.-Hyg.*, **21**: 152–154.
- KLEMM G. (1966): Qualitätsbeurteilung von Frikadellen auf Grund histometrischer Untersuchungen. *Fleischwirtschaft*, **46**: 22–23.
- KÖNIGSMANN R., HILDEBRANDT G., SINELL H.-J. (1980): Quantitativer Knochenanweis in Fleischerzeugnissen mittels Fernsbildanalyse. I. Mitteilung. *Arch. Lebensm.-Hyg.*, **31**: 6–12.
- KOOLMEES P. A., BIJKER P. G. H. (1985): Histometric and chemical methods for determining collagen in meats. *Vet. Quart.*, **7**: 84–90.
- KOOLMEES P. A., BIJKER P. G., VAN LOGTESTIJN J. G., TUINSTRAMELGERS J. (1986): Histometrical and chemical analysis of mechanically deboned pork, poultry and veal. *Anim. Sci.*, **63**: 1830–183.

- KUSCHFELDT D. (1975): Zum histologischen Nachweis von Fremdeiweiß in Fleischerzeugnissen. *Fleischwirtschaft*, **55**: 1070–1071.
- KUSCHFELDT D. (1986): Zur rechtlichen Bewertung histologischer Befunde bei Fleischerzeugnissen. *Fleischwirtschaft*, **66**: 1723–1725.
- KUSCHFELDT D. (1994): *Lebensmittelhistologie für Institutierärzte*. Krefeld, SVUA.
- LINKE H. (1960): Histologische Untersuchung von Wurstkonserven. *Fleischwirtschaft*, **40**: 86–88.
- LINKE H. (1964): Die Verarbeitung von Geflügelhaut zu Fleischerzeugnissen. *Fleischwirtschaft*, **44**: 755–757.
- LINKE H. (1969): Histologischer Nachweis von „TVP“. *Fleischwirtschaft*, **49**: 469–471.
- LINKE H., GROSS B. (1973): Zur Bestimmung des Brätanteils bei „groben“ Bratwürsten. *Fleischwirtschaft*, **53**: 1109–1110.
- LINKE H., HILDEBRANDT G. (1980): Verkehrsauffassung über die Verwendung von Trüffeln bei Fleischerzeugnissen. *Fleischwirtschaft*, **60**: 2148–2150.
- LINKE H., THUMSER W. (1964): Zur Beurteilung von Knochen- und Knorpelgewebe in Roh- und Brühwürsten. *Arch. Lebensm.-Hyg.*, **9**: 201–203.
- LLEWELLYN J. W. (1979): Determination of non-meat protein in meat products. *IFFA*, 115–117.
- OELKER P. (1986): Elektronenoptische Beobachtungen der Ultrastruktur von Rohwurst. *Fleischwirtschaft*, **66**: 219–224.
- OELKER P. (1987): Elektronenoptische Beobachtungen über ultrastrukturelle Bedingungen der Fettemulgierung und Wasserbindung in Brühwurstbrät. 1. Untersuchungen über die ultrastrukturelle Bedingungen der Fettemulgierung. *Fleischwirtschaft*, **67**: 1405–1409.
- OELKER P. (1988): Elektronenoptische Beobachtungen über ultrastrukturelle Bedingungen der Fettemulgierung und Wasserbindung in Brühwurstbrät. 2. Untersuchungen über die ultrastrukturellen Bedingungen der Wasserbindung. *Fleischwirtschaft*, **68**: 116–119.
- OELKER P. (1995): Zur Fettemulgierung in feiner Leberwurst. *Fleischwirtschaft*, **75**: 1198–1201.
- OELKER P., PEETZ P. (1988): Elektronenmikroskopische Darstellung der Funktion von Fetten in Wurstwaren. *Fleischwirtschaft*, **68**: 1187–1192.
- PIPEK P., INGR I., PIPKOVÁ Z. (1998): *Falšování potravin – maso a masné výrobky*. *Výž. Potr.*, **53**: 170–172.
- PRÄNDL O. (1961): Die histologische Analyse von Wurstwaren. Grundlagen für die quantitative Auswertung histologischer Präparate. München, Gerhard Röttinger Verlag.
- PSOTA A., MERKL H., AUSSERLECHNER G. (1982): Nachweisbarkeit von Hühnerseparatormaterial in Brühwurst. *Ernährung*, **6**: 74–75.
- QUERNHORST H. (1965): Zur Frage der Wiederverarbeitung von Fehlfabrikaten und Wurstresten in Brühwürsten. *Fleischwirtschaft*, **45**: 24–25.
- REUSSE U. (1971): Polarisiertes Licht – eine Hilfe beim Nachweis von Sojamehl in Fleischerzeugnissen. *Arch. Lebensm.-Hyg.*, **22** (6): 136–137.
- SCHOLZ A., PAULKE T., EGER H. (1995): Bestimmung des Marmorierungsgrades beim Schwein. Einsatz der computer-gestützten Videobildanalyse. *Fleischwirtschaft*, **75**: 320–322.
- SCHÖNBERG F. (1958): *Atlas der histologischen Wurstuntersuchung*. Hannover, Verlag M. u. H. Schaper.
- SINELL H.-J., SCHMIDT O. C. (1961): Histologischer Nachweis und Zulässigkeit der erneuten Verarbeitung von Wurstteilen in frischem Brät. *Fleischwirtschaft*, **41**: 631–636.
- STÜRMER J., A., HILDEBRANDT G. (1986): Vergleichende Untersuchungen zum Bindegewebsnachweis in Hackfleisch-erzeugnissen. *Fleischwirtschaft*, **66**: 815–827.
- THIEL W. (1962): Die Wiederarbeitung von Fehlfabrikaten und Wurstresten in Brühwurst. *Fleischwirtschaft*, **43**: 1058–1063.
- TRZISZKA T., UIJTENBOOGAART T. G., SCHREURS F. J. G. (1993): Isolierte myofibrilläre Proteine aus mechanisch separiertem Geflügelfleisch. Produktmerkmale bei unterschiedlichen Verfahren. *Fleischwirtschaft*, **73**: 1069–1072.
- WEISS H., HILDEBRANDT G. (1971a): Statistische Beurteilung histometrischer Analysen im Rahmen der Lebensmittelüberwachung. 1. Mitteilung: Darstellung und Kritik der bislang eingesetzten Stichprobenverfahren Beurteilung von Fleisch- und Wurstwaren. *Fleischwirtschaft*, **51**: 1331–1334.
- WEISS H., HILDEBRANDT G. (1971b): Statistische Beurteilung histometrischer Analysen im Rahmen der Lebensmittelüberwachung. 2. Mitteilung: Optimaler Einsatz sequentieller Stichprobenverfahren zur qualitative Beurteilung von Fleisch- und Wurstwaren. *Fleischwirtschaft*, **51**: 1511–1513.
- WEISS H., HILDEBRANDT G. (1971c): Statistische Beurteilung histometrischer Analysen im Rahmen der Lebensmittelüberwachung. 3. Mitteilung: Vergleichende Betrachtung der statistischen Beurteilungsverfahren histometrischer Analysen unter Praxisbedingungen. *Fleischwirtschaft*, **51**: 1635–1636.
- WEISS H., HILDEBRANDT G. (1974): Statistische Beurteilung histometrischer Analysen im Rahmen der Lebensmittelüberwachung. 4. Mitteilung: Konstruktion geschlossener sequentieller Stichprobenpläne zur Qualitätsbeurteilung von Fleisch- und Wurstwaren. *Fleischwirtschaft*, **54**: 93–96.
- WENZEL A., ANHALT G., SCHAAL M., FRÖHNER H. (1974): Vergleichende Untersuchungen zum qualitativen und quantitativen Nachweis von Knochengewebe in Fleisch- und Wursterzeugnissen durch direkte und indirekte Verfahren. *Arch. Lebensm.-Hyg.*, **25**: 173–175.
- WICHMANN-SCHAUER H., JAHNS D.-T., HILDEBRANDT G. (1998): Histologischer Nachweis von Fischgräten. *Fleischwirtschaft*, **78**: 819–820.
- ZHAO S., LIU J., HUANG Y. (1990): Untersuchung der Ultrastruktur von Stärkekörnchen und Stärkewurst. *Fleischwirtschaft*, **70**: 209–210.
- ZIJDERVELD M. H. G., KOOLMEES P. A. (1990): Utility of immunohistochemical identification of muscle proteins in microstructural studies of comminuted meat products. *Meat Sci.*, **27**: 55–60.

Kontaktní adresa:

MVD. BOHUSLAVA TREMLOVÁ, Veterinární a farmaceutická univerzita, Brno, Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Ústav veterinárního hygienického dozoru, Palackého 1-3, 612 42 Brno, Česká republika, tel.: + 420 5 41 56 26 05, fax: + 420 5 41 56 29 03, e-mail: http://bohunka.t@seznam.cz

INSTRUCTIONS FOR AUTHORS

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

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

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

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

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

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

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

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

Results should be presented clear and concise.

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

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

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

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

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

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

POKYNY PRO AUTORY

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Poděkování se uvádí před přehled použité literatury.

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

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

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

Separáty: Autor obdrží zdarma 20 separátních výtisků práce.

Contents

Obsah

<p>► Antioxidant activities of rosemary and sage extracts in rapeseed and sunflower oils</p>	<p>Antioxidační účinnost extraktů z rozmarýny a šalvěže v řepkovém a slunečnicovém oleji</p>	<p>NGUYEN H. T. T. POKORNÝ J. KORCZAK J.</p>	<p>121</p>
<p>► Effect of processing and storage conditions on patulin content in apple juice concentrate</p>	<p>Vliv podmínek zpracování a skladování na obsah patulinu v jablčném koncentrátu</p>	<p>BRŮNA D., VOLDŘICH M. MAREK M. KAMARÁD J.</p>	<p>127</p>
<p>► Antioxidant activity and synergism of 2,6-dimethyl-3,5-diethoxycarbonyl-1,4-dihydropyridine(Diludin) with BHT and BHA</p>	<p>Antioxidační aktivita a synergismus 2,5-dimethyl-3,5-diethoxykarbonyl-1,4-dihydropyridinu (Diludinu) s BHT a BHA</p>	<p>TIRZITIS G. KIRULE I.</p>	<p>133</p>
<p>► Texture profile analysis applied to cooked potato</p>	<p>Analýza texturního profilu vařených brambor</p>	<p>BLAHOVEC J. ESMIR A. A. S., VACEK J.</p>	<p>136</p>
<p>Use of indirect conductometry for measuring CO₂ production by <i>Leuconostoc</i></p>	<p>► Tvorba CO₂ u bakterií rodu <i>Leuconostoc</i> stanovená pomocí nepřímé vodivostní metody</p>	<p>DRÁB V. KVASNIČKOVÁ E. ČERNÝ V.</p>	<p>143</p>
<p>Evaluation of antimutagenic activity of pressurized (pascalized) and pasteurized cauliflower juice</p>	<p>► Hodnocení antimutagenní aktivity tlakově ošetřené (paskalizované) a tepelně ošetřené (pasterované) květákové šťávy</p>	<p>SEDMÍKOVÁ M., TUREK B. BÁRTA I., STROHALM J. ŠMERÁK P., HOUŠKA M. MÜLLEROVÁ J.</p>	<p>149</p>
<p>REVIEW</p>	<p>REVIEW</p>		
<p>History and the present of microscopic examination of meat and meat products</p>	<p>► Historie a současnost mikroskopického vyšetřování masa a masných výrobků</p>	<p>TREMLOVÁ B.</p>	<p>153</p>