

**JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH**

**ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA**

**DISERTAČNÍ PRÁCE**

**Obsah antioxidantů v surovinách a jejich stabilita v obohacených  
potravinách v závislosti na technologii výroby**

**(The content of antioxidants in raw materials and their stability in  
enriched foods depending on the processing technology)**

**ING. JAN BEDRNÍČEK**

**ČESKÉ BUDĚJOVICE**

**2020**

**Autor:** ING. JAN BEDRNÍČEK

**Studijní program:** Zootechnika

**Studijní obor:** Zoohygiena a prevence chorob hospodářských zvířat

**Školící pracoviště:** Katedra potravinářských biotechnologií a kvality zemědělských produktů, Zemědělská fakulta, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

**Vedoucí školitel:** DOC. ING. EVA SAMKOVÁ, PH.D.

**Pracoviště:** Katedra potravinářských biotechnologií a kvality zemědělských produktů, Zemědělská fakulta, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

**Školitel specialista:** DOC. ING. PAVEL SMETANA, PH.D.

**Pracoviště:** Katedra potravinářských biotechnologií a kvality zemědělských produktů, Zemědělská fakulta, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

### ***Poděkování***

Rád bych tímto vyjádřil vděk svým školitelům doc. Ing. Evě Samkové, Ph.D. a doc. Ing. Pavlu Smetanovi, Ph.D. za jejich odborné vedení během celého studia i za jejich vstřícný a milý přístup, který mi pomohl po odborné i osobní stránce. Dík patří i Ing. Ivaně Laknerové, RNDr. Naděždě Vrchotové, CSc. a prof. Ing. Janu Třískovi, CSc. za jejich praktické rady a pomoc při chemických analýzách. Dále bych chtěl poděkovat všem členům Katedry potravinářských biotechnologií a kvality zemědělských produktů ZF JU a spoluautorům všech publikací za vytvoření přátelského pracovního kolektivu v průběhu celého mého studia. Ten největší dík ale patří mé rodině, která za mnou stála a pomáhala mi za všech okolností.

## ***Prohlášení***

Prohlašuji, že jsem disertační práci vypracoval samostatně podle pokynu vedoucích práce a za použití uvedené literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své disertační práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejich webových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací *Theses.cz* provozovanou *Národním registrem vysokých kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů*.

.....  
Ing. Jan Bedrníček

V Českých Budějovicích dne .....

## Seznam zkratek

A•	-	radikál antioxidantu
ABTS	-	2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonát): chemikálie; název chemické metody
AH	-	antioxidant: zkratka použita pouze v chemických rovnicích
AO	-	antioxidant
AOA	-	antioxidační aktivita
CPM	-	celkový počet mikroorganismů
DAD	-	diode array detector: detektor diodového pole
DNPH	-	2,4-dinitrofenylhydrazin: chemikálie; název chemické metody
DPPH	-	2,2-difenyl-1-pikrylhydrazyl: chemikálie; název chemické metody
EDTA	-	ethylenediaminetetraacetic acid: ethylendiamintetraoctová kyselina
ELSD	-	evaporative light scattering detector: odpařovací detektor rozptylu světla
FRAP	-	ferric reducing antioxidant power: název chemické metody
GC	-	gas chromatography: plynová chromatografie
GSH	-	glutathion
GSSH	-	glutathion disulfid
HNE	-	4-hydroxynonenal
HPLC	-	high performance liquid chromatography: vysokoúčinná kapalinová chromatografie
LC-MS/MS	-	liquid chromatography – tandem mass spektrometry: kapalinová chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií
MDA	-	malondialdehyd
MS	-	mass spectrometry: hmotnostní spektrometrie
MS/MS	-	tandemová hmotnostní spektrometrie
NIR	-	near infra-red spectroscopy: spektroskopie v blízké infračervené oblasti
ORAC	-	oxygen radical absorbance capacity: název chemické metody
PLE	-	pressurized liquid extraction: extrakce stlačenou kapalinou
R•	-	lipidový organický radikál
RI	-	refractive index: refrakční detektor
RONS	-	reactive oxygen and nitrogen species: reaktivní formy kyslíku a dusíku
ROO•	-	organický peroxy radikál
ROOH	-	hydroperoxid
SEC	-	size exclusion chromatography: vylučovací chromatografie
SPE	-	solid phase extraction: extrakce tuhou fází
SWE	-	subcritical water extraction: extrakce subkritickou vodou
TBARS	-	thiobarbituric acid reactive substances: sloučeniny reagující s kyselinou barbiturovou
TE	-	trolox equivalent: ekvivalent troloxu
UV	-	ultraviolet: ultrafialové
UV-VIS	-	ultraviolet-visible: ultrafialová a viditelná část světla

# Obsah

1	Úvod .....	8
2	Literární přehled .....	9
2.1	Antioxidanty – charakteristika a rozdělení .....	9
2.2	Polyfenolické antioxidanty .....	13
2.2.1	Charakteristika a rozdělení .....	13
2.2.2	Význam polyfenolických antioxidantů.....	18
2.2.3	Zdroje polyfenolických antioxidantů.....	21
2.2.3.1	Rostlinné zdroje polyfenolických antioxidantů .....	21
2.2.3.2	Rostlinné odpadní produkty jako zdroj polyfenolických antioxidantů .....	25
2.3	Přírodní polyfenoly jako přídatné látky v potravinářství.....	27
2.3.1	Polyfenoly a údržnost potravin.....	27
2.3.2	Příklady použití polyfenolů jako potravinářských antioxidantů.....	31
2.3.3	Nevýhody využívání polyfenolů v potravinářství .....	32
2.3.4	Fortifikované a funkční potraviny .....	33
2.3.5	Právní předpisy týkající se využití antioxidantů v potravinářství .....	36
2.4	Metody stanovení polyfenolů a antioxidačních vlastností potravin .....	38
2.4.1	Metody stanovování polyfenolů a jejich antioxidační aktivity.....	38
2.4.1.1	Metody extrakce polyfenolů .....	38
2.4.1.2	Analytické metody stanovení polyfenolů.....	40
2.4.2	Metody stanovení antioxidační aktivity.....	44
2.4.3	Metody stanovení míry oxidace lipidů a proteinů .....	44
3	Cíl práce.....	47
4	Materiál a metodika .....	49
4.1	Materiál .....	49
4.2	Metodika .....	50
4.2.1	Příprava fortifikovaných potravin.....	50
4.2.2	Analytické metody.....	50
5	Výsledky a diskuze .....	52
5.1	Vliv extraktu z rozmarýnu na skladovatelnost rybích filet.....	53
5.2	Vodné extrakty z cibulových slupek jako zdroj antioxidantů pro masné výrobky .....	70

5.3	Cibulové odpady jako zdroj biologicky aktivních látek pro bezlepkové pečivo .....	82
5.4	Mouka z cibulových slupek jako zdroj antioxidantů pro masné výrobky .....	99
6	Závěr .....	131
7	Souhrn.....	132
8	Summary.....	133
9	Seznam literatury .....	134
10	Seznam tabulek, grafů a obrázků.....	147
11	Prohlášení spoluautorů.....	149
12	Přílohy .....	150
12.1	Publikace v časopise s impakt faktorem.....	150
12.2	Publikace v recenzovaných časopisech .....	150
12.3	Příspěvky na konferencích a ve sbornících .....	151
12.4	Kapitola v knize.....	151
12.5	Aplikované výsledky .....	152

## 1 ÚVOD

Přírodní polyfenolické látky jsou sekundární metabolity rostlin, které se vyskytují téměř ve všech rostlinných surovinách určených pro lidskou výživu. Vyznačují se různými vlastnostmi, které mohou mít pozitivní vliv na lidské zdraví. Jedná se zejména o antioxidační, protizánětlivé, antikarcinogenní a mnohé další účinky. S ohledem na tyto pozitivní účinky se polyfenoly mohou používat v potravinářství. Mají potenciál nahradit syntetické antioxidanty, které se přidávají do potravin pro potlačení oxidačních procesů, jejichž nežádoucí produkty mohou negativně ovlivňovat sensorické i nutriční vlastnosti výrobků a následně mohou mít i negativní dopad na zdraví lidí.

V přírodě lze nalézt mnoho rostlinných zdrojů, které jsou pro získávání, resp. extrakci polyfenolů vhodné. Jedná se např. o odpadní nebo vedlejší produkty vznikající při zpracování ovoce, zeleniny, zrnin či bylin. Tyto odpady jsou tvořeny většinou nekonzumovatelnými částmi rostlin, v nichž je obsah polyfenolů mnohdy vyšší než v části konzumovatelné. Využívání vedlejších rostlinných produktů jako zdroje polyfenolů v potravinářství má tu výhodu, že se z potravinového řetězce tyto látky neztrácejí.

Suroviny bohaté na polyfenoly mohou být do potravin přidávány v různých formách, jako čisté sypké extrakty, mletý prášek (mouka) nebo vodné výluhy. V případě přidání namleté suroviny nejsou přidávány jen polyfenoly, ale také jiné technologicky a nutričně prospěšné látky, např. vláknina. Různé formy surovin s polyfenoly mohou nicméně ovlivnit sensorické vlastnosti, které jsou spolu s cenou pro zákazníka stěžejním kritériem pro výběr potravin. Z těchto důvodů je důležité ověřit při tvorbě receptury, jaká forma a množství bude účinné a zároveň negativně neovlivní některé vlastnosti potravin, které by pak mohly konzumenty odradit.



## 2 LITERÁRNÍ PŘEHLED

### 2.1 ANTIOXIDANTY – CHARAKTERISTIKA A ROZDĚLENÍ

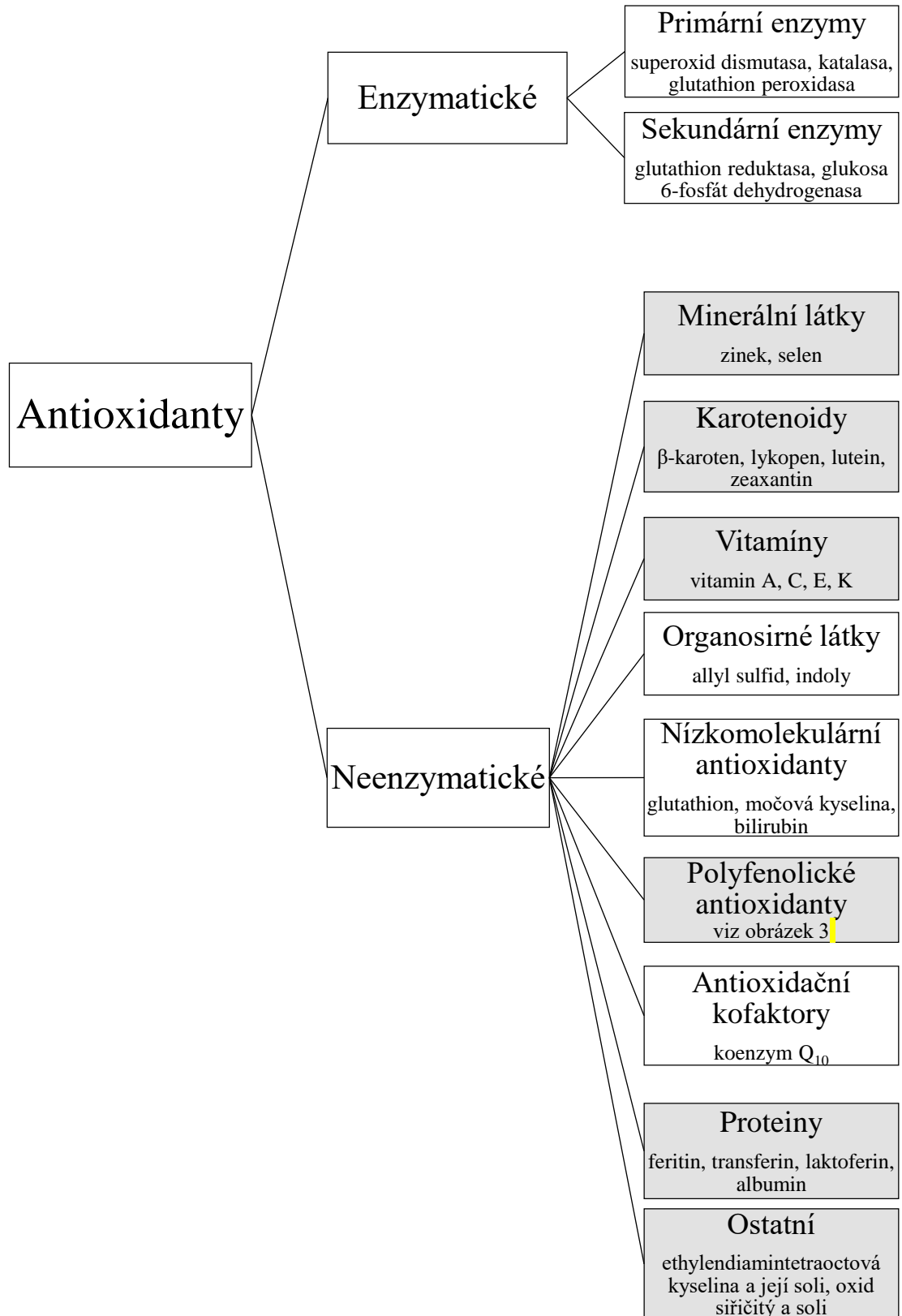
Antioxidanty (AO) jsou širokou skupinou látek, které mají společné vlastnosti. Existuje pro ně mnoho definicí, které jsou různě vhodné pro různé vědní obory. Halliwell (2007) definuje AO jako jakoukoliv látku, která oddaluje, zabraňuje či odstraňuje oxidační poškození cílové molekuly. V této souvislosti pojem cílové molekuly zahrnuje primárně proteiny, lipidy, polysacharidy či látky nesoucí dědičnou informaci (DNA). Khlebnikov et al. (2007) tuto definici rozšiřují a popisují AO jako jakoukoliv látku, která přímo zachytává reaktivní formy kyslíku nebo nepřímo působí jako pozitivní regulátor antioxidační obrany nebo inhibuje produkci reaktivních forem kyslíku. Tyto dvě definice najdou uplatnění spíše v biologických vědách. Z pohledu potravinářského však může být AO látkou, která prodlužuje trvanlivost potravin a oddaluje zhoršování kvality způsobené oxidací (Sindhi et al., 2013).

AO jsou velmi různorodou skupinou látek, u kterých se lze setkat jak s nízkou (desítky až stovky Da, např. gallová kyselina), tak s vysokou (desítky tisíc Da, např. glutathion peroxidasa) molekulovou hmotností. V literatuře se vyskytuje početné množství dělení AO, podle různých hledisek. Jedním z nejčastěji používaných rozdělení AO je dle jejich enzymatické povahy: na enzymatické a neenzymatické. Toto rozdělení je znázorněno na obrázku 1.

AO se také často dělí podle toho, zda se mohou tvořit v živočišném organismu. Ty, které jsou takto syntetizovány, se nazývají endogenní a patří mezi ně superoxid dismutasa, katalasa či albumin aj. Druhou skupinou jsou exogenní AO, které živočišný organismus není schopen syntetizovat. Mezi ně se řadí např.  $\alpha$ -tokoferol nebo flavonoidy (Pisoschi a Negulescu, 2011).

Velkou řadu AO je také možné vyrábět průmyslově, proto se lze setkat s dělením na syntetické (butylovaný hydroxytoluen, trolox aj.) a přírodní, kam se řadí značná část AO (Augustyniak et al., 2010).

Obrázek 1. Schématické rozdělení antioxidantů.



Zdroj: upraveno podle Elias et al., 2008 a Shalaby a Shanab, 2013. Šedě vyznačené skupiny mají potravinářské uplatnění.

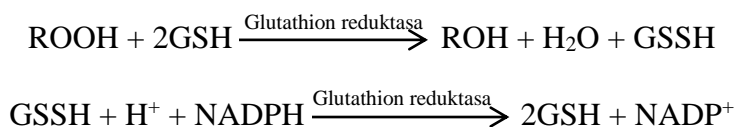
Z potravinářského hlediska je poměrně důležité dělení podle mechanismu účinku, na základě kterého se rozdělují do čtyř skupin (Velíšek a Hajšlová, 2009), a to na:

- 1) primární,
- 2) sekundární,
- 3) sekvestranty a
- 4) lapače kyslíku.

V prvním případě, tedy u primárních AO, dochází k tomu, že látka reaguje s volným radikálem, např. peroxylovým (ROO•; více o volných radikálech v kapitole 2.2.2) tím způsobem, že mu předá vodík, čímž jej převádí do méně reaktivní formy, např. na hydroperoxydy (ROOH). V tomto okamžiku přechází sám AO do radikálové formy, ale je natolik stabilní, že již těžko reaguje s ostatními látkami a dochází tak k přerušení řetězové reakce. Tímto způsobem dochází k tzv. zhášení volných radikálů. (Jomova et al., 2014). Z potravinářského hlediska je tato skupina AO velmi důležitá a řadí se mezi ně L-askorbová kyselina, polyfenolické látky, tokoferoly, karotenoidy a další. Mechanismus působení primárních AO lze vyjádřit touto rovnicí:

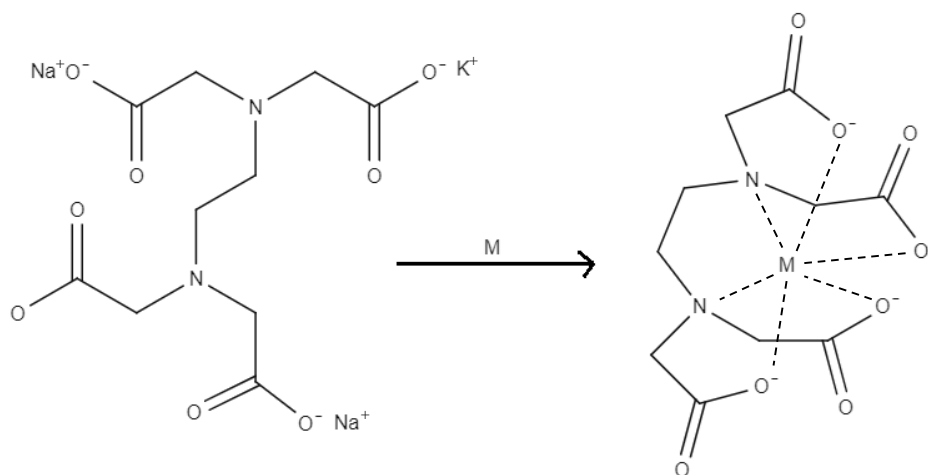


Sekundární AO jsou schopné odstraňovat již vzniklé hydroperoxydy (ROOH) a přeměňovat je na méně reaktivní formy (organické hydroxidy, ROH) za vzniku vody. Sekundárním AO je např. tripeptid glutathion (GSH) a s ním související enzymy glutathion peroxidasa a glutathion reduktasa. Glutathion a jeho enzymatický systém odstraňují hydroperoxydy (ROOH) tak, že je přeměňují na méně reaktivní formy (organické hydroxidy) za vzniku vody a glutathion disulfidu (GSSH). Tyto AO jsou však účinné pouze v syrovém materiálu a neuplatňují se v potravinářské výrobě (Tolinski, 2015; Stratil a Kubáň, 2018). Mimo jiné patří do této skupiny methionin. Mechanismus působení glutathionu je znázorněn rovnicí:

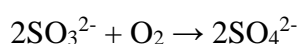


Sekvestranty, čili chelatační činidla, dokáží poutat ionty přechodných kovů s prooxidačními vlastnostmi do komplexů (chelátů), čímž je převedou do neaktivní formy. Negativní účinky přechodných kovů, zejména mědi a železa, spočívají především v jejich prooxidačních vlastnostech, které mohou vést k nežádoucím změnám v potravinách, jako je zhoršení barvy a chuti. Nejznámějším sekvestrantem je ethylendiamintetraoctová kyselina (EDTA) a její soli, disodné, disodno-vápenaté nebo disodno-draselné (obrázek 2). Dalším příkladem sekvestrantů je citronová kyselina, polyfenoly či polyfosfáty (Damodaran et al., 2008; Wei et al., 2016). V potravinářství jsou velmi významné, používají se do majonéz nebo některých pomazánek.

Obrázek 2. Schématické zobrazení antioxidačního účinku disodno draselné soli ethylendiamintetraoctové kyseliny.



Poslední skupinou AO jsou lapače kyslíku. Jsou to látky, které přímo reagují s kyslíkem a vytvářejí s ním sloučeniny. Nejvýznamnějším lapačem kyslíku je oxid siřičitý, který reaguje s vodou za vzniku kyseliny siřičité. Po disociaci reaguje vzniklý siřičitan s rozpuštěným kyslíkem za vzniku síranu (Dvořák et al., 2006). Siřičitany se používají převážně ve vinařství, pivním průmyslu, ale i do sušeného ovoce. Mechanismus jejich působení je vyjádřen následující rovnicí:



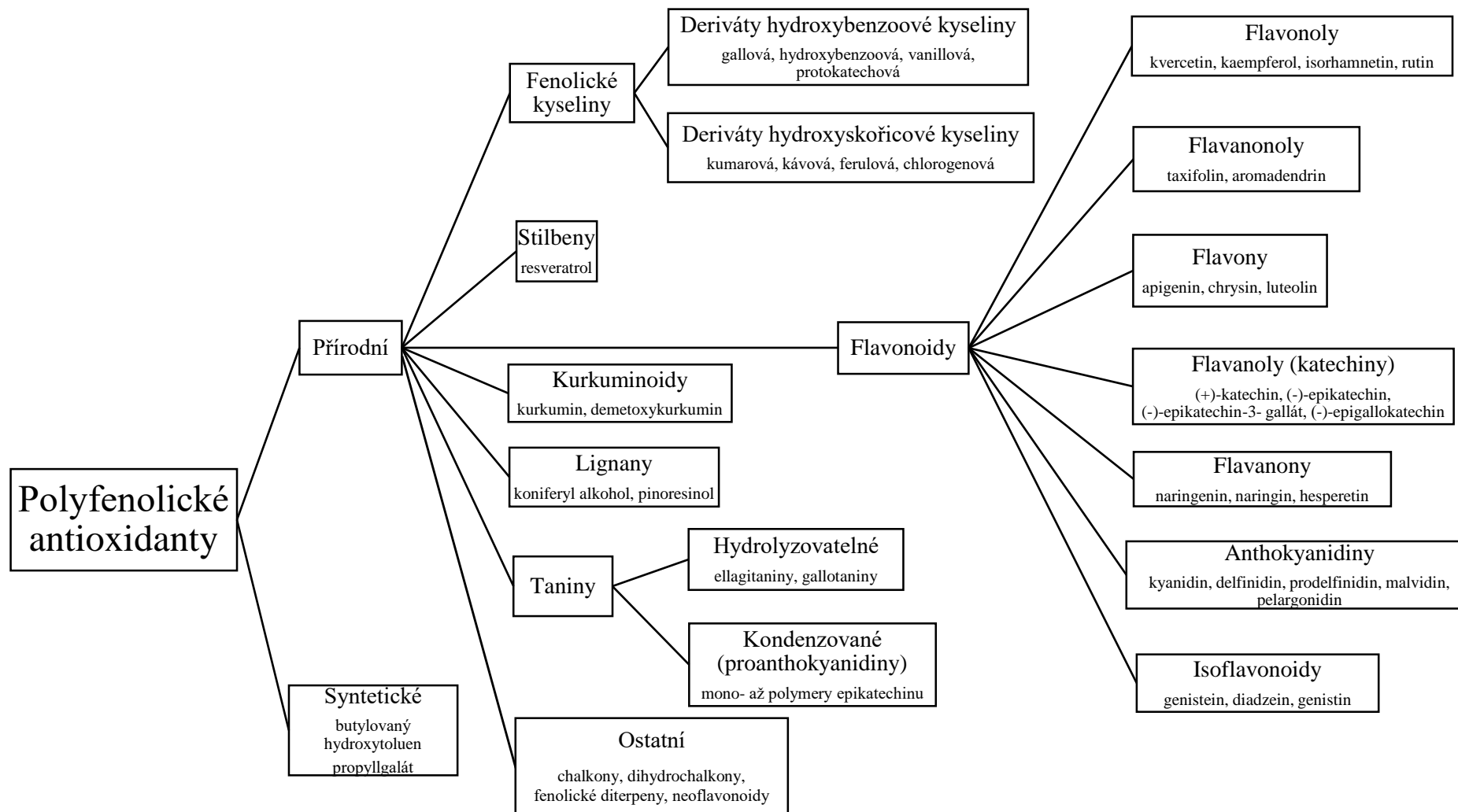
## **2.2 POLYFENOLICKÉ ANTIOXIDANTY**

Tato práce je zaměřena na polyfenolické AO, a proto jim bude věnována větší pozornost a budou popsány více do detailu. Je to skupina látek, která je v rostlinné říši velmi rozšířená a má zajímavé chemické a biologické vlastnosti, které lze využít v potravinářské výrobě. Dalším důvodem je i to, že oproti některým vitaminům s antioxidačními vlastnostmi (vitamin C a E) nejsou tak dobře popsány a prozkoumány.

### **2.2.1 Charakteristika a rozdělení**

V rostlinách bylo identifikováno několik tisíc molekul, které mají polyhydroxyfenolickou strukturu, tedy několik hydroxylových skupin na aromatických jádrech (Hartmatha, 2005). Podle chemické struktury lze rozlišit tyto skupiny: fenolické kyseliny, flavonoidy, stilbeny, lignany, taniny nebo kurkuminoidy (Manach et al., 2004), viz obrázek 3. Všechny vyjmenované skupiny látek se dnes souhrnně označují jako polyfenoly (Williamson, 2017). Do polyfenolických AO se mohou řadit také fenolické diterpeny (Baño et al., 2003).

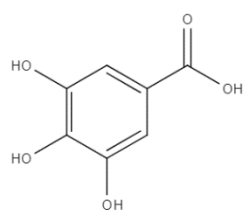
Obrázek 3. Rozdělení polyfenolických antioxidantů.



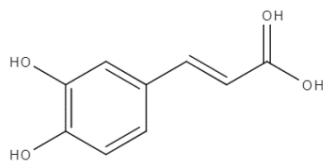
Výskyt polyfenolů v rostlinách je úzce spjat s aminokyselinou fenylalanin, která vzniká v tzv. šikimátové cestě. Fenylalanin poté vstupuje do tzv. fenylpropanové dráhy, kde po deaminaci vzniká skořicová kyselina a ta následnými reakcemi dává vznik tisícům různých fenolických látek (Chouhan et al., 2017).

Polyfenolické AO se následně dělí do mnoha skupin (obrázek 4) podle typu chemické struktury, která se nazývá skelet. Nejjednodušší šestiuhlíkatý skelet C<sub>6</sub>-C<sub>1</sub> mají deriváty hydroxybenzoové kyseliny. O něco složitější strukturu C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub> mají deriváty hydroxyskořicové kyseliny. Spojením C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> vznikají flavonoidy, spojením C<sub>6</sub>-C<sub>4</sub>-C<sub>6</sub> některé lignany. Velice komplikované struktury pak vznikají spojením různých skeletů, jako jsou kondenzované taniny, např. prokyanidin B2 vzniká spojením dvou jednotek se skeletem C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> (Harmatha, 2005; Tsao, 2010).

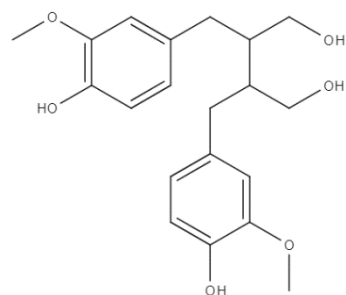
Obrázek 4. Chemické struktury polyfenolických antioxidantů.



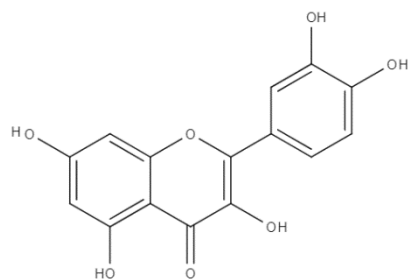
Derivát hydroxybenzoové kyseliny: gallová kyselina



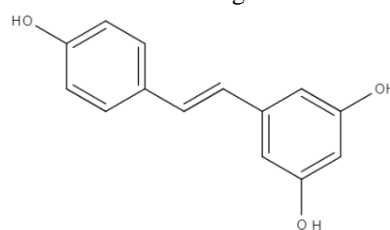
Derivát hydroxyskořicové kyseliny: kávová kyselina



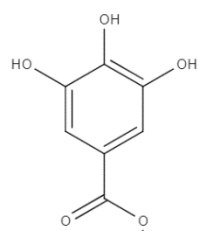
Lignan: secoisolariciresinol



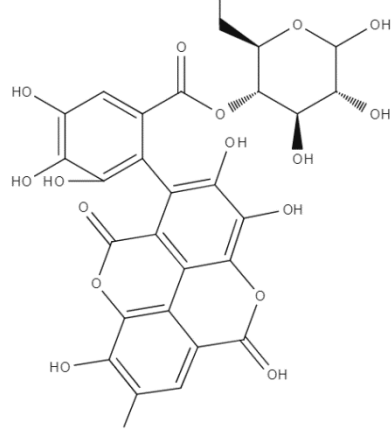
Flavonoid: kvercetin



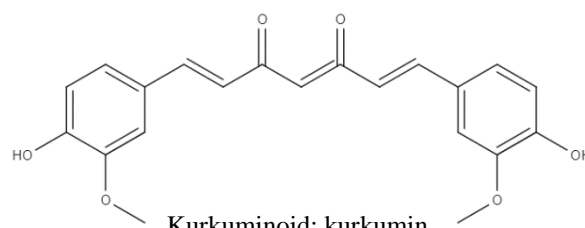
Stilben: resveratrol



Kurkuminoid: kurkumin



Hydrolyzovatelný tannin: terflavin B



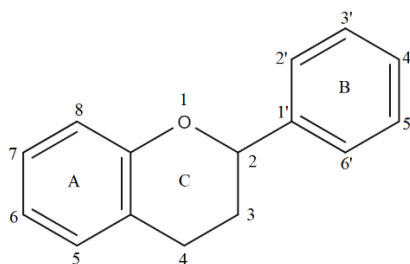
Kondenzovaný tannin: prokyanidin B2

Flavonoidy jsou nejrozšířenějším zástupcem polyfenolů a jsou přítomné ve většině rostlinných zdrojů. Jejich struktura vychází z 15uhlíkatého C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> flavanu a je reprezentována dvěma benzenovými kruhy A a B, spojenými heterocyklickým trojúhelníkatým kruhem C (obrázek 5). Flavan je proto základním meziproduktem při



syntéze dalších druhů flavonoidů. Velká diverzita této skupiny pak vyplývá z počtu a polohy hydroxylových, methylových a methoxylových skupin, dále může docházet až k polymeraci a velmi často i k O-glykosylaci, tedy k navázání necukerného flavonoidu (aglykonu) na cukernou (glykosidickou) část. Glykosidické části mohou být převážně monosacharidy, jako D-glukosa, L-rhamnosa, galaktosa, arabinosa či disacharid rutinosa (Dugas et al., 2000; Tapas et al., 2008; Chouhan et al., 2017; Wang et al., 2018).

Obrázek 5. Chemická struktura flavanu, základní stavební jednotky flavonoidů.

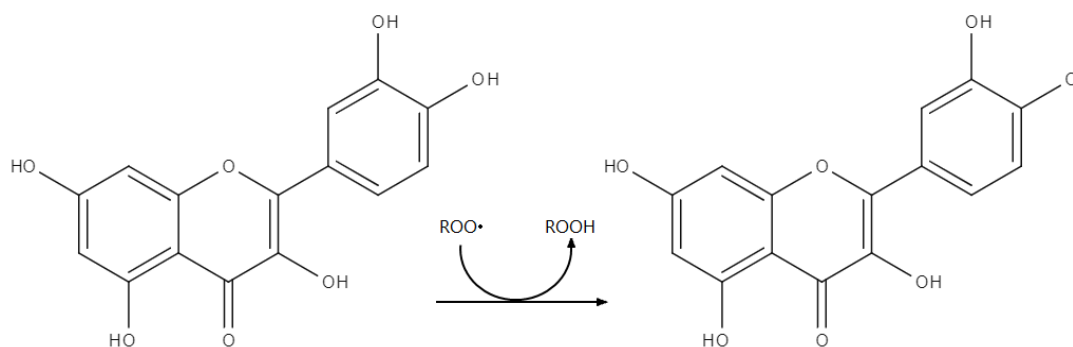


Díky velké rozmanitosti v chemické struktuře se flavonoidy dělí na flavonoly, flavanonoly, flavony, flavanoly (katechiny), flavanony, anthokyanidiny a isoflavonoidy (Shahidi a Ambigaipalan, 2015). Dále se mohou mezi flavonoidy řadit i méně časté neoflavonoidy, které nejsou odvozeny od flavanu, a chalkony s otevřeným C kruhem (Tsao, 2010). Některé látky z těchto skupin jsou v rostlinné říši velmi rozšířené a některé jsou omezeny pouze na určitou taxonomickou kategorii, například luskoviny jsou typické vysokým obsahem isoflavonoidů (Panche et al., 2016).

Z hlediska mechanismu působení jsou polyfenoly řazeny mezi primární AO, protože jsou schopné převádět volné radikály do neaktivní formy a také mezi sekvestranty, protože dokáží vytvářet komplexy s prooxidačně působícími přechodnými kovy (Leopoldini et al., 2011).

Jako primární AO působí tak, že předají radikálu např. peroxylovému ( $\text{ROO}\cdot$ ) vodík, čímž vzniká méně reaktivní hydroperoxid ( $\text{ROOH}$ ). Nízká reaktivita vzniklého (fenoxy) radikálu vychází z delokalizace nepárového elektronu okolo aromatického kruhu. Tento jev se nazývá stabilizace resonancí (Shahidi a Ambigaipalan, 2015). Mechanismus antioxidačního účinku polyfenolů je znázorněn na obrázku 6.

Obrázek 6. Schématické zobrazení antioxidačního účinku kvercetinu.



Jak uvádí Rice-Evans et al. (1996), antioxidační aktivita (AOA) je ovlivněna strukturou látky, resp. počtem, ale i polohou hydroxylových skupin a dvojných vazeb. Například kvercetin má zhruba dvojnásobnou *in vitro* AOA oproti katechinu, a to i přesto, že oba tyto flavonoidy mají stejný počet i polohu (na uhlících 3, 5, 7, 3', 4') hydroxylových skupin. Kvercetin, na rozdíl od katechinu, má však v C kruhu dvojnou vazbu mezi 2. a 3. uhlíkem a také 4-oxoskupinu. To poukazuje na důležitost přítomnosti dvojných vazeb v C kruhu, která umožňuje delokalizaci elektronu v tomto kruhu, čímž se stabilizuje vzniklý radikál AO. Vyšší AOA než má kvercetin vykazovaly jen epikatechin gallát a epigallokatechin gallát, které mají 8, resp. 9 hydroxylových skupin. Na AOA má vliv i přítomnost glykosidické části. Například glykosylace kvercetinu na uhlíku 3 v kruhu C, jako je tomu u rutinu, významně snižuje schopnost zhaset volné radikály (Pietta, 2000).

### 2.2.2 Význam polyfenolických antioxidantů

Jak již bylo uvedeno, polyfenolické AO jsou sekundární rostlinné metabolity, a právě v rostlinném organismu plní tyto látky mnohé funkce. Primární úlohou je ochrana rostlin proti plísním, býložravcům, patogenům a oxidačnímu stresu, protože fungují jako UV filtr ve slupkách, kde jsou přítomny v nejvyšších koncentracích. Polyfenoly také působí jako stimulant, který přitahuje hmyz ke zdroji potravy a k opylení rostliny. Názorným příkladem jsou anthokyany zbarvující květy či plody ovoce a zeleniny od červené přes růžovou a fialovou po modrou (Cook a Samman, 1996; Stevanato et al., 2014). Z hlediska sensorických vjemů jsou některé polyfenoly

zodpovědné i za trpkost a hořkost konzumovaných částí rostlin či z nich vyrobených produktů (Troszyńska et al., 2010).

Se senzorickými vlastnostmi a obranou rostliny před biotickými a abiotickými vlivy souvisí i enzymatické hnědnutí ovoce a zeleniny, které nastává po mechanickém poškození tkání rostliny nebo po napadení patogenem. Za změnu barvy jsou zodpovědné enzymy polyfenol oxidasa a polyfenol peroxidasa, které rozkládají za přítomnosti kyslíku polyfenolické látky na o-chinony, které následně polymerizují, čímž se vytváří tmavé pigmenty. Vznikají tak látky s antimikrobiálními a antifungálními vlastnostmi, kterými se rostlina brání. Tento proces je z hlediska kvality produktu obecně brán jako nežádoucí (vyjma např. výroby černého čaje), protože je spojován se zhoršením senzorických a nutričních vlastností (Fuerst et al., 2014; Singh et al., 2018).

Polyfenoly mají význam i pro člověka. Bylo zjištěno, že konzumace potravin bohatých na polyfenolické AO je spojována s řadou zdravotních benefitů (Fraga et al., 2019). Mnoho intervenčních, *in vitro* a epidemiologických studií podporuje roli polyfenolů při boji proti rozvoji tzv. chronických onemocnění (Williamson, 2017). Chronické neboli civilizační nemoci jsou neinfekční degenerativní onemocnění, jako diabetes mellitus, kardiovaskulární choroby, rakovina, autoimunitní nemoci, Alzheimerova choroba a mnoho dalších (Kopp, 2019). Na vzniku těchto chorob se do značné míry podílí oxidační stres, což je stav organismu, kdy převládá koncentrace tzv. reaktivních kyslíkových a dusíkových forem (anglicky RONS – reactive oxygen and nitrogen species; příklady znázorňuje tabulka 1), radikálových i neradikálových, nad látkami s antioxidačními vlastnostmi (Birben et al., 2012). RONS jsou látky, které vznikají přirozeně v buňkách živého organismu, nicméně nadměrný příjem je ovlivněn také exogenními vlivy. Mezi ty se řadí zejména znečištěná voda či ovzduší, průmyslová rozpouštědla, radiace, kouření, užívání drog a také nezdravé stravovací návyky – konzumace alkoholu, uzeného masa, oxidovaných tuků a olejů aj. (Liguori et al., 2018). Volné radikály (jakožto podskupina, patřící do skupiny RONS) jsou látky nebo fragmenty látek, které mají jeden nebo více nepárových elektronů, což je činí vysoce reaktivní (Poprac et al., 2017). Tyto látky poté indukují oxidaci důležitých molekul v těle (např. lipidy, proteiny, DNA), čímž mění jejich vlastnosti a funkce (Lykkesfeldt, 2007). Panche et al. (2016) uvádí, že funkce polyfenolů při ochraně organismu před oxidačním stresem stále není plně pochopena, ale jako jedna

z nejdůležitějších vlastností se zdá být právě antioxidační schopnost, která dokáže regulovat peroxidaci lipidů způsobenou volnými radikály.

Tabulka 1. Příklady reaktivních kyslíkových a dusíkových forem.

Radikálové (tzv. volné radikály)	Chemická značka	Neradikálové	Chemická značka
Superoxidový anion	$O_2^{\bullet-}$	Peroxid vodíku	$H_2O_2$
Hydroxylový radikál	$\bullet OH$	Singletový kyslík	$^1O_2$
Hydroperoxylový radikál	$\bullet OOH$	Kyselina chlorná	$HClO$
Peroxylový radikál	$ROO\bullet$	Ozón	$O_3$
Alkoxylový radikál	$RO\bullet$	Peroxynitritový radikál	$ONOO\bullet$
Radikál oxidu dusnatého	$NO\bullet$		

Zdroj: upraveno podle Birben et al., 2012 a Poprac et al., 2017

Přibývají také studie, které dokazují velice specifické mechanismy účinku polyfenolů nespočívající přímo v antioxidačních vlastnostech. Mezi ně se řadí protizánětlivé vlastnosti, modulace funkce enzymů, regulace exprese genů a další (Joven et al., 2011; Panche et al., 2016). Polyfenolům je také přisuzováno, že *in vivo* dokáží zlepšit metabolismus tuků, snížit tělesnou hmotnost, krevní tlak a také hladinu glukózy v krvi (Tresserra-Rimbau et al., 2017), což jsou rizikové faktory pro vznik některých výše zmíněných onemocnění (diabetes, kardiovaskulární choroby).

Některé polyfenoly mají estrogení účinky, protože jsou strukturně a/nebo funkčně podobné endogennímu estrogeneru. V této souvislosti jsou označovány jako fytoestrogeny. Jedná se převážně o isoflavonoidy (např. diadzein, genistein) ze sóji, kterým jsou přiřítány různé zdravotní benefity. Nejčastěji se uvádí ochranný efekt proti vzniku osteoporózy, srdečním chorobám, rakovině prsu a také zmírňující symptomy menopauzy. Na druhou stranu jsou také označovány jako endokrinní disruptory, které mohou mít potenciálně negativní účinky na zdraví žen v souvislosti s rakovinou prsu. Riziko jejího vzniku do určité míry podporuje estrogen, který podněcuje růst rakovinných buněk (Patisaul a Jefferson, 2010).

V posledních letech se výzkum zaměřuje také na interakci polyfenolů a střevní mikrobioty. I přesto, že mechanismus není přesně znám, předpokládá se, že některé

polyfenoly mohou regulovat růst patogenních bakterií, zatímco jiné mohou podporovat růst bifidobakterií. Tyto výsledky naznačují, že takovéto interakce mohou snižovat riziko chronických nemocí a také zvyšovat inzulinovou senzitivitu a předcházet vzniku aterosklerózy. Rovněž se předpokládá, že polyfenoly podporují prospěšné působení probiotik (Cory et al., 2018).

Díky výše uvedeným vlastnostem je v posledních letech o přírodní polyfenolické AO velký zájem, což dokazuje velký počet publikací zaměřených na využití polyfenolů jako nutraceutik (Tomé-Carneiro a Visioli, 2016), látek vhodných do kosmetických (Buzanello et al., 2019) nebo potravinářských výrobků (Papuc et al., 2017).

Na druhou stranu Pandareesh et al. (2015) upozorňují, že účinky polyfenolů jsou přímo závislé na biodostupnosti (vstřebatelnosti), která je obecně poměrně malá a závisí na mnoha faktorech.

Udává se, že člověk za den přijme zhruba 1 g polyfenolů, z nichž největší část zaujímají flavonoidy a fenolické kyseliny (Bahadoran et al., 2013; Zamora-Ros et al., 2018).

Po zkonzumování potravin obsahujících polyfenoly dochází k jejich enzymatickým přeměnám v tenkém i tlustém střevě a v játrech. Většina polyfenolů podléhá hydrolýze v tenkém střevě, kde se uvolňuje aglykonická část, popřípadě může k hydrolýze docházet až v tlustém střevě pomocí mikrobiálních enzymů. Následuje pasivní difuze střevní stěnou, při které dochází ke konjugaci a vzniku nových metabolitů, z chemického hlediska jde o glukuronidaci, metylaci a sulfataci. Další změny probíhají v játrech a odtud se metabolity rozvádí po těle krví nebo dochází k jejich vylučování (Thilakarathna a Rupasinghe, 2013).

### **2.2.3 Zdroje polyfenolických antioxidantů**

#### **2.2.3.1 Rostlinné zdroje polyfenolických antioxidantů**

Polyfenoly jsou nejhojněji se vyskytující AO v naší stravě a jsou přirozenou složkou různých druhů ovoce, zeleniny, cereálií, oliv, luštěnin, čokolády, koření, bylin, čaje, kávy nebo vína. Některé z polyfenolů jsou vázané na konkrétní

taxonomickou kategorií. Například flavanony se nachází primárně v citrusových plodech, isoflavonoidy v luskovinách nebo floridzin v jablkách. Opakem je třeba flavonol kvercetin, který se vyskytuje téměř ve všech rostlinných produktech: v zelenině, cereáliích, luskovinách, čaji, víně (D'Archivio et al., 2007). Příklady polyfenolů, jejich zdroje a přibližné obsahy shrnuje tabulka 2.

Tabulka 2. Zdroje a příklady vybraných polyfenolů v potravinách a jejich přibližný obsah.

<b>Skupina polyfenolů</b>	<b>Polyfenol</b>	<b>Příklad potravin</b>	<b>Obsah (mg/kg)*</b>
Flavonoly	kvercetin myricetin kaempferol	černý a zelený čaj, bílé a červené víno, vlašské ořechy, mandle, jablko se slupkou, pomeranče, borůvky, černá čokoláda, syrový špenát, cibule, brukvovité (např. květák, brokolice)	většinou desítky až stovky, v cibuli až tisíce
Flavanoly (katechiny)	(+)-katechin (-)-epikatechin (+)-gallokatechin (-)-epikatechin-3-gallát (-)-epigallokatechin-3-gallát	černý a zelený čaj, bílé víno, mandle, lískové oříšky, jablko se slupkou, borůvky, černá čokoláda	zhruba stovky
Flavanony	eriodictyol naringenin hesperetin	citrusové ovoce a džusy, rajčata a rajčatové výrobky	desítky až stovky, horní hranice platí spíše pro citrusové plody
Flavony	apigenin luteolin	obiloviny, rostlinné oleje, celer, paprika	desítky až stovky
Isoflavonoidy	diadzein genistein glycitein	soja, tofu, luskoviny	zhruba tisíce
Anthokyanidiny	kyanidin delfinidin petunidin malvidin peonidin	červené víno, borůvky a další drobnoplodé ovoce, grep, modrá kukuřice, modré odrůdy brambor	stovky až tisíce

*pokračování tabulky 2*

Proanthokyanidiny	prokyanidiny (oligomery epikatechinu) prodelfinidin (polymery epigallokatechinu)	hroznová semínka, červené víno, brusinky, černý rybíz, černý a zelený čaj, kakao, buráky, borovicová kůra	zhruba stovky
Hydroxyskořicové kyseliny	chlorogenová kyselina káвовá kyselina p-kumarová kyselina ferulová kyselina sinapová kyselina	káva, maté, červené víno, červené ovoce, zelenina, celá zrna (např. obiloviny, olejniny), kiwi, třešně, borůvky	desítky až tisíce
Ellagotaniny	punikalagin, strictinin, veskalagin, kastalagin, kasuariktin	bobulovité ovoce, tropické ovoce, granátová jablka, ořechy	stovky až tisíce
Lignany	secoisolariciresinol pinoresinol	celozrnné cereálie, lněná a sezamová semínka	desítky až tisíce, ve lněném semínku spíše tisíce
Hydroxybenzoové kyseliny	gallová a protokatechová kyselina	bobulovité ovoce, koření, cereálie, čaj	desítky až stovky
Kurkuminoidy	kurkumin	kurkuma (kurkumovník dlouhý) a produkty z ní (např. prášek, čaje)	stovky až desetitisíce, většinou tisíce

Zdroj: převzato a upraveno podle Manach et al., 2004; McCue a Shetty, 2004; Wu et al., 2004; Koponen et al., 2007; Zhang et al., 2009; Bhagwat et al., 2014; Landete, 2014; Fraga et al., 2019; \* vzhledem k tomu, že existuje v obsazích polyfenolů velká variabilita, jsou koncentrace uvedené pouze v řádech.

Obecně lze uvést, že koncentrace polyfenolických AO v rostlinných surovinách se pohybuje v řádu od desítek do tisíců miligramů na kilogram čerstvé hmoty, resp. na litr v případě nápojů. V následujícím odstavci jsou všechny koncentrace vyjádřeny v čerstvé hmotě.

V potravinách rostlinného původu lze nalézt v poměrně malém množství (desítky až většinou stovky mg/kg nebo mg/l) deriváty hydroxybenzoové kyseliny, flavony a flavanony. Hydroxyskořicové kyseliny se vyskytují ve větším množství a jejich koncentrace se pohybují od desítek po tisíce mg/kg. Ačkoliv jsou flavonoly z polyfenolů nejrozšířenější, jejich koncentrace nejsou v potravinách příliš vysoké,

obecně v řádu desítek až stovek mg/kg nebo mg/l. Na druhou stranu, v cibuli, která je nejbohatším zdrojem flavonolů, lze nalézt až 1,2 g/kg.

Další významnou skupinou látek jsou flavanoly, které jsou opět spíše v nižších koncentracích (cca stovky mg/kg nebo mg/l). S flavanoly souvisí i jejich oligomery proanthokyanidiny, které jsou obsažené ve zhruba stejné koncentraci. Isoflavonoidy se vyskytují v luštěninách (zejména v sóji), popřípadě ve výrobcích z nich, zato však ve vyšších koncentracích, obvykle to jsou jednotky tisíc mg/kg. Anthokyanidiny (resp. glykosidické anthokyaniny), z nichž nejběžnější je kyanidin, jsou nejvíce zastoupeny v ovoci, zejména v drobných bobulovitých plodech (borůvky, bez, maliny a mnoho dalších). Nejčastěji se nachází ve slupkách a obsah v potravině je většinou přímo úměrný barevné intenzitě. Například v bílém rybízu se anthokyaniny prakticky nevyskytují, zatímco v černém rybízu jejich obsah může dosahovat až 6 g/kg (Manach et al., 2004; McCue a Shetty, 2004; Wu et al., 2004; Bhagwat et al., 2014).

Kurkuminoidy se vyskytují nejvíce v kurkumě, tedy prášku z oddenků kurkumovníku dlouhého. Koncentrace v kurkumě jsou poměrně vysoké a pohybují se v širokém rozpětí mezi desítkami až desetitisíci mg/kg (Zhang et al., 2009). Ellagotaniny v potravinách rostlinného původu příliš časté nejsou, jejich výskyt je většinou vázán pouze na pár druhů ovoce, většinou bobulovitého a na ořechy, kde se vyskytují v koncentracích mezi desítkami až tisíci mg/kg (Koponen et al., 2007). Lignany jsou nejvíce obsaženy ve lněném semínku, kde jsou koncentrace velmi vysoké, v řádu tisíců mg/kg, ale je možné je najít ve většině běžně konzumovaných potravinách rostlinného původu (Landete, 2014).

Velké rozdíly a variabilita v koncentracích polyfenolů v rostlinných surovinách jsou ovlivněné řadou faktorů, především pak druhem, odrůdou, částí rostliny, agroekologickými podmínkami, zpracováním a skladováním (Biesiada a Tomczak, 2012). Harnly et al. (2006) uvádí, že variační koeficient pro koncentraci stejného flavonoidu u stejného druhu potraviny, ale jiného kusu, dosahovala až 168 %.

Bližší informace o koncentracích je možné nalézt v databázi Phenol-Explorer (<http://phenol-explorer.eu>, staženo dne 30. 6. 2020), kde je uvedeno zhruba 500 různých polyfenolických látek ve více než 400 druzích potravin.



### 2.2.3.2 Rostlinné odpadní produkty jako zdroj polyfenolických antioxidantů

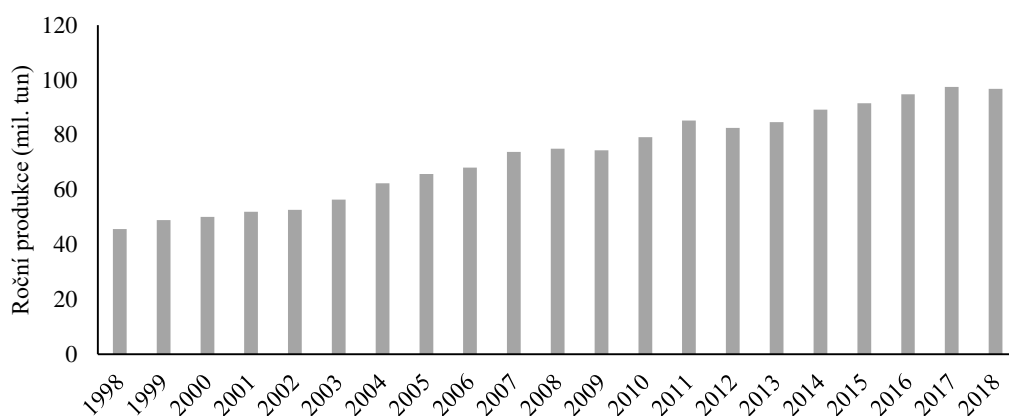
Mimo ovoce, zeleninu a nápoje z rostlinných surovin jsou velmi bohatým zdrojem polyfenolů také vedlejší a odpadní produkty vznikající při pěstování nebo zpracování rostlinného materiálu pro potravinářské účely. Globální produkce těchto odpadů dosahuje úrovně miliard tun za rok. I když nejběžnější strategií pro využití těchto surovin je použití jako krmivo pro hospodářská zvířata nebo hnojivo, současný trend je využít tento materiál také jako obnovitelný zdroj pro výrobu biopaliv, pro produkci biotechnologicky významných mikroorganismů a enzymů nebo pro extrakci polyfenolů, které mohou být následně zužitkovány v dalších odvětvích průmyslu (Donato et al., 2017).

Extrahování polyfenolů z vedlejších produktů je výhodné, neboť se z potravinového řetězce neztrácejí látky, které mají mnoho pozitivních biologických a v potravinářském odvětví i technologických funkcí.

Z těchto důvodů se velká řada publikací zaměřuje na způsoby využívání či extrakci těchto látek z odpadních materiálů. Zdrojem k extrahování jsou nejčastěji dřeň a slupky po oloupaní nebo vylisování šťávy či oleje, semínka po vypeckování různých druhů ovoce, zeleniny, olejnin, ořechů a cereálií. Dále to mohou být celé listy, které se sklídí společně s plodem, jako je tomu v případě sklizně peckovic rakytníku řešetlákového (*Hippophae rhamnoides* L.) nebo olivovníku evropského (*Olea europaea* L.). Poměrně často se také lze setkat s tím, že odpadní produkty mají vyšší obsah polyfenolů než samotná využívaná, resp. požitelná část rostliny (Ignat et al., 2011; Kappusamy et al., 2015).

Potenciálně vhodným materiálem, který by se dal využívat jako zdroj polyfenolických AO, jsou vedlejší produkty vznikající při pěstování a zpracování cibule kuchyňské (*Allium cepa* L.). Cibule je po rajčatech druhou nejpěstovanější zeleninou na světě z pohledu vyprodukovaného množství, které se během posledních 20 let zdvojnásobilo na současných zhruba 97 milionů tun (FAOSTAT, 2020), viz graf 1.

Graf 1. Roční světová produkce cibule kuchyňské v letech 1998 až 2018.



Zdroj: FAOSTAT, 2020

V souvislosti s takto velkou produkcí vznikají ročně stovky tisíc tun odpadu jen na území Evropské unie (Kiassos et al., 2009). Tento odpad je tvořen různými frakcemi, jako jsou spodní a horní odřezky z cibule, suché slupky a malé, napadené nebo poškozené cibule, které se nehodí pro přímý prodej (Nile et al., 2017). Cibule i jejich odřezky stále obsahují vysoké procento vody, a proto nejsou dlouhodobě skladovatelné. Zato cibulové slupky (obrázek 7) obsahují okolo 10 % vody a nehrozí tak jejich kažení či plesnivění. Bylo prokázáno, že obsahují velké množství flavonolů, konkrétně kvercetin a jeho glukosidů (kvercetin-3,4'-diglukosid a kvercetin-4'-monoglukosid), ale i dimery a trimer, které se v jiných rostlinách nevyskytují (Ly et al., 2005; Albishi et al., 2013). Slupky také obsahují velké množství vlákniny až 75 % (Benítez et al., 2011), která po přidávku do potravin může zvyšovat vaznost vody.

Obrázek 7. Cibulové slupky.



## 2.3 PŘÍRODNÍ POLYFENOLY JAKO PŘÍDATNÉ LÁTKY V POTRAVINÁŘSTVÍ

Přidávání polyfenolických AO do potravin má několik důvodů, z nichž k nejdůležitějším patří zlepšení údržnosti potravin. V tomto případě zastávají přírodní polyfenoly roli aditivních látek a mohou nahrazovat běžně využívané syntetické AO, jako je např. L-askorbová kyselina nebo butylovaný hydroxytoluen. Důvodem pro zvyšující se atraktivitu a využívání polyfenolických AO je zejména skutečnost, že jsou to látky přírodní, oproti syntetickým polyfenolickým AO nevykazují toxické vlastnosti, ale naopak mají potenciálně pozitivní vliv na lidské zdraví (Papuc et al., 2017).

Na druhou stranu může být přidávání polyfenolů do potravin chápáno jako fortifikace za účelem zvýšení obsahu biologicky aktivních látek. Takto obohacené potraviny mohou být označovány jako „fortifikované“ nebo „funkční“.

### 2.3.1 Polyfenoly a údržnost potravin

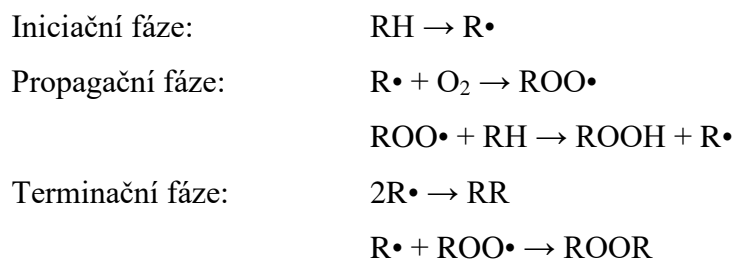
Úlohou AO v potravinářství je zabránění oxidace složek potravin, zejména lipidů a jejich doprovodných látek. Největší opodstatnění má proto u takových výrobků, které obsahují vysoké množství lipidů. Běžně se tak využívají při zpracování surovin živočišného původu, hlavně u masa a výrobků z něj. U rostlinných produktů plní AO důležitou roli při zpracování a skladování olejů.

Oxidace lipidů, v porovnání s oxidací ostatních složek potravin, nejvíce ovlivňuje senzorické vlastnosti potravin, tj. chuť, vůni či barvu. V důsledku oxidace lipidů dochází dále ke snížené nutriční hodnotě, zhoršeným technologickým vlastnostem a tvorbě zdravotně nežádoucích látek (Bartosz a Kołakowska, 2011).

Podle mechanismu vzniku se rozeznává několik druhů oxidace: autooxidace, fotooxidace, oxidace katalyzovaná lipoxygenasami a oxidace katalyzovaná kovy. Všechny tyto typy oxidace lze zmírnit využitím polyfenolických AO.

Nejčastějším druhem oxidace je autooxidace, a proto bude popsána podrobněji. Dochází k ní v podstatě během jakékoliv fáze výroby a skladování potravin. Při tomto typu oxidace dochází k reakci kyslíku ( $O_2$ ) s mastnými kyselinami, ať volnými nebo

přítomnými v tri-, di- nebo monoacylglycerolech. Autooxidace je radikálová řetězová reakce, která má tři hlavní fáze: iniciační, propagační a terminační. Při iniciační fázi dochází k odtržení vodíku od molekuly mastné kyseliny (RH) a vzniká alkyl radikál (R•). Odtržení je iniciováno volnými radikály (např. hydroxylovými, peroxylovými nebo hydroperoxylovými radikály). Tato fáze je urychlena vyšším stupněm nenasycenosti mastných kyselin, vysokými teplotami, zářením (UV nebo viditelným), koncentrací kyslíku a přítomností AO a prooxidantů. V propagační fázi reaguje alkyl radikál (R•) s kyslíkem za vzniku peroxylového radiálu (ROO•), který následně odtrhuje další mastné kyselině (RH) vodík a vzniká tak opět alkyl radikál (R•) a hydroperoxid mastné kyseliny (ROOH). Pokud je koncentrace radikálů (R•, ROO•) vysoká, řetězová reakce přechází do terminační fáze tím, že zreagují dva volné radikály, čímž vznikne stabilní produkt, který již není radikál (RR, ROOR). Tím se reakce ukončuje (Gordon, 2001; Damodaran et al., 2008; Kołakowska a Bartosz, 2014). Zjednodušené schéma autooxidace je zobrazeno v následujících rovnicích:



Primárními produkty autooxidace lipidů jsou hydroperoxydy, ty mohou ale podléhat dalším degradačním procesům a mohou vznikat sekundární produkty oxidace. Ty mohou mít stejný počet uhlíků jako původní mastná kyselina (cyklické peroxidy, hydroxykyseliny) nebo po štěpení nižší počet uhlíků (některé aldehydy jako toxický malondialdehyd - MDA) či naopak vyšší počet uhlíků, což jsou např. polymery mastných kyselin (Velíšek a Hajšlová, 2009).

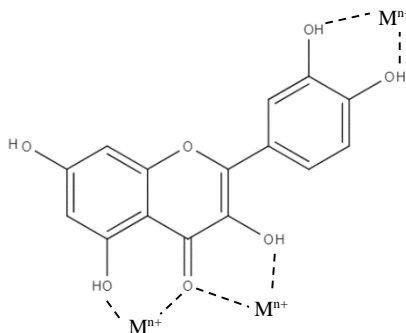
Vzniklé hydroperoxydy jsou bez zápachu a nevytváří tak změny chuti nebo vůně. Sekundární produkty, hlavně ty nízkomolekulární, do kterých patří aldehydy, ketony, alkoholy, estery či některé organické kyseliny, významným způsobem přispívají ke vzniku pachutí či nepříjemného aroma oxidované potraviny. Z tohoto pohledu jsou senzorycky nejaktivnější aldehydy (Domínguez et al., 2019).

Fotooxidace je druh oxidace, která zahrnuje vznik singletového kyslíku  $^1\text{O}_2$ , v přítomnosti fotosenzibilní látky po ozáření viditelným nebo UV světlem. Singletový kyslík poté reaguje velice rychle s mastnou kyselinou, což vede k tvorbě hydroperoxidů, které mohou následně podléhat dalším změnám, tak jako v případě autooxidace. Fotosenzibilní látky jsou např. bilirubin, hemová barviva, chlorofyly, riboflavin. Tyto látky lehce absorbují světelnou energii díky konjugovanému systému dvojných vazeb a přechází do nestabilního excitovaného stavu. Přijatou energii poté snadno přenesou na tripletový kyslík  $^3\text{O}_2$ , ze kterého následně vzniká singletový, který je velmi reaktivní. Některé fotosenzibilizátory jsou lipofilní, a proto mohou vytvářet singletový kyslík v těsné blízkosti lipidů (Tejero et al., 2004; Velíšek a Hajšlová, 2009).

Společně s neenzymatickými reakcemi vedoucími k oxidaci lipidů existují i enzymatické procesy, které jsou zprostředkovány lipoxygenasami. Výsledkem je opět hydroperoxid, avšak specifický, podle konkrétního typu lipoxygenasy. Ten poté podléhá rozkladu na specifické a často sensoricky aktivní produkty (Ahmed et al., 2015). V souvislosti s polyfenoly bylo zjištěno, že některé mohou inhibovat aktivitu lipoxygenas u sóji (Zhang et al., 2019), ale i v rybích produktech (Banerjee, 2006), čímž se zamezí zhoršování jejich kvality.

Oxidace může být vyvolána i přechodnými kovy (železo, měď, nikl, kobalt, titan). Nejaktivnější jsou železo a měď. Role kovů spočívá v jejich schopnosti redukovat se po přijetí elektronu, a tím katalyzovat produkci volných radikálů nebo se přímo zapojit do oxidace. Pokud jsou kovy ve vyšší valenci, mohou autooxidaci katalyzovat přímo. Pokud jsou v nižší valenci, nejprve reagují s kyslíkem a poté se sérií reakcí vytváří volné radikály, které vstupují do iniciační fáze oxidace lipidů (Velíšek a Hajšlová, 2009; Domínguez et al., 2019). Polyfenoly jsou známé svými chelatačními schopnostmi (Leopoldini et al., 2011), čímž zamezují tomuto typu oxidace (obrázek 8). Kovy navázené v komplexu s polyfenolem se již nemohou zapojovat do oxidačních reakcí.

Obrázek 8. Polyfenoly jako chelatační činidla



Oxidaci podléhají i doprovodné látky lipidů, jako je např. cholesterol. Tato látka ze skupiny sterolů plní v živočišných buňkách důležité funkce, jako je fluidita a permeabilita buněčných membrán, je prekurzorem pro vitamin D, žlučové kyseliny i steroidní hormony (Sales de Oliveira et al., 2018).

Vincente et al. (2011) uvádí, že bylo identifikováno více než 70 chemických látek vznikajících v důsledku oxidace cholesterolu (oxycholesteroly) a většina z nich vykazuje cytotoxické, aterogenní, mutagenní a karcinogenní vlastnosti. Některé skupiny polyfenolických látek (hydroxyskořicové kyseliny, flavanoly, prokyanidiny a flavonoly) dokáží účinně bránit vzniku oxycholesterolů v mase (Rodríguez-Carpena et al., 2012).

Lipidy nejsou jedinou složkou potravin, která podléhá oxidaci. Změny v jakosti (nutriční, smyslové, technologické) mohou být vyvolány i oxidací proteinů. Oxidace proteinů je ovlivněna stejnými faktory jako oxidace lipidů. Rychlost oxidační reakce u lipidů a proteinů je zhruba stejná, avšak škála výsledných produktů oxidace proteinů je širší, díky větší variabilitě proteinů. Mnoho let byla oxidace proteinů opomíjena, převážně proto, že nemá tak velký vliv na zhoršení aroma a je hůře měřitelná. Nyní se však ukazuje, že oxidace bílkovin ovlivňuje ze sensorických parametrů spíše texturu, a to v souvislosti se zhoršenou vazností vody, rozpustností bílkovin a větší tuhostí masa (Silva et al., 2018; Hematyar et al., 2019). Vyskytují se práce, které dokazují, že rostlinné polyfenoly např. z černého bezu, rozmarýnu, šalvěže nebo listů olivovníku dokáží účinně brzdit oxidaci proteinů (Falowo et al., 2014; Xu et al., 2018).

Pozitivní efekt přídavku polyfenolů nespočívá jen v potlačení oxidace složek potravin. Bylo prokázáno, že některé polyfenoly mohou inhibovat růst patogenních

bakterií (*Salmonella*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*) a bakterií zodpovědných za kažení masa (Taguri et al., 2004; Zhang et al., 2009). Tyto antimikrobiální účinky také prodlužují skladovatelnost potravin.

### 2.3.2 Příklady použití polyfenolů jako potravinářských antioxidantů

Na trhu existuje velká řada komerčně dostupných přípravků na bázi přírodních extraktů z rostlin, které jsou velmi bohaté na polyfenolické AO. Jedná se zejména o extrakty z hroznových semínek a slupek, borovicové kůry, zeleného čaje, kávy, olivovníkových listů, rozmarýnu a mnohých dalších (Shah et al., 2014).

Ve vědecké literatuře lze nalézt desítky původních prací o přidávání extrémně různorodých zdrojů polyfenolů (např. do masných výrobků), které na trhu doposud dostupné nejsou. Hygreeva et al. (2014), Shah et al. (2014), Ahmad et al. (2015), Papuc et al. (2017) a Lorenzo et al. (2018) shrnuli tyto aplikace do přehledových článků. Jako zdroje polyfenolů jsou v těchto studiích uváděny např. hroznová semínka, šalvěj, rozmarýn, zelený a černý čaj, česnek, lesní plody (bobulovité ovoce), česnek, cibule, ale také odpadní nebo vedlejší produkty, jako jsou jablečné či bramborové slupky. Polyfenoly z těchto surovin jsou přidávány do potravin v různých formách, zejména jako sytké čisté extrakty, kde je většina hmotnosti tvořena právě polyfenoly, poté to může být ve formě mletého prášku (mouky – usušený a namletý rostlinný materiál) nebo se může jednat o vodné extrakty. K extrakci polyfenolů se většinou používá směs vody a ethanolu (v koncentraci od 50 do 95 %), nicméně se používá i čistá deionizovaná voda, methanol, aceton, hexan nebo dimethyl sulfoxid. Tato organická rozpouštědla se však musí před přidáním do potravin odpařit (pod proudem dusíku nebo ve vakuové odparce).

Vzhledem k různým formám AO se liší i použité množství přidávané do dané potravin. Toto množství se může pohybovat od setin až po desítky procent.

Z hlediska oxidace lipidů jsou účinné i extrakty z kaštanovníku setého a meduňky lékařské, které byly přidány do sýru typu Serra da Estrela (Carocho et al., 2015).

Také v rostlinných olejích jsou polyfenolické AO účinné proti oxidaci lipidů. Popisován je zejména přídavek extraktů z listů olivovníku, které po přidání do

olivového oleje a jeho následném zahřívání na teploty smažení dokázaly zabránit oxidaci tokoferolů a tvorbě těkavých látek (akrolein a další těkavé aldehydy). Uvedené látky způsobují nepříjemný pach spáleného oleje a mají negativní účinky na lidské zdraví (Esposito et al., 2015). Podobné výsledky publikovali i Salta et al. (2007). Autoři přidali polyfenoly z listů olivovníku do olivového, slunečnicového a palmového oleje a dále do ztuženého rostlinného tuku. Oleje i ztužený rostlinný tuk poté vykazovaly vyšší oxidační stabilitu v rancimátovém testu (metoda zrychlené oxidace).

### **2.3.3 Nevýhody využívání polyfenolů v potravinářství**

Používání přírodních polyfenolů v potravinách může být do určité míry limitováno tím, jakým způsobem ovlivňují senzorycké a technologické vlastnosti finálního produktu. Největším problémem v tomto ohledu jsou senzorycké vlastnosti. Polyfenolické látky mohou nepříjemně ovlivňovat chuť tím, že ve vyšším množství dávají potravině hořkou až trpkou chuť (Lesschaeve a Noble, 2005). Se senzoryckou kvalitou fortifikovaných potravin souvisí také barevné změny, které nemusí být pro konzumenta přijatelné a problémem bývá také tvrdost, která může být v porovnání s neobohacenými vzorky vyšší. To se týká zejména masných a pekařských výrobků (Sivam et al., 2010; Metha et al., 2015). Přídavek polyfenolů do pekárenských výrobků může znamenat i zhoršení některých technologických vlastností. Jedná se zejména o menší objem bochníku a větší tvrdost střídy (Martins et al., 2017).

Další nevýhodou může být nestabilita některých polyfenolických látek. V tomto případě se jedná zejména o anthokyany, které jsou nejvíce náchylné k degradaci během tepelného opracování potravin (Ou et al., 2019). Na druhou stranu některé polyfenoly mohou vysokým teplotám odolávat. Příkladem je třeba flavonol kvercetin (a některé jeho glykosidy), který je dostatečně tepelně stabilní i za teplot typických pro domácí přípravu pokrmů (Lombard et al., 2005; Rohn et al., 2007). Vogrinčič et al. (2010) naznačují, že během pečení chleba z mouky pohanky tatarské je kvercetin stabilnější než rutin.

Velkým úskalím fortifikace potravin polyfenoly je jejich biodostupnost ovlivněná nejen jejich vlastnostmi (např. hydro- nebo lipofilita), ale i ostatními složkami potravy. Nerozpustná vláknina (celulóza, hemicelulóza a lignin) obecně biodostupnost polyfenolů snižuje. Stejně tak na polyfenoly působí i přítomnost



bílkovin v potravině, protože s nimi mohou vytvářet nestravitelné komplexy. Naopak lipidy v potravinách biodostupnost polyfenolů mohou zvyšovat, protože některé lipofilní polyfenoly (např. kvercetin) jsou v nich lépe rozpustné (Bohn, 2014).

### **2.3.4 Fortifikované a funkční potraviny**

Obohacování potravin polyfenoly úzce souvisí s pojmy „fortifikace“ a „funkční potraviny“. Fortifikace znamená obohacení potravin určitými látkami, např. nutričně významnými nebo biologicky aktivními, které jsou v neobohacené potravině ve velmi malém množství nebo nejsou přítomny vůbec. Může se tak jednat o vitaminy, minerální látky, probiotika aj. Pojem funkční potravina je však širší a Crowe et al. (2013) jej definují jako jakoukoliv potravinu, původní, fortifikovanou nebo jakkoliv vylepšenou, která má při běžné konzumaci pozitivní vliv na lidské zdraví. Z tohoto hlediska se jeví jako vhodná „nosná média“ polyfenolických látek pekařské výrobky (Ou et al., 2019), masné výrobky (Metha et al., 2015) a v neposlední řadě i mléčné výrobky (Sampaio Cutrim a Sloboda Cortez, 2018). Jejich hlavní výhodou je, že jsou součástí každodenní stravy.

Jak bylo zmíněno v kapitole 2.3.2, polyfenoly se mohou přidávat do potravin i ve formě mouky, resp. jemně mleté suroviny. To s sebou přináší, na rozdíl od přidávání čistého extraktu, další možnosti využití. Rostlinné materiály, a zvláště ty odpadní, jsou často velmi bohatým zdrojem nejen polyfenolů, ale i vlákniny, která může plnit v masných i pekařských výrobcích důležité technologické a nutriční funkce. Saura-Calixto (1998) poprvé zavedl pojem „vláknina bohatá na antioxidanty“, která kombinuje zdravotní přínosy vyplývající z konzumace vlákniny a polyfenolických AO, což jí činí vhodnou ingrediencí pro vývoj a výrobu funkčních potravin. Vláknina má pozitivní vliv na lidské zdraví, neboť bylo prokázáno, že strava chudá na vlákninu vede k rozvoji mnoha chorob a komplikací, jako jsou diabetes mellitus 2. typu, obezita, kardiovaskulární choroby a další (Li a Komarek, 2017; Gianfredi et al., 2019).

Výhody přidávání vlákniny bohaté na polyfenoly do masných výrobků uvádí Das et al. (2020). V masných výrobcích tato vláknina může zvyšovat vaznost vody, snižovat hmotnostní ztráty během tepelného opracování a zlepšovat nutriční vlastnosti.

Může rovněž ovlivňovat sensorické vlastnosti, neboť v masném výrobku zvyšuje šťavnatost a pozitivně ovlivňuje chuť a vůni.

V případě pekárenských výrobků může obohacování vlákninou bohatou na polyfenoly příznivě ovlivňovat nejen obsah vlákniny, ale i AOA, stabilitu těsta a objem bochníku (Sivam et al., 2010). Příklady obohacování chleba materiálem bohatým na polyfenoly jsou uvedeny v přehledovém článku autorů Dziki et al. (2014). Autoři jako zdroj vlákniny bohaté na AO vhodné pro pekařské výrobky uvádí vedlejší produkty vznikající při zpracování rostlinných surovin. Jde např. o rýžové a pšeničné otruby, mouku ze sušených čajových listů, mleté cibulové slupky či mleté listy koriandru.

V souvislosti s obohacováním pekařských výrobků přírodními polyfenoly poukazují Ou et al. (2019) také na další zdravotní benefit. Uvádí, že polyfenoly přidané do těsta dokáží během pečení bránit vzniku některým produktům Maillardovy reakce s negativními účinky na zdraví. Problematický je v tomto směru zejména akrylamid, který má toxické a pravděpodobně i karcinogenní vlastnosti (Liu et al., 2015).

Fortifikace mléčných výrobků spočívá především v použití bylinek a koření bohatého na polyfenoly, které se dají ze sensorického hlediska lépe zkombinovat s touto skupinou potravin (El-Sayed a Youssef, 2019). Nicméně podobně jako v případě pekárenských a masných výrobků mohou být do mléčných výrobků použity i extrakty z různých vedlejších produktů vznikající při zpracování potravin (Sampaio Cutrim a Sloboda Cortez, 2018).

Konkrétní příklady fortifikace potravin surovinami bohatými na polyfenoly jsou uvedeny v tabulce 3.

Tabulka 3. Příklady fortifikace potravin surovinami bohatými na polyfenoly.

Fortifikovaná potravina	Obohacující složka	Přidané množství	Analýza	Efekt oproti kontrolní skupině	Reference
<i>Masné výrobky</i>					
Tepelně opracované vepřové karbanátky	Rozmarýnový extrakt	0,02 %	TBARS; SA	↓ oxidace lipidů, ↑ senzorycké vlastnosti	Nissen et al., 2004
Tepelně opracované hovězí karbanátky	Extrakt z hroznového semínka	1 %	TBARS, CIE, MiBio	↓ oxidace lipidů, tmavší barva, ↓ kolonií <i>E. coli</i>	Ahn et al., 2007
Mleté kozí maso a nugety	Extrakt ze slupek granátového jablka	1 %	TBARS, CIE, MiBio,	↓ oxidace lipidů, světlejší barva; ↓ CPM	Devetkal et al., 2014
<i>Mléčné výrobky</i>					
Fermentované mléko	Směsný extrakt ze hřebíčku a cesmíny	1 %	CP, AOA	↑ AOA a CP	Ramos et al., 2017
Jogurt	Výlisky z hroznů	1 – 3 %	Vláknina PČ, SA	↑ vlákniny, ↓ senzorycké vlastnosti, ↓ oxidace lipidů	Tseng a Zhao, 2013
Sýr	Čisté fenolické látky (katechin, hesperetin, taninová kyselina ad.)	0,5 mg/ml mléka na výrobu sýra od každé látky	AOA	↑ AOA	Han et al., 2011
<i>Pekařské výrobky</i>					
Chléb	Mleté cibulové slupky	1 – 5 %	AOA, SA,	↑ AOA, ↑ senzoryckých vlastností při 1 – 3 %; při vyšším přídávku ↓	Gawlik-Dziki et al., 2013
Chléb	Prášek ze semínek fenyklu	3, 5, 7,10 a 15 %	AOA SA	↑ AOA, 5 a 7 % ↑ senzoryckých vlastností	Das et al., 2013
Sušenky	Mleté arašídové skořápky	1,3 – 2,5 %	CP, SA, AOA, vláknina	↑ AOA a CP, bez vlivu na senzory. vlast., ↑ nerozpust. vláknina	Costa da Camargo et al., 2014

↓ snížení/zhoršení oproti kontrole; ↑ zvýšení/zlepšení oproti kontrole; SA: senzorycká analýza; TBARS: thiobarbituric acid reactive substances; PČ: peroxidové číslo; AOA: antioxidační aktivita; CP: obsah celkových polyfenolů; CIE: kolorimetrycká analýza barvy; MiBio: mikrobiologycký rozbor; CPM: celkový počet mikroorganismů

### 2.3.5 Právní předpisy týkající se využití antioxidantů v potravinářství

Využívání AO v potravinářské výrobě v zemích Evropské unie je primárně regulováno Nařízením Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1333/2008 o potravinářských přídatných látkách. V Příloze I tohoto nařízení je také definován pojem „antioxidant“ jako látka, která prodlužuje trvanlivost potravin tím, že je chrání proti zkáze způsobené oxidací, např. proti žluknutí tuků a barevným změnám. Zároveň je zde vymezen i způsob označení těchto látek na obalu potravin, a to buď názvem látky nebo kódem „E“ a příslušným třímístným číslem AO, např. kód E300 odpovídá L-askorbové kyselině.

V příloze II (která je upravena Nařízením Komise č. 1129/2011) je vypsán seznam všech potravinářských aditiv, která jsou rozdělena do několika skupin: barviva, náhradní sladidla a potravinářské přídatné látky jiné než barviva a náhradní sladidla. Z rozdělení vyplývá, že tento legislativní předpis skupinu „antioxidanty“ neuvádí a je jasné, že látky s antioxidačními vlastnostmi jsou ve skupině barviva (např. lykopen, lutein ad.) a potravinářské přídatné látky jiné než barviva a náhradní sladidla (např. L-askorbová kyselina či  $\alpha$ -tokoferol). V této příloze jsou současně vypsány kategorie potravin (např. mléčné výrobky a jejich analogy s podskupinami) a k nim přiřazeny použitelné přídatné látky a jejich maximální aplikovatelné množství do potravin, popř. jiná omezení či výjimky. Legislativa týkající se použití přídatných látek (a tedy i AO) do potravin je přehledně zpracována v interaktivní aplikaci na oficiálních stránkách Evropské unie

([https://webgate.ec.europa.eu/foods\\_system/main/?event=display](https://webgate.ec.europa.eu/foods_system/main/?event=display), staženo dne 15. 6. 2020).

Vzhledem k tomu, že tato disertační práce je zaměřena na přírodní AO, zejména polyfenolické, je třeba zmínit, že právní předpisy tyto látky např. ve formě extraktů nijak nedefinují a neupravují. V seznamu přídatných látek (Příloha II, Nařízení č. 1333/2008 ES) jsou pouze čtyři druhy extraktů z rostlinných zdrojů, a to paprikový extrakt (E160c), extrakt s vysokým obsahem tokoferolů (E306), extrakt z kvillaji (E999) a extrakt rozmarýnu (E392), pouze první a poslední z nich se používají jako antioxidační složka.

V případě aplikace mletého rostlinného materiálu bohatého na flavonoidy by měl být v seznamu složení uveden název suroviny, např. „cibule“, i přesto, že byly

použity mleté slupky. Pokud by se využíval extrakt z cibulových slupek, pak by měl být uveden např. jako „extrakt z koření“.

Vedle složení se mohou na obalu potravin objevit i tzv. výživová a zdravotní tvrzení. Tato tvrzení, ač nejsou povinná, jsou rovněž regulovaná, a to Nařízením Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1924/2006 o výživových a zdravotních tvrzeních při označování potravin, které definuje tato tvrzení a určuje podmínky jejich použití. Dále v Nařízení Komise (EU) č. 432/2012, kterým se zřizuje seznam schválených zdravotních tvrzení při označování potravin jiných než tvrzení o snížení rizika onemocnění a o vývoji a zdraví dětí, je uveden seznam živin, látek, potravin nebo kategorií potravin a k nim povolená zdravotní tvrzení.

V reklamách či na obalech některých potravin se může zákazník setkat s různými typy zdravotních či výživových tvrzení. Například „polyfenoly z olivového oleje přispívají k ochraně krevních lipidů před oxidativním stresem“ v případě olivových olejů či „zdroj vlákniny“ na obalu potravin, které obsahují alespoň 3 g vlákniny na 100 g. Evropský úřad pro bezpečnost potravin (angl. EFSA – European Food Safety Authority) vydává průběžně EFSA Journal, ve kterém na základě dostupných vědeckých poznatků posuzuje a následně povoluje či zakazuje používání různých zdravotních tvrzení na obale potravin.

V případě aplikace mleté formy rostlinného materiálu bohatého na polyfenoly či extraktu však není možné jakékoliv zdravotní tvrzení použít, protože v současné době na seznamu povolených tvrzení polyfenoly (kromě polyfenolů z olivového oleje), uvedeny nejsou, a to i přesto, že ve vědecké literatuře existuje řada studií, které na určité pozitivní vlastnosti na lidský organismus poukazují (viz kapitola 2.2.2). To znamená, že i přes současné snahy o vývoj funkčních potravin nelze legálně jakýmkoliv způsobem upozornit na jejich zdravotní benefity. Na druhou stranu jediné možné použitelné tvrzení je výživové. Při vhodném složení výrobku obohaceného mletým materiálem to může být tvrzení „zdroj vlákniny“, protože většina rostlinných produktů velké množství vlákniny obsahuje.

V souvislosti s funkčními nebo fortifikovanými potravinami je třeba zmínit, že pro ně v současné době neexistují legislativní předpisy a regulace pro funkční nebo fortifikované potraviny přírodními polyfenoly, z čehož mohou vyplývat určité nedostatky a obavy, které shrnují Cory et al. (2018). Autoři upozorňují, že extrahované

polyfenoly použité buď pro doplňky stravy, nebo pro fortifikaci nemusí mít stejný efekt, jako polyfenoly přítomné ve stravě přirozeně bohaté na polyfenoly. Autoři rovněž podotýkají, že pro polyfenoly neexistuje doporučená denní dávka, a tedy stále není jasné, při jakém množství je jejich přidávání bezpečné nebo zdraví prospěšné. Konzumace příliš vysokých dávek (např. stokrát vyšší než v běžné stravě) by totiž lidskému zdraví mohla škodit.

## **2.4 METODY STANOVENÍ POLYFENOLŮ A ANTIOXIDAČNÍCH VLASTNOSTÍ POTRAVIN**

V současné době existuje široká škála metod, které dokážou charakterizovat přímo či nepřímo polyfenolické AO a jejich AOA. Oproti tomu jsou vyvinuty metody stanovující stabilitu lipidů a proteinů a tvorbu produktů vycházející z jejich oxidace v potravinách. *De facto* tím také ověřují AOA potraviny. Proto je tato kapitola rozdělena na tři části, a sice na metody zaměřené na stanovení polyfenolů, jejich AOA a na metody zaměřující se na oxidační stabilitu lipidů a proteinů.

### **2.4.1 Metody stanovování polyfenolů a jejich antioxidační aktivity**

Vzhledem k velkému množství polyfenolických látek s různými chemickými vlastnostmi v různých matricích neexistuje pouze jedna detekční a kvantifikační metoda. Přesto je možné se v analýze setkat s obecnými postupy.

#### **2.4.1.1 Metody extrakce polyfenolů**

Prvním krokem je sběr reprezentativního vzorku, po kterém, v případě pevných vzorků, následuje sušení, zamrazování nebo lyofilizace. U tekutých jde o filtraci nebo odstředování, po čemž může být vzorek rovnou analyzován nebo mohou následovat další kroky (viz níže). Pevné vzorky (rostliny a potraviny) mohou být následně mlety a homogenizovány. Dalším krokem je samotná extrakce, která zahrnuje využití směsi vody a organických rozpouštědel v různých poměrech podle polaritý látek ve vzorku. Organická rozpouštědla jsou zastoupena většinou ethanolem, methanolem, acetonem, diethyl etherem a ethyl acetátem. Nicméně čím polárnější látky jsou, tím větší podíl

vody musí být použit, např. pro některé fenolické kyseliny 100% organické rozpouštědlo není vhodné (Tsao a Deng, 2004; Stalikas, 2007).

Samotná extrakce za použití výše zmíněných rozpouštědel je v podobě kapalina-kapalina nebo pevná látka-kapalina. Tyto dva typy jsou nejčastější. Při extrakci kapalina-kapalina se dostává do kontaktu kapalný vzorek s vodou nemísitelným nebo těžce mísitelným rozpouštědlem (např. ethyl acetát, diethyl ether). Analyt díky své povaze přechází do rozpouštědla, ke kterému vykazuje větší afinitu. Extrakce pevná látka-kapalina spočívá v kontaktu pevného vzorku s extrakčním roztokem. Tento typ extrakce může být proveden v několika variantách, z nichž některé jsou konvenční a některé novější.

Mezi konvenční metody extrakce pevná látka-kapalina patří soxhletova extrakce a macerace, při které se vzorek pouze smísí s rozpouštědlem za různých teplot nebo se může promíchávat či třepat na laboratorní třepačce. Některé flavonoidy, zejména fenolické kyseliny jsou kovalentně vázány na buněčné stěny tvořené nerozpustnými polysacharidy. V tomto případě je před extrakcí zapotřebí hydrolyzovat vzorek roztokem NaOH (tzv. alkalická hydrolýza) o koncentraci 0,1 - 10M po dobu několika hodin. Naproti tomu kyselá hydrolýza (např. 1% HCl) je využívána k tomu, aby byly rozrušeny glykosidické vazby. To napomůže stanovení celkového obsahu aglykonické formy, což někdy zjednoduší následné chromatografické stanovení (Acosta-Estrada et al., 2014; Oreopoulou et al., 2019).

Novější typy extrakce zahrnují např. využití superkritické fluidní extrakce. Při té se nejčastěji využívá stlačeného a mírně zahřátého oxidu uhličitého, který za těchto podmínek mění své vlastnosti a má dobré extrakční schopnosti. Tento superkritický CO<sub>2</sub> prochází přes patronu, která je naplněna vzorkem a rozpuštěný analyt je poté nesen do sběrné nádoby (Herrero et al., 2006).

Další relativně novou technikou je využití extrakce stlačenou kapalinou (PLE – pressurized liquid extraction). Zde se klasická rozpouštědla za vysokého tlaku zahřejí nad jejich body varu, přičemž zůstávají kapalná, a opět protékají patronou naplněnou vzorkem. Následně je analyt zachycován ve sběrné nádobce. Výhodou je poměrně velká účinnost a krátká doba extrakce (Mustafa a Turner, 2011).

S touto technikou souvisí i subkritická extrakce vodou (SWE – subcritical water extraction), kde je voda za velkého tlaku (10 barů) zahřívána mezi 100 až

374 °C. Voda poté změní své vlastnosti a může rozpouštět analyty, které za běžných podmínek ve vodě extrahovatelné nejsou (Zhang et al., 2020).

Účinnější extrakce je dosaženo také při využití mikrovlnného záření. Mikrovlny o frekvenci od 300 MHz do 300 GHz způsobí zahřátí vody a ta následně způsobí poškození rostlinných tkání, ze kterých je poté analyt lehce vyplaven do roztoku rozpouštědla. Velmi častou metodou se stává i extrakce za pomoci ultrazvuku o frekvenci 20-2000 KHz. Vlnění poškodí buněčné stěny ve vzorku a analyty se mohou snáze extrahovat do rozpouštědla. Existují i další metody jako enzymatická hydrolýza nebo vystavení vzorku pulzům v elektrickém poli. Tyto metody se však často v analýze potravin nevyužívají (Azmir et al., 2013; Acosta-Estrada et al., 2014).

Po extrakci je ve většině případů směs rozpouštědla a pevné látky filtrována nebo odstředěna. Poté mohou být využity postupy k čištění vzorku od interferujících látek, které by mohly ztížit detekci. Mezi tyto postupy se řadí např. využití SPE kolonek (solid phase extraction – extrakce tuhou fází), kdy se na kolonku naplněnou určitým sorbentem (většinou uhlovodík C18 vázaný na silikagel, ale existuje mnoho jiných druhů) nanese vyextrahovaný vzorek, analyty se podle afinity na sorbentu zachytí, zatímco necílové látky odečou pryč. Následně jsou analyty vyplaveny ze sorbentu pomocí silnějšího rozpouštědla (a často vhodného pro separační analýzy), čímž se získá čistý extrakt (Andrade-Eiroa et al., 2016). Čištění vzorků pomocí SPE není často zapotřebí.

V případě malé koncentrace analytu v extraktu se může odpařit rozpouštědlo buď ve vakuové odparce či pod proudem dusíku. Následný suchý extrakt se rozpustí ve vhodnějším a hlavně menším objemu nového rozpouštědla.

#### **2.4.1.2 Analytické metody stanovení polyfenolů**

Vyextrahovaný a vhodně upravený extrakt se využívá k vlastní analýze, která může být buď nepřímá, založená na stanovení celé skupiny látek nebo přímá, při které se využívá zejména separačních metod, které mohou identifikovat a kvantifikovat jednotlivé analyty.

Nepřímé metody jsou založeny na spektrofotometrickém stanovení a jejich principem je barevná změna činidla po reakci s polyfenoly nebo jejich skupin (např.



flavonoidy, anthokyaniny). Tato barevná změna je pak přímo úměrná jejich koncentraci, která se vyjadřuje v ekvivalentech látky na ml nebo g studovaného materiálu. Z těchto metod lze vyjmenovat stanovení celkových polyfenolů pomocí Folin-Ciocalteuovo činidla.

Další metodou je stanovení celkových flavonoidů. Používané činidlo, jehož součástí je iont  $Al^{3+}$ , reaguje s hydroxylovými skupinami flavonoidů. Tzv. vanilinová metoda je využívána ke stanovení kondenzovaných taninů, flavanolů a dihydrochalkonů. Zde reaguje vanilin v okyseleném prostředí s volnou hydroxylovou skupinou na 3. uhlíku v kruhu B. Poslední metodou je stanovení celkových anthokyanů. Využívá se principu změny barvy při změně pH. Všechny tyto metody jsou levné a poměrně rychlé, avšak neposkytují přesné údaje a jsou spíše orientační, protože i jiné necílové látky mohou reagovat s používanými činidly a mohou tak např. nadsahovat výsledky. Z těchto důvodů jsou lepší přímé metody stanovení (Naczka a Shahidi, 2006; Stalikas, 2007; Ignat et al., 2011; Sampaio Cutrim a Sloboda Cortez, 2018).

Přímé metody stanovení polyfenolů dokáží detekovat jednotlivé analyty, čehož je dosaženo separací v chromatografické koloně. V současné době je drtivá většina polyfenolických látek stanovována pomocí HPLC (high performance liquid chromatography - vysokoúčinná kapalinová chromatografie) na reverzní fázi nebo různými variantami HPLC (UHPLC/UPLC – ultra high performance liquid chromatography).

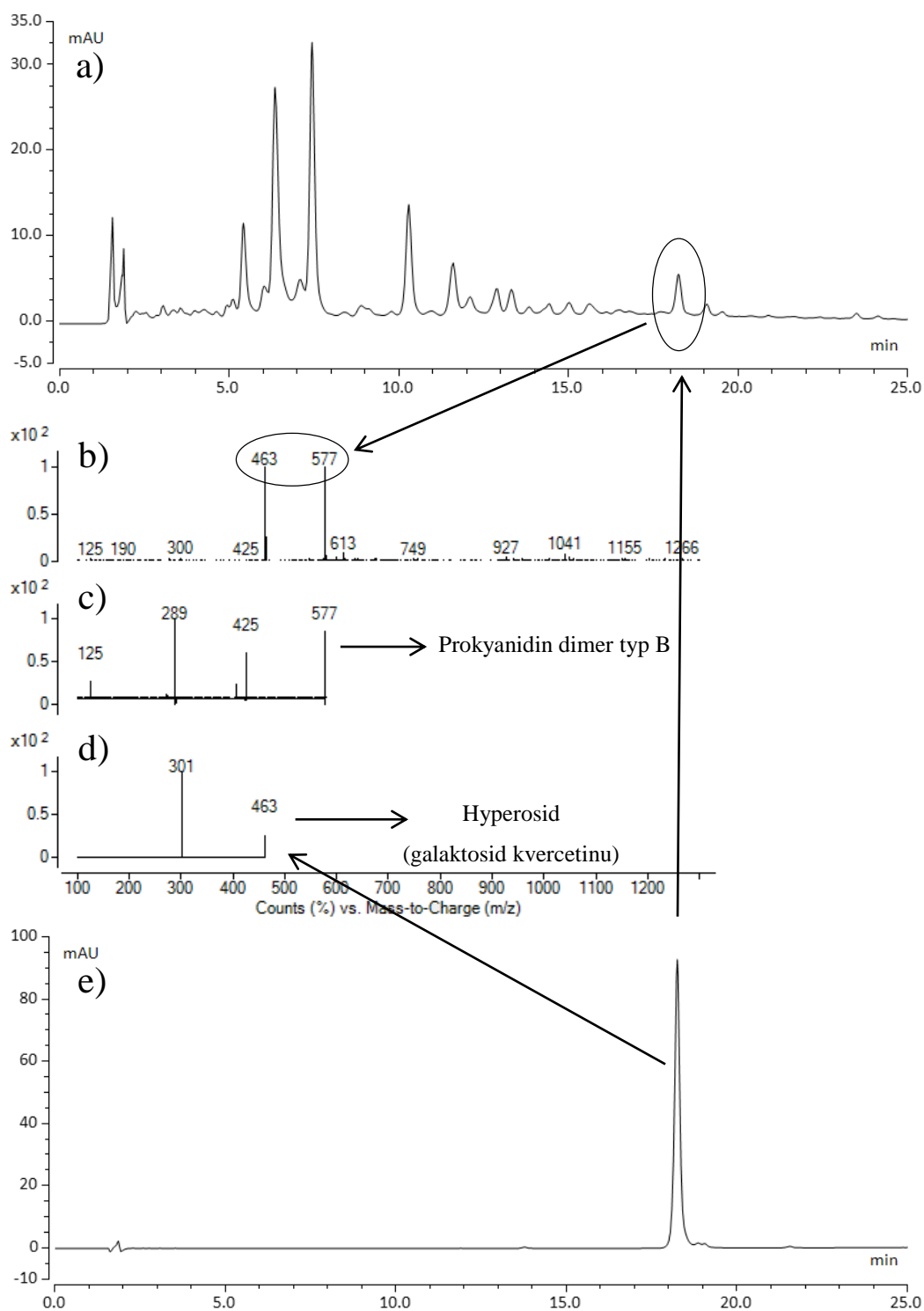
K separaci v kapalinové chromatografii se nejčastěji využívají C18 kolony a jako mobilní fáze slouží obvykle směs vody, methanolu nebo acetonitrilu, které mohou být upraveny na určité pH mravenčí, octovou nebo fosforečnou kyselinou či jejich solemi. Po separaci na koloně musí přijít na řadu identifikace analytu v detektoru. Nejčastěji využívanými detektory jsou UV-VIS, resp. DAD detektory (diode array detector – detektor diodového pole), které dokáží snímat absorbanci v širokém pásmu, od 190 do 800 nm. Tyto detektory jsou vhodné, protože většina polyfenolů absorbuje UV záření v oblastech mezi 220-280 nm (např. fenolické kyseliny a první absorpční maximum flavonoidů) a mezi 300-550 nm (druhé absorpční maximum flavonoidů). Pro stilbeny, např. resveratrol, je vhodný i fluorescenční detektor. Pro stanovení některých polyfenolů, např. isoflavonoidů jsou také popsány metody založené na

plynové chromatografie (GC – gas chromatography). Zde je však nutné analyty nejdříve derivatizovat na methylestery, což dodá látkám potřebnou těkavost pro separaci v koloně (Naczka a Shahidi, 2006; Stalikas, 2007; Tsao 2010).

Největší rozvoj je však ve využívání spřažených technik, resp. použití HPLC s tandemovou hmotnostní spektrometrií (MS/MS – tandem mass spectrometry), toto spojení je poté označováno jako LC-MS/MS (liquid chromatography – tandem mass spectrometry: kapalinová chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií). Tato metoda využívá fragmentaci molekul a poskytuje tak informace o struktuře látky a zároveň je schopná v režimu MRM (multiple reaction monitoring) tyto analyty kvantifikovat, a to i v případě, že dochází ke koeluci (Naczka a Shahidi, 2006; Stalikas, 2007; Tsao 2010). Přibližná identifikace koeluovaných látek je znázorněna na obrázku 9.

K analýze polyfenolů se také využívají další metody, jako kapilární elektroforéza, NIR spektroskopie (near infra-red – blízká infračervená spektroskopie) nebo nukleární magnetická resonance (Ajila et al., 2010) Tyto metody jsou však příliš specifické, a pro běžné analýzy se ve větší míře nepoužívají.

Obrázek 9. Identifikace koeluovaných látek v džemu z hlohu peřenoklaného (*Crataegus pinnatifida* Bunge) pomocí HPLC-MS/MS.



Poznámka: a) hlohový extrakt byl analyzován pomocí HPLC s UV detektorem při 280 nm: je vidět pouze jeden pik (označený v oválu); b) záznam hmotnostních spekter ( $m/z$ ) příslušného piků (bez fragmentace, negativní mód s elektrosprejovou ionizací  $[M-H]^-$ ), jsou vidět dvě dominantní látky s molekulovou hmotností 577 a 463; c) provedení MS/MS: fragmentace molekuly o hmotnosti 577 dává vznik fragmentům o hmotnostech 425, 289 a 125; d) provedení MS/MS: fragmentace molekuly o hmotnosti 463 dává vznik dceřiného iontu o molekulové hmotnosti 301; po získání těchto hmotnostních spekter lze pátrat v literatuře nebo knihovnách hmotnostních spekter a najít tak informace o těchto látkách, které se vyskytují v hlohu peřenoklaném; e) standard hyperosidu: v případě dostupného standardu je možné ověřit retenční čas látky ve vzorku, podle kterého je možné s jistotou potvrdit, že jedna z koeluovaných látek ve vzorku je hyperosid a druhá prokyanidin dimer typ B; tyto látky byly identifikovány podle Liu et al. (2010), pomocí retenčních časů a hmotnostních spekter dostupného standardu (hyperosidu).

## 2.4.2 Metody stanovení antioxidační aktivity

Metody, které stanovují AOA, resp. „sílu“ či účinnost AO jsou spektrofotometrické metody založené na změně barvy po reakci AO s činidlem, která je přímo úměrná antioxidačním schopnostem studovaných látek.

Nejznámější je metoda využívající stabilní radikál DPPH (2,2-difenyl-1-pikrylhydrazyl), který po reakci s AO mění barvu. Na podobném principu funguje i metoda ABTS (2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonát). Často využívanou metodou je i FRAP (ferric reducing antioxidant power), ve které je redukováno trojmocné železo na dvojmocné, které tvoří s 2,4,6-tripyridyl-s-triazinem modrý komplex. Další poměrně využívanou metodou je ORAC (oxygen radical absorbance capacity), při které se v testovaném systému generují kyslíkové radikály a následně se hodnotí schopnost testované látky zpomalit nebo zastavit radikálovou reakci. Stanovení se provádí měřením úbytku fluorescence. Všechny tyto metody mají určité nedostatky, protože nedokáží dobře vystihnout fyziologické podmínky v těle, nicméně poskytují alespoň orientační představu o účinnosti AO v potravině (Paulová et al., 2004; Tsao a Deng, 2004).

Kromě výše uvedených metod jsou využívány ještě další metody, které jsou popsány např. v přehledovém článku Gupta (2015), nicméně jejich popis by byl nad rámec této práce.

## 2.4.3 Metody stanovení míry oxidace lipidů a proteinů

Metody stanovení míry oxidace lipidů a proteinů do určité míry souvisí s AOA. Jejich principem však není stanovení AO či jejich vlastností, ale zaměřují se především na oxidační produkty, které se dělí na primární a sekundární (viz kapitola 2.3.1). I když se v praxi lze setkat s více metodami, které dokáží popsat oxidační změny lipidů, v potravinářství se využívají jen některé z nich a na ně bude tato kapitola zaměřena.

Primárními produkty oxidace lipidů jsou hydroperoxy, které jsou stanovovány tzv. peroxidovým číslem. Jedná se o jodometrické stanovení, při kterém hydroperoxy reagují s jodidem, což vede k vytvoření jódu, který je poté titrován thiosíranem sodným. Jako indikátor je využíván škrob. Výsledek je vyjádřen jako mg aktivního kyslíku obsaženého v 1 g lipidů, který dokáže oxidovat jodid draselný.

Peroxidové číslo je jedna z nejstarších a nejpoužívanějších metod hodnocení oxidace lipidů. Metoda má i spektrofotometrické provedení – stanovení konjugovaných dienů. Konjugované dvojně vazby se vytváří v polynenasycených mastných kyselinách jako důsledek oxidace. Konjugované dieny absorbují UV záření při 234 nm. Zvýšení absorbance při této vlnové délce znamená více konjugovaných dvojných vazeb, a tedy vyšší stupeň oxidace (Shantha a Decker, 1994; Laguerre et al., 2007; Pignitter a Somoza, 2012).

Z metod stanovujících sekundární produkty oxidace lipidů je jednou z nejčastějších metod TBARS analýza (thiobarbituric acid reactive substances – látky reagující s kyselinou barbiturovou). Při oxidaci podléhají hydroperoxydy degradaci a vytváří se další oxidační produkty, nejčastěji aldehydy. Ty jsou zastoupeny převážně MDA a 4-hydroxynonenalem (HNE). MDA reaguje s kyselinou 2-thiobarbiturovou za vzniku barevného produktu. Absorbance při 532-535 nm je přímo úměrná koncentraci MDA (Papastergiadis et al., 2012).

Podobnou metodou stanovující i jiné aldehydy než jen MDA je *p*-anisidinové číslo. Metoda je založená na reakci karbonylové skupiny aldehydů s *p*-anisidinem, což vede k formaci produktu absorbujícího UV záření při 350 nm (Barriuso et al., 2013). Zuo et al. (2017) však upozorňují, že tato metoda je pouze relativním posouzením oxidace oleje nebo tuku a neposkytuje přesné zastoupení a koncentraci jednotlivých oxidačních produktů.

Z těchto důvodů jsou využívány další metody založené na principu chromatografie, které jednotlivé analyty dokáží detekovat. Vzhledem k tomu, že velká část sekundárních produktů oxidace lipidů (aldehydy, ketony, alkoholy a další uhlovodíky) jsou těkavé látky, jeví se k využití jako vhodná metoda plynové chromatografie (GC – gas chromatography) spojená s hmotnostní spektrometrií (GC-MS) (Laguerre et al., 2007).

U produktů oxidace lipidů, které těkavé nejsou, je možné využít HPLC, nejvýhodnější se opět jeví ve spojení s hmotnostní spektrometrií, nejlépe tandemovou (HPLC-MS/MS), kde při analýze lipidů mohou být detekční limity v řádu pikogramů (Mssey a Nicolaou, 2013).

Další variantou kapalinové chromatografie je i SEC (size exclusion chromatography) neboli vylučovací chromatografie, u které jsou jako vhodné

detektory používány RI detektor (refractive index – refraktometrický detektor) a ELSD (evaporative light scattering detector – odpařovací detektor rozptylu světla). SEC je použitelná hlavně pro polymery triacylglycerolů, proto je často využívána u fritovacích olejů, kde k polymeraci u déle používaného oleje dochází (Caldwell et al., 2011).

Barriuso et al. (2013) uvádí, že existují i další metody na posuzování oxidačních produktů lipidů. Jsou to např. chemiluminescence, fluorescenční spektroskopie, infračervená spektroskopie, Ramanova spektroskopie, nukleární magnetická resonance a elektronová paramagnetická resonance. Tyto metody jsou velmi specifické a pro běžné posuzování oxidace lipidů v potravinách se příliš nevyžívají.

Jak bylo zmíněno v předchozích kapitolách, lipidy nejsou jediným substrátem pro oxidační pochody. Významnou složkou potravin jsou i proteiny, které také podléhají oxidaci. I zde je možno setkat se s rozmanitou skupinou metod, avšak v publikacích zaměřených na oxidaci proteinů ve velké míře převažuje metoda stanovující proteinové karbonyly, tzv. DNPH metoda (2,4-dinitrofenylhydrazin). Oxidační modifikace proteinů může vést k tvorbě karbonylových derivátů peptidů a aminokyselin. Karbonylové deriváty vytváří s DNPH produkt detekovatelný při 370 nm a absorbance je přímo úměrná karbonylových sloučenin (Nollet a Toldrá, 2008).

### 3 CÍL PRÁCE

Hlavní náplní disertační práce bylo studium vlivu přídatku surovin bohatých na polyfenolické sloučeniny na chemické, technologické a senzorické vlastnosti běžně konzumovaných potravin. Jednalo se zejména o komerčně dostupný extrakt rozmarýnu lékařského (*Rosmarinus officinalis* L.) Inolens 4 o a vedlejší produkty cibule kuchyňské (*Allium cepa* L.) jakožto odpadní suroviny vznikající při zpracování cibule kuchyňské.

Dílčími cíli práce bylo:

- najít vhodnou formu cibulových slupek (čistý extrakt/vodný výluh/namletá sypká směs), která by sloužila jako obohacující složka pro potraviny za účelem zvýšení jejich oxidační stability,
- ověřit účinnost přidané složky bohaté na antioxidanty ve vybraných potravinách rostlinného a živočišného původu, zejména posoudit antioxidační aktivitu obohacené potraviny, míru oxidace lipidů a tepelnou stabilitu polyfenolických látek,
- posoudit vliv přídatku na senzorické vlastnosti fortifikované potraviny.

Disertační práce vznikla za finanční podpory a v souvislosti s řešením těchto projektů:

- NAZV KUS QJ1610324 – Studium tradičních a nových zemědělských plodin jako zdrojů antioxidantů a dalších zdravích prospěšných látek a jejich využití při výrobě potravin,
- TAČR GAMA TG03010027 – Posílení aktivit proof-of-concept na Jihočeské univerzitě: dílčí projekt: Aplikační možnosti fermentace bezlepkových surovin pro zpracování na bezlepkové pekařské výrobky s vyšší výživovou hodnotou,
- GAJU 002/2016/Z – Genetika, zdraví zvířat a kvalita produktů jako základ konkurenceschopnosti,
- GAJU 028/2019/Z – Genetika, zdraví zvířat a biologicky a senzoricky aktivní látky jako základní předpoklady kvalitních potravin a zemědělských surovin,
- GAJU 032/2018/T – Využití odpadních produktů při pěstování a zpracování cibule kuchyňské (*Allium cepa* L.) jako zdroje biologicky a technologicky cenných látek v potravinářské výrobě,

- NAZV KUS QJ1510336 – Výzkum a podpora produkce zdravotně spotřebitelsky benefitních mléčných výrobků cílenou selekcí a modifikací profilu mastných kyselin mléčného tuku.



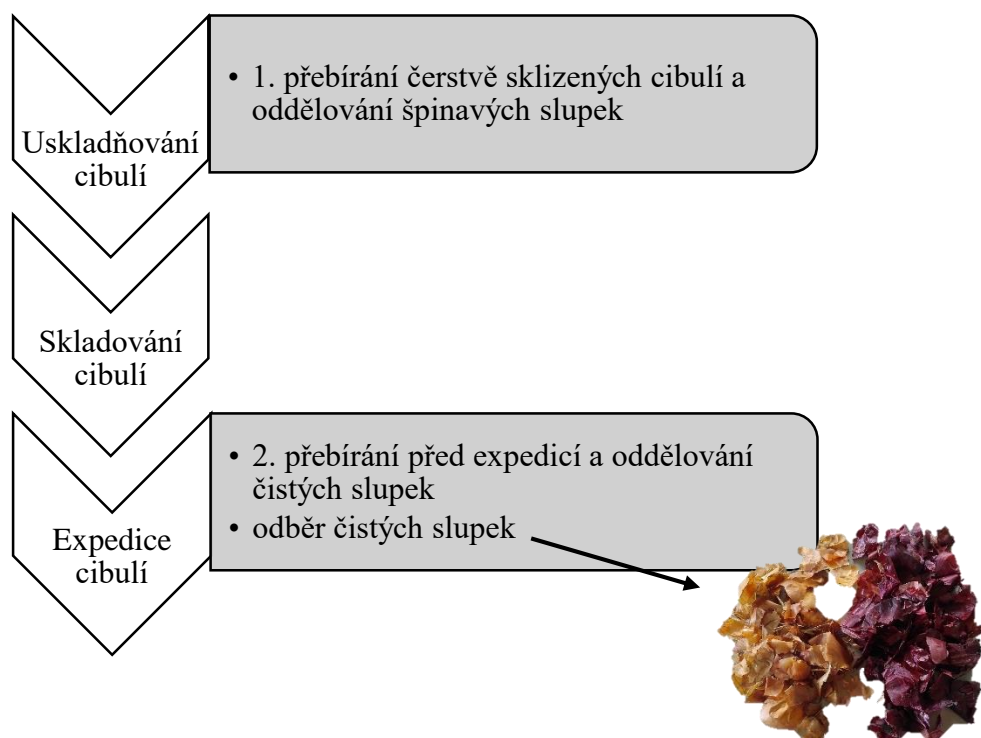
## 4 MATERIÁL A METODIKA

### 4.1 MATERIÁL

Komerčně dostupný extrakt rozmarýnu lékařského Inolens 4 (Vitiva d.d., Slovinsko). Hlavní účinné složky byly karnosol a karnosová kyselina. Antioxidant je schválený jako potravinářská přídatná látka označená kódem E392 podle Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1333/2008.

Vedlejší (odpadní) produkty při zpracování cibule kuchyňské byly poskytnuty firmou VITAL Czech s.r.o., Všešary, Česká republika. Tato zemědělská firma je jedním z největších producentů cibule kuchyňské ve střední Evropě. Vedlejší produkty byly složeny přednostně z cibulových slupek a malých či deformovaných, ale jinak zdravých cibulí dvou odrůd: žlutá Hybelle a červená Lisa. Vzhledem k velkému znečištění zeminou nebyly odebírány nejsvrchnější slupky, které se separují při naskladňování cibule do skladů, ale byla odebírána až druhá vrstva, která je již čistá. Tyto čisté slupky vznikají při expedici cibule, tedy v době, kdy už jsou špinavé slupky oddělené. Schéma odběru cibulových slupek je znázorněno na obrázku 10.

Obrázek 10. Schéma třídění cibulí a odběr čistých slupek.



## 4.2 METODIKA

### 4.2.1 Příprava fortifikovaných potravin

Typy potravin určené pro obohacení byly vybrány na základě splnění těchto podmínek:

- 1.) jsou běžně konzumované,
- 2.) obsahují lipidy náchylné k oxidaci a
- 3.) jsou vhodné pro fortifikaci z hlediska sensorických vlastností.

Z těchto důvodů byly vybrány následující typy potravin: rybí filety, vepřové karbanátky, bezlepkový chléb a rybí klobása. Tabulka 4 shrnuje druh obohacující složky a procento jejího přídavku. Konkrétní složení a postupy výroby jsou popsány v jednotlivých publikacích (kapitoly 5.1, 5.2, 5.3 a 5.4).

Tabulka 4. Aplikace různých forem obohacující složky do potravin.

Obhacující složka aplikovaná do potravin			
Rozmarýnový extrakt	Vodný výluh z cibulových slupek	Smažená cibule, sušená cibule a mouka z cibulových slupek	Mouka z cibulových slupek
↓	↓	↓	↓
Rybí filety	Vepřové karbanátky	Bezlepkové chleby	Rybí klobásy
Rozmarýnový extrakt byl rozředěn na 0,5, 1 a 2 % ve vodě. Filety byly rozděleny na 4 skupiny. Poté byly na 10 minut ponořeny do rozředěných extraktů o příslušné koncentraci. U kontrolního vzorku byla použita místo extraktu voda.	Vodné výluhy cibulových slupek žluté a červené odrůdy byly aplikovány do karbanátek z vepřové krkvice. Celkem bylo 5 skupin: kontrolní, 10 a 20 % přídavku výluhu ze žlutých cibulových slupek a 10 a 20 % přídavku červených cibulových slupek.	5 % bezlepkové směsi mouk nahrazeno různými frakcemi cibulového odpadu červené odrůdy. Celkem byly 4 skupiny: kontrolní, smažená cibule, sušená cibule a mouka z cibulových slupek.	Mouka z cibulových slupek žluté odrůdy aplikována do klobásy vyrobené z rybiho strojně odděleného masa. Celkem byly 4 skupiny, kontrolní, 1, 2 a 3 % přídavku slupkové mouky.

### 4.2.2 Analytické metody

Analýzy, které byly použité při experimentech, jsou shrnuty v tabulce 5. Detailní popis jednotlivých analýz je popsán v každé publikaci. Stěžejními analýzami

u fortifikovaných potravin byly vždy AOA (metodou DPPH), senzorická analýza a pokud se jednalo o masný výrobek, byla vždy provedena analýza sekundární oxidace lipidů (TBARS).

Tabulka 5. Přehled provedených analýz u forem cibulových slupek a fortifikovaných potravin.

Analýza	Cibulové slupky			Fortifikovaná potravina		
	Vodný výluh	Namletá mouka	Rybí filety*	Vepřové karbanátky	Bezlepkové chleby	Rybí klobásy
<b>Základní chemické složení**</b>		x		x		x
<b>Antioxidační vlastnosti</b>						
Celkové polyfenoly	x	x		x	x	x
DPPH	x	x	x	x	x	x
FRAP	x	x			x	x
LC-MS/MS	x	x			x	
<b>Oxidační stabilita tuků</b>						
TBARS			x	x		x
Peroxidové číslo			x			
pH		x				x
<b>Fyzikální vlastnosti</b>						
Analýza barvy			x		x	x
Hmotnostní ztráta po tepelném opracování						x
Analýza textury					x	
Vaznost vody		x				
<b>Mikrobiologické vyšetření</b>						
CPM			x			x
Psychofilní						x
<b>Senzorická analýza</b>			x	x	x	x

DPPH: 2,2-difenyl-1-pikrylhydrazyl; FRAP: ferric reducing antioxidant power; LC-MS/MS: liquid chromatography – tandem mass spectrometry; TBARS: thiobarbituric acid reactive substances; CPM: celkový počet mikroorganismů \*Rozmarýnový extrakt Inolens 4, aplikovaný na rybí filety, analyzován nebyl. Při experimentech se vycházelo z deklarace výrobce, který udává, že aktivní látky extraktu jsou karnosol a karnosová kyselina; \*\*Základní chemické složení: voda, tuk, bílkoviny, lipidy, sůl, popel

## 5 VÝSLEDKY A DISKUZE

Tato kapitola bude členěna do 4 podkapitol, které představují 3 publikované výsledky v časopisech s impakt faktorem a 1 výsledek ve formě manuskriptu připraveného k odeslání do redakce. V každé podkapitole bude krátký souhrn nejdůležitějších výsledků, popřípadě budou zobrazeny výsledky, které nebyly součástí příslušných publikací.

Práce byla zaměřena na studium vlivu přídavku surovin bohatých na AO do běžných potravin. Na základě předběžných výsledků byla práce následně zaměřena více na využívání vedlejších produktů cibule kuchyňské, zejména slupky, jako zdroj AO pro fortifikaci potravin. Cibule kuchyňská je z hlediska vyprodukovaného množství druhou nejpěstovanější zeleninou na světě. Její pěstování a zpracování je spojeno s generováním velkého množství odpadu, který by mohl být vhodným zdrojem technologicky i biologicky prospěšných látek.

## 5.1 VLIV EXTRAKTU Z ROZMARÝNU NA SKLADOVATELNOST RYBÍCH FILET

Linhartová, Z., Lunda, R., Dvořák, P., Bárta, J., Bártová, V., Kadlec, J., Samková, E., **Bedrníček, J.**, Pešek, M., Laknerová, I., Možina, S.S., Smetana, P., Mráz, J. 2019. Influence of rosemary extract (*Rosmarinus officinalis*) to extend the shelf life of vacuum-packed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fillets stored under refrigerated conditions. *Aquaculture International*, 27: 833-847.

Skladovatelnost různých potravin se liší s ohledem na rozdílný obsah vody a skladbu živin. Neošetřené rybí maso se rychle kazí a má nejkratší skladovatelnost oproti ostatním potravinám, jako jsou zrniny, zelenina, ovoce a ostatní druhy masa. Hlavními důvody jsou vyšší obsah vody a vyšší pH (Chang et al., 2020).

Rychlé mikrobiální a biochemické reakce, které probíhají po porážce ryb, vedou ke změnám v senzoričích a nutričních vlastnostech a zhoršují tak skladovatelnost. Pro zamezení těchto procesů se často využívají rostlinné extrakty, které mají antioxidační i antimikrobiální vlastnosti (Olatunde a Benjakul, 2018). Velmi často využívaný je také extrakt z rozmarýnu lékařského (*Rosmarinus officinalis* L.), který je velmi účinný a komerčně dostupný (Xie et al., 2017).

Cílem této studie bylo prodloužit skladovatelnost čerstvých filet z pstruha duhového (*Oncorhynchus mykiss* L.) pomocí extraktu z rozmarýnu lékařského Inolens 4.

Extrakt z rozmarýnu byl zředěn ve vodě na koncentrace 0,5 %, 1 % a 2 %. V kontrolní skupině byla použita pouze pitná voda. Do zředěných extraktů, resp. vody byly na 10 minut ponořeny vzorky filet. Poté byly vyjmuty a ponechány na odkapání, následně vakuově zabaleny a uskladněny po dobu 14 dnů při teplotě 4 °C. Sledovanými parametry byly:

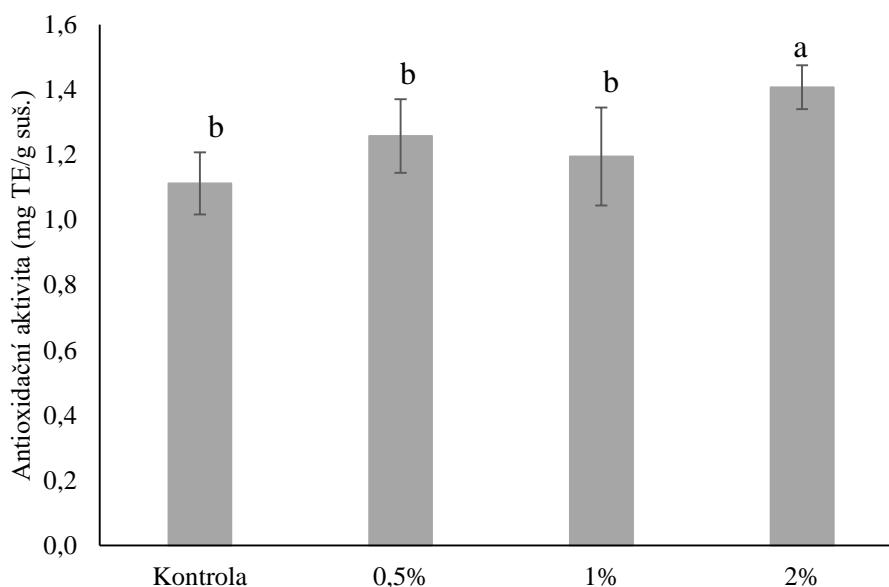
- počet celkových mikroorganismů,
- oxidace lipidů,
- AOA (metodou DPPH) a
- senzoričká analýza.

Ošetření vzorků extraktem rozmarýnu mělo pozitivní efekt na skladovatelnost. Během skladování měla kontrolní skupina výrazně vyšší celkové počty

mikroorganismů a koncentraci MDA, naznačující výraznou oxidaci lipidů. AOA (graf 2; není součástí publikace) byla zvýšena u všech skupin ošetřených extraktem, pouze u skupiny ošetřené 2% roztokem bylo navýšení statisticky významné. Přesto, že se AOA u skupin 0,5 % a 1 % statisticky významně nezvýšila, byly tyto koncentrace dostatečně účinné pro potlačení oxidace.

Senzorické hodnocení ukázalo, že nejlépe hodnocené byly vzorky ošetřené 0,5% roztokem extraktu. Z výsledků vyplývá, že použití extraktu nemělo negativní vliv na senzorické vlastnosti.

Graf 2. Antioxidační aktivita (DPPH) rybích filetů ošetřených rozmarýnovým extraktem.



Sloupce v grafu představují průměr  $\pm$  směrodatnou odchylku ( $n = 4$ ); <sup>a,b</sup> sloupce pro DPPH s různými indexy se statisticky významně liší; statistická analýza: ANOVA + *post hoc* Tukey HSD test;  $\alpha = 0,05$ ; DPPH: 2,2-difenyl-1-pikrylhydrazyl

V závěru lze konstatovat, že rozmarýnový extrakt byl dostatečně účinný k prodloužení skladovatelnosti syrových vakuově balených filetů pstruha duhového.



## Influence of rosemary extract (*Rosmarinus officinalis*) Inolens to extend the shelf life of vacuum-packed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fillets stored under refrigerated conditions

Zuzana Linhartová<sup>1</sup> · Roman Lunda<sup>1</sup> · Petr Dvořák<sup>1</sup> · Jan Bárta<sup>2</sup> · Veronika Bártová<sup>2</sup> · Jaromír Kadlec<sup>3</sup> · Eva Samková<sup>3</sup> · Jan Bedrníček<sup>3</sup> · Milan Pešek<sup>4</sup> · Ivana Laknerová<sup>5</sup> · Sonja Smole Možina<sup>6</sup> · Pavel Smetana<sup>3</sup> · Jan Mráz<sup>1</sup>

Received: 19 June 2018 / Accepted: 24 March 2019 / Published online: 11 April 2019  
© Springer Nature Switzerland AG 2019

### Abstract

The effects of three concentrations (0.5, 1.0 and 2%) of rosemary extract “Inolens 4” and control (without additive) on microbiological quality, sensory attributes, colour parameters and oxidative stability of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fillets during refrigerated storage after different periods (0, 3, 6, 10 and 14 days) were investigated. Microbial communities grew to between 1.93 and 2.29 colony-forming units per gramme (log CFU g<sup>-1</sup>), 5.10 and 5.27, 5.12 and 5.80 and 6.34 and 7.66 log CFU g<sup>-1</sup> after 0, 6, 8 and 10 days of storage, respectively, and fillets treated with Inolens 0.5 showed the lowest total viable counts among all analysed groups. Also, sensory analyses showed that Inolens 0.5 achieved best scores in all sensory attributes of cooked flesh. Evaluation of lipid oxidation parameters proved that treatment with Inolens 4 had a positive effect, leading to delay oxidation processes in flesh.

**Keywords** Antioxidant · Fish flesh · Lipid oxidation · Microbiological analyses · Sensory attributes

### Introduction

One of the most important parameters of fish flesh quality is the freshness (Alasavar et al. 2011). Generally, fish flesh, in comparison to poultry, pork or beef (Grau et al. 2011), is known for its very short shelf life, due to faster chemical and biological changes (such as oxidation of lipids, autolytic changes, metabolic activities of microorganisms) starting at the onset of the fish death (FAO 2005). This is affected by high water, nitrogen and protein content; low content of carbohydrates (close to neutral pH); and the presence of native autolytic and

---

✉ Zuzana Linhartová  
linhartova@frov.jcu.cz

Extended author information available on the last page of the article

microbial proteolytic activity in fish flesh (Sivertsvik et al. 2002). Thus, it is desirable to extend the time from killing the fish to its consumption and maintain freshness of flesh (Pacquit et al. 2007). There are many factors that affect freshness parameters of fish flesh such as: age of the fish, methods and time of fish processing, correct slaughtering and evisceration, storage temperature during handling, packaging technologies, lipid content and microbial contamination (Gates 2011; Pearce et al. 2011). From consumers' point of view, the colour and odour of fresh fish are the two most important quality parameters. Better results for fish freshness can be achieved using additives that suppress the growth of undesirable microorganisms, increase antioxidant capacity and have positive effect on other qualitative parameters (Pezeshk et al. 2015).

Recently, a great interest has been shown in natural additives because of the numerous benefits that they promise to human health. Among the most commonly used natural additives belong essential oils, plant extracts and herbs (Burt 2004; Holley and Patel 2005; Bakkali et al. 2008). Particular attention is being paid to the antioxidant and antimicrobial effects of extracts from the family Lamiaceae as rosemary (*Rosmarinus officinalis*), oregano (*Origanum glandulosum*), thyme (*Thymus vulgaris*), sage (*Salvia officinalis*) and also clove (*Syzygium aromaticum*) and citrus fruits extracts, which are the most studied natural additives used in the food industry (McCarthy et al. 2001; Corbo et al. 2008; Alén-Ruiz et al. 2009). Rosemary, belonging to the Lamiaceae family and being used as a medicinal herb for centuries, is an extremely effective herb that is the most profusely used active natural agent in food industry (Akhtar et al. 1998; Klančnik et al. 2010; Serdaroğlu and Felekoğlu 2005). The substances responsible for the high antioxidant effect of rosemary are phenolic diterpenes mainly including carnosic acid, 12-methoxy carnosic acid and carnosol (Borrás-Linares et al. 2014; Richheimer et al. 1996) and their antioxidant actions are similar to those of synthetic phenolic antioxidants (Cuvelier et al. 1996). Peiretti et al. 2012 studied the effect of three concentrations (0.2%, 1% and 3%) of rosemary oil (RO) on minced rainbow trout meat (MTM) and reported improvement of pH and oxidative stability of the lipids and fatty acids profile, which resulted in a significant extension of MTM shelf life after RO treatment. Also Li et al. (2012a) indicated that dipping of large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*) with tea polyphenol and rosemary extract combined with chitosan coating during refrigerated storage could extend the shelf life of fish to 8–10 days compared with the control (untreated) group. Bensid et al. (2014) showed reduced growth of bacteria (*Pseudomonas*) using 0.04% thyme extract (decrease of 1.92 log colony-forming unit (CFU) g<sup>-1</sup>) on anchovies (*Engraulis encrasicolus*) stored on ice. Similar results were obtained using 0.03% oregano extract (0.79 log CFU g<sup>-1</sup> reduction) and 0.02% clove (1.13 log CFU g<sup>-1</sup> reduction).

So far, most studies have focused on the effect of natural additives on bacterial growth or oxidative changes in fish flesh. However, the positive antimicrobial/antioxidative effects of these natural substances are not a priority from a consumer perspective. High quality of the fresh product with ideal sensory properties such as odour, taste, aftertaste, texture and colour are the most important factors for consumers. It is necessary to study how a natural extract can influence the organoleptic properties and texture of the final product, because it may not always be positively attributed by consumers. As an example, Pezeshk et al. (2015), used thyme extract, which positively inhibited the bacterial growth, but on the other hand, negatively affected the texture, colour, aroma and taste of the rainbow trout fillets. Similar results were obtained by Andevvari and Rezaei (2011) using cinnamon oil, which negatively affected mainly the colour of rainbow trout flesh. As mentioned before, plant extracts are strong antioxidants, but may have a negative effect on taste. Therefore, pre-tests for the improvement of sensory characteristics as well as better fish flesh quality and longer shelf life are needed and



could improve the fish consumption. For the present study, we have chosen a commercial product from the company Vitiva d.d., Slovenia—a rosemary extract called “Inolens 4” with active antioxidant substances (carnosol and carnosic acid). However, the effect of the product of rosemary extract Inolens 4 on microbiological, sensory, colour and lipid oxidation parameters analyses of flesh in rainbow trout has not been investigated yet.

The main objective of this study was to evaluate the effects of natural additive Inolens 4, following sensory and colour analyses, microbiological growth and lipid oxidation parameters of vacuum-packed rainbow trout fillets stored under refrigerated conditions

## Materials and methods

### Experimental fish, filleting and treatments

Farmed rainbow trouts of marketable size ( $414 \pm 86$  g) were obtained from a local company Lesy a rybníky města České Budějovice s.r.o., Czech Republic, in November 2016. Fish were immediately transported to the processing facilities of the Institute of Aquaculture and Protection of Waters (IAPW), Faculty of Fisheries and Protection of Waters (FFPW), University of South Bohemia (USB) in České Budějovice, Czech Republic. Then, 48 fish were randomly selected and divided into four experimental groups ( $n = 12$  per group). Fish from each group were stunned, weighted, beheaded, gutted and filleted. All fish were hand filleted by the same person to ensure consistency. Fillets were washed in cold water with ice. Experimental fish were processed per group (12 fish per group), which were named based on the concentration of the used rosemary extract Inolens 4 (Vitiva d.d., Slovenia). Four different treatments were applied: (A) control (without any additive); (B) Inolens 0.5 (Inolens of concentration 0.5% with dilution 5 mL/1 L of tap water); (C) Inolens 1.0 (Inolens of concentration 1.0% with dilution 10 mL/1 L of tap water) and (D) Inolens 2.0 (Inolens of concentration 2.0% with dilution 20 mL/1 L of tap water). After filleting, fillets were washed in a bath with the appropriate dilution of Inolens in cold tap water for 10 min (control group only bath with tap water) and led to drip on grids for 5 min. Five grams of muscle was cut from each fillet, frozen at  $-80$  °C for later analysis of the compliance with the permitted levels of active substances (carnosol and carnosic acid) of rosemary extract according to Regulation (EC) No. 1333/2008 of the European Parliament and of the council with regard to the use of extracts of rosemary (E 392) in certain low-fat meat and fish. These analyses were done by the company Vitiva d.d., Slovenia. Subsequently, fillets from each group were packed separately in polyvinyl chloride bags, vacuumed and stored in straight horizontal position separately in refrigerated chambers at a temperature of  $4.3 \pm 0.6$  °C for up to 14 days.

Sensory and microbiological analyses were performed on days 0, 3, 6 and 10 and colour analysis on days 0 and 7. Sampling for lipid oxidation analyses was done on days 0, 8, 10 and 14 and samples were frozen at  $-80$  °C for later analyses.

### Microbiological analyses

Microbiological analyses were performed on storage days 0, 3, 6 and 10 in duplicates. Ten grams of individual right trout fillet ( $n = 10$  per experimental group) was cut, weighed and homogenised with 90 mL of sterile peptone water (0.1 % peptone, Sigma-Aldrich, Prague, Czech Republic) in Stomacher Classic Panoramic IU500 (IUL Instruments, Spain) for 90 s. Further decimal dilutions

were made with the same diluent and diluted inoculum was poured with molten plate count agar (PCA, Sigma-Aldrich, Prague, Czech Republic) and congealed. PCA plates were incubated under aerobic conditions at 30 °C for 72 h. Total viable counts (TVC) were determined after incubation and recorded as log colony-forming units per gramme.

### Sensory analyses

Sensory analyses were evaluated on raw fillets at days 0, 6, 8 and 10 and on cooked fillets on days 0, 6 and 8. Sensory quality of raw and cooked fillets was evaluated by a panel of 10 trained members from the staff of Institute of Aquaculture and Protection of Waters (IAPW), Faculty of Fisheries and Protection of Waters (FFPW), University of South Bohemia (USB), České Budějovice, Czech Republic, in individual cubicles to separate panellists from each other (ISO 8589 2007) under controlled conditions of light, temperature and humidity. The evaluators were asked to avoid the following prior to the test: drinking coffee, eating spicy food, being too hungry or too full, smoking and wearing strong perfumes. Sensory analyses of cooked samples were composed of three small pieces of flesh ( $2 \times 2$  cm), each from a different part of fillet of the appropriate group, placed separately in 0.2-L glass jars with a lid labelled with random 3- or 4-digit codes and cooked for 15 min at 150 °C in an electric oven. To comply with the rules of ISO 6658 (2005) and ISO 8589 (2007), no salt, oil, or spices were added. Samples of each group were served warm, in unopened jars and evaluation of each sample was performed twice under different coding with 30-min break between assessments. The panellists classified five parameters, namely odour, flavour, after taste, consistency and assessing of liking and were supposed to indicate the rating by assigning a point on a 100-mm unstructured hedonic scale (0 mm = very good fresh quality; 100 mm = spoiled quality). Points in hedonic scale were measured by a ruler, converted to numbers and statistically analysed. Sensory analysis of raw fillets of rainbow trout were examined by four attributes by numbers from 1 to 5, namely: consistency (5 = firm; 1 = soft); colour/discolouration (5 = no discolouration; 1 = extreme discolouration), odour (5 = extremely desirable; 1 = extremely undesirable) and overall acceptability (5 = extremely acceptable; 1 = extremely unacceptable) according to Másilko et al. (2015).

### Colour measurement

Colour of rainbow trout fillets of the four experimental groups ( $n = 5$  per group) during storage (days 0 and 7) was measured at three locations along the dorsal part: A = frontal; B = mid and C = caudal, and two locations along the ventral part: D = frontal and E = caudal. Colour was measured at five locations of each fillet to represent the whole surface using a Colour Spectrophotometer CM-600d (Konica Minolta Inc., Japan). Colorimetric data represented as CIE  $L^*$  = whiteness,  $a^*$  = the red-green axis and  $b^*$  = the yellow-blue axis were measured directly on the fillets and each spot was measured in duplicates.

### Spectrophotometric determination of lipid oxidation parameters: thiobarbituric acid reactive substances and peroxide value

Samplings for lipid oxidation analyses were performed on days 0, 8, 10 and 14. Five grammes of muscle was cut and homogenised in a table blender. Lipid oxidation parameters were determined by two spectrophotometric methods.

Firstly, lipid hydroperoxides determined by peroxide value (PV) was performed according to Shanta and Decker (1994) and Richards and Hultin (2002). To 1-g homogenised sample (each sample in triplicates), ice cold chloroform/methanol (2:1 v/v) was added and homogenised with T18 basic Ultra-Turrax (IKA, Germany) for 3 min. The homogenate was filtrated, 0.5% NaCl was added, vortexed and centrifuged at  $3000\times g$  (Hereus Megafuge 16R, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) for 5 min. Lower phase was additionally diluted. To 2.5 mL of final sample solution, ammonium thiocyanate and iron (II) chloride were added. Samples were incubated in the dark, at room temperature for 20 min. After incubation, the absorbance was determined at 500 nm on spectrophotometer Spectroquant Pharo 100 (Merck s.r.o., Prague, Czech Republic). Calibration curve was prepared with iron (III) chloride and results were expressed as milliequivalents of peroxide per kilogram of sample. Analyses were performed on samples from four experimental groups from the beginning (day 0) and at the end (day 14) of storage.

Secondly, thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) were performed following the method of Miller (1998). To 1-g homogenised sample (each sample in triplicates), butylhydroxytoluene (BHT) and 10% TCA in 0.2 M  $H_3PO_4$  solutions were added and homogenised with T18 basic Ultra-Turrax (IKA, Germany) for 1 min. After homogenisation and filtration, 0.02 M thiobarbituric acid (TBA) was added to the filtrate, vortexed and heated for 30 min at 85 °C. After heating, each sample was pipetted in triplicates on 96-well plate and the absorbance was determined at 550 nm on PLATE Reader AF 2200 (Eppendorf AG, Hamburg, Germany). Standard curve was prepared with triethyl phosphate (TEP) and results were expressed as micrograms of malondialdehyde (MDA) per gramme of sample. Analyses were performed on samples from four experimental groups and storage days 0, 8, 10 and 14.

### Free radical scavenging method

The antioxidant activity (AOA) of rosemary extract was determined using 2,2-diphenyl picrylhydrazyl (DPPH) as a free radical. Samplings for AOA analyses were performed on day 0. Ten grammes of muscle of fillets ( $n = 10$  per treatment) was cut and stored at  $-80\text{ °C}$  for analyses. On the day of analysis, samples were homogenised. To 0.5-g homogenised sample (each sample in triplicates), 0.5 mL of methanol was added. Samples were extracted for 10 min and centrifuged at  $7000\times g$  (Hereus Megafuge 16R, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) at  $5\text{ °C}$  for 15 min. The analytical amount of DPPH was estimated based on the procedure described by Brand-Williams et al. (1995) and Sánchez-Moreno et al. (1998) with slighter modifications. To 4 mL of methanol-DPPH solution at a concentration of  $0.0275\text{ mg mL}^{-1}$ , 100  $\mu\text{L}$  of extracted supernatant was added and incubated at room temperature for 2 h. After incubation, the absorbance was determined at 515 nm against methanol. The evaluation was performed using the external standard method (Trolox). The results were expressed as milligrammes of Trolox equivalent (TE) per gramme of dry matter of fish, showing the same AOA as antioxidants present in 1-g sample.

### Statistical analyses

All data were calculated as means  $\pm$  standard deviations (SD). The microbiological and spectrophotometric data were performed with analysis of variance (ANOVA) with subsequent post hoc comparisons using Tukey's honest significant difference (HSD) or Fisher's low significant difference (LSD) tests. Sensory analyses were evaluated using hierarchical ANOVA

(assessors nested in treatments, assessments nested in assessors) using Fisher's LSD test. In the same way, colour measurement were performed using hierarchical ANOVA (storage days nested in treatments) using Fisher's LSD test. Probability values of  $p < 0.05$  were considered as significant. All statistical analyses were performed using STATISTICA software (Version 12, StatSoft, Inc., 2013) for MS Windows.

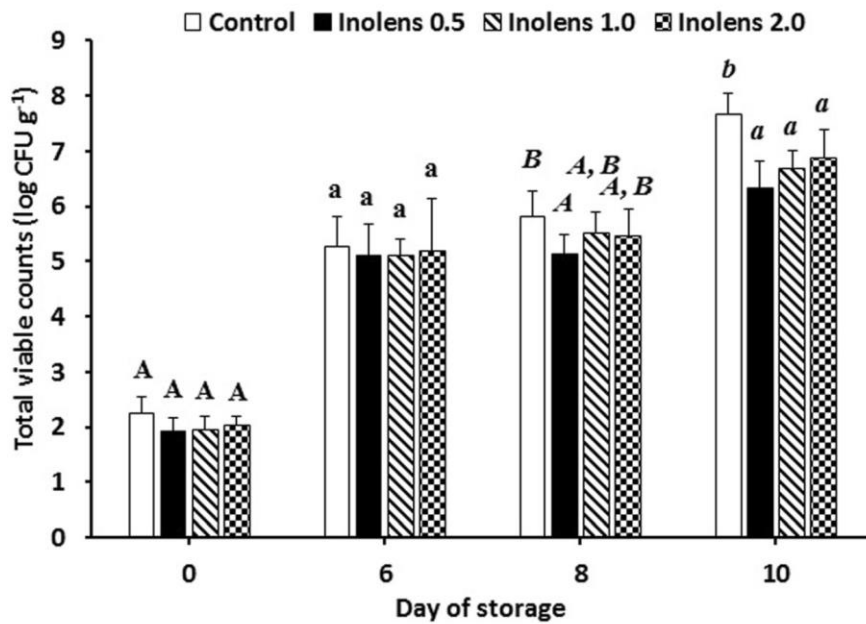
## Results and discussion

### Fish sample and filleting

The bodyweight of fish of all analysed groups namely control, Inolens 0.5, Inolens 1.0 and Inolens 2.0 was  $413.98 \pm 87.59$  g. Moreover, weight of right and left fillets was examined and were  $135.66 \pm 17.79$  and  $137.56 \pm 20.12$  g, respectively. High filleting yield with very low SD ( $59.59 \pm 1.33\%$ ) and no significance difference (Fisher's LSD test,  $p > 0.05$ ,  $n = 12$  per treatment) between the weight of right and left fillets show professional filleting of only one qualified person. The analyses done by Vitiva d.d., Slovenia, on compliance with the permitted levels of active substances (carnosol and carnosic acid) of rosemary extract according to Regulation (EC) No. 1333/2008 were in regulation (10–12 mg/kg of carnosic acid and carnosol) and did not exceed the limit value 15 mg/kg expressed as the sum of carnosic acid and carnosol for low-fat meat and fish.

### Microbiological analyses

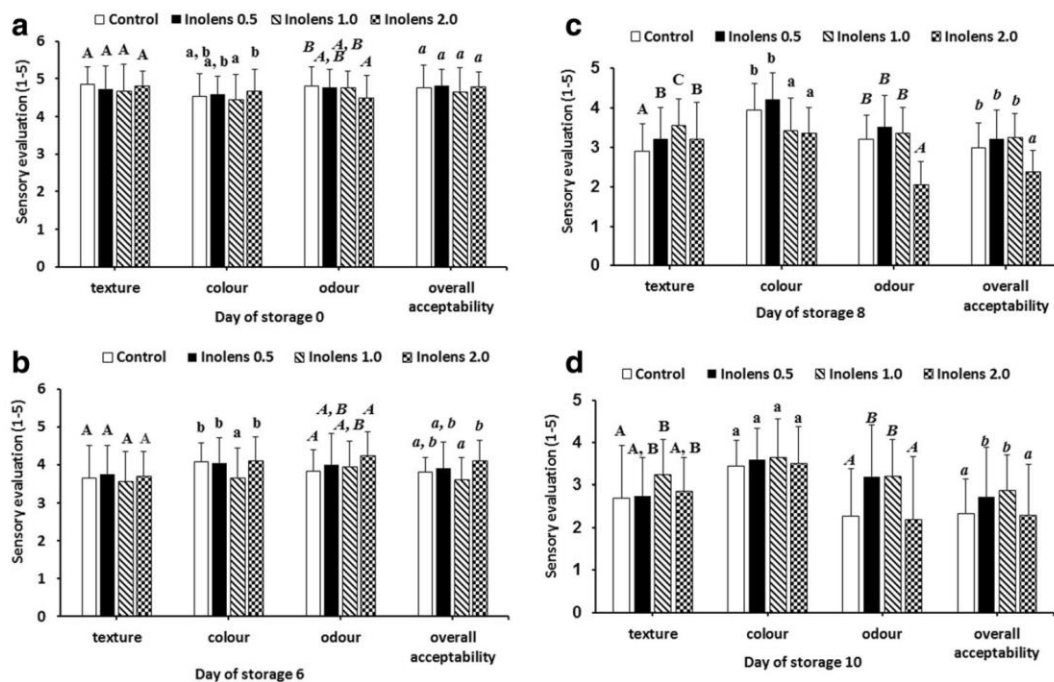
Figure 1 shows the changes in TVC ( $\log \text{CFU g}^{-1}$ ) in trout fillets of four experimental groups during storage (days of analyses = 0, 3, 8 and 10). The highest bacterial growth was documented in the control group and the lowest in the group Inolens 0.5 during all days of analyses (Fig. 1). The initial load was 1.93–2.29  $\log \text{CFU g}^{-1}$  and increased to 5.10–5.27, 5.12–5.80 and 6.34–7.66  $\log \text{CFU g}^{-1}$  after 6, 8 and 10 days of storage in tested groups, respectively. Considering the 7  $\log \text{CFU g}^{-1}$  as an upper acceptable level for TVC in samples of fish fillets (ICMSF 1986), this limit was exceeded on day 10 and only in the control group ( $7.66 \pm 0.38 \log \text{CFU g}^{-1}$ ). Inolens 0.5 showed the smallest increases in TVC during storage. This proves our hypothesis that Inolens inhibits microbial growth and extended the shelf life of rainbow trout fillets to 10 days. Similar results were demonstrated by Gao et al. (2014), where rosemary extract in combination with nisin extended the shelf life of pompano (*Trachinotus ovatus*) fillet for 6 days compared to control during chilled storage. This is in accordance with reports of Li et al. (2012a, b), who studied the effect of 2% rosemary extract in crucian carp and microbial deterioration was delayed about 5 days. Jiang et al. (2011) identified that rosemary essential oil had strong antibacterial activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria. Also, Coban and Ozpolat (2013) reported that rosemary extract was effective in reduction of bacteria growth. Mahmoud et al. (2004) documented that various essential oils reduced growth total aerobic mesophilic and psychrotrophic bacteria. Likewise, Oğuzhan Yildiz (2015) confirmed that the thyme and rosemary oil effectively inhibited the growth of total aerobic flora. Similar results have been reported in other recent studies (Ucak et al. 2011; Erkan 2012; Çoban and Can 2013).



**Fig. 1.** Changes in total viable counts of four experimental groups (control, Inolens 0.5, Inolens 1.0 and Inolens 2.0) of rainbow trout fillets in dependence on the length of storage period (days 0, 3, 6 and 10) at  $4.3 \pm 0.6$  °C. Data are shown as mean (bars)  $\pm$  standard deviation (whiskers) within the treatments. Bars with the same letters are not significantly different (Tukey's HSD test,  $p < 0.05$ ),  $n = 10$  per treatment

### Sensory evaluation

The best way for fish freshness evaluation is the organoleptic assessment. If the plant extract/essential oil has a positive antibacterial and antioxidant effect, the organoleptic consumers' preferences and satisfaction would be important (Pezeshk et al. 2015). Figure 2 documents the development of sensory properties (texture, colour, odour and overall acceptability) of raw fillets of rainbow trout of four experimental groups during storage (days 0, 6, 8 and 10), where the higher scoring represents better quality. Figure 3 shows the evaluation of the sensory properties (odour, flavour, after taste and consistency) of four experimental groups of cooked rainbow trout fillets on days 0, 6 and 8. Based on the results of the microbiology analyses (TVC range = 6.34–7.66 log CFU g<sup>-1</sup>) and sensory analyses (discolouration, slime production and off-odour) mainly in control group, the samples were rejected for consumption on day 10. On the first day of sensory analysis (day 0, Figs. 2a and 3a) similar results were recorded among all analysed groups in all sensory attributes on raw fillets, whereas in the case of cooked fillets, the best scores were recorded in the group Inolens 0.5, in all analysed characteristics. On day 8, the best result with significant difference was recorded in group Inolens 1.0 for texture of raw flesh (Fig. 2c). For cooked flesh, similar results as on day 0 were detected on day 8, where Inolens 0.5 achieved best scores in all attributes and control the worst scores except for after taste (Fig. 3c). This also strengthened the result that the better sensory results of the fillets treated with Inolens correlate with the lower microbial counts in these fillets. Sensory scores in each evaluated parameter increased (cooked, 0 = fresh and 100 = spoilage quality) or decreased (raw, 1 = the worst and 5 = the best) as storage time increased. On the last day of analyses, where only raw fillets were tested, control group reported the worst results in all sensory attributes (Fig. 2d).

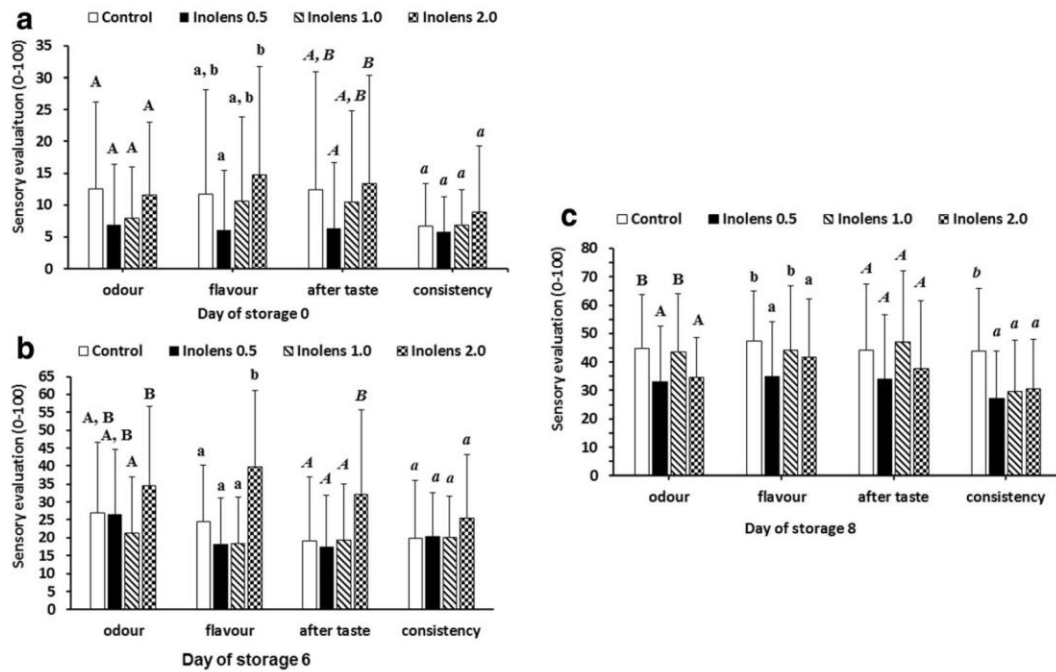


**Fig. 2.** Sensory evaluation (texture, colour, odour and overall acceptability) of raw (the best = 5, the worst = 1) fillets of rainbow trout of four experimental groups (control, Inolens 0.5, Inolens 1.0, and Inolens 2.0) on days (a) 0, (b) 6, (c) 8 and (d) 10 at  $4.3 \pm 0.6$  °C. Results are expressed as mean (bars)  $\pm$  standard deviation (whiskers) within the treatments. Bars having the same character are not significantly different (hierarchical ANOVA, Fisher's LSD test,  $p > 0.05$ ),  $n = 10$  per treatment

The results show that rosemary flavour and colour have no negative attributes. Similar results in odour and taste were documented by Çoban and Can (2013) in smoked rainbow trout by determining the fish to be of “good quality” after processing. Oğuzhan Yildiz (2015) improved the sensory quality of smoked rainbow trout flesh by using rosemary and thyme essential oils. The flavour and texture of the whole crucian carp treated with 0.2% tea polyphenols and 0.2% rosemary extract were improved during storage at  $4 \pm 1$  °C (Li et al. 2012a). Similar results were reported in other recent studies (Ucak et al. 2011; Erkan 2012; Coban and Ozpolat 2013).

### Colour analysis

Colorimetric data of fillets of four experimental groups (control, Inolens 0.5, Inolens 1.0 and Inolens 2.0) of rainbow trout were evaluated at 5 points (A–E) on each fillet by CIE  $L^*$  = lightness,  $a^*$  = redness (red-green axis) and  $b^*$  = yellowness (yellow-blue axis) during storage (days 0 and 7) and recorded in Table 1. The results show that fillets of all experimental groups slightly brightened ( $L^*$ ), slightly reddened ( $a^*$ ) and yellowed ( $b^*$ ) during storage. As was expected, the strongly green rosemary extract had a significant effect on the coloration of fillets from the Inolens 2.0 group with detected green colouring ( $-a^*$ ) at the beginning of the experiment. On the other hand, green colouring of groups 0.5 and 1.0 Inolens were comparable with the control. However, on day 7, significantly higher  $a^*$  (less green) values in the Inolens 2.0 group were measured than on the first day of analysis (Table 1) and were comparable with control, indicating that the green colour disappears during storage and does not negatively affect the coloration of flesh. We found that the ventral parts (spot D) of examined fillets were



**Fig. 3.** Sensory attribute analysis (odour, flavour, after taste and consistency) of four experimental groups (control, Inolens 0.5, Inolens 1.0 and Inolens 2.0) of cooked rainbow trout fillets on days (a) 0, (b) 6 and (c) 8 at  $4.3 \pm 0.6$  °C. Results (0 = very fresh quality; 100 = spoiled quality) are expressed as mean (bars)  $\pm$  standard deviation (whiskers) within the treatments. Bars having the same characters are not significantly different (hierarchical ANOVA, Fisher’s LSD test,  $p < 0.05$ ),  $n = 10$  per treatment

significantly lighter and more yellow than the dorsal ones. This could be associated with the distribution of fat in fish flesh, which is usually lower in the dorsal and posterior parts than in the ventral and anterior parts of fish fillet (Nortvedt and Tuene 1998; Roth et al. 2007). In the study of Tironi et al. (2009) the rosemary extract partially prevented the loss of red colour in chilled Argentinian sea perch (*Pseudoperca semifasciata*) muscle. Similar flesh colour variables according to storage time and treatments (0.2, 1.0 and 2.0 % rosemary oil) in minced rainbow trout were reported by Peiretti et al. (2012). Likewise, the variabilities and colour loss in fish flesh attributed to the oxidation of protein was documented by Li et al. (2012a, b).

**Spectrophotometric determination of lipid oxidation**

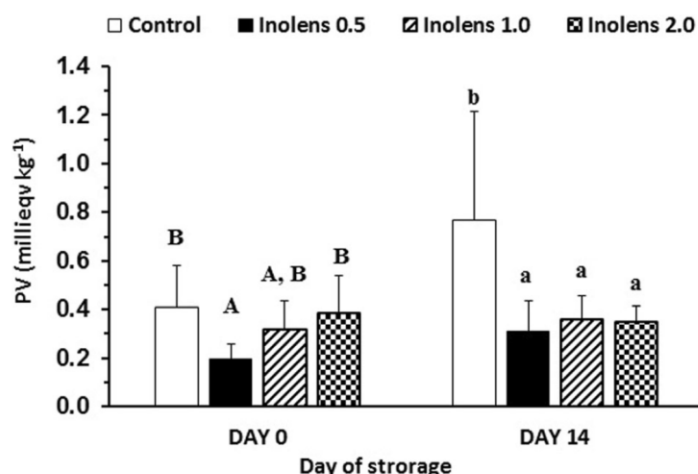
Two lipid oxidation parameters were measured and in both, increasing trend was observed during storage with significant difference between control and Inolens groups at the last days of analyses as shown in Figs. 4 and 5.

In PV analysis, only data from the beginning (day 0) and last (day 14) day of storage are reported (Fig. 4). The PV was measured, because it provides information about lipid oxidation degree and indicates the amount of oxidised substances, mainly the hydroperoxides, so-called primary oxidation products (Çoban and Can 2013). The limit value of PV content for human consumption is between 8 and 10 millieqv  $\text{kg}^{-1}$  fat (Schormüller 1968). In the control group, PV significantly increased from initial  $0.41 \pm 0.17$  to  $0.77 \pm 0.45$  millieqv peroxide  $\text{kg}^{-1}$ , representing over 50% increase of PV. Moreover, PV in control group was significantly higher than in all analysed Inolens groups and ranged from  $0.31 \pm 0.12$  to  $0.36 \pm 0.12$  millieqv peroxide  $\text{kg}^{-1}$ , which showed an effective inhibition in the primary oxidation process. Tironi

**Table 1** Colour parameters of fillets of four experimental groups (control, Inolens 0.5, Inolens 1.0 and Inolens 2.0) of rainbow trout represented as  $L^*$  = whiteness,  $a^*$  = redness and  $b^*$  = yellowness during storage (days 0 and 7). Data are shown as mean  $\pm$  standard deviation (SD). Values having the same character in the same row and among colour parameters and positions are not significantly different (hierarchical ANOVA, Fisher's LSD test,  $p > 0.05$ ),  $n = 5$  per treatment

		Experimental group/day of storage	
Colour parameters (mean $\pm$ SD)	Position	Control/0	Control/7
$L^*$	A	54.04 $\pm$ 2.17 <sup>b,c</sup>	56.54 $\pm$ 2.05 <sup>a,b</sup>
	B	54.12 $\pm$ 3.37 <sup>a,b</sup>	55.81 $\pm$ 2.03 <sup>a,b</sup>
	C	53.56 $\pm$ 3.90 <sup>a</sup>	56.26 $\pm$ 2.67 <sup>a,b</sup>
	D	59.51 $\pm$ 1.93 <sup>b,c</sup>	62.25 $\pm$ 1.62 <sup>c</sup>
	E	55.80 $\pm$ 1.78 <sup>a,b</sup>	53.89 $\pm$ 1.12 <sup>a</sup>
$a^*$	A	- 2.76 $\pm$ 0.72 <sup>c</sup>	- 2.55 $\pm$ 0.94 <sup>c</sup>
	B	- 2.41 $\pm$ 0.57 <sup>c</sup>	- 1.95 $\pm$ 1.07 <sup>b</sup>
	C	- 1.99 $\pm$ 0.67 <sup>b,c</sup>	- 1.90 $\pm$ 0.85 <sup>b</sup>
	D	- 1.82 $\pm$ 1.26 <sup>b</sup>	- 2.15 $\pm$ 1.03 <sup>b,c</sup>
	E	- 1.48 $\pm$ 0.51 <sup>a,b</sup>	- 0.91 $\pm$ 0.53 <sup>a</sup>
$b^*$	A	6.63 $\pm$ 2.54 <sup>a</sup>	8.25 $\pm$ 2.63 <sup>a,b</sup>
	B	6.88 $\pm$ 2.15 <sup>a</sup>	8.50 $\pm$ 2.36 <sup>a,b</sup>
	C	7.84 $\pm$ 2.31 <sup>a,b</sup>	9.61 $\pm$ 3.02 <sup>b,c</sup>
	D	11.18 $\pm$ 1.36 <sup>c</sup>	10.86 $\pm$ 2.18 <sup>c</sup>
	E	7.18 $\pm$ 2.96 <sup>a</sup>	8.45 $\pm$ 2.56 <sup>a,b</sup>
Colour parameters (mean $\pm$ SD)	Position	Inolens 0.5/0	Inolens 0.5/7
$L^*$	A	55.71 $\pm$ 3.59 <sup>a,c</sup>	57.40 $\pm$ 2.31 <sup>c</sup>
	B	54.02 $\pm$ 4.78 <sup>a,b</sup>	56.35 $\pm$ 3.96 <sup>b,c</sup>
	C	52.44 $\pm$ 3.51 <sup>a</sup>	57.45 $\pm$ 3.86 <sup>c</sup>
	D	62.97 $\pm$ 3.14 <sup>d</sup>	61.90 $\pm$ 1.94 <sup>d</sup>
	E	55.38 $\pm$ 3.20 <sup>a,c</sup>	53.38 $\pm$ 3.82 <sup>a,b</sup>
$a^*$	A	- 2.78 $\pm$ 0.53 <sup>d</sup>	- 2.23 $\pm$ 0.82 <sup>c,d</sup>
	B	- 2.36 $\pm$ 0.55 <sup>c,d</sup>	- 1.79 $\pm$ 0.91 <sup>b,c</sup>
	C	- 1.54 $\pm$ 0.78 <sup>b,c</sup>	- 1.43 $\pm$ 0.78 <sup>a,b</sup>
	D	- 1.61 $\pm$ 0.56 <sup>b,c</sup>	- 1.63 $\pm$ 1.42 <sup>b,c</sup>
	E	- 1.03 $\pm$ 0.46 <sup>a,b</sup>	- 0.65 $\pm$ 1.08 <sup>a</sup>
$b^*$	A	6.38 $\pm$ 2.94 <sup>a</sup>	8.09 $\pm$ 2.34 <sup>a,b</sup>
	B	6.68 $\pm$ 2.12 <sup>a</sup>	8.27 $\pm$ 2.49 <sup>a,b</sup>
	C	8.82 $\pm$ 3.31 <sup>b</sup>	10.03 $\pm$ 2.25 <sup>b,c</sup>
	D	10.92 $\pm$ 1.02 <sup>c</sup>	11.11 $\pm$ 1.04 <sup>c</sup>
	E	8.62 $\pm$ 0.88 <sup>b</sup>	8.67 $\pm$ 1.65 <sup>b</sup>
Colour parameters (mean $\pm$ SD)	Position	Inolens 1.0/0	Inolens 1.0/7
$L^*$	A	56.85 $\pm$ 3.84 <sup>b</sup>	58.95 $\pm$ 3.3 <sup>b,c</sup>
	B	55.29 $\pm$ 2.00 <sup>a,b</sup>	58.73 $\pm$ 3.61 <sup>c</sup>
	C	54.27 $\pm$ 0.93 <sup>a</sup>	57.20 $\pm$ 3.20 <sup>b</sup>
	D	60.51 $\pm$ 1.88 <sup>c,d</sup>	63.06 $\pm$ 2.53 <sup>d</sup>
	E	52.58 $\pm$ 2.26 <sup>a</sup>	55.31 $\pm$ 4.72 <sup>a,b</sup>
$a^*$	A	- 2.69 $\pm$ 0.40 <sup>c</sup>	- 2.78 $\pm$ 0.59 <sup>d</sup>
	B	- 2.18 $\pm$ 0.24 <sup>b</sup>	- 2.19 $\pm$ 0.32 <sup>b</sup>
	C	- 2.02 $\pm$ 0.47 <sup>b</sup>	- 2.08 $\pm$ 0.28 <sup>b</sup>
	D	- 2.38 $\pm$ 0.35 <sup>b,c</sup>	- 2.59 $\pm$ 0.20 <sup>c,d</sup>
	E	- 1.04 $\pm$ 0.37 <sup>a</sup>	- 1.20 $\pm$ 0.56 <sup>a</sup>
$b^*$	A	6.69 $\pm$ 2.44 <sup>a</sup>	8.25 $\pm$ 0.84 <sup>b</sup>
	B	8.45 $\pm$ 0.91 <sup>b</sup>	9.09 $\pm$ 1.06 <sup>b,c</sup>
	C	8.27 $\pm$ 0.80 <sup>b</sup>	7.94 $\pm$ 1.21 <sup>a,b</sup>
	D	9.94 $\pm$ 1.20 <sup>c</sup>	11.26 $\pm$ 1.06 <sup>d</sup>
	E	7.02 $\pm$ 1.45 <sup>a,b</sup>	8.78 $\pm$ 1.68 <sup>b,c</sup>
Colour parameters (mean $\pm$ SD)	Position	Inolens 2.0/0	Inolens 2.0/7
$L^*$	A	55.44 $\pm$ 1.41 <sup>b,c</sup>	57.70 $\pm$ 1.95 <sup>c</sup>
	B	53.84 $\pm$ 1.93 <sup>a,b</sup>	55.22 $\pm$ 0.86 <sup>b</sup>
	C	54.28 $\pm$ 5.22 <sup>a,b</sup>	54.83 $\pm$ 2.18 <sup>a,b</sup>
	D	55.89 $\pm$ 1.86 <sup>b,c</sup>	57.32 $\pm$ 1.88 <sup>c</sup>
	E	52.20 $\pm$ 2.65 <sup>a</sup>	52.67 $\pm$ 3.00 <sup>a</sup>
$a^*$	A	- 3.39 $\pm$ 0.29 <sup>e</sup>	- 2.41 $\pm$ 0.27 <sup>c,d</sup>
	B	- 2.80 $\pm$ 0.44 <sup>d</sup>	- 1.91 $\pm$ 0.29 <sup>b,c</sup>
	C	- 2.19 $\pm$ 0.46 <sup>c</sup>	- 1.65 $\pm$ 0.35 <sup>b</sup>
	D	- 2.51 $\pm$ 0.55 <sup>c,d</sup>	- 1.84 $\pm$ 0.93 <sup>b,c</sup>
	E	- 1.50 $\pm$ 0.55 <sup>b</sup>	- 0.80 $\pm$ 0.64 <sup>a</sup>
$b^*$	A	6.55 $\pm$ 1.58 <sup>a,b</sup>	6.61 $\pm$ 0.76 <sup>a,b</sup>
	B	6.99 $\pm$ 0.42 <sup>b,c</sup>	5.81 $\pm$ 0.65 <sup>a</sup>
	C	8.85 $\pm$ 1.90 <sup>c</sup>	6.96 $\pm$ 0.24 <sup>b,c</sup>
	D	9.65 $\pm$ 2.07 <sup>c</sup>	8.99 $\pm$ 1.39 <sup>c</sup>
	E	7.08 $\pm$ 0.47 <sup>b</sup>	7.36 $\pm$ 0.76 <sup>b</sup>

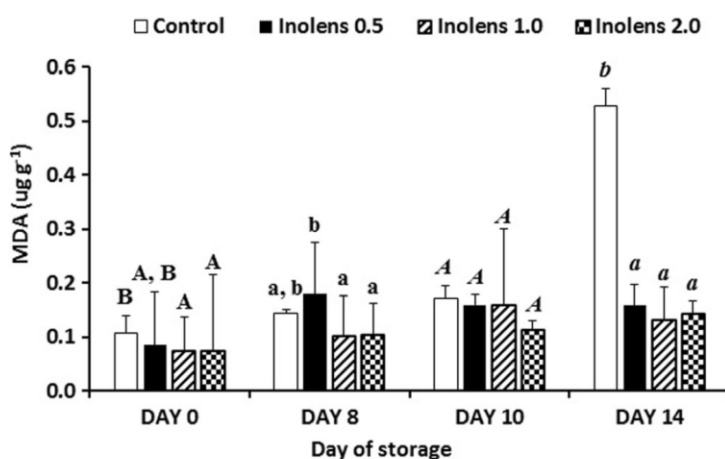




**Fig. 4.** Spectrophotometric determination of lipid oxidation parameters determined by peroxide value (PV), expressed as milliequivalents of peroxide per kilogramme of sample, at the beginning (day 0) and at the end (day 14) of storage. Data are represented as mean (bars) ± standard deviation (whiskers) within the treatments. Bars having the same letters are not significantly different (Fisher’s LSD test,  $p < 0.05$ ),  $n = 5$  per treatment in triplicates

et al. (2009) reported the application of 200 and 500 mg kg<sup>-1</sup> rosemary extract in chilled Argentine sandperch muscle, which significantly reduced production of secondary oxidation compounds.

The TBA test is widely used to measure lipid oxidation in food products (mainly alkanes, alkenes, aldehydes and ketones) during the final stage of oxidation—the secondary oxidation products. The reaction of aldehydes (particularly malondialdehydes and glutaraldehydes), with amino groups in proteins or DNA, may cause structural and functional changes (Gerrard and Brown 2002). The consumable limit value of the TBA content is between 7 and 8 mg MDA kg<sup>-1</sup> samples (Sinnuber and Yu 1958; Coban and Ozpolat 2013). On the first day of analysis, TBARS in control group ( $0.11 \pm 0.03 \mu\text{g MDA g}^{-1}$ ) was significantly higher compared to



**Fig. 5** Spectrophotometric determination of lipid oxidation parameters by thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) expressed as microgrammes of MDA per gram of sample in dependence of storage period (days 0, 8, 10 and 14). Data are shown as mean (bars) ± standard deviation (whiskers) within the treatments. Bars with the same letter are not significantly different (Fisher’s LSD test,  $p < 0.05$ ),  $n = 5$  per treatment in triplicates

Inolens groups 1.0 ( $0.07 \pm 0.02 \mu\text{g MDA g}^{-1}$ ) and 2.0 ( $0.07 \pm 0.02 \mu\text{g MDA g}^{-1}$ , Fig. 5). The TBARS values increased during storage and reached significantly higher values ( $p > 0.05$ ) in control ( $0.53 \pm 0.14 \mu\text{g MDA g}^{-1}$ ) in comparison to all Inolens groups ( $0.13\text{--}0.16 \mu\text{g MDA g}^{-1}$ , Fig. 5). Our observation was similar to the results from Ojagh et al. (2010) and Li et al. (2012a). More or less similar results on the effective antioxidant activity of essential oils or extracts have been obtained in rainbow trout (Erkan 2012; Çoban and Can 2013; Oğuzhan Yildiz 2015) and mangar (*Luciobarbus esocinus*) (Coban and Ozpolat 2013). Cadun et al. (2008) investigated the effect of rosemary extract on the quality of marinated deep-water pink shrimp during refrigerated storage and showed that addition of rosemary extract decreased TBA values in comparison with the control group. Also, Serdaroglu and Felekoğlu (2005) observed inhibition of TBA by using that rosemary and onion extract. To sum up, lipid oxidation parameters showed that Inolens has a positive effect on delaying oxidation processes in fish flesh and did not reach the limit for flesh consumability.

### Antioxidant activity

The DPPH method was used to evaluate the antioxidant capacity of fillet treated with rosemary extract Inolens 4 at the beginning of experiment (day 0). The DPPH radical scavenging activities of rosemary extract increased with the increasing concentration and control exhibited the lowest AOA. The AOA reached significantly lower values in control ( $1.11 \pm 0.08 \text{ mg TE g}^{-1}$  dry matter) in comparison to Inolens group 2.0 ( $1.41 \pm 0.06 \text{ mg TE g}^{-1}$  dry matter). The results are consistent with previous reported data on antioxidant activity of rosemary oils (Hussain et al. 2010; Amariei et al. 2016).

### Conclusion

The present study showed that rosemary extract Inolens 4 (0.5, 1.0 and 2%) could effectively inhibit lipid oxidation, delay the oxidative changes in fish flesh, retard the microbial growth, could improve colour and sensory characteristics and extend the shelf life of rainbow trout fillets. Therefore, treatment with Inolens 4 on vacuum-packed rainbow trout fillets stored under refrigerated conditions can be utilized as a safe method for the preservation of fish and could extend the shelf life to 10 days.

**Acknowledgements** Special thanks belong to the technicians Kateřina Fulínová and Vítězslav Plička, from the Laboratory of nutrition of IAPW, FFPW, USB, České Budějovice, for their kind help during the analyses.

**Funding** The study was financially supported by the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic—the CENAKVA project (LM2018099), CENAKVA Center Development (CZ.1.05/2.1.00/19.0380) and Biodiversity (CZ.02.1.01/0.0/0.0/16\_025/0007370), by the Ministry of Agriculture of the Czech Republic (No. QJ1510119 and No. QJ1610324).

### Compliance with ethical standards

**Conflict of Interest** The authors declare that they have no conflict of interest.

**Ethical approval** All applicable international, national and/or institutional guidelines for the care and use of animals were followed by the authors.

## References

- Akhtar P, Gray JI, Booren AM, Garling DL (1998) Effect of dietary components and surface application of oleoresin rosemary on lipid stability of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) muscle during refrigerated and frozen storage. *J Food Lipids* 5:43–58. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4522.1998.tb00106.x>
- Alasavar C, Shanhidi F, Miyashita K, Wanasundra U (2011) Handbook of seafood quality, safety and health applications. Wiley-Blackwell, Ltd., p 576
- Alén-Ruiz F, García-Falcón MS, Pérez-Lamela MC, Martínez-Carballo E, Simal-Gándara J (2009) Influence of major polyphenols on antioxidant activity in Mencía and Brancellao red wines. *Food Chem* 113:53–60. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.07.038>
- Amañei S, Poroch-Seritan M, Gutt G, Oroian M, Ciomei E (2016) Rosemary, thyme and oregano essential oils influence on physicochemical properties and microbiological stability of minced meat. *J Microbiol Biotechnol Food Sci* 6:670–676. <https://doi.org/10.15414/jmbfs.2016.6.1.670-676>
- Andevári GT, Rezaei M (2011) Effect of gelatin coating incorporated with cinnamon oil on the quality of fresh rainbow trout in cold storage. *Int J Food Sci Technol* 46:2305–2311. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2011.02750.x>
- Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M (2008) Biological effects of essential oil—a review. *Food Chem Toxicol* 46:446–475. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2007.09.106>
- Bensid A, Ucar Y, Bendeddouche B, Ozogul F (2014) Effect of the icing with thyme, oregano and clove extracts on quality parameters of gutted and beheaded anchovy (*Engraulis encrasicolus*) during chilled storage. *Food Chem* 145:681–686. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.08.106>
- Borrás-Linares I, Stojanović Z, Quirantes-Piné R, Arráez-Román D, Švarc-Gajić J, Fernández-Gutiérrez A, Segura-Carretero A (2014) *Rosmarinus officinalis* leaves as a natural source of bioactive compounds. *Int JMol Sci* 15:20585–20606. <https://doi.org/10.3390/ijms151120585>
- Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C (1995) Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT Food Sci Technol* 28:25–30. [https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5)
- Burt S (2004) Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *Int J Food Microbiol* 94:223–253. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022>
- Cadun A, Kisla D, Cakli S (2008) Marination of deep-water pink shrimp with rosemary extract and the determination of its shelf-life. *Food Chem* 109:81–87. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.12.021>
- Çoban OE, Can OP (2013) The effect of active packaging film containing rosemary extract on the quality of smoked rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J Aquat Food Prod T* 22:361–370. <https://doi.org/10.1080/10498850.2011.652766>
- Coban OE, Ozpolat E (2013) The effects of different concentrations of rosemary (*Rosmarinus officinalis*) extract on the shelf life of hot-smoked and vacuum-packed *Luciobarbus esocinus* fillets. *J Food Process Preserv* 37:269–274. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4549.2011.00645.x>
- Corbo MR, Speranza B, Fillippone A, Granatiero S, Conte A, Sinigaglia M, Del Nobile MA (2008) Study on the synergic effect of natural compounds on microbial quality decay of packed fish hamburger. *Int J Food Microbiol* 127:261–267. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.07.014>
- Cuvelier ME, Richard H, Berset C (1996) Antioxidative activity of phenolic composition of pilot-plant and commercial extracts of sage and rosemary. *J Am Oil Chem Soc* 73:645–652. <https://doi.org/10.1007/bf02518121>
- Erkan N (2012) The effect of thyme and garlic oil on the preservation of vacuum-packaged hot smoked rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Food Bioprocess Technol* 5:1246–1254. <https://doi.org/10.1007/s11947-010-0412-7>
- FAO (2005) Food and Agricultural Organization. Post-harvest changes in fish. Cited 25 February 2017 <http://www.fao.org/fishery/topic/12320/en>
- Gao M, Feng L, Jiang T, Zhu J, Fu L, Yuan D, Li J (2014) The use of rosemary extract in combination with nisin to extend the shelf life of pompano (*Trachinotus ovatus*) fillet during chilled storage. *Food Control* 37:1–8. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.09.010>
- Gates KW (2011) Handbook of seafood and seafood products analysis. In: Leo, M.L. & Noller, F.T. (eds.) *J Aquat Food Prod T* 20:258–269 <https://doi.org/10.1080/10498850.2011.561188>
- Gerrard AJ, Brown KP (2002) Protein cross-linking in food: mechanisms, consequences, applications. *Int Congr Ser* 1245:211–215. [https://doi.org/10.1016/S0531-5131\(02\)00910-X](https://doi.org/10.1016/S0531-5131(02)00910-X)
- Grau R, Sánchez AJ, Girón J, Iborra E, Fuentes A, Barat JM (2011) Nondestructive assessment of freshness in packaged slice chicken breasts using SW-NIR spectroscopy. *Food Res Int* 44:331–337. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.10.011>
- Holley RA, Patel D (2005) Improvement in shelf-life and safety of perishable foods by plant essential oils and smoke antimicrobials. *Food Microbiol* 22:273–292. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2004.08.006>
- Hussain AI, Anwar F, Chatha SAS, Jabbar A, Mahboob S, Nigam PS (2010) *Rosmarinus officinalis* essential oil: antiproliferative, antioxidant and antibacterial activities. *Braz J Microbiol* 41:1070–1078. <https://doi.org/10.1590/S1517-838220100004000027>

- ICMSF (1986) International commission on microbiological specifications for foods. Sampling plans for fish and shellfish. In: ICMSF (ed.). Microorganisms in foods. Sampling for microbiological analysis: principles and scientific applications. Vol. 2 (2nd edn). Toronto, Canada: University of Toronto Press
- ISO 6658 (2005) Sensory analysis—methodology—general guidance. [http://www.iso.org/iso/iso\\_catalogue/catalogue\\_tc/catalogue\\_detail.htm?csnumber=36226](http://www.iso.org/iso/iso_catalogue/catalogue_tc/catalogue_detail.htm?csnumber=36226)
- ISO 8589 (2007) Sensory analysis—general guidance for the design of test rooms. [http://www.iso.org/iso/catalogue\\_detail.htm?csnumber=36385](http://www.iso.org/iso/catalogue_detail.htm?csnumber=36385)
- Jiang Y, Wu N, Fu YJ, Wang W, Luo M, Zhao CJ, Zu YG, Liu XL (2011) Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of rosemary. *Environ Toxicol Pharmacol* 32:63–68. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2011.03.011>
- Klančnik A, Piskemik S, Jeršek B, Smole Možina S (2010) Evaluation of diffusion and dilution methods to determine the antibacterial activity of plant extracts. *J Microbiol Methods* 81(2):121–126. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2010.02.004>
- Li T, Hu W, Li J, Zhang X, Zhu J, Li X (2012a) Coating effects of tea polyphenol and rosemary extract combined with chitosan on the storage quality of large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*). *Food Control* 25:101–106. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.10.029>
- Li TT, Li JR, Hu WZ, Zhang XG, Li XP, Zhao J (2012b) Shelf-life extension of crucian carp (*Carassius auratus*) using natural preservatives during chilled storage. *Food Chem* 135:140–145. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.04.115>
- Mahmoud BSM, Yamazaki K, Miyashita K, Shin IS, Dong-Suk C, Suzuki T (2004) Bacterial microflora of carp (*Cyprinus carpio*) and its shelf-life extension by essential oil compounds. *Food Chem* 21:656–662. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2004.03.001>
- Másilko J, Zajíc T, Hlaváč D (2015) The culture system affects organoleptic properties and lipid composition of common carp (*Cyprinus carpio* L.) meat. *J Texture Stud* 46:345–352. <https://doi.org/10.1111/jtxs.12134>
- McCarthy T, Kerry JP, Kerry JF, Lynch PB, Buckley D (2001) Assessment of the antioxidant potential of natural food and plant extracts in fresh and previously frozen pork patties. *Meat Sci* 57:177–184. [https://doi.org/10.1016/S0309-1740\(00\)00090-5](https://doi.org/10.1016/S0309-1740(00)00090-5)
- Miller DD (1998) Lipid peroxidation. Food chemistry—a laboratory manual. Wiley-Interscience, John Wiley & Sons, New York, Chichester, Weinheim, Brisbane, Singapore, Toronto, pp 57–67
- Nortvedt R, Tuene S (1998) Body composition and sensory assessment of three weight groups of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) fed three pellet sizes and three dietary fat levels. *Aquaculture* 161:295–313. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(97\)00277-9](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(97)00277-9)
- Oğuzhan Yildiz P (2015) Effect of essential oils and packaging on hot smoked rainbow trout during storage. *J Food Process Preserv* 39:806–815. <https://doi.org/10.1111/jfpp.12291>
- Ojagh SM, Rezaei M, Razavi SH, Hosseini SMH (2010) Effect of chitosan coatings enriched with cinnamon oil on the quality of refrigerated rainbow trout. *Food Chem* 120:193–198. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.10.006>
- Pacquit A, Frisby J, Diamond D, Lau KT, Farrell A, Quilty B, Dimond D (2007) Development of smart packaging for the monitoring of fish spoilage. *Food Chem* 102:466–470. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.05.052>
- Pearce KL, Rosenvold K, Andersen HJ, Hopkins DL (2011) Water distribution and mobility in meat during the conversion of muscle to meat and ageing and the impacts on fresh meat quality attributes—a review. *Meat Sci* 89:111–124. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2011.04.007>
- Peiretti PG, Gai F, Ortoffi M, Aigotti R, Medana C (2012) Effects of rosemary oil (*Rosmarinus officinalis*) on the shelf-life of minced rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) during refrigerated storage. *Foods* 1:28–39. <https://doi.org/10.3390/foods1010028>
- Pezeshk S, Ojagh SM, Alishahi A (2015) Effect of plant antioxidant and antimicrobial compounds on the shelf-life of seafood—a review. *Czech J Food Sci* 33:195–203. <https://doi.org/10.17221/593/2014-CJFS>
- Richards MP, Hultin HO (2002) Contributions of blood and blood components to lipid oxidation in fish muscle. *J Agric Food Chem* 50:555–564. <https://doi.org/10.1021/jf010562h>
- Richheimer SL, Bernart MW, King GA, Kent MC, Beiley DT (1996) Antioxidant activity of lipid-soluble phenolic diterpenes from rosemary. *J Am Oil Chem Soc* 73(4):507–514
- Roth B, Jenssen MD, Jonassen TM, Foss A, Imstrand A (2007) Change in flesh quality associated with early maturation of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*). *Aquac Res* 38:757–763. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2007.01729.x>
- Sánchez-Moreno C, Larrauri JA, Saura-Calixto F (1998) A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. *J Sci Food Agric* 76:270–276. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0010\(199802\)76:2<270::AID-JSFA945>3.0.CO;2-9](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0010(199802)76:2<270::AID-JSFA945>3.0.CO;2-9)
- Schormüller J (1968) Handbuch der Lebensmittel Chemie. Band III/2 Teil. Tierische Lebensmittel Eier, Fleisch, Buttermilch. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, pp 1482–1537

- Serdaroğlu M, Felekoğlu E (2005) Effects of using rosemary extract and onion juice on oxidative stability of sardine (*Sardina pilchardus*) mince. *J Food Qual* 28:109–120
- Shanta NC, Decker EA (1994) Rapid, sensitive, iron-based spectrophotometrical methods for determination of peroxide values of food lipids. *Journal of AOAC Int* 77:421–424. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4557.2005.00016.x>
- Sinnuber RO, Yu TC (1958) 2-Thiobarbituric acid method for the measurement of rancidity in fishery products, II. The quantitative determination of malonaldehyde. *Food Technol* 1:9–12
- Sivertsvik M, Jeksrud J, Rosnes JT (2002) A review of modified atmosphere packaging of fish and fishery products—significance of microbial growth, activities and safety. *Int J Food Sci Technol* 37:107–127. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2621.2002.00548.x>
- Tironi V, Tomás M, Añón M (2009) Lipid and protein changes in chilled sea salmon (*Pseudoperca semifasciata*): effect of previous rosemary extract (*Rosmarinus officinalis* L.) application. *Int J Food Sci Technol* 44:1254–1262. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2009.01955.x>
- Ucak I, Ozogul Y, Durmus M (2011) The effects of rosemary extract combination with vacuum packing on the changes of Atlantic mackerel fish burgers. *Int J Food Sci Technology* 46:1157–1163. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2011.02610.x>

**Publisher's Note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

## Affiliations

Zuzana Linhartová<sup>1</sup> · Roman Lunda<sup>1</sup> · Petr Dvořák<sup>1</sup> · Jan Bárta<sup>2</sup> · Veronika Bártová<sup>2</sup> · Jaromír Kadlec<sup>3</sup> · Eva Samková<sup>3</sup> · Jan Bedrníček<sup>3</sup> · Milan Pešek<sup>4</sup> · Ivana Laknerová<sup>5</sup> · Sonja Smole Možina<sup>6</sup> · Pavel Smetana<sup>3</sup> · Jan Mráz<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Faculty of Fisheries and Protection of Waters, South Bohemian Research Center of Aquaculture and Biodiversity of Hydrocenoses, Institute of Aquaculture and Protection of Waters, University of South Bohemia in České Budějovice, Na Sádkách 1780, 370 05 České Budějovice, Czech Republic

<sup>2</sup> Faculty of Agriculture, Department of Plant Production, University of South Bohemia in České Budějovice, Studentská 1668, 370 05 České Budějovice, Czech Republic

<sup>3</sup> Faculty of Agriculture, Department of Food Biotechnologies and Agricultural Products Quality, University of South Bohemia in České Budějovice, Studentská 1668, 370 05 České Budějovice, Czech Republic

<sup>4</sup> Faculty of Education, Department of Health Education, University of South Bohemia in České Budějovice, České Budějovice, Czech Republic

<sup>5</sup> Food Research Institute Prague, Radiová 1285/7, 102 00, 10-Hostivař Praha, Czech Republic

<sup>6</sup> Biotechnical Faculty, Department of Food Science and Technology, University of Ljubljana, Jamnikarjeva 101, 1000 Ljubljana, Slovenia

## 5.2 VODNÉ EXTRAKTY Z CIBULOVÝCH SLUPEK JAKO ZDROJ ANTIOXIDANTŮ PRO MASNÉ VÝROBKY

**Bedrníček, J.,** Laknerová, I., Linhartová, Z., Kadlec, J., Samková, E., Bárta, J., Bártová, V., Mráz, J., Pešek, M., Winterová, R., Vrchotová, N., Tríska, J., Smetana, P. 2019. Onion waste as a rich source of antioxidants for meat products. *Czech Journal of Food Sciences*, 37: 268-275.

Voda v receptuře většiny masných výrobků zaujímá důležité místo. U některých výrobků se přidává ve velkém množství, až okolo 30 %. Důvodů pro přidávání vody je několik. Jde o ekonomiku výroby, vzhledem k tomu, že voda je nejlevnější ingrediencí a snižuje cenu produktu. Voda má významnou technologickou funkci, rozpouští proteiny, fosfáty a sůl, ve formě ledu snižuje teplotu během kutrování či mělnění. S tím souvisí i senzorické vlastnosti, protože přidaná voda zvyšuje šťavnatost výrobku (Rhodes a Nute, 1980; Feiner, 2006).

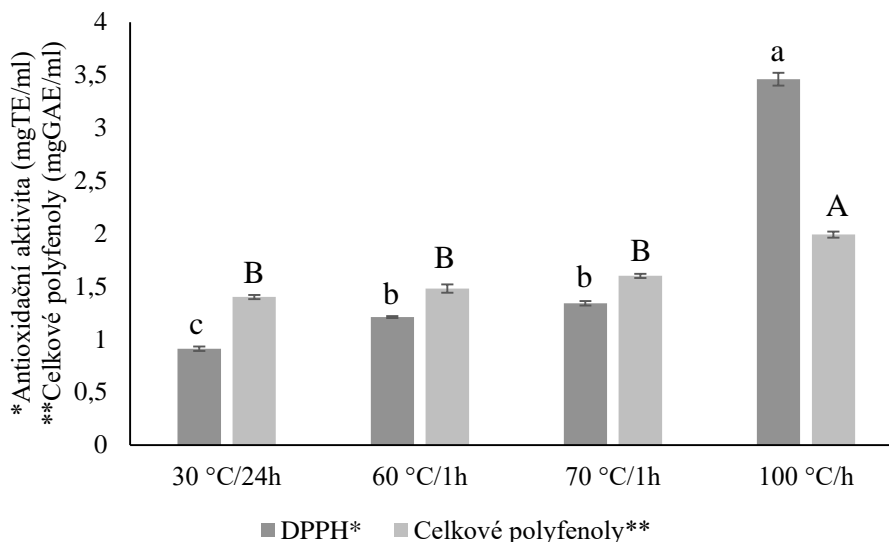
Cílem tohoto experimentu bylo nahradit vodu používanou při výrobě masných výrobků vodným výluhem (extraktem) z cibulových slupek za účelem zvýšení AOA masného výrobku a oxidační stability lipidů.

Důvodem využití vodného výluhu bylo pokusit se jednoduchým, v průmyslovém měřítku proveditelným, způsobem zvýšit antioxidační vlastnosti bez nutnosti využívat složité extrakční postupy a organická rozpouštědla. Jako modelový masný výrobek byl zvolen karbanátek vyrobený z vepřové krkovice.

Výluhy cibulových slupek žluté odrůdy (Ž) Hybelle a červené odrůdy (Č) Lisa (obrázek 11) byly vyrobeny následujícím způsobem: 50 g nenamletých slupek bylo extrahováno ve 2 litrech vody při 100 °C. Kombinace doby a teploty extrakce cibulových slupek na výrobu vodných extraktů, které byly následně použity při výrobě karbanátků, byla zvolena na základě předchozího experimentu provedeného u cibulových slupek Ž. Předpokus spočíval v nalezení optimální kombinace doby a teploty, při které by měl výluh nejvyšší AOA a obsah celkových polyfenolů. Výsledky tohoto pre-experimentu jsou znázorněny v grafu 3 (není součástí publikace). Z grafu je patrné, že nejlepší antioxidační vlastnosti měl výluh extrahovaný při teplotě 100 °C po dobu 1 hodiny. Na základě tohoto zjištění byl poté vyroben i výluh z cibulových slupek Č. Nejsilnější výluh Ž dosahoval hodnoty 3,46±0,06 mg TE/ml, což je v porovnání se samotnými cibulovými slupkami velmi málo. AOA samotných

slupek Ž byla 84,67 mg TE/g, tj. zhruba 25x více, AOA slupek Č činila 99,9 mg TE/g. Výroba vodných výluhů se tak zdá být velice neefektivní, nicméně je to lehce aplikovatelná forma obohacující složky.

Graf 3. Antioxidační aktivita (metodou DPPH) a obsah celkových polyfenolů ve vodných extraktech cibulových slupek žluté odrůdy Hybelle.



Sloupce v grafu představují průměr  $\pm$  směrodatnou odchylku ( $n = 4$ ); <sup>a-c</sup>sloupce pro DPPH s různými indexy se statisticky významně liší; <sup>A,B</sup>sloupce pro obsah celkových polyfenolů s různými indexy se statisticky významně liší; statistická analýza: ANOVA + *post hoc* Tukey HSD test;  $\alpha = 0,05$ ; DPPH: 2,2-difenyl-1-pikrylhydrazyl

Do vzorků masa byla přidána různá množství (10 %, 20 %) výluhů (extrahovaných při 100 °C/1 hodina) cibulových slupek Ž a Č. Celkem bylo vytvořeno pět skupin: 10 % Ž, 10 % Č a 20 % Ž a 20 % Č. Kontrolní skupina byla bez přidaného výluhu. Vyrobené vzorky karbanátků byly skladovány pět dnů při 5 °C v polyetylenových sáčcích bez modifikace atmosféry.

Sledovanými parametry u vzorků byly:

- AOA (metodou DPPH),
- obsah celkových polyfenolů,
- TBARS a
- senzorická analýza.

Pro posouzení vlivu tepelného opracování na AOA a obsah celkových polyfenolů ve vzorcích karbanátků byly tyto analýzy provedeny jak v syrových, tak

pečených vzorcích. Také byl proveden rozbor cibulových výluhů Ž a Č pomocí LC-MS/MS, kde bylo cílem identifikovat hlavní účinné látky s antioxidačními vlastnostmi.

Obrázek 11. Výluhy z cibulových slupek žluté odrůdy Hybelle (vlevo) a červené odrůdy Lisa (vpravo).

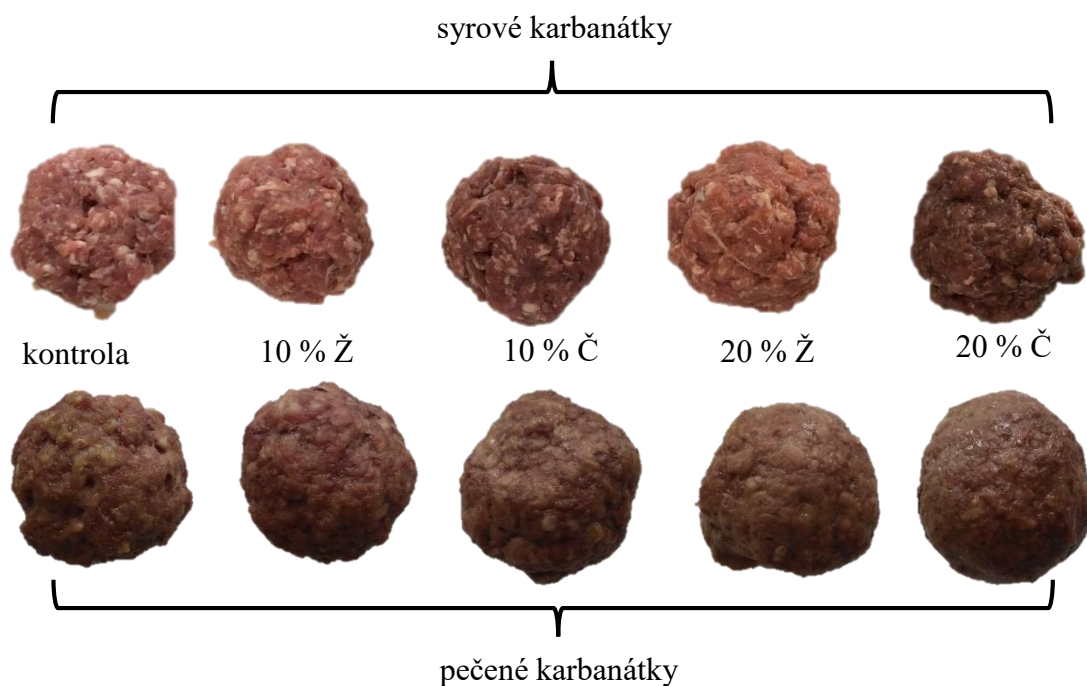


Výsledky přinesly poměrně zajímavé informace. Dominantní látkou ve výluzích cibulových slupek byl kvercetin, který byl určen na základě hmotnostních spekter a který byl zodpovědný za antioxidační vlastnosti výluhů. Přídavek výluhů do vzorků karbanátků zvýšil jak obsah celkových polyfenolů, tak AOA. Tepelné opracování (pečení) mělo negativní vliv na tyto dva analyzované parametry, respektive výrazně je snížilo. To naznačuje částečný tepelný rozklad kvercetinu. I přesto toto snížení dokázaly výluhy zabránit oxidaci lipidů, protože u kontrolního vzorku byl obsah MDA mnohem vyšší než ve vzorcích s výluhy.

Zajímavým zjištěním bylo také to, že přídavek výluhů cibulových slupek neovlivnil sensorické vlastnosti, zejména chuť, vůni a vzhled. Předpoklad, že se červené výluhy osvědčí ve zlepšení barvy hotového výrobku, potvrzen nebyl. Na obrázku 12 jsou zobrazeny karbanátky syrové i pečené vyrobené v průběhu experimentu. Je jasně patrné, že výluhy nedokázaly dostatečně dobře hotový výrobek obarvit. Z toho bohužel vyplývá, že se tak nedají v praxi používat jako červené barvivo do masných výrobků.



Obrázek 12. Karbanátky s 10 % a 20 % vodných výluhů ze žlutých (Ž) a červených (Č) cibulových slupek.



Cibulové výluhy dokázaly zvýšit AOA a obsah celkových polyfenolů, zpomalit oxidaci lipidů a zároveň negativně neovlivnily sensorické vlastnosti. Na druhou stranu je jejich nevýhodou to, že se musí do masného výrobku přidávat v poměrně velkém množství.

## Onion waste as a rich source of antioxidants for meat products

JAN BEDRNÍČEK<sup>1\*</sup>, IVANA LAKNEROVÁ<sup>2</sup>, ZUZANA LINHARTOVÁ<sup>3</sup>, JAROMÍR KADLEC<sup>1</sup>, EVA SAMKOVÁ<sup>1</sup>, JAN BÁRTA<sup>4</sup>, VERONIKA BÁRTOVÁ<sup>4</sup>, JAN MRÁZ<sup>3</sup>, MILAN PEŠEK<sup>5</sup>, RENATA WINTEROVÁ<sup>2</sup>, NADĚŽDA VRCHOTOVÁ<sup>6</sup>, JAN TRÍSKA<sup>6</sup>, PAVEL SMETANA<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Food Biotechnologies and Agricultural Products Quality, Faculty of Agriculture, University of South Bohemia in České Budějovice, České Budějovice, Czech Republic

<sup>2</sup>Food Research Institute Prague, Prague, Czech Republic

<sup>3</sup>Institute of Aquaculture and Protection of Waters, Faculty of Fisheries and Protection of Waters, University of South Bohemia in České Budějovice, České Budějovice, Czech Republic

<sup>4</sup>Department of Special Plant Production, Faculty of Agriculture, University of South Bohemia in České Budějovice, České Budějovice, Czech Republic

<sup>5</sup>Department of Health Education, Faculty of Education, University of South Bohemia in České Budějovice, České Budějovice, Czech Republic

<sup>6</sup>Laboratory of Metabolomics and Isotopic Analyses, Global Change Research Institute, Czech Academy of Sciences, Brno, Czech Republic

\*Corresponding author: [janbedrnicek@seznam.cz](mailto:janbedrnicek@seznam.cz)

**Citation:** Bedrníček J., Laknerová I., Linhartová Z., Kadlec J., Samková E., Bárta J., BártoVá V., Mráz J., Pešek M., Winterová R., Vrchotová N., Tríska J., Smetana P. (2019): Onion waste as a rich source of antioxidants for meat products. *Czech J. Food Sci.*, 37: 268–275.

**Abstract:** Onion skin is a waste produced in thousands of tons annually in the European Union. It is a rich natural source of flavonoids and its water extracts (as an environmentally friendly solvent) could be used as an antioxidant material for meat products. Therefore, antioxidant properties of onion skin water extracts (OSWEs) were tested on cooked pork patties. Pork patties were divided into five treatments: control (no antioxidant), 10 and 20% (w/w) of yellow OSWE, and 10 and 20% (w/w) of red OSWE. Antioxidant activity, total polyphenols, thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), and sensory analysis were assessed. Patties with added antioxidants showed significantly ( $P < 0.05$ ) higher antioxidant activity and total polyphenol content. Samples with OSWEs, after 5-day storage (5°C), had significantly ( $P < 0.05$ ) lower TBARS values compared to control. Two main phenolic compounds were identified in OSWEs by liquid chromatography – mass spectrometry using electrospray ionisation in negative mode: quercetin ( $m/z$  301) and quercetin monoglucoside ( $m/z$  463). OSWEs demonstrated the potential to be used as a source of natural antioxidants with strong antioxidant activity in meat products.

**Keywords:** antioxidant; LC/MS; onion skin; pork patties

Natural materials and ingredients are increasingly more preferred by consumers because of health concerns, thus the utilization of them is an emerging

field in food science. Onion (*Allium cepa* L.) is one of the most common species of vegetable in the world, and it is a very important source of flavonoids in the

Supported by the Ministry of Agriculture of the Czech Republic, Project No. QJ1610324, the The Grant Agency of The University of South Bohemia, Grant No. GAJU-028/2019/Z, and by the Ministry of Education, Youth and Sports of Czech Republic, Grant No. LO1415.

<https://doi.org/10.17221/68/2018-CJFS>

human diet (BEESK *et al.* 2010). Thousands of tons of industrial onion waste are produced annually in the European Union (KIASSOS *et al.* 2009). Certain parts of onion waste are rich in flavonoids with the richest being onion skin, where the most abundant compound with antioxidant and radical scavenging properties is quercetin and its glycosides (ALBISHI *et al.* 2013). These phenolics could reduce some unwanted processes in foods.

Lipid oxidation is one of the most unfavorable chemical reactions that takes place in meat products (ROHLÍK *et al.* 2013), which can lead to a deterioration of the sensory and nutritional parameters of meat products (NUÑEZ DE GONZALEZ *et al.* 2008). The addition of antioxidants can effectively inhibit or prevent these undesired processes (ŠOJIĆ *et al.* 2017). Previous research shows that ethanol onion skin extracts, as a natural antioxidant source, can reduce meat lipid oxidation (SHIM *et al.* 2012) and can also eliminate microbial spoilage (ALAHAKOON *et al.* 2013). There are many conventional extraction methods using organic solvents (e.g. maceration, sonication and soxhlet) and some newer 'green extraction techniques' such as pressurized liquid extraction, supercritical CO<sub>2</sub> extraction and microwave-assisted extraction suitable for obtaining antioxidants from plant material (CAMPONE *et al.* 2018), however, these procedures require specific instruments.

Water, unlike ethanol, is an environmentally friendly solvent without any negative impact on consumer health, and it is also the only liquid used in food preparation in amounts up to 30% (for example in some recipes of meat products). To the best of our knowledge, there is no data in scientific literature that deals with the effects of onion skin water extracts on meat product quality.

Based on all arguments mentioned above, our aim was to evaluate antioxidant activity, total polyphenol content, lipid peroxidation and sensory attributes of meat products fortified with natural antioxidants obtained from industrial onion waste, using water as extraction agent. Additionally, high performance liquid chromatography coupled with electrospray ionization tandem mass spectrometry (HPLC-ESI-MS/MS) analysis was conducted to determine main phenolic antioxidants in onion waste extracts.

## MATERIAL AND METHODS

**Material and chemicals.** Fresh pork neck meat was obtained from the local retail market in Prague, Czech

Republic. Meat was stored at 5°C in the dark, approximately 10 h before use. Dry onion skin as a waste was obtained directly from the grower (Vital Czech s.r.o., Czech Republic). For this experiment, two colours of onion skin were used, red (var. Lisa) and yellow (var. Hybelle).

All chemicals, namely Trolox, 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), thiobarbituric acid, Folin-Ciocalteu reagent, butylated hydroxytoluene (BHT), trichloroacetic acid (TCA), gallic acid, 1,1,3,3-tetraethoxypropane (TEP), *ortho*-phosphoric acid (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>), sodium carbonate, acetonitrile (LiChrosolv, LC/MS grade), formic acid (reagent grade), quercetin dihydrate and quercetin-3,4'-diglucoside were purchased from Sigma-Aldrich (Czech Republic).

**Preparation of onion skin water extracts (OSWEs).** Two variants of OSWE were prepared, one was from yellow onion skin (YWE – yellow water extract) and one from red onion skin (RWE – red water extract). The onion skins were washed to remove residues of soil and then dried in an oven (Memmert UN 75; Memmert, Germany) for 8 h at 40°C. Washed and dried onion skins (50 g) were added to 2 l of water. This mixture was gently boiled (100°C) for 40 minutes. Thereafter, the mixture was left for 15 min to cool down and then filtered. The onion skin was then manually squeezed to obtain remaining liquid extract. OSWEs were immediately used for pork patty preparation, HPLC-ESI-MS/MS analysis, determination of antioxidant activity (AOA) and also for total polyphenolic content determination (TPC).

**Preparation of pork meat patties.** Approximately 3 kg of pork neck meat was minced using a 2 mm plate. After mincing, the meat was divided into one of the following five treatments: control (no antioxidant); 10Y (10% w/w of YWE); 10R (10% w/w of RWE); 20Y (20% w/w of YWE) and 20R (20% w/w of RWE). Also, 2% (w/w) of salt was added to all samples. When all ingredients were added, the meat was properly hand-mixed and then formed into patties (50 g portions). A hot air oven (T-fal Maxi-Oven Varmluft; Tefal, France) was used to cook the patties for 17 min at 200°C to reach an internal temperature of 70°C for 10 minutes. After 30 min, when the temperature of the patties decreased to room temperature, they were aerobically packed into low density polyethylene bags and stored at 5°C for 5 days and analysed for TPC, AOA, organoleptic properties, and thiobarbituric acid reactive substances (TBARS). TPC, AOA, dry matter and fat content were analysed before and after the heat treatment, and TBARS after cooking

(day 0) and after 5 days of storage. Sensory analysis was conducted after cooking at day 0.

**Qualitative analysis of main antioxidant compounds in OSWEs by HPLC-ESI-MS/MS.** Firstly, extraction was performed according to CHENG *et al.* (2013) with modifications. Briefly, 0.25 g of onion skin water extracts (OSWE) was dissolved in 12 ml of methanol/water (80:20, v/v). The mixture was sonicated for 1 h at room temperature and then centrifuged at 4000 rpm for 15 minutes. Extracts were filtered through a 0.45 µm glass filter and for the analysis 20 µl (diluted if needed) was injected into an HPLC system.

Analysis of the OSWEs was accomplished using a Dionex UltiMate 3000 UHPLC system (Dionex, Germany), which consisted of a quaternary pump, column compartment, and UV detector. Separation was performed on a Phenomenex Kinetex C18 100Å analytical column (150 mm × 2.1 mm, 2.6 µm). Column temperature was maintained at 35°C. A linear gradient elution with mobile phase A (5% acetonitrile + 0.5% formic acid in water) and B (100% acetonitrile) was used as follows: mobile phase B increased from 5% to 60% within 35 min, then decreased back to 5% in 5 min to equilibrate the system. Flow rate was 0.2 ml/min and analytes were detected at 355 nm.

After separation in the HPLC system, qualitative analysis was conducted on an Agilent 6420 Triple Quadrupole Mass Spectrometer (Agilent Technologies, USA). The mass spectrometer was operating in negative electrospray ionization (ESI) mode. For drying and nebulising nitrogen (N<sub>2</sub>) gas was used at a flow rate of 11 l/min and nebulising pressure of 15 psi. Drying gas temperature was set at 300°C and capillary voltage at 4000 V. Fragmentor, collision, and cell accelerator voltages were 100, 10 and 7 volts, respectively.

**Antioxidant activity (DPPH assay).** The free radical-scavenging activity was measured using

1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) according to BRAND-WILLIAMS *et al.* (1995) and SANCHEZ-MORENO *et al.* (1998). The antioxidant activity was related to Trolox and expressed as mg of Trolox equivalent (TE) per g of dry weight (DW).

**Determination of total phenolic content (TPC).** The amount of total phenolics was determined using Folin-Ciocalteu reagent (LACHMAN *et al.* 1997) and calculated as gallic acid equivalent (GAE) in mg per g of DW.

**Determination of dry matter and fat content.** Patties were analysed for its dry matter (ISO 1442:1997) and total fat content (AOAC 922:06) and expressed as a mass percentage of fresh weight (Table 1).

**Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS).** For expression of lipid oxidation, TBARS assay was used according to MILLER (1998) with modifications. To 1 g of homogenized sample, 0.2 ml BHT (0.2 mg per ml in methanol) and 9.1 ml 10% TCA in 0.2M H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> solutions were added and homogenized with T18 Basic Ultra-Turrax (IKA, Germany) for 1 minute. Homogenate was filtrated and 1.5 ml was transferred to a test tube, then 1.5 ml of 0.02M TBA was added and the mixture was vortexed and heated for 30 min at 85°C. After heating, each sample was pipetted in triplicate on 96 well plates and absorbance was read at 530 nm on Tecan (Eppendorf, Czech Republic). TEP was used as a standard and the results were expressed as µg of malondialdehyde (MDA) per gram of sample.

**Sensory analysis.** Sensory evaluation of the meat products was conducted in the laboratory of sensory analysis in Food Research Institute, Prague, equipped according to the international standard ISO 8589. The sensory analysis was carried out under ISO 6658 conditions. The assessor panel was composed of 10 highly trained panelists according to ISO 8586. For this evaluation method, 100 mm long non-structured

Table 1. Dry matter and fat content in a raw and cooked patties (%)

Meat patty	Dry matter		Fat content	
	raw	cooked	raw	cooked
Control	32.65 ± 0.76 <sup>ab</sup>	44.11 ± 0.55 <sup>aA</sup>	14.15 ± 0.35 <sup>ab</sup>	19.76 ± 0.39 <sup>aA</sup>
10Y	31.02 ± 0.86 <sup>ab</sup>	43.08 ± 0.06 <sup>aA</sup>	12.21 ± 0.31 <sup>bB</sup>	17.78 ± 0.33 <sup>bA</sup>
10R	30.62 ± 0.93 <sup>ab</sup>	40.95 ± 0.36 <sup>abA</sup>	11.64 ± 0.27 <sup>bB</sup>	17.28 ± 0.33 <sup>bA</sup>
20Y	25.44 ± 0.67 <sup>bB</sup>	42.59 ± 0.29 <sup>abA</sup>	8.84 ± 0.59 <sup>cB</sup>	15.62 ± 1.07 <sup>cA</sup>
20R	26.41 ± 0.28 <sup>bB</sup>	36.08 ± 0.04 <sup>bA</sup>	8.74 ± 0.28 <sup>cB</sup>	15.12 ± 0.27 <sup>cA</sup>

<sup>a-c</sup> means within a column with the same letter do not differ significantly ( $P > 0.05$ ); <sup>A-B</sup> means within a row with the same letter do not differ significantly ( $P > 0.05$ ); control – no antioxidant; 10Y–20Y – meat patty with 10–20% of yellow onion skin water extract; 10R–20R – meat patty with 10–20% of red onion skin water extract

<https://doi.org/10.17221/68/2018-CJFS>

abscissas were used while panelists recorded 6 attributes: appearance, colour, odour, flavour, texture and overall acceptability (100 = excellent, 0 = very poor).

**Data analysis.** All analyses were done in triplicate and the results were reported as mean  $\pm$  standard error. Students' *t*-test, analysis of variance with Tukey's HSD test were used to determine statistically significant differences ( $P < 0.05$ ). Normality of the input data obtained from sensory analysis was checked using the Shapiro-Wilk test and outliers were determined by the Dean-Dixon test. STATVYD Version 2.0 (TBU, Czech Republic) and Statistica 12 (StatSoft, USA) was used for data processing.

## RESULTS AND DISCUSSION

**Qualitative analysis of main antioxidant compounds in OSWEs by HPLC-ESI-MS/MS.** To identify main phenolic compounds in OSWEs, LC-MS analysis was used. Comparison of retention times and mass spectra with those obtained from analysis of available standards and also reports in existing literature were used for compound identification.

It is well known that onion skin contains high amounts of flavonol antioxidants, which are represented mainly by quercetin aglycone and its glucosides (SUH *et al.* 1999). However, our aim was to identify phenolic compounds that are presented in water extracts, since water is not the strongest solvent for less polar compounds such as quercetin (XU *et al.* 2006).

As illustrated in Figure 1, there are only two main peaks with retention times 14.6 and 18.0 min (peak 2 and 3, respectively) which have been later deter-

mined in MS<sup>2</sup> analysis. The fragmentation pattern in negative ionization mode provided very useful information for identification of flavonols. Peak 2 was assigned as quercetin monoglucoside (Figure 2A) which showed fragmentation of the molecular ion as a precursor ion at  $m/z$  463 [M-H]<sup>-</sup> to fragment ion at  $m/z$  301 [M-162]<sup>-</sup>. The fragment with  $m/z$  162 is anhydroglucose and it is typical for the fragmentation of glucosides, which is the same fragmentation as described by BONACCORSI *et al.* (2008). Peak 3 with a molecular ion at  $m/z$  301 [M-H]<sup>-</sup> (Figure 2B) was identified as quercetin due to its MS<sup>2</sup> fragments ( $m/z$  179 and 151), which are typical for quercetin (FABRE *et al.* 2001).

Also, quercetin 3,4'-diglucoside (peak 1) was identified according to its fragmentation pattern and coelution with authentic standard. The molecular ion at  $m/z$  625 [M-H]<sup>-</sup> (Figure 2C) showed fragmentation in MS<sup>2</sup> analysis ( $m/z$  463 and 301) after losing glucosyl moieties [M-H-162-162]<sup>-</sup>, which is typical for this compound (MULLEN *et al.* 2003). It is one of the most dominant flavonol in edible parts of the onion (ROLDÁN-MARÍN *et al.* 2009), but in OSWEs it is presented only as minor compound.

Qualitative composition of the main polyphenolic compounds in OSWE corresponds with the composition of onion skin as reported by KIM and KIM (2006), where these authors found only two main peaks (quercetin monoglucoside and quercetin).

**AOA and TPC content in OSWEs and meat patties.** The results of AOA and TPC assays in OSWEs are presented in Table 2. The RWE had significantly higher ( $P < 0.05$ ) antioxidant activity and total polyphenol content than YWE. This confirms that red skin onions are a richer source of antioxidants than yellow

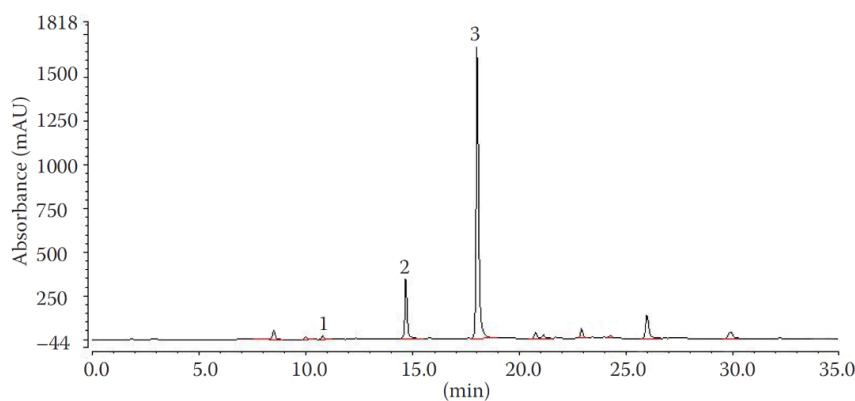


Figure 1. Typical HPLC chromatogram of OSWE recorded at 355 nm  
1 – quercetin-3,4'-diglucoside, 2 – quercetin monoglucoside, 3 – quercetin

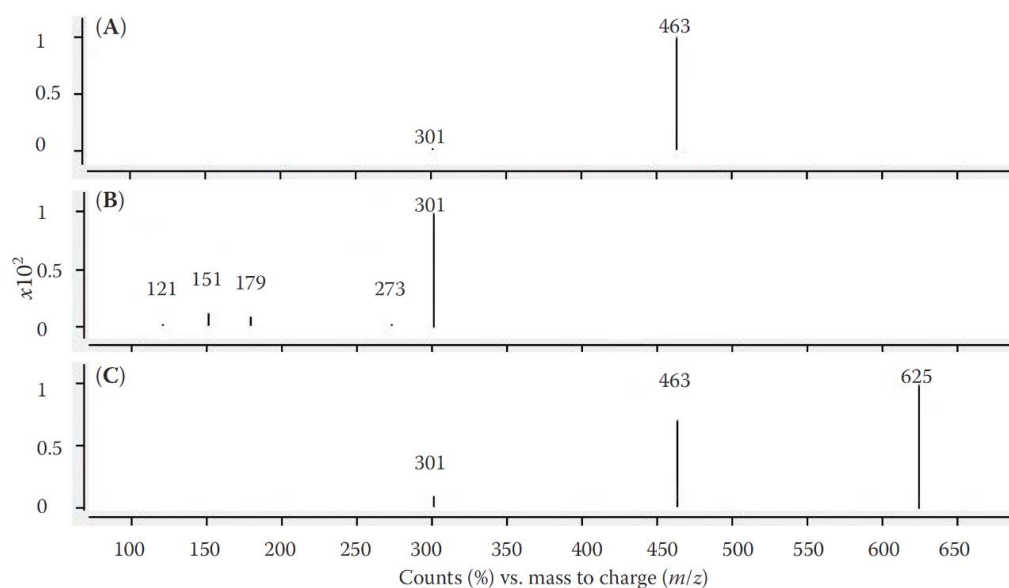


Figure 2. Mass spectrum (ESI in negative mode) of selected main and minor constituents of OSWE: (A) quercetin monoglucoside; (B) quercetin; (C) quercetin 3,4'-diglucoside

varieties, which is in accordance with the findings of many authors (ALBISHI *et al.* 2013; LEE *et al.* 2015; REN *et al.* 2017). A positive linear correlation ( $R^2 = 0.998$ ; graph not shown) between antioxidant activity and total

polyphenol content in OSWEs was also found, which suggests that the polyphenolic compounds contributed significantly to the antioxidant activity of OSWEs. This correlation corresponds with other authors which reported similar results (CHENG *et al.* 2013).

Table 2. Antioxidant activity (DPPH) and total polyphenols content (TPC)

Sample	DPPH (mg TE/g FW)	TPC (mg GAE/g FW)
YWE	3.46 ± 0.06 <sup>b</sup>	1.99 ± 0.03 <sup>b</sup>
RWE	6.35 ± 0.32 <sup>a</sup>	4.13 ± 0.25 <sup>a</sup>

<sup>a–b</sup>means within a column with the same letter do not differ significantly ( $P > 0.05$ ); FW – fresh weight; YWE – yellow onion skin water extract; RWE – red onion skin water extract

AOA and TPC in pork meat patties are illustrated in Table 3. All treatment groups showed higher antioxidant activity than control ( $P < 0.05$ ) and Trolox equivalent content ranged between 0.83–5.35 mg TE/g DM for raw samples and between 0.98–4.05 mg TE/g DM for cooked samples. In treatment groups the highest antioxidant activity was observed in the treatment 20R and the lowest in 10Y. The same trend was observed in total polyphenol content. Concentration varied between 1.01–3.26 mg GAE/g DM

Table 3. Effect of onion skin water extracts on antioxidant activity (DPPH) and total polyphenol content (TPC) in raw and cooked pork patties

Type of meat patty	DPPH (mg TE/g DM)		TPC (mg GAE/g DM)	
	raw	cooked	raw	cooked
Control	0.83 ± 0.00 <sup>cB</sup>	0.98 ± 0.00 <sup>cA</sup>	1.01 ± 0.0 <sup>cA</sup>	0.97 ± 0.01 <sup>dA</sup>
10Y	1.93 ± 0.02 <sup>dA</sup>	1.07 ± 0.02 <sup>dB</sup>	1.45 ± 0.04 <sup>dA</sup>	1.3 ± 0.00 <sup>cB</sup>
10R	2.71 ± 0.00 <sup>cA</sup>	1.68 ± 0.02 <sup>cB</sup>	1.93 ± 0.00 <sup>cA</sup>	1.86 ± 0.07 <sup>bA</sup>
20Y	2.84 ± 0.00 <sup>bA</sup>	2.25 ± 0.0 <sup>bB</sup>	2.46 ± 0.08 <sup>bA</sup>	1.83 ± 0.02 <sup>bB</sup>
20R	5.35 ± 0.06 <sup>aA</sup>	4.05 ± 0.01 <sup>aB</sup>	3.26 ± 0.09 <sup>aA</sup>	2.97 ± 0.03 <sup>aB</sup>

<sup>a–c</sup>means within a column with the same letter do not differ significantly ( $P > 0.05$ ); <sup>A–B</sup>means within a row with the same letter do not differ significantly ( $P > 0.05$ ); <sup>\*</sup>For abbreviations see Table 1

<https://doi.org/10.17221/68/2018-CJFS>

for raw samples and 0.97–2.97 mg GAE/g DM for cooked samples, and all enriched groups with OSWEs had significantly ( $P < 0.05$ ) higher polyphenol concentration compared to control. The highest polyphenol concentration was found in treatment 20R which is in agreement with AOA assay, and the lowest value was found in group 10Y.

As can be seen in Table 3, there are significant ( $P < 0.05$ ) differences between raw and cooked patties with antioxidants in TPC and AOA. It is obvious that the heat treatment reduced antioxidant activity and also decreased the content of total polyphenols in groups with antioxidants, except for the group 10R.

Also, a strong positive linear correlation ( $R^2 = 0.927$ ) between AOA and TPC in meat patties was found, which is illustrated Figure 3. KIM and KIM (2006) reported that DPPH radical scavenging activity is affected by the quercetin level in onion, which is the main phenolic compound in onion skin.

**Lipid oxidation (TBARS values).** Fat oxidation can negatively affect sensory and hygienic attributes of meat products, thus its inhibition is very impor-

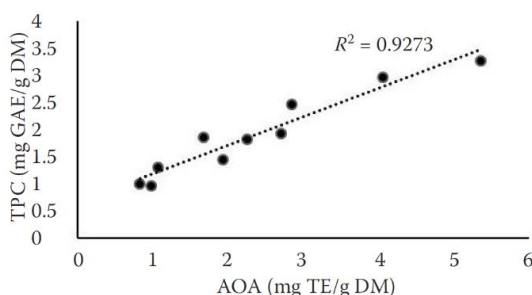


Figure 3. The relationship between total polyphenol content (TPC) and antioxidant activity (AOA) in meat patties

Table 4. Effect of onion skin water extracts on lipid peroxidation (TBARS) values in cooked pork patties under refrigerated conditions at day 0 and 5

Sample	TBARS ( $\mu\text{g}$ malondialdehyde/g)	
	day 0	day 5
Control	$0.30 \pm 0.03^{\text{aB}}$	$2.07 \pm 0.09^{\text{aA}}$
10Y	$0.15 \pm 0.01^{\text{bB}}$	$0.19 \pm 0.00^{\text{bA}}$
10R	$0.15 \pm 0.01^{\text{bB}}$	$0.26 \pm 0.01^{\text{bA}}$
20Y	$0.11 \pm 0.01^{\text{dB}}$	$0.19 \pm 0.01^{\text{bA}}$
20R	$0.13 \pm 0.01^{\text{bA}}$	$0.12 \pm 0.01^{\text{bA}}$

<sup>a–b</sup>means within a column with the same letter do not differ significantly ( $P > 0.05$ ); <sup>A–B</sup>means within a row with the same letter do not differ significantly ( $P > 0.05$ ); \*for abbreviations see Table 1

tant (ROHLÍK *et al.* 2013). The effect of different treatments on the concentration of MDA in cooked pork patties is shown in Table 4. Content of MDA at day 0 ranged from 0.11 to 0.30  $\mu\text{g}$  MDA per g of sample and from 0.12 to 2.07  $\mu\text{g}$  MDA/g of sample at day 5, respectively. Storage time significantly ( $P < 0.05$ ) influenced TBARS values. For example, the control sample had an almost sevenfold increase in MDA content after 5 days. However, in group 20R, there were no significant ( $P > 0.05$ ) differences after five days of storage. Statistically highest ( $P < 0.05$ ) TBARS values were observed in control samples compared to all other treatments, but no significant differences ( $P > 0.05$ ) were observed between groups with antioxidants. These results suggest that OSWEs, at a concentration of 10%, radically inhibit fat oxidation.

Our results are in agreement with other authors who reported high effectivity of onion skin ethanol extracts in relation to meat lipid oxidation, and also that red onion skin ethanol extracts showed better results than yellow onion skin extracts (ALBISHI *et al.* 2013; SHIM *et al.* 2012).

**Sensory analysis.** Sensory analysis of cooked pork patties was performed at day 0. The parameters tested were: overall acceptance, appearance, colour, flavour, texture and odour. Sensory evaluation results are illustrated in Figure 4.

Assessors detected the differences between all groups of patties, however, they were not significant ( $P > 0.05$ ). Results indicate that the addition of OSWE at a concentration of 10 or 20% has only a small ef-

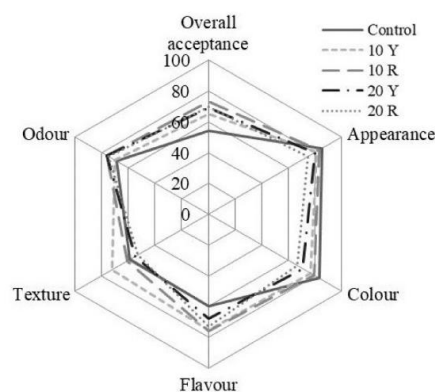


Figure 4. Sensory evaluation of meat patties with addition of antioxidants

Control – no antioxidant; 10Y–20Y – meat patty (10–20% of yellow onion skin water extract); 10R–20R – meat patty (10–20% of red onion skin water extract)

fect on the sensory attributes of cooked meat patties. This might be influenced by trace concentrations of sulphur and alk(en)yl cysteine sulphoxides in onion skin, which are the main precursors of onion flavour (BENÍTEZ *et al.* 2011). However, our results are in disagreement with other authors who added onion skin ethanolic extracts to meat products and reported negative effects on sensory parameters (ALAKAHOON *et al.* 2013). Nevertheless, the authors admit that the change of the recipe can solve the problem with deterioration of sensory properties.

### CONCLUSIONS

OSWEs showed positive effects on the selected properties of meat patties. They significantly increased the antioxidant activity and total polyphenol content of meat patties, at a concentration of 10%, and also provided good protection of fat against oxidation. High antioxidant activity of OSWEs is caused mainly by the presence of quercetin and quercetin monoglucoside. Our results indicate that the water extracts from onion skin, which is a waste material, can be used as a good source of antioxidants for the enhancement of cooked pork patties. There is no other data available in existing literature that can be compared with our results regarding the usage of water as an extraction agent. There are only a few references about utilization of onion skin as a source of antioxidants for meat products, but ethanol or subcritical water were used as an extraction solvent, which is, at the present time, difficult for practical application. Our simple extraction method provides a possible application for the food industry, however, more research is needed.

**Acknowledgement.** Many thanks go to PAUL SULTANA for his English grammar corrections.

### References

- Alahakoon A.U., Bae Y.S., Kim H.J., Jung S., Jayasena D.D., Young H.I., Kim S.H., Jo C. (2013): The effect of citrus and onion peel extracts, calcium lactate, and phosvitin on microbial quality of seasoned chicken breast meat. *CNU Journal of Agricultural Science*, 40: 131–137.
- Albishi T., John J.A., Al-Khalifa A.S., Shahidi F. (2013): Antioxidative phenolic constituents of skins of onion varieties and their activities. *Journal of Functional Foods*, 5: 1191–1203.
- Beesk N., Perner H., Schwarz D., George E., Kroh L.W., Rohn S. (2010): Distribution of quercetin-3, 4'-*o*-diglucoside, quercetin-4'-*o*-monoglucoside, and quercetin in different parts of the onion bulb (*Allium cepa* L.) influenced by genotype. *Food Chemistry*, 122: 566–571.
- Benítez V., Mollá E., Martín-Cabrejas M.A., Aguilera Y., López-Andréu F.J., Cools K., Terry L.A., Esteban R.M. (2011): Characterization of industrial onion wastes (*Allium cepa* L.): dietary fibre and bioactive compounds. *Plant Foods for Human Nutrition*, 66: 48–57.
- Bonaccorsi P., Caristi C., Cargiulli C., Leuzzi U. (2008): Flavonol glucosides in *Allium* species: A comparative study by means of HPLC–DAD–ESI–MS–MS. *Food Chemistry*, 107: 1668–1673.
- Brand-Williams W., Cuvelier M.E., Berset C. (1995): Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*, 28: 25–30.
- Campone L., Celano R., Piccinelli A.L., Pagano I., Carabetta S., Di Sanzo R., Russo M., Ibañez E., Cifuentes A., Rastrelli L. (2018) Response surface methodology to optimize supercritical carbon dioxide/co-solvent extraction of brown onion skin by-products as source of nutraceutical compounds. *Food Chemistry*, 269: 495–502.
- Cheng A., Chen X., Jin Q., Wang W., Shi J., Liu Y. (2013): Comparison of phenolic content and antioxidant capacity of red and yellow onions. *Czech Journal of Food Sciences*, 31: 501–508.
- Fabre N., Rustan I., de Hoffmann E., Quetin-Leclerq J. (2001): Determination of flavone, flavonol, and flavanone aglycones by negative ion liquid chromatography electrospray ion trap mass spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 12: 707–715.
- Kiassos E., Mylonaki S., Makris D.P., Kefalas P. (2009): Implementation of response surface methodology to optimise extraction of onion (*Allium cepa* L.) solid waste phenolics. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 10: 246–252.
- Kim S.J., Kim G.H. (2006): Quantification of quercetin in different parts of onion and its DPPH radical scavenging and antibacterial activity. *Food Science and Biotechnology*, 2: 39–43.
- Lachman J., Hosnedl V., Pivec V. (1997): Changes in the content of polyphenols in barley grains and pea seed after controlled accelerated ageing treatment. *Scientia Agriculturae Bohemica*, 28: 17–30.
- Lee E.N., Patil B.S., Yoo K.S. (2015): Antioxidants of 15 onions with white, yellow, and red colors and their relationship with pungency, anthocyanin, and quercetin. *LWT-Food Science and Technology*, 63: 108–114.
- Miller D.D. (1998): Lipid peroxidation. In: Miller D.D. (ed.). *Food Chemistry: A Laboratory Manual*. New York, Wiley-Interscience: 57–67.



<https://doi.org/10.17221/68/2018-CJFS>

- Mullen W., Yokota T., Lean M.E.J., Crozier A. (2003): Analysis of ellagitannins and conjugates of ellagic acid and quercetin in raspberry fruits by LC–MS<sup>n</sup>. *Phytochemistry*, 64: 617–624.
- Nuñez de Gonzalez M.T., Hafley B.S., Boleman R.M., Miller R.K., Rhee K.S., Keeton J.T. (2008): Antioxidant properties of plum concentrates and powder in precooked roast beef to reduce lipid oxidation. *Meat Science*, 80: 997–1004.
- Ren F., Reilly K., Kerry J.P., Gaffney M. Hossain M., Rai D.K. (2017): Higher antioxidant activity, total flavonols, and specific quercetin glucosides in two different onion (*Allium cepa* L.) varieties grown under organic production: results from a 6-year field study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65: 5122–5132.
- Rohlík B.-A., Pipek P., Pánek J. (2013): The effect of natural antioxidants on the colour and lipid stability of paprika salami. *Czech Journal of Food Sciences*, 31: 307–312.
- Roldán-Marín E., Sánchez-Moreno C., Lloría R., de Ancos B., Cano M.P. (2009): Onion high-pressure processing: flavonol content and antioxidant activity. *LWT-Food Science and Technology*, 42: 835–841.
- Sanchez-Moreno C., Larrauri J.A., Saura-Calixto F. (1998): A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 76: 270–276.
- Shim S.-Y., Choi Y.-S., Kim H.-Y., Kim H.-W., Hwang K.-E., Song D.-H., Lee M.-A., Lee J.-W., Kim C.-J. (2012): Antioxidative properties of onion peel extracts against lipid oxidation in raw ground pork. *Food Science and Biotechnology*, 21: 565–572.
- Šojić B., Tomović V., Jokanović M., Ikonić P., Džinić N., Kocić-Tanackov S., Popović L., Tasić T., Savanović J., Živković Šojić N. (2017): Antioxidant activity of *Juniperus communis* L. essential oil in cooked pork sausages. *Czech Journal of Food Science*, 35: 189–193.
- Suh H.J., Lee J.M., Cho J.S., Kim X.S., Chung S.H. (1999): Radical scavenging compounds in onion skin. *Food Research International*, 32: 659–664.
- Xu M.-S., Luo M.-F., Xing X.-H., Chen H.-Z. (2006): Characteristics of quercetin transglycosidation catalysed by *Penicillium decumbens* glycosidase. *Food and Bioprocesses Processing*, 84: 237–241.

Received: 2018–03–13

Accepted after corrections: 2019–05–02

### 5.3 CIBULOVÉ ODPADY JAKO ZDROJ BIOLOGICKY AKTIVNÍCH LÁTEK PRO BEZLEPKOVÉ PEČIVO

**Bedrníček, J.,** Jirotková, D., Kadlec, J., Laknerová, I., Vrchotová, N., Tříška, J., Samková, E., Smetana, P. 2020. Thermal stability and bioavailability of bioactive compounds after baking of bread enriched with different onion by-products. *Food Chemistry*, 319, 126562.

Celiakie je autoimunitní porucha, způsobující permanentní nesnášenlivost lepkových proteinů. Je charakterizována chronickým zánětem střevní sliznice a atrofií střevních klků (Saturi et al., 2010).

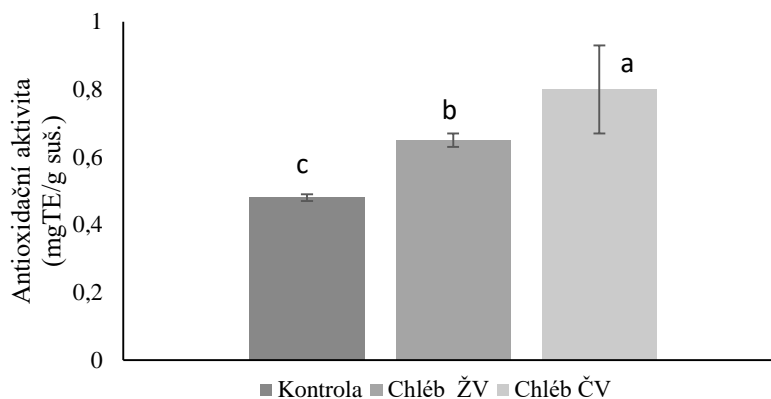
Ferretti et al. (2012) udávají, že některé složky potravin, např. polyfenoly, mohou pomoci při prevenci a léčbě celiakie, hlavně díky zmírnění zánětu střevní sliznice a oxidačního stresu. Serra et al. (2018) uvádí, že bezlepková dieta může mimo jiné způsobovat i dysbalanci střevní mikrobioty, což může podporovat zánět ve střevech. Také udávají, že polyfenoly mohou určitým způsobem mikrobiotu pozitivně ovlivňovat, což znamená, že polyfenoly mohou potlačovat zánětlivé projevy i tímto způsobem. Studie ukazují, že 20 až 38 % lidí trpící celiakií mají určité výživové deficity, např. nedostatek vlákniny a dalších mikronutrientů (Saturi et al., 2010), a proto je důležité v rámci výzkumu vyvíjet bezlepkové produkty s vyšším obsahem nutričně prospěšných látek, jako jsou minerální látky, AO a vláknina (Giménez-Bastida et al., 2015).

Vzhledem k výše zmíněným důvodům byl pro fortifikaci vybrán pohankový (pohanka obecná; *Fagopyrum esculentum* Moench) bezlepkový chléb obohacený různě upravenými vedlejšími produkty cibule kuchyňské. Vedlejší produkty byly neprodejné (malé nebo deformované, ale chorobami nenapadené) cibule červené odrůdy Lisa a cibulové slupky téže odrůdy.

V první fázi tohoto experimentu byl proveden předpokus. Jeho cílem bylo zjistit vliv přídatku vodných výluhů z cibulových slupek Ž a Č na AOA vzorků pšeničného chleba. Výluhy byly vyrobeny tak, jak bylo popsáno v kapitole 5.2, tzn., že extrakce probíhala při 100 °C po dobu jedné hodiny. Účelem bylo nahradit vodu, která se používá při zadělávání těsta slupkovými výluhy. Z celkové hmotnosti těsta tvořily výluhy 41 % (59 % pak tvořila směs mouk), v případě kontrolního chleba byla do těsta použita pouze pitná voda. U pečených vzorků chlebů byla stanovena AOA metodou DPPH. Výsledky předpokusu jsou zobrazeny v grafu 4 (není součástí

publikace). Nahrazení vody výluhem sice statisticky významně zvýšilo AOA, nicméně tyto hodnoty jsou stále poměrně nízké. Z tohoto důvodu byly do pokusu s bezlepkovými chleby vybrány cibulové slupky Č ve formě mouky, a nikoliv ve formě vodního výluhu.

Graf 4. Antioxidační aktivita (DPPH) chlebů s přidanými výluhy z cibulových slupek žluté odrůdy (Ž) Hybelle a červené odrůdy (Č) Lisa.



Sloupce v grafu představují průměr  $\pm$  směrodatnou odchylku ( $n = 4$ ); <sup>a-c</sup>sloupce s různými indexy se statisticky významně liší; statistická analýza: ANOVA + *post hoc* Tukey HSD test;  $\alpha = 0,05$ ; DPPH: 2,2-difenyl-1-pikrylhydrazyl

Do pokusu byly vedlejší produkty vznikající při zpracování cibule připraveny takto: malé cibulky byly buď usušeny i se slupkami nebo osmaženy (pouze dužnina bez slupek). Slupky byly namlety na mouku o velikosti částic menší než 0,25 mm (obrázek 13). Pět procent kontrolní bezlepkové směsi mouk bylo nahrazeno smaženou cibulí, sušenou cibulí nebo moukou z cibulových slupek. Celkem byly tedy čtyři skupiny: vzorky kontrolní, se smaženou cibulí, se sušenou cibulí a s cibulovými slupkami.

Cílem této studie bylo posoudit vliv druhu obohacující složky na:

- obsah polyfenolických látek a AOA (metodou DPPH) u vzorků bezlepkových chlebů,
- tepelnou stabilitu polyfenolů během pečení a
- senzorické vlastnosti bezlepkových chlebů.

Obrázek 13. Mouka z červených cibulových slupek odrůdy Lisa.



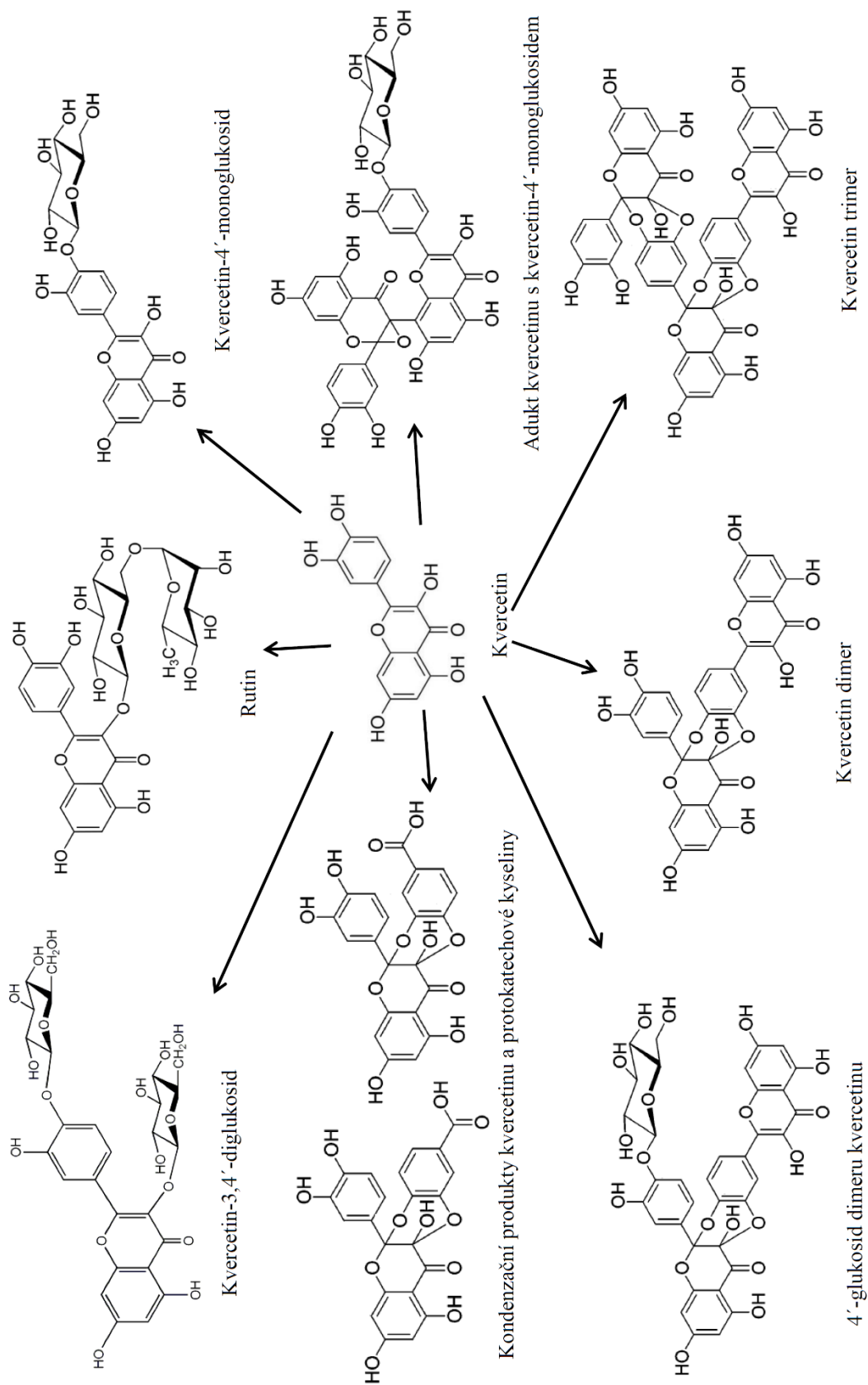
Z výsledků vyplývá, že AOA vzorků chlebů se oproti kontrole výrazně zvýšila přidáním smažené i sušené cibule a mletých cibulových slupek. Pomocí LC-MS/MS analýzy bylo zjištěno, že cibulové vedlejší produkty obsahují nejvíce kvercetin, kvercetin-3,4'-diglukosid a kvercetin-4'-monoglukosid. Jejich zastoupení (poměry) byly závislé na použité cibulové frakci. U sušené a smažené cibule převládaly obě formy glukosidů nad kvercetinem a naopak ve vzorku chleba s cibulovými slupkami byl dominantní kvercetin. Navíc v této skupině byly identifikovány (nikoliv kvantifikovány) další deriváty kvercetinu, které v jiných rostlinných materiálech nalezeny nebyly. Jedná se o čtyři druhy dimeru kvercetinu a jeden trimer. Strukturální vzorce všech studovaných látek jsou na obrázku 14.

V souvislosti s použitím pohankové mouky byl také stanovován rutin, což je v pohance dominantní polyfenol. Ve vzorcích chlebů bylo nalezeno pouze zanedbatelné množství, mezi 4,31 až 7,26  $\mu\text{g/g}$  sušiny. Nízké koncentrace však mohou být ovlivněné tím, že byla použita pohanková mouka bílá a nikoliv celozrnná, neboť jak uvádí Lin et al. (2009), obsah rutinu je vyšší v celozrnné pohankové mouce, protože se více vyskytuje v obalových vrstvách nažky.

Zajímavým výsledkem, který tento experiment přinesl, je i poznatek o tepelné stabilitě kvercetinu a jeho derivátů. Tepelná stabilita byla určována tak, že se změřily obsahy látek ve vzorcích těst těsně před pečením a poté v pečených vzorcích chlebů. Výsledky jednoznačně poukazují na to, že glykosidy (rutin i oba glukosidy) během pečení degradují a uvolňuje se kvercetin (aglykon), jehož koncentrace byla v pečených

vzorcích vždy o něco vyšší než v těstech. Velice překvapivý jev byl pozorován u skupiny s přidanými slupkami. Zde během pečení došlo i k rozkladu dalších derivátů kvercetinu. Jedná se o dimery a trimer. Tato publikace byla první, která popsala tepelný rozklad těchto látek. Pečení tedy přispívá ke zvýšení AOA chleba s cibulovými slupkami.

Obrázek 14. Strukturální vzorce studovaných látek (zdroj: Ly et al. 2005).



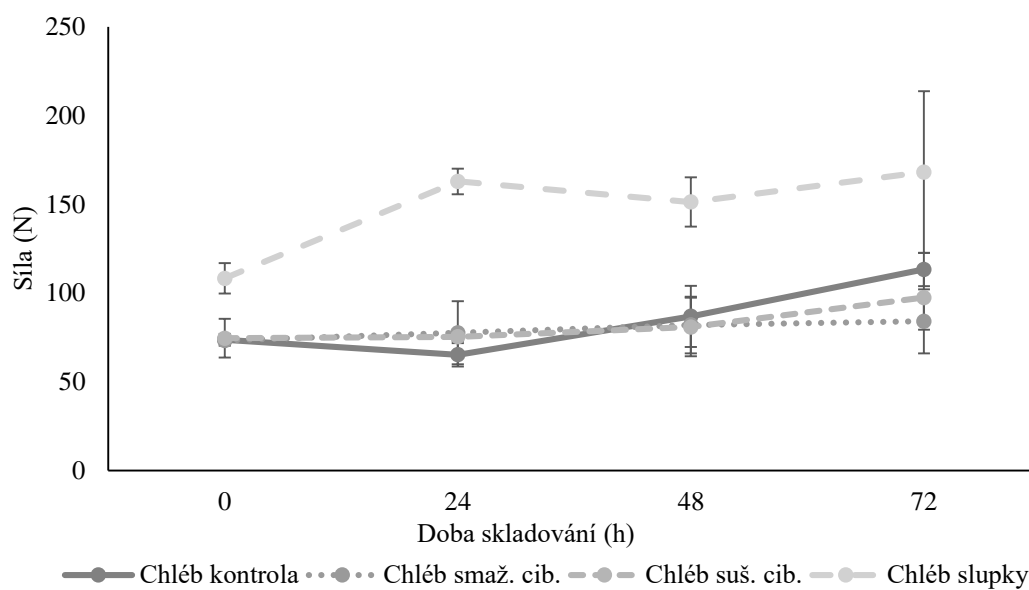
Na základě sensorického hodnocení vzorků chlebů bylo zjištěno, že nahrazení bezlepkové směsi mouk 5 % cibulových vedlejších produktů výrazně neovlivňuje příjemnost, chuť, vůni, vzhled a texturu. Přídavek cibulových slupek však výrazně změnil barvu vzorků chlebů (viz obrázek 15). Z tohoto hlediska je možné cibulové slupky doporučit jako barvivo pro pekařské výrobky.

Obrázek 15. Bezlepkové chleby vyrobené během experimentu.



V návaznosti na sensorické vlastnosti uvádí Torbica et al. (2010), že problémem u bezlepkového pečiva je rychlé stárnutí, kdy pečivo tvrdne v důsledku retrogradace škrobu. Z toho důvodu byl proveden skladovací pokus (tři dny při pokojové teplotě, nezabalené), kde se sledovala tvrdost texturometrem TA.XT Plus podle metody Moore et al. (2008). Výsledky (Graf 5, není součástí publikace) jednoznačně ukazují, že nejtvrdší po celou dobu skladování byly chleby s cibulovými slupkami. To je pravděpodobně způsobeno tím, že slupky obsahují zhruba 75 % vlákniny, která je převážně nerozpustná (Benítez et al., 2011). Na druhou stranu nejměkčí byly vzorky se smaženou cibulí, což bylo způsobeno tím, že smažená cibule měla oproti sušené cibuli a slupkám nejvyšší vlhkost, čímž zjemnila střídu chleba.

Graf 5. Změny tvrdosti střídy bezlepkových chlebů během třídenního skladování.



Body v grafu představují průměr  $\pm$  směrodatnou odchylku ( $n = 4$ )

Z výsledků vyplynulo, že cibulové vedlejší produkty jsou vhodným zdrojem polyfenolických AO, které mohou být přidávány do bezlepkového chleba. Nejbohatší surovinou jsou bezesporu mleté cibulové slupky, kde je dominantní látkou kvercetin, který je stabilní během pečení a zůstává tak i v hotovém výrobku.





Contents lists available at ScienceDirect

Food Chemistry

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/foodchem](http://www.elsevier.com/locate/foodchem)

## Thermal stability and bioavailability of bioactive compounds after baking of bread enriched with different onion by-products

Jan Bedrníček<sup>a,\*</sup>, Dana Jirotková<sup>a</sup>, Jaromír Kadlec<sup>a</sup>, Ivana Laknerová<sup>b</sup>, Naděžda Vrchotová<sup>c</sup>, Jan Tříška<sup>c</sup>, Eva Samková<sup>a</sup>, Pavel Smetana<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Department of Food Biotechnologies and Agricultural Products Quality, Faculty of Agriculture, University of South Bohemia in České Budějovice, Studentská 1668, 370 05 České Budějovice, Czech Republic

<sup>b</sup> Food Research Institute Prague, Radiová 1285/7, 102 00 Praha 10 – Hostivař, Czech Republic

<sup>c</sup> Laboratory of Metabolomics and Isotopic Analyses, Global Change Research Institute, CAS, Bělidla 986/4a, 603 00 Brno, Czech Republic

### ARTICLE INFO

#### Keywords:

Onion waste  
Gluten-free bread  
Thermal processing  
HPLC–MS/MS  
Flavonoids  
Quercetin dimers  
Quercetin trimers

#### Chemical compounds studied in this article:

Quercetin (PubChem CID 5280343)  
Quercetin-4'-O-glucoside (PubChem CID 12442954)  
Quercetin-3,4'-O-diglucoside (PubChem CID 44259154)  
Rutin (PubChem CID 5280805)

### ABSTRACT

This study investigated the effects of the addition of onion waste fractions into gluten-free (GF) bread to promote its health benefits. 5% of the control (C) GF flour blend was replaced with three waste fractions in the form of: fried onion (FO), dried onion (DO) and onion peel (OP). Antioxidant activity, content of flavonols and total polyphenols of breads increased in the following order: C < FO < DO < OP. No differences were observed in sensory analysis. We found that quercetin glycosides, dimers and trimer in OP-bread, determined according to their mass spectra, decomposed during baking and released free quercetin, which points to their thermal instability. Cross-over study revealed that consumption of OP-bread significantly increased ( $p < 0.05$ ) antioxidant activity of consumers' blood compared to control bread consumption, indicating good bioavailability of flavonols. Results suggest incorporation of OP into GF bread can increase its biological value with satisfactory sensory acceptance.

### 1. Introduction

Celiac disease is an immune-mediated systemic disorder triggered by ingestion of gluten or related prolamines in genetically susceptible individuals and is occurring still more frequently in the human population. The only effective treatment for celiac disease is a strict adherence to a gluten-free (GF) diet throughout the patient's life. Previous studies have demonstrated that 20–38% of celiac patients have some nutritional deficiencies, therefore obtaining GF food products with health-promoting components (such as fibre, antioxidants and/or minerals), the optimization of recipes and the characterization of final products in terms of sensory acceptance and potential functional properties have acquired a lot of interest in the past few years (Giménez-Bastida, Piskula, & Zieliński, 2015; Saturni, Ferretti, & Bacchetti, 2010).

Development of GF products involves a diverse approach which

includes the use of starches, dairy products, gums and hydrocolloids, other non-gluten proteins or prebiotics in order to improve the structure, mouthfeel, acceptability and shelf life of GF bakery products. Finally, blends of buckwheat and rice flours in the presence of hydrogenated vegetable fat also have the potential to produce GF breads with good sensory attributes (Torbica, Hadnadev, & Dapčević, 2010).

By-products of fruit and vegetable processing are appropriate sources of nutrients and functional ingredients for GF products without increasing their price (Drabińska, Ciska, Szmatowicz, & Krupak-Kozak, 2018). Suitable sources meeting these requirements can be, for example, onion waste, which is composed of different fractions, such as the upper and bottom parts of onion bulbs, onion skin and undersized, malformed and diseased or damaged bulbs (Nile, Nile, Keum, & Sharma, 2017). Based on FAOSTAT (2017), the onion is the second most cultivated vegetable in the world, with an approximate production of 98 million tons every year, which results in huge amounts of by-

\* Corresponding author.

E-mail addresses: [bedrnj00@zf.jcu.cz](mailto:bedrnj00@zf.jcu.cz) (J. Bedrníček), [jirot@zf.jcu.cz](mailto:jirot@zf.jcu.cz) (D. Jirotková), [kadlec@zf.jcu.cz](mailto:kadlec@zf.jcu.cz) (J. Kadlec), [ivana.laknerova@vupp.cz](mailto:ivana.laknerova@vupp.cz) (I. Laknerová), [vrchotova.n@czechglobe.cz](mailto:vrchotova.n@czechglobe.cz) (N. Vrchotová), [triska.j@czechglobe.cz](mailto:triska.j@czechglobe.cz) (J. Tříška), [samkova@zf.jcu.cz](mailto:samkova@zf.jcu.cz) (E. Samková), [smetana@zf.jcu.cz](mailto:smetana@zf.jcu.cz) (P. Smetana).

<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126562>

Received 26 August 2019; Received in revised form 16 February 2020; Accepted 3 March 2020

Available online 04 March 2020

0308-8146/ © 2020 Elsevier Ltd. All rights reserved.

products. Hence it is necessary to find a way to utilize them. The waste products generated from industrially processed onions consist of a significant amount of dietary and phenolic compounds, especially quercetin and its derivatives, mainly represented by glucosides (Benítez et al., 2011).

Over the last few decades, many biological studies on quercetin have been published, reporting a wide range of biological effects *in vitro* and *in vivo*, including anti-inflammatory and neuroprotective activities (Almeida et al., 2018), as well as antioxidant and protective properties against cancer and cardiovascular diseases (Lesjak et al., 2018). There is already quite a lot of evidence that suggests onion peel is a good source of quercetin and dietary fibre which can be added to wheat bread (Gawlik-Dziki et al., 2013; Prokopov et al., 2018).

However, potential health effects of bioactive compounds depend on bioavailability that follows oral administration (Egert et al., 2008) and their stability or transformation during food preparation (Germ et al., 2019), because, according to Ou, Wang, Zheng, and Ou (2019), some polyphenols are not thermally stable. High temperatures during cooking can cause cleavage of the glucosyl moiety from aglycone, which can then change the bioavailability of the original compound (Manach, Scalbert, Morand, Rémésy, & Jiménez, 2004).

Considering all the arguments mentioned above, we hypothesized that the incorporation of onion waste into GF bread may improve its potential health benefits. Therefore, the aim of this study was:

- i. to assess the effect of different fractions of onion waste on the content and thermal stability of biologically active compounds and the antioxidant activity of fortified GF breads,
- ii. to evaluate sensory characteristics of GF breads and
- iii. to investigate the effect of consumption of fortified GF bread on the antioxidant activity and the concentration of free radicals in the blood of consumers.

In addition, the new HPLC-MS/MS method was employed to characterize and quantify some of the main biologically active compounds in enriched doughs and breads.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Preparation of onion wastes and enriched GF breads

First of all, onion-related ingredients were prepared. The industrial waste of the red variety, Lisa, supplied by a local grower (VITAL Czech s.r.o., Všeřaty, Czech Republic), was composed of dry onion peel and small or unusually-shaped (deformed) but disease-free onions that did not meet required visual quality parameters to be sold on the market.

The onion peel was washed with drinking water and dried at 40 °C to a consistent weight and then milled to powder with particles smaller than 0.25 mm. One part of the deformed onion bulbs was peeled and cut into small pieces. These were then fried for seven minutes in oil used in bread-making, reaching a temperature of 113 °C in the middle of the onion pieces. The second part of the waste was processed even with inner dry layers of peel (closer to the centre of the bulb) as follows: it was washed with drinking water and cut into slices (0.3 mm), dried (40 °C/48 h) and also milled to a fine powder (< 0.25 mm). All three fractions were stored at 4 °C prior to bread making.

Control bread (C) was prepared according to this formula (all percentages are w/w): unhusked white buckwheat flour 19.2%, corn flour 13.7%, rice flour 11%, linseed flour 9.3%, yeasts 0.4%, rapeseed oil 1% and water 45.4%. In experimental batches, 5% (w/w) of the dry control flour blend was replaced with a) fried onion (FO), b) dried onion (DO) and c) onion peel (OP). The content of water, yeasts and oil remained unchanged. In the FO group, the requested amount of rapeseed oil, which was used for frying, was added together with the fried onion. The percentages of antioxidant-rich materials were chosen after previous antioxidant activity and sensory analyses (data not shown). All

ingredients were put into an automated electric bread maker (Duplica Vital Plus, Eta, Czech Republic). The baking process consisted of three steps: the first step - mixing of ingredients (30 min; room temperature); the second step - fermentation (60 min; 33 °C) and the last step, baking (60 min; 180 °C). The maximum temperature inside of the dough reached roughly 95 °C during the last 30 min of baking. Finished breads were taken out of the bread maker and left to cool down to room temperature overnight. Samples of doughs (the dough moisture content ranged from 52.2 to 54%) were taken before commencement of the baking phase (at the end of fermentation phase) and from finished breads after cooling down to room temperature (the moisture content for all breads ranged between 48.6 and 51.4%). Afterwards, all samples taken for chemical analyses were lyophilised (containing 1.3 to 3% of water after lyophilisation), milled (< 0.25 mm) and stored at 4 °C until analysis. Lyophilised samples were analysed for their antioxidant activity, flavonoids and total polyphenolic content (TPC), whilst fresh bread samples were also used in sensory analyses, colour measurement and cross-over stud.

### 2.2. Study design of cross-over experiment

To find out how antioxidants from control and enriched breads affect *in vivo* antioxidant activity (FORD assay - Free Oxygen Radical Defence) and *in vivo* concentration of free radicals (FORT assay - Free Oxygen Radical Test) in the blood of consumers, the following trial was conducted. It was designed as a randomised cross-over experiment separated by a one-day wash-out interval.

According to Bojňanská, Frančáková, Chlebo, and Vollmannová (2009), a 200 g portion of C and OP breads were administered to 14 healthy volunteers (3 men and 11 women who were staff and students of the University of South Bohemia in České Budějovice) with an average age of 26 ± 5 years and weight of 61.5 ± 9.27 kg. They were randomly divided into two groups, A and B, each composed of 7 volunteers. Subjects were told not to eat antioxidant rich foods such as vegetables and fruits and drink beverages for 1 day prior to and throughout the experiment (foods that were avoided together with recommended foods are shown in Supplementary Material 1). Volunteers were familiar with the experiment and written informed consent was obtained from all of them. The study was approved by the Ethical Committee of the Faculty of Education, University of South Bohemia in České Budějovice and was in accordance with the Helsinki Declaration.

Group A ingested C bread and group B ingested OP bread. After a one-day wash-out period groups were swapped, so that group A ingested OP bread and group B ingested C bread. This means that the time between consumption of C and OP bread (and vice versa) for all participants was 48 h. In all days, groups of volunteers came to the laboratory in the morning at 8:00 after an overnight fast of at least 12 h and their FORD and FORT in their blood were measured (time 0 = baseline). After this, the breads were consumed with 200 ml of water and were ingested within 10 min. Then, 90 min after ingestion, antioxidant activity and free radicals were measured again, to simulate the same time period and methodology as reported by Kashino et al. (2015).

### 2.3. Chemical analyses

#### 2.3.1. Chemicals

Chemicals were supplied from Sigma-Aldrich (Prague, Czech Republic), namely quercetin (purity ≥ 95%), quercetin-4'-O-glucoside (purity ≥ 95%), quercetin-3,4'-O-diglucoside (purity ≥ 85%), gallic acid (purity ≥ 99%), sodium acetate (purity ≥ 99%), acetic acid (purity ≥ 99%), formic acid LC/MS grade 98–100%, acetonitrile LC/MS grade, methanol LC/MS grade, ethanol for spectroscopy, sodium carbonate, ferric (III) chloride, hydrochloric acid (37%; HCl), 2,4,6-tris (2-pyridyl)-1,3,5-triazine (TPTZ, purity ≥ 98%), 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), Trolox (purity ≥ 97%), Folin-Ciocalteu's phenol

reagent. FORD and FORT kits were obtained from Callegari SpA, Italy.

### 2.3.2. HPLC-MS/MS analysis of antioxidant compounds in doughs and breads

Approximately 1 g of the lyophilised sample was mixed in 5 ml of methanol, then extracted using an ultrasonic bath for 15 min and occasionally shaken. The extract was centrifuged at 4000 rpm for 15 min and kept at  $-18^{\circ}\text{C}$  until analysis. For analysis, 5  $\mu\text{l}$  of the properly diluted sample was injected into the HPLC-MS/MS system.

Analyses were carried out on the HPLC Dionex UltiMate 3000 system and Agilent 6420 triple quadrupole mass spectrometer (MS) equipped with an electrospray ionisation source (ESI). For separation, a Phenomenex Kinetex column (C18, 2.6  $\mu\text{m}$ , 150  $\times$  2.1 mm) maintained at  $35^{\circ}\text{C}$  was used for the separation of analytes. Mobile phases consisted of mobile phase A (5% acetonitrile and 0.5% formic acid) and B (100% acetonitrile). The gradient involved a linear increase of solvent B from 15 to 70% within 20 min, then a decrease back to 15% in the next 5 min. Afterwards, the column was equilibrated for 5 min to be prepared for the next injection. The flow-rate of the mobile phases was 0.2 ml/min.

After separation, analytes were introduced into the MS operating in ESI negative mode, which was used for their identification and quantification. Quantification of quercetin, quercetin-4'-O-glucoside, quercetin-3,4'-O-diglucoside and rutin was performed using multiple reaction monitoring (MRM). Settings of MS parameters were as follows: 11 L/min of drying gas ( $\text{N}_2$ ), nebulizer pressure of 35 psi, gas temperature  $300^{\circ}\text{C}$ , capillary voltage  $-4\text{kV}$  and cell acceleration voltage of 7 V. Fragmentor voltage (FV), collision energy voltage (CE) and transitions were optimised for each compound. For quercetin the transition  $m/z$  was 301  $\rightarrow$  151 with FV = 130 V and CE = 20 eV, for quercetin-4'-O-glucoside 463  $\rightarrow$  301  $m/z$  with FV = 100 V and CE = 10 eV, for quercetin-3,4'-O-diglucoside 625  $\rightarrow$  463 with FV = 100 V and CE = 10 eV, for rutin 609  $\rightarrow$  300 with FV = 200 V and CE = 30 eV. A 6-point calibration curve for all compounds was prepared in the range between 0.1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  to 25  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Results are expressed as  $\mu\text{g}/\text{g}$  of dry matter (DM).

The applied method was validated considering linearity, limit of detection (LOD), limit of quantification (LOQ), intra- and inter-day precision.

### 2.3.3. In vitro antioxidant activity of doughs and breads

Exactly 0.2 g of the lyophilised sample was mixed with 9.8 ml of methanol: water (90:10, v/v), shaken in a laboratory shaker for 10 min and finally centrifuged at 7000 RPM at  $5^{\circ}\text{C}$  for 15 min. Supernatant was used for determination of the DPPH and FRAP (ferric reducing antioxidant power) assay of antioxidant activity.

**2.3.3.1. DPPH assay.** A method for measuring antioxidant activity using DPPH as a reaction agent was conducted according to Brand-Williams, Cuvelier, and Berset (1995) with modifications. Briefly, 100  $\mu\text{l}$  of extract was added to 4 ml of DPPH solution in methanol (27.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). The reaction mixture was kept in the dark at room temperature for 2 h. Then the absorbance at 515 nm was measured against a blank. Results are expressed as Trolox equivalents (TE)/g DM.

**2.3.3.2. FRAP assay.** A slightly modified FRAP method of Dudonné, Vitrac, Coutière, Woillez, and Mérillon (2009) was used. The FRAP reagent was prepared by the mixing of 100 ml of 300 mM acetate buffer (pH 3.6) with 10 ml of 10 mM TPTZ in 40 mM HCl and 10 ml of 10 mM ferric chloride. To 4 ml of FRAP reagent, 0.1 ml of sample extract was added. The mixture was kept at  $37^{\circ}\text{C}$  for 30 min. After this, the absorbance was measured at 593 nm with a spectrophotometer against the acetate buffer. Results are expressed as TE/g DM.

### 2.3.4. Determination of TPC of doughs and breads

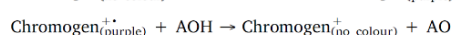
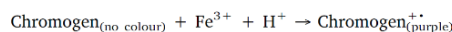
5 g of lyophilised sample was extracted in 100 ml of 80% ethanol

(v/v) under reflux at  $90^{\circ}\text{C}$  for 120 min. The TPC was determined by the method described by Lachman, Hosnedl, and Pivec (1998) with modifications. Briefly, the obtained extract was filtered and aliquot (1 ml) was transferred into a 50 ml volumetric flask. Then 10 ml of deionized water, 2.5 ml of Folin-Ciocalteu reagent and 7.5 ml of 20% sodium carbonate were added and properly mixed. Afterwards, the flask was filled with deionized water up to the mark. The mixture was incubated at room temperature for 120 min, followed by the measurement of absorbance at 765 nm. Results are expressed as gallic acid equivalents (GAE)/g DM.

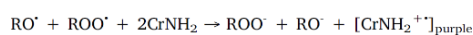
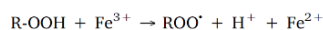
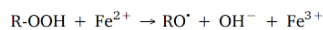
### 2.3.5. In vivo antioxidant activity and in vivo free radicals measurement in blood

In vivo antioxidant activity (FORD assay) and in vivo free radicals (FORT assay) of consumers' blood was measured using Callegari CR3000 kit (Callegari SpA, Catellani Group, Parma, Italy) based on the manufacturers' instructions. 50 and 20  $\mu\text{l}$  of capillary blood for FORD and FORT analyses, respectively, was collected from their fingertips. The capillary blood was collected as follows: subjects came into the laboratory, warmed their hands under a stream of warm water and then sat quietly for a few minutes to calm down. One middle finger of the right or left hand was chosen for taking a blood sample. The finger was cleaned (with 70% ethanol), then dried and a sterile needle was used to make a puncture on the side of the fingertip. The first drop of blood was removed with gauze as it may contain tissue fluid. Afterwards, the finger was then gently and repeatedly squeezed until a big drop of blood was formed. The blood was collected using a 50  $\mu\text{l}$  glass capillary tube for the FORD analysis and a 20  $\mu\text{l}$  glass capillary tube for FORT analysis which were included in the Callegari kits. Glass capillary tubes were then filled with blood without air bubbles by touching the blood drop; capillaries were filled by capillary action. Subjects' blood was directly mixed with supplied reagents by shaking in a closed centrifuge micro tube, then centrifuged and spectrophotometrically determined. The principles of the FORD and FORT analyses are described below according to the manufacturer.

The FORD test uses a stable coloured radical, the absorbance of which at 505 nm is inversely proportional to the concentration of antioxidants in blood. Specifically, in the presence of an acidic buffer (pH = 5.2) and a suitable oxidant ( $\text{FeCl}_3$ ), the chromogen (which contains 4-amino-N,N-diethylaniline sulphate) forms a stable and coloured radical cation, photometrically detectable at 505 nm. Antioxidant (AOH/AO) in the sample reduces the radical cation of the chromogen, quenching the colour and producing a decolouration of the solution which is proportional to its concentration. Results are expressed as mmol TE/l blood.



FORT is a colorimetric assay based on the ability of transition metals such as iron to catalyse, in the presence of hydroperoxides (ROOH), the formation of free radicals which are then trapped by an amine derivative  $\text{CrNH}_2$ . The amine reacts with free radicals forming a coloured, fairly long-lived radical cation, detected at 505 nm. The intensity of the colour correlates directly to the quantity of radical compounds. Results are expressed as mmol  $\text{H}_2\text{O}_2$  eq. /l blood.



### 2.4. Sensory analysis and colour measurement of breads

Fresh bread samples were cut into slices (1.5 cm thick, square shaped according to a baking form with dimensions of 12  $\times$  9 cm) and

randomly marked with a three-digit number. Then each assessor received a plate with all the samples to compare them at the same time. Appearance, flavour, texture and overall acceptability of all sample groups were evaluated on a 5-point hedonic scale (1 = dislike extremely, 3 = neither like nor dislike 5 = like extremely) by a 33-member panel, which was chosen from instructed staff and students of the Department of Food Biotechnologies and Agricultural Products' Quality, Faculty of Agriculture, University of South Bohemia in České Budějovice. Due to the high number of assessors and the small capacity of the evaluation room, they were divided into smaller groups, where the maximum number of panellists was six. The assessment room with a controlled temperature (22 °C with approximately 40–55% relative air humidity) was equipped with tables for each assessor and daylight-type bulbs for balanced light. Water was also served to let panellists rinse their mouth before the judging of the next sample. The sensory assessment was led by a sensory expert who did not allow panellists to influence each other during the analysis.

Colour analysis in the CIE  $L^*a^*b^*$  system was accomplished using a ColorEye XTH Spectrophotometer (GretagMacbeth, USA). Bread crumbs were chosen as a representing part of bread and results are expressed in the  $L^*a^*b^*$  scale.

### 2.5. Statistical analysis

Results are given as the mean  $\pm$  standard deviation for all analyses except sensory analysis. One-way analysis of variance (ANOVA) was used to compare differences between groups in HPLC-MS/MS measurement, *in vitro* antioxidant activity, TPC and colour analyses of doughs and breads. The Tukey HSD test was thereafter applied to determine the difference between groups.

Data obtained from the sensory analysis were expressed as medians and analysed with the Kruskal-Wallis nonparametric ANOVA because they were found not to be normally distributed, based on the Shapiro-Wilk test.

ANOVA was used for repeated measures with the post-hoc Tukey HSD test to assess differences in FORD and FORT assays before and after consumption of control and enriched breads.

Differences in all analyses were considered significant at  $p < 0.05$ . Statistica, version 12, was used as a statistical software.

## 3. Results and discussion

### 3.1. HPLC-MS/MS method validation

Nowadays, there is an increasing trend to use mass spectrometry as a powerful tool for qualitative and quantitative analysis of polyphenols in foods (Ottaviani, Fong, Borges, Schroeter, & Crozier, 2018). Many analytical methods were developed and used for the quantitative determination of flavonols in onion and onion waste products, however, most of them were based on Diode Array Detection after HPLC separation (Bonaccorsi, Caristi, Gargiulli, & Leuzzi, 2008; Campono et al., 2018). Our HPLC-MS method using MRM was validated with respect to linearity given as the correlation coefficient, detection and quantification limits (LOD, LOQ) and precision (intra- and inter-day). Results are

shown in Table 1.

Calibration curves were obtained by plotting the peak areas versus concentration of analytes. The method provided good linearity for calibration curves of all compounds ( $r \geq 0.99$ ) in the range of 0.1 to 25  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . However, sample extracts exceeding the concentration range were appropriately diluted before injection.

Also, good results were obtained in determination of LODs and LOQs, which were calculated according to this formula:  $\text{LOD}; \text{LOQ} = \frac{k\sigma}{S}$ , where  $k$  is 3 or 10 for LOD or LOQ, respectively,  $\sigma$  is the baseline noise of the blank solution chromatogram and  $S$  the slope of the regression line, as described by Douša, Reitmajer, Lustig, and Štefko (2016). The values of LODs ranged between 0.00002 and 0.00007  $\mu\text{g}/\text{ml}$  and of LOQs between 0.00007 and 0.00022  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . In both cases, the lowest values belong to quercetin-4'-O-glucoside and the highest to quercetin. If other authors are taken into account with regard to quercetin as a main flavonol in onion peel, our method achieved lower LOD and LOQ, compared to Chen et al. (2015), who quantified quercetin using LC-MS/MS apparatus. Their limits were approximately two orders higher.

The method precision was also determined. Intra-day precision was determined on real samples as follows: ten independently prepared extracts (according to the established extraction method in chapter 2.2.2.) of random sample were analysed, each in duplicate. To determine inter-day precision, ten previously prepared extracts, stored at  $-18$  °C, were analysed 14 days later, also in duplicate. Results are given as the relative standard deviation (RSD). Analysis of method precision gave satisfactory RSDs, for intra-day, ranging between 4.59% and 14.35% and for inter-day, between 1.07% and 10.35%, which indicates a good level of precision. Overall, the validation tests showed that the MRM method is suitable and sensitive enough for analysis of fortified GF breads, where it was successfully applied.

### 3.2. HPLC-MS/MS analysis of polyphenolic compounds in doughs and breads

Quercetin-3,4'-O-diglucoside, rutin, quercetin-4'-O-glucoside and quercetin were analysed in doughs and baked breads enriched with FO, DO and OP as well as in C bread. The contents of analytes are presented in Table 2. The sum of determined flavonol compounds in doughs and breads decreases in this order: OP > DO > FO > C. It indicates that OP bread has the highest flavonol content. Buckwheat flour was the only ingredient that contained rutin, thus it was represented in all samples in very low amounts (8.21–10.40  $\mu\text{g}/\text{g}$  DM for doughs; 4.31–6.41  $\mu\text{g}/\text{g}$  DM for breads). However, the content in our breads is very similar to values presented by Lin, Liu, Yu, Lin, and Mau (2009) in buckwheat bread (9.0  $\mu\text{g}/\text{g}$  DM), where these authors replaced 15% of wheat flour by unhulled buckwheat flour. Rutin was also the only flavonol compound found in C dough, but in C bread after baking, quercetin was also present, that was released from the rutin after the cleavage of glucosyl moiety (rutinose).

The highest content of quercetin-3,4'-O-diglucoside was observed in samples with FO (167.45 and 75.82  $\mu\text{g}/\text{g}$  DM for dough and bread, respectively). It is the expected result, because, according to Bonaccorsi et al. (2008), 90% of flavonols in onion bulbs are represented by

**Table 1**  
Linearity, limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ), intra- and inter-day precision.

	Regression equation	Correlation coefficient	LOD	LOQ	Intra-day precision	Inter-day precision
			( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )		RSD (%)	
Quercetin-3,4'-O-diglucoside	$y = 16783.1x + 10423.4$	0.994	0.00005	0.00016	10.34	10.32
Rutin	$y = 21569.5x + 10858.1$	0.997	0.00005	0.00015	14.35	10.35
Quercetin-4'-O-glucoside	$y = 61146.8x + 44740.2$	0.996	0.00002	0.00007	6.70	7.97
Quercetin	$y = 16497.0x + 6562.4$	0.998	0.00007	0.00022	4.59	1.07

RSD: Relative standard deviation.

**Table 2**  
Content (µg/g DM) of quercetin-3,4'-O-diglucoside (Q-3,4'-O-dgs), rutin, quercetin-4'-O-glucoside (Q-4'-O-gs) and quercetin, remaining content of flavonol compounds (%) after heat treatment, *in vitro* antioxidant activity (DPPH and FRAP assays; mg TE/g DM) and total polyphenol content (TPC; mg GAE/g DM) in doughs and breads.

	Control			Fried onion			Dried onion			Onion peel			Average remaining amount of compound (%) <sup>1</sup>
	Dough		Bread	Dough		Bread	Dough		Bread	Dough		Bread	
Q-3,4'-O-dgs	0 ± 0 <sup>f</sup>	0 ± 0 <sup>f</sup>	167.45 ± 2.55 <sup>g</sup>	103.49 ± 3.13 <sup>b</sup>	30.01 ± 3.83 <sup>d</sup>	21.51 ± 1.78 <sup>e</sup>	4.36 ± 0.26 <sup>f</sup>	31					
Rutin	9.88 ± 1.00 <sup>a</sup>	6.41 ± 0.72 <sup>b</sup>	9.77 ± 0.20 <sup>a</sup>	8.21 ± 0.15 <sup>b</sup>	4.84 ± 1.85 <sup>a</sup>	10.40 ± 1.85 <sup>a</sup>	4.31 ± 0.29 <sup>c</sup>	60					
Q-4'-O-gs	0 ± 0 <sup>e</sup>	0 ± 0 <sup>e</sup>	128.38 ± 1.85 <sup>c</sup>	74.4 ± 5.56 <sup>d</sup>	216.44 ± 3.39 <sup>a</sup>	138.92 ± 10.95 <sup>c</sup>	169.08 ± 10.79 <sup>b</sup>	58					
Quercetin	0 ± 0 <sup>f</sup>	1.83 ± 0.15 <sup>f</sup>	21.54 ± 2.33 <sup>e</sup>	97.83 ± 4.69 <sup>d</sup>	150.79 ± 12.22 <sup>c</sup>	253.60 ± 9.31 <sup>b</sup>	598.43 ± 17.75 <sup>a</sup>	181					
Total flavonols <sup>2</sup>	9.88 ± 1.00 <sup>e</sup>	8.24 ± 1.00 <sup>e</sup>	327.14 ± 1.81 <sup>c</sup>	190.09 ± 14.53 <sup>d</sup>	324.55 ± 27.40 <sup>c</sup>	454.58 ± 23.45 <sup>b</sup>	695.63 ± 22.55 <sup>a</sup>						
Remaining flavonols after baking (%) <sup>3</sup>	83	58	76	153									
DPPH <sup>4</sup>	0.95 ± 0.02 <sup>e</sup>	0.62 ± 0.02 <sup>g</sup>	1.29 ± 0.02 <sup>cd</sup>	1.34 ± 0.03 <sup>c</sup>	1.23 ± 0.03 <sup>d</sup>	4.05 ± 0.05 <sup>b</sup>	4.70 ± 0.02 <sup>a</sup>						
FRAP <sup>5</sup>	0.92 ± 0.02 <sup>d</sup>	0.63 ± 0.01 <sup>e</sup>	1.49 ± 0.02 <sup>d</sup>	1.56 ± 0.05 <sup>c</sup>	1.43 ± 0.01 <sup>c</sup>	3.48 ± 0.06 <sup>b</sup>	6.36 ± 0.02 <sup>a</sup>						
TPC	1.29 ± 0.01 <sup>d</sup>	1.1 ± 0.07 <sup>d</sup>	1.58 ± 0.04 <sup>c</sup>	1.96 ± 0.02 <sup>b</sup>	1.87 ± 0.01 <sup>b</sup>	5.27 ± 0.01 <sup>a</sup>	5.28 ± 0.11 <sup>a</sup>						

Results are expressed as mean ± standard deviation (*n* = 4 for flavonols, DPPH and FRAP; *n* = 2 for TPC).  
<sup>a-f</sup> Values with different superscripts within a row differ significantly (*p* < 0.05).  
 DM: dry matter; TE = Trolox equivalent; GAE = gallic acid equivalent.  
<sup>1</sup> Value was calculated as an average ratio of content of specific compound before and after baking.  
<sup>2</sup> sum of Q-3,4'-O-dgs, Rut, Q-4'-O-gs and Q.  
<sup>3</sup> remaining flavonols after baking (%) were calculated as a ratio of content of total flavonols before and after heat treatment.  
<sup>4</sup> DPPH: 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazil.  
<sup>5</sup> FRAP: Ferric Reducing Antioxidant Power.

quercetin glucosides and especially, quercetin-3,4'-O-diglucoside, which is the most abundant. On the other hand, the lowest content of quercetin-3,4'-O-diglucoside was observed in samples with OP (dough and bread), which is also in agreement with Takahama and Hirota (2000), because quercetin in onion peel is mainly represented as aglycone due to the presence of glucosidases that catalyze the cleavage of glucose moiety. Thus, the most dominant compound in OP samples was quercetin.

The content of quercetin in OP bread was  $598.43 \pm 17.75 \mu\text{g/g}$  DM, which was much more than reported by Gawlik-Dziki et al. (2013), who also incorporated up to 5% of onion peel into wheat bread. Samples with DO (dough and bread) had the highest content of quercetin-4'-O-glucoside, which was in the range between 216.44 and 138.92  $\mu\text{g/g}$  DM. It is because dried onion contained small amounts of dry onion peel (as mentioned in chapter 2.1.), in which this compound is also very abundant (Benítez et al., 2011).

Many authors have studied the thermal stability of polyphenols in enriched products because it is very important to ensure that these antioxidant compounds are stable enough to resist high temperatures during thermal processing and remain in the final product (Ou et al., 2019). In our study, the content loss of flavonol compounds after heat treatment (baking) was also evaluated (Table 2). Results show that the total flavonol content (sum of flavonol derivatives) decreased after baking in C, FO and DO breads, mainly because quercetin glycosides decomposed and transformed into quercetin, which in all breads was slightly higher than in doughs. The least stable was quercetin-3,4'-O-diglucoside (only 31% remained in breads) whereas quercetin-4'-O-glucoside and rutin had almost the same values (58% and 60% remained, respectively). This transformation was foreseeable. On the other hand, a very different situation occurred in groups (dough and bread) enriched with OP. There was a very significant increase of quercetin in bread after baking (almost a 3-fold higher content than in dough).

As mentioned above, 90% of flavonol antioxidants in onion bulbs are represented mainly by glucosides, but in onion peel they are represented predominantly by free quercetin and its derivatives such as dimers, trimer, glucoside-dimers and condensation products with protocatechuic acid. These compounds were identified according to their mass spectra obtained by MS/MS analysis (Table 3) and confirmed by literature data (Campone et al., 2018; Ly et al., 2005). Fig. 1a and 1b shows full scans (Total Ion Chromatogram) of dough and bread respectively, both enriched with OP. There can be clearly seen that under the described baking conditions (180 °C/60 min; 95 °C/30 min inside of the dough) these derivatives decomposed to their final degradation product, quercetin. This finding gives a brief insight into the thermal stability of quercetin dimers and trimer. High temperatures (above 100 °C) are also applied in techniques (e.g. subcritical water extraction) used for obtaining phenolic compounds from onion solid wastes, including onion peel, that can be used as a food additive or for medical purposes (Munir, Kheirkhah, Baroutian, Quek, & Young, 2018). Some

papers have been published concerning the utilization of onion peel in wheat bread (Gawlik-Dziki et al., 2013; Prokopov et al., 2018) and also several papers dealing with the positive biological impact of onion peel extracts on human health (Abouzed et al., 2018; Choi et al., 2015). It means that it is important to know how these compounds behave during the thermal processing of food, because it can change their structure and also their biological effects, which still remain unknown. It is also very difficult or almost impossible to determine the thermal stability of quercetin when it is in a mixture with its derivatives, because its content raises after derivatives decompose. However, our recent results imply that quercetin is very stable at baking conditions, whereas glycosides, dimers and trimer are not.

### 3.3. *In vitro* antioxidant activity (DPPH and FRAP assay) and TPC in doughs and breads

The same trend as in total flavonol content, measured by LC-MS/MS, is observed in the case of antioxidant activity (DPPH and FRAP assay), as given in Table 2. Addition of onion wastes (FO, DO, OP) into doughs and breads increased antioxidant activity significantly ( $p < 0.05$ ) compared to C samples. Also baking affected these values, because in baked breads, antioxidant activity was lower than in doughs with the exception of OP samples, where antioxidant activity was significantly higher ( $p < 0.05$ ) in both assays. This phenomenon suggests that quercetin, after degradation of its derivatives (dimers, condensation products with protocatechuic acid and glycosides), has higher antioxidant activity than when it is bounded. This is in agreement with Ly et al. (2005), who reported also the highest antioxidant activity for quercetin compared to its bound forms in onion peel extract. This claim is also supported by correlation analysis. A very strong statistically significant ( $p < 0.05$ ) correlation was found between the quercetin content and antioxidant activity. Coefficients (data not given in the table) were 0.91 and 0.98 for DPPH and FRAP, respectively.

The highest value for TPC was noticed in dough and bread fortified with OP ( $5.27 \pm 0.01$  and  $5.28 \pm 0.11 \text{ mg GAE/g DM}$ , respectively). The content of polyphenols in enriched doughs and breads decreased in the following order: OP > DO > FO > C. There was a very slightly decreasing trend in TPC after heat treatment (i.e. baking) of doughs, however, these changes were not statistically significant ( $p > 0.05$ ). This can be probably caused by the degradation of quercetin derivatives into quercetin, which reacts with the Folin-Ciocalteu's reagent in the same ratio as when quercetin is bounded to glycosyl moiety, or in dimers, trimer or condensation products with protocatechuic acid. However, the exact reaction is still unknown (Sánchez-Rangel, Benavides, Heredia, Cisneros-Zevallos, & Jacobo-Velázquez, 2013).

### 3.4. Sensory and colour analysis of breads

Our assumption was that the addition of DO and OP causes the deterioration of organoleptic properties, and that the FO would be the

**Table 3**  
HPLC-MS/MS data of flavonol compounds in dough and bread enriched with onion peel.

Peak No.	Compound	Retention time (min)	ESI negative $[M - H]^-$ ( $m/z$ )	
			Molecular Ion	Fragment ions (MS/MS)
1	Quercetin-3,4'-O-diglucoside	2.88	625	301, 151
2	Rutin	3.65	609	463, 301, 300, 151
3	Quercetin-4'-O-glucoside	6.83	463	301
4	Condensation products of quercetin with protocatechuic acid	9.50	453	299
5		9.69	453	299
6	Quercetin	9.95	301	273, 179, 151, 121
7	Adduct of quercetin with quercetin-4'-O-glucoside	11.58	763	299
8	4'-O-glucoside of quercetin dimer	12.87	763	299
9	Quercetin dimer	14.91	601	299, 273
10	Quercetin trimer	17.12	901	599, 299

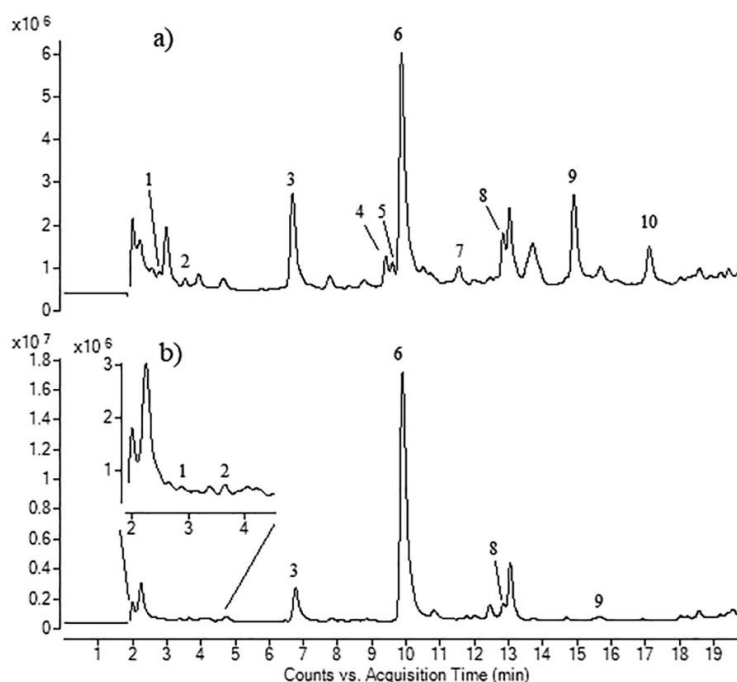


Fig. 1. Total Ion Chromatogram (full scan; presented compounds are described in Table 3) of (a) dough and (b) bread enriched with onion peel.

most preferred, but this was not confirmed. Nevertheless, despite these results, sensory analysis yielded satisfactory results.

Differences were observed among samples within descriptors of appearance and texture (Table 4), but they were not statistically significant ( $p > 0.05$ ). The lowest score for the appearance and texture was received by C bread. Texture evaluation also revealed OP bread as less favourable, which is consistent with results published by Prokopov et al. (2018). This can be explained by the presence of the high content of non-soluble fibre (Benítez et al., 2011) which makes the texture harder. On the other hand, Gawlik-Dziki et al. (2013) reported that wheat bread fortified with 5% of onion peel powder was assessed as the worst which was not in agreement with our results. However, our breads had a different recipe (GF vs. wheat bread), which could cause the difference in acceptability. It could be caused by the fact that buckwheat flour gives the bread a characteristic aroma (Lin, Hsieh, Liu, Lee, & Mau, 2009) which could cover the pleasant taste of fried onion in the bread or that the amount of onion ingredients was too small.

Applying FO, DO and OP had a significant effect ( $p < 0.05$ ) upon the colour of GF breads in the CIE  $L^*a^*b^*$  system (Table 4). The

addition of wastes of a red variety of onion caused a decrease in the  $L^*$  value, which made fortified samples darker compared to the control and with a big contribution of red in the case of the sample with OP where the  $a^*$  value was  $11.3 \pm 0.6$  vs.  $5.3 \pm 0.1$  for the control. This suggests that the utilization of onion peel from the red variety can serve as a colorant for breads. Samples with FO and DO were very similar in  $L^*$  and  $a^*$  values, whereas  $b^*$  was slightly but statistically different ( $p < 0.05$ ).

### 3.5. In vivo antioxidant activity and in vivo free radicals in the blood of consumers

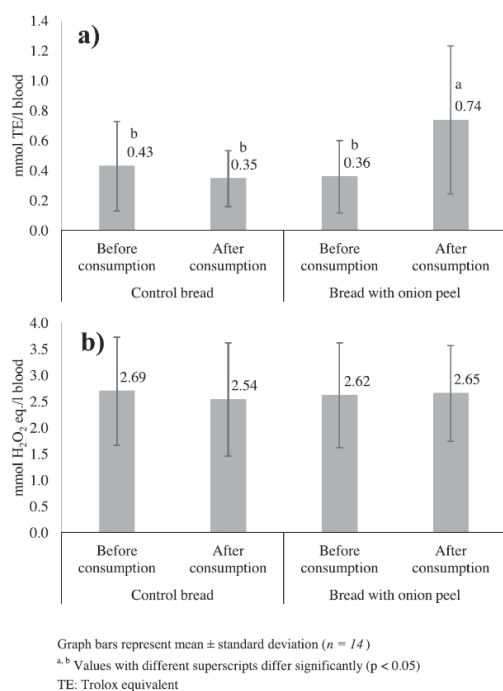
For this experiment, whose results are shown in Fig. 2, C bread and bread with OP as the experimental bread were chosen. Despite the fact that OP enriched bread had a lower sensory score in texture compared to other enriched groups, differences were not statistically significant, thus we decided to choose this sample because it had the highest content of TPC, highest antioxidant activity and highest amount of quercetin.

Table 4

Sensory analysis of control bread, and breads enriched with fried onion, dried onion and onion peel and their colour analysis in the CIE Lab system.

Assessed attribute	Control	Fried onion	Dried onion	Onion peel
Appearance	3	4	4	4
Flavour	3	3	3	3
Texture	3	4	4	3
Overall acceptability	3	3	3	3
$L^*$	$47.0 \pm 0.2^A$	$40.5 \pm 0.1^B$	$41.5 \pm 0.4^B$	$27.0 \pm 0.6^C$
$a^*$	$5.3 \pm 0.1^B$	$5.5 \pm 0.4^B$	$6.3 \pm 0.4^B$	$11.3 \pm 0.6^A$
$b^*$	$16.8 \pm 0.3^A$	$13.9 \pm 1.2^B$	$16.5 \pm 0.2^A$	$11.9 \pm 0.6^C$

Results are expressed as median for sensory analysis ( $n = 33$ ) and as mean  $\pm$  standard deviation for colour analysis ( $n = 3$ ). Values with different upper case letter within a row differ significantly ( $p > 0.05$ ). Score 5 is the best.



**Fig. 2.** *In vivo* antioxidant activity (a) and *in vivo* free radicals concentration (b) in blood of consumers before (0 min) and after (90 min) consumption of control and onion peel enriched bread.

There are some suggestions that food matrix enhances the bioavailability of quercetin, e.g. quercetin from onion peel is more bioavailable than a pure compound (Burak et al., 2017) due to its lipophilic character and low solubility in the digestive tract (Wiczowski et al., 2008). To the best of our knowledge, this is the first study that deals with the antioxidant activity of consumers' blood after the administration of functional GF bread fortified with onion peel powder, which is a real and common type of food for some consumers.

A 200 g portion of control bread contained 0.84 mg of flavonols (the sum of quercetin-3,4'-O-diglucoside, rutin, quercetin-4'-O-glucoside and quercetin) which corresponds to 0.51 mg of quercetin equivalents. The same portion of OP enriched bread contained 68.02 mg of flavonols (approximately 65 mg quercetin equivalents), that were mainly represented by quercetin aglycone, as described in chapter 3.2. This content is adequate, because quercetin may be used as a nutraceutical for functional foods within a content range of 0.008–0.5% or 10–125 mg/serving (Harwood et al., 2007).

It can be seen in Fig. 2a, that the C bread did not alter FORD values (antioxidant activity) in consumers' blood, but after OP enriched bread was ingested, the antioxidant activity of subjects increased significantly (p < 0.05) to double the compared values before consumption.

In FORD assays, our data show considerable inter-individual variability (standard deviation). As reported by Almeida et al. (2018), in many studies focused on bioavailability of quercetin, high inter-individual variability was observed, which can arise from numerous factors, including genetic polymorphism, dietary adaptation, composition of gut microbiota, drug exposure and other subject characteristics such as body mass index and health status.

Our finding is a contrary result compared to other authors (Egert et al., 2008; Shanely et al., 2010), who did not observe any effect on antioxidant activity of blood after oral supplementation with quercetin.

However, they administered a pure compound in the form of capsules which was not therefore presented in its natural matrix (e.g. food). They also used different monitoring methods, such as ORAC (oxygen radical absorbance capacity) or FRAP. Thus it is hard to compare these results. Nevertheless, these antioxidant activity measurement methods as well as other assays (including FORD) suffer from low specificity (Lotio & Frei, 2006), and thus each of them can give different results. Unfortunately, authors who were focused on the bioavailability of quercetin from onion peel did not measure blood antioxidant activity (Burak et al., 2017; Kashino et al., 2015; Wiczowski et al., 2008).

FORD is a fast, simple and non-selective method for the determination of free radicals that was used in several studies (e.g. Lorgis et al., 2010). Antioxidants provided in the diet neutralize free radicals produced by physiological processes and obtained from exogenous sources (Harasym & Oledzki, 2014). However, we did not observe any statistically significant changes (p > 0.05) 90 min after the consumption of C or OP enriched bread, even though there were differences in FORD after the consumption of OP bread. This can be partly explained by the nonsufficient dosage of quercetin equivalents and/or the length of the experiment. Thus more research is still needed.

#### 4. Conclusions

In present days, there are a vast amount of onion wastes composed of different fractions that are excluded from the food chain. In this research, our study presented the fate of biologically active compounds from onion wastes on their way from enriched dough, through their changes during bread baking, to humans via bread consumption. The incorporation of different kinds of onion waste, including deformed but healthy onions (fried or dried) and onion peel, significantly increased the content of flavonols, TPC and the *in vitro* antioxidant activity of fortified GF breads. However, onion peel appeared to be the richest source of flavonol antioxidants. Also baking showed significant influences on the quality and quantity of flavonols, determined by the new LC-MS/MS method, in onion waste enriched breads. Nevertheless, quercetin showed good thermal stability, despite the fact that thermal treatment decomposed complex quercetin derivatives, such as dimers or trimer, which caused a release of quercetin itself. Finally, in a cross-over FORD and FORT assay study, we found a significant increase of *in vivo* antioxidant activity in consumers' blood after the consumption of onion peel enriched bread compared to control bread. This indicates that flavonols from onion peel are bioavailable even though they underwent changes during baking at high temperatures. Thus, we conclude that onion peel is a rich source of antioxidants suitable for bread made from GF ingredients with potentially elevated health benefits while maintaining satisfactory sensory properties.

#### CRedit authorship contribution statement

**Jan Bedrníček:** Conceptualization, Methodology, Investigation, Writing - original draft, Data curation, Formal analysis. **Dana Jirotková:** Conceptualization, Investigation, Methodology. **Jaromír Kadlec:** Investigation, Methodology. **Ivana Laknerová:** Investigation, Formal analysis. **Naděžda Vrchotová:** Investigation, Validation. **Jan Tříška:** Investigation, Validation, Writing - review & editing. **Eva Samková:** Visualization, Writing - review & editing. **Pavel Smetana:** Project administration, Funding acquisition, Supervision.

#### Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.



## Acknowledgements

This study was financially supported by The Technology Agency of the Czech Republic (grant No. TA CR GAMA TG03010027), by The Grant Agency of the University of South Bohemia in České Budějovice (grant No. 028/2019/Z), and also by the Ministry of Education, Youth and Sports of CR, project SustES – Adaptation strategies for sustainable ecosystem services and food security under adverse environmental conditions (CZ.02.1.01/0.0/0.0/16.019/0000797); and finally by a grant of the Ministry of Education, Youth and Sports of CR No. LM2018100. The authors would like to thank Vital Czech, s.r.o. for supplying onion wastes.

## Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126562>.

## References

- Abouzed, T. K., del Mar Contreras, M., Sadek, K. M., Shurky, M., Abdelhady, D. H., Gouda, W. M., et al. (2018). Red onion scales ameliorated streptozotocin-induced diabetes and diabetic nephropathy in wistar rats in relation to their metabolite fingerprint. *Diabetes Research and Clinical Practice*, *140*, 253–264.
- Almeida, A. F., Borge, G. I. A., Piskula, M., Tudose, A., Tudoreanu, L., Valentová, K., et al. (2018). Bioavailability of quercetin in humans with a focus on interindividual variation. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, *17*(3), 714–731.
- Benítez, V., Mollá, E., Martín-Cabezas, M. A., Aguilera, Y., López-Andréu, F. J., Cools, K., et al. (2011). Characterization of industrial onion wastes (*Allium cepa* L.): Dietary fibre and bioactive compounds. *Plant Foods for Human Nutrition*, *66*(1), 48–57.
- Bojiňanská, T., Frančáková, H., Chlebo, P., & Vollmannová, A. (2009). Rutin content in buckwheat enriched bread and influence of its consumption on plasma total antioxidant status. *Czech Journal of Food Sciences*, *27*, S236–S240.
- Bonaccorsi, P., Caristi, C., Gargiulli, C., & Leuzzi, U. (2008). Flavonol glucosides in *Allium* species: A comparative study by means of HPLC-DAD-ESI-MS-MS. *Food Chemistry*, *107*(4), 1668–1673.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*, *28*, 25–30.
- Burak, C., Brill, V., Langguth, P., Zimmermann, F. B., Stoffel-Wagner, B., Sausen, U., et al. (2017). Higher plasma quercetin levels following oral administration of an onion skin extract compared with pure quercetin dehydrate in humans. *European Journal of Nutrition*, *56*(1), 343–353.
- Campono, L., Celano, R., Piccinelli, A. L., Pagano, I., Carabetta, S., Di Sanzo, R., et al. (2018). Response surface methodology to optimize supercritical carbon dioxide/col-solvent extraction of brown onion skin by-products as source of nutraceutical compounds. *Food Chemistry*, *269*, 495–502.
- Chen, Y., Yu, H., Wu, H., Pan, Y., Wang, K., Jin, Y., & Zhang, C. (2015). Characterization and quantification by LC-MS/MS of the chemical components of the heating products of the flavonoids extract in *Pollen Typhae* for transformation rule exploration. *Molecules*, *20*(10), 18352–18366.
- Choi, E. Y., Lee, H., Woo, J. S., Jang, H. H., Hwang, S. J., Kim, H. S., et al. (2015). Effect of onion peel extract on endothelial function and endothelial progenitor cells in overweight and obese individuals. *Nutrition*, *31*(9), 1131–1135.
- Douša, M., Reitmajer, J., Lustig, P., & Štefko, M. (2016). Effect of chromatographic conditions on enantioseparation of badequiline using polysaccharide-based chiral stationary phases in RP-HPLC. *Journal of Chromatographic Science*, *54*(9), 1501–1507.
- Drabiňská, N., Ciska, E., Szmatowic, B., & Krupak-Kozak, U. (2018). Broccoli by-product improve the nutraceutical potential of gluten-free mini sponge cakes. *Food Chemistry*, *267*, 170–177.
- Dudonné, S., Vitrac, X., Coutière, P., Woillez, M., & Mérillon, J.-M. (2009). Comparative study of antioxidant properties and total phenolic content of 30 plant extracts of industrial interest using DPPH, ABTS, FRAP, SOD and ORAC Assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *57*(5), 1768–1774.
- Egert, S., Wolfram, S., Bost-Westphal, A., Boesch-Saadatmandi, C., Wagner, A. E., Frank, J., & Mueller (2008). Daily quercetin supplementation dose dependently increases plasma quercetin concentrations in healthy humans. *The Journal of Nutrition*, *138*(9), 1615–1621.
- FAOSTAT. Crop production statistics. (2017). <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>. Accessed 14 May 2019.
- Gawlik-Dziki, U., Świeca, M., Dziki, D., Baraniak, B., Tomilo, J., & Czyż, J. (2013). Quality and antioxidant properties of bread enriched with dry onion (*Allium cepa* L.) skin. *Food Chemistry*, *138*(2), 1621–1628.
- Germ, M., Árvy, J., Vollmannová, A., Tóth, T., Golob, A., Luthar, Z., & Kreft, I. (2019). The temperature threshold for the transformation of rutin to quercetin in tartary buckwheat dough. *Food Chemistry*, *283*, 28–31.
- Giménez-Bastida, J. A., Piskula, M., & Zieliński, H. (2015). Recent advances in development of gluten-free buckwheat products. *Trends in Food Science and Technology*, *44*(1), 58–65.
- Harasym, J., & Oledzki, R. (2014). Effect of fruit and vegetable antioxidants on total antioxidant capacity of blood plasma. *Nutrition*, *30*(5), 511–517.
- Harwood, M., Danielewska-Nikiel, B., Borzelleca, J. F., Flamm, G. W., Williams, G. M., & Lines, T. C. (2007). A critical review of the data related to the safety of quercetin and lack of evidence of *in vivo* toxicity, including lack of genotoxic/carcinogenic properties. *Food and Chemical Toxicology*, *45*(11), 2179–2205.
- Kashino, Y., Murota, K., Matsuda, N., Tomotake, M., Hamano, T., Mukai, R., & Terao, J. (2015). Effect of processed onions on the plasma concentration of quercetin in rats and humans. *Journal of Food Science*, *80*(11), 2597–2602.
- Lachman, J., Hosnedl, V., & Pivec, V. (1998, July). Polyphenols in cereals and their positive and negative role in human and animal nutrition. Conference paper: Cereals for Human Health and Preventive Nutrition, Brno, Czech Republic.
- Lesjak, M., Beara, I., Simin, N., Pintač, D., Majkić, T., Bekvalac, K., et al. (2018). Antioxidant and anti-inflammatory activities of quercetin and its derivatives. *Journal of Functional Foods*, *40*, 68–75.
- Lin, L.-Y., Liu, H.-M., Yu, Y.-W., Lin, S.-D., & Mau, J.-L. (2009). Quality and antioxidant property of buckwheat enhanced wheat bread. *Food Chemistry*, *112*(4), 987–991.
- Lin, L.-Y., Hsieh, Y.-J., Liu, M.-H., Lee, C.-C., & Mau, J.-L. (2009). Flavor components in buckwheat bread. *Journal of Food Processing and Preservation*, *33*(6), 814–826.
- Lorgis, L., Zeller, M., Dentan, G., Sicard, P., Buffet, P., L'Huillier, I., et al. (2010). The free oxygen radicals test (FORT) to assess circulating oxidative stress in patients with acute myocardial infarction. *Atherosclerosis*, *213*(2), 616–621.
- Lotio, B. S., & Frei, B. (2006). Consumption of flavonoid-rich foods and increased plasma antioxidant capacity in humans: Cause, consequence, or epiphenomenon? *Free Radical Biology and Medicine*, *41*(12), 177–1746.
- Ly, N. T., Hazama, C., Shimoyamada, M., Ando, H., Kato, K., & Yamauchi, R. (2005). Antioxidative compounds from the outer scales of onion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *53*(21), 8183–8189.
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., & Jiménez, L. (2004). Polyphenols: Food sources and bioavailability. *American Journal of Clinical Nutrition*, *79*(5), 727–747.
- Munir, M. T., Kheirkhah, H., Baroutian, S., Quek, S. Y., & Young, B. R. (2018). Subcritical water extraction of bioactive compounds from waste onion skin. *Journal of Cleaner Production*, *183*, 487–494.
- Nile, S. H., Nile, A. S., Keum, Y. S., & Sharma, K. (2017). Utilization of quercetin and quercetin glycosides from onion (*Allium cepa* L.) solid waste as an antioxidant, urease and xanthinase oxidase inhibitors. *Food Chemistry*, *235*, 119–126.
- Ottaviani, J. I., Fong, R. Y., Borges, G., Schroeter, H., & Crozier, A. (2018). Use of LC-MS for the quantitative analysis of (poly)phenol metabolites does not necessarily yield accurate results: Implications for assessing existing data and conducting future research. *Free Radical Biology and Medicine*, *124*, 97–103.
- Ou, J., Wang, M., Zheng, J., & Ou, S. (2019). Positive and negative effects of polyphenol incorporation in baked foods. *Food Chemistry*, *284*, 90–99.
- Prokopov, T., Chonova, V., Slavov, A., Dessev, T., Dimitrov, N., & Petkova, N. (2018). Effect on the quality and health-enhancing properties of industrial onion waste powder on bread. *Journal of Food Science and Technology*, *55*(12), 5091–5097.
- Sánchez-Rangel, J. C., Benavides, J., Heredia, B. J., Cisneros-Zevallos, L., & Jacobo-Velázquez, D. A. (2013). The Folin-Ciocalteu assay revisited: Improvement of its specificity for total phenolic content determination. *Analytical Methods*, *5*(21), 5990–5999.
- Saturni, L., Ferretti, G., & Bacchetti, T. (2010). The gluten-free diet: Safety and nutritional quality. *Nutrients*, *2*(1), 16–34.
- Shanely, R. A., Knab, A. M., Nieman, D. C., Jin, F., McAnulty, S. R., & Landram, M. J. (2010). Quercetin supplementation does not alter antioxidant status in humans. *Free Radical Research*, *44*(2), 224–231.
- Takahama, U., & Hirota, S. (2000). Deglucosidation of quercetin glucosides to the aglycone and formation of antifungal agents by peroxidase-dependent oxidation of quercetin on browning of onion scales. *Plant and Cell Physiology*, *41*(9), 1021–1029.
- Torbica, A., Hadnadev, M., & Dapčević, T. (2010). Rheological, textural and sensory properties of gluten-free bread formulations based on rice and buckwheat flour. *Food Hydrocolloids*, *24*(6–7), 626–632.
- Wiczakowski, W., Romaszko, J., Bucinski, A., Szawara-Nowak, D., Honke, J., Zielinsky, H., & Piskula, M. K. (2008). Quercetin from Shallots (*Allium cepa* L. var. *aggregatum*) is more bioavailable than its glucosides. *The Journal of Nutrition*, *138*(5), 885–888.

## Supplementary material 1

List of foods that were not allowed and recommended during the *in vivo* experiment

### 1.) Foods that were not allowed

- a. all kinds of fruits and vegetables in any form
- b. cocoa, chocolate
- c. legumes
- d. wholegrain bakery products (including buckwheat)
- e. nuts and seeds,
- f. virgin oils
- g. offal
- h. beverages – fruit or vegetable juices, coffee, tea (black, green or herbal)
- i. alcoholic beverages – especially wine, beer and herbal alcoholic beverages

### 2.) Recommended foods

- a. drinking water (excluding sparkling water)
- b. potatoes
- c. white peeled rice
- d. wheat pasta
- e. dumplings
- f. white wheat bread and pastries
- g. dairy products – milk, butter, fresh non-ripened cheeses, cottage
- h. refined oil
- i. meat/meat products – chicken, pork/chicken ham

## 5.4 MOUKA Z CIBULOVÝCH SLUPEK JAKO ZDROJ ANTIOXIDANTŮ PRO MASNÉ VÝROBKY

**Bedrníček, J.,** Kadlec, J., Laknerová, I., Mráz, J., Samková, E., Petrášková, E., Hasoňová, E., Vácha, F., Kron, V., Smetana, P. Onion peel powder as an antioxidant rich material for sausages prepared from mechanically separated fish meat - *Manuskript*.

Rybí maso je nutričně cenná součást lidské stravy, protože obsahuje polynenasycené mastné kyseliny s dlouhým řetězcem, které mají pozitivní vliv na lidské zdraví (Tilami a Sampels, 2018). Jedná se zejména o dokosaheptaenovou (DHA) a eikosapentaenovou (EPA) kyselinu.

Rybářský průmysl pro lidskou konzumaci často získává z ryb jen filety (FAO, 2018). Při takovém zpracování ryb vzniká velké množství odpadů, resp. vedlejších produktů, které mohou tvořit až 55 % z celkové hmotnosti ryb. Do těchto odpadů patří například zbytky masa na kostech po filetování, ze kterých se může získat strojně oddělené maso, které je stále nutričně cenné a které může být použito na výrobu rybích masných výrobků (Arvanitoyannis a Tserkezou, 2014; Palmeira et al., 2016), zejména klobás, paštik nebo sekaných.

Mastné kyseliny obsažené v rybím mase rychle podléhají oxidaci, což je jeden z hlavních důvodů vedoucích ke zhoršování kvality rybích produktů. Následkem oxidace je snížení nutriční hodnoty a tvorba látek, které mohou negativně ovlivnit lidské zdraví (Ali et al., 2019). Z hlediska údržnosti vedlejších produktů vznikajících při zpracování ryb je náchylnost k oxidaci vyšší než u samotného rybího masa (Jayathilakan et al., 2012).

Cibulové slupky obsahují velké množství polyfenolů (Benítez et al., 2011), proto by mohly výše popsaným negativním změnám probíhajícím v mase zabránit. V tomto pokusu byla místo výluhů (popsaných v kapitole 5.2) vybrána slupková mouka. Důvodem byla skutečnost, že AOA výluhů není tak vysoká, a protože cibulové slupky obsahují mimo jiné i značné množství vlákniny, která by mohla mít určitý technologický význam. Je totiž známo, že vláknina v masných výrobcích může zvyšovat vaznost vody a snižovat hmotnostní ztrátu během tepelného opracování (Feiner, 2006).

Cílem experimentu bylo zjistit vliv přídavku mletých slupek do rybích klobás na:

- hmotnostní ztrátu během tepelného opracování,
- pH,
- AOA (metodou DPPH),
- obsah celkových polyfenolů,
- oxidaci lipidů (TBARS),
- senzorycké vlastnosti a
- mikrobiologické vlastnosti (celkový počet mikroorganismů a psychrotrofní mikroorganismy).

Celkem byly vyrobeny čtyři skupiny výrobků: rybí klobásy obohacené 1 %, 2 % a 3 % mouky z cibulových slupek Ž (obrázek 16), skupina bez přídavku mouky byla kontrolní (obrázek 17). Po tepelném opracování byly klobásy vakuově zabaleny a skladovány 28 dní při teplotě 5 °C. Rozbory byly prováděny 0., 7., 14., a 28. den.

Obrázek 16. Mouka z cibulových slupek žluté odrůdy Hybelle.



Přídavek slupkové mouky významně zvýšil AOA rybích klobás i obsah celkových polyfenolů. Nárůst těchto hodnot byl přímo úměrný přidanému množství slupek. S tím souvisela i snížená oxidace tuků. U kontrolních vzorků byly oproti vzorkům se slupkovou moukou hodnoty MDA po celou dobu skladování výrazně vyšší.

Obrázek 17. Klobásy ze strojně odděleného rybího masa s různým podílem cibulových slupek žluté odrůdy Hybelle.



Zajímavé byly změny hodnot pH vzorků klobás v průběhu celého skladování. Přídavek cibulových slupek významně snížil pH vzorků, které se projevilo už v den výroby. Nejvyšší pH měly kontrolní vzorky a nejnižší vzorky s přídavkem 3 % cibulových slupek. To mohlo být způsobeno kyselou povahou látek přítomných v cibulových slupkách, které obsahují velké množství pektinu, až 28 % (Babbar et al., 2016). Tento heteropolysacharid je složený z řetězce galakturonové kyseliny, která dává pektinu kyselé vlastnosti (Slavov et al., 2009). Snížení pH masného výrobků tak může prodloužit jeho trvanlivost (Leistner a Gorris, 1995).

Velmi pozitivní výsledky přinesla i sensorická analýza. Rybí klobásy s 1 % a 2 % cibulových slupek byly ze sensorického hlediska hodnoceny výrazně lépe po celou dobu skladování, zatímco sensorické vlastnosti kontrolních vzorků byly hodnoceny spíše negativně. Vzorky se 3 % cibulových slupek byly rovněž hodnoceny negativně, zejména z důvodu nepřijatelné, tuhé konzistence. Cibulové slupky dokázaly ve vzorcích rybích klobás velmi efektivně buď překrýt nebo zmírnit nepříjemný rybí pach, který je pro konzumenty často důvodem odmítání (Leek et al., 2000). Z pohledu sensorických vlastností se tedy zdá být přídavek 1 % až 2 % slupkové mouky ideálním množstvím.

Obohacení vzorků rybích klobás 3 % slupkové mouky se projevilo negativně i na hmotnostní ztrátě během tepelného opracování. Nepotvrdila se tudíž hypotéza, že by mohlo vyšší procento cibulových slupek přispět k vyšší vaznosti vody v masném výrobku. Nejpravděpodobnější vysvětlení tohoto jevu bude spočívat ve skutečnosti, že vláknina ve slupkách dokáže vodu poutat mnohem rychleji než proteiny, které jsou za

vaznost vody primárně zodpovědné, ale následně během tepelného opracování není tato vláknina schopna vodu udržet.

V případě zpracování živočišných produktů je problematická údržnost také z hlediska mikrobiálního. Přídavek různých ingrediencí, například koření může být rizikový v důsledku kontaminace širokou škálou mikroorganismů (Hampikyan et al., 2009).

V experimentu se ukázalo, že tepelné ošetření neinaktivovalo všechny mikroorganismy a zdá se, že vyšší přídavek cibulových slupek mohl způsobit i vyšší mikrobiální zátěž. Nicméně celkový počet mikroorganismů nemusí nutně znamenat přítomnost bakterií způsobující kažení masa, což potvrdila i senzorická analýza. Z těchto důvodů by bylo vhodné se v dalším výzkumu zaměřit více i na tuto problematiku.

Z celkových výsledků vyplývá, že přídavek 1 – 2 % cibulových slupek dokázal prodloužit trvanlivost klobás vyrobených z rybího masa, zejména z hlediska senzorického a chemického (snížená oxidace lipidů).

## **Onion peel powder as an antioxidant rich material for sausages prepared from mechanically separated fish meat**

Jan BEDRNÍČEK<sup>\*a</sup>, Jaromír KADLEC<sup>a</sup>, Ivana LAKNEROVÁ<sup>b</sup>, Jan MRÁZ<sup>c</sup>, Eva SAMKOVÁ<sup>a</sup>, Eva PETRÁŠKOVÁ<sup>d</sup>, Lucie HASOŇOVÁ<sup>a</sup>, František VÁCHA<sup>a</sup>, Vladimír KRON<sup>a</sup>, Pavel SMETANA<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Department of Food Biotechnologies and Agricultural Products Quality, Faculty of Agriculture, University of South Bohemia in České Budějovice, Studentská 1668, 370 05 České Budějovice, Czech Republic

<sup>b</sup>Food Research Institute Prague, Radiová 1285/7, 102 00 Praha 10 – Hostivař, Czech Republic

<sup>c</sup>University of South Bohemia in České Budějovice, Faculty of Fisheries and Protection of Waters, Institute of Aquaculture and Protection of Waters, Na Sádkách 1780, 370 05 České Budějovice, Czech Republic

<sup>d</sup>Department of Animal Husbandry Sciences, Faculty of Agriculture, University of South Bohemia in České Budějovice, Studentská 1668, 370 05 České Budějovice, Czech Republic

### **Email addresses:**

Jan BEDRNÍČEK<sup>\*</sup> [bedrnj00@zf.jcu.cz](mailto:bedrnj00@zf.jcu.cz) corresponding author,

Phone number: +420721657114

Ivana LAKNEROVÁ [ivana.laknerova@vupp.cz](mailto:ivana.laknerova@vupp.cz)

Eva SAMKOVÁ [samkova@zf.jcu.cz](mailto:samkova@zf.jcu.cz)

Pavel SMETANA [smetana@zf.jcu.cz](mailto:smetana@zf.jcu.cz)

Jan MRÁZ [jmraz@frov.jcu.cz](mailto:jmraz@frov.jcu.cz)

Eva PETRÁŠKOVÁ [epetraskova@zf.jcu.cz](mailto:epetraskova@zf.jcu.cz)

František VÁCHA [fvacha@zf.jcu.cz](mailto:fvacha@zf.jcu.cz)

Lucie HASOŇOVÁ [hasonova@zf.jcu.cz](mailto:hasonova@zf.jcu.cz)

Jaromír KADLEC [kadlec@zf.jcu.cz](mailto:kadlec@zf.jcu.cz)

Vladimír KRON [vladimir.kron@trouwnutrition.com](mailto:vladimir.kron@trouwnutrition.com)

## **ABSTRACT**

Mechanically separated fish meat (MSFM) can be used for manufacturing of ready-to-eat products, such as sausages, however, it is highly perishable. Several plant by-products, including onion peel, rich in polyphenol antioxidants can be added to food to extend shelf life. This study investigated the effects of the addition of onion peel powder (OPP) to sausage made from MSFM. Sausages were divided into four treatments with different amounts of added OPP: 0 % (control), 1 %, 2 % and 3 %. Cooked sausages were stored for 28 days at 5 °C. Samples were analysed for thiobarbituric acid reactive, antioxidant activity, total polyphenol content, pH and organoleptic properties. The addition of OPP significantly increased antioxidant activity and total polyphenol content and decreased pH indicating acidic nature of OPP. Polyphenols from OPP effectively suppressed lipid oxidation. 1-2 % addition of OPP enhanced sensory properties. After 28-day storage, control samples received the lowest sensory score due to the presence of strong fishy odour which was not presented in samples with OPP. HPLC-MS/MS analysis revealed that quercetin is the most dominant compound in OPP. Overall, results indicate that the addition of OPP in amounts 1-2% can extend shelf life without deterioration of sensory properties.

## **KEYWORDS**

Mechanically separated fish meat, fish sausage, onion peel, lipid oxidation, shelf life

## **1. INTRODUCTION**

Fish meat is nutritionally valuable part of the human diet and consumption two times a week is recommended, mostly due to the content of long chain polyunsaturated n-3 fatty acids with positive impact on human health (Tilami and Sampels, 2018).

In 2016, about 88% (of total 171 million tonnes) of fish production were utilized for direct human consumption, primarily in live, fresh or chilled form, however, the fish industry often extracts only fillets. The remaining 12% were used for non-food purposes, such as fish meal or fish oil (FAO, 2018).

Fish processing is tightly related to the production of wide range of wastes or by-products. The edible proportion of fish represents approximately 45% of the total fish



weight; therefore, 55% of the fish can be considered as a fish waste from processing, including head, guts, bones, skin, fins, frame and meat adhered to bones and skin (Arvanitoyannis and Tserkezou, 2014). On the other hand, mechanically separated fish meat (the meat originally adhered to head, bones and skin) from commercial fish processing and fishes not acceptable, such as fillets and whole fishes with non-commercial size, are considered as a fish waste, which can be consumed by human and, therefore, could be used for the manufacturing of ready-to-eat products (Palmeira et al., 2016).

According to Vanhonacker et al. (2013), some people may have an aversion to fish consumption. The reason of this is perceived difficulty in buying, preparing and cooking, the belief that it is expensive, or the unpleasant properties of some varieties of fish such as presence of bones and the smell (Leek et al., 2000). Such a ready-to-eat product is for example fish sausage, since it could overcome above mentioned barriers for consumers, and thus, might be easily acceptable.

Unfortunately, fish meat, compared to poultry, pork or beef, is known for its very short shelf life, due to faster chemical and biological changes (such as oxidation of lipids, autolytic changes and metabolic activities of microorganisms) starting at the onset of the fish death (Linhartová et al., 2019). Far worse situation is in case of the utilization and disposal of product specific waste due to its inadequate biological stability, potentially pathogenic nature, high water content, potential for rapid auto-oxidation and high level of enzymatic activity (Jayathilakan et al., 2012).

The incorporation of antioxidants is considered as an effective method to inhibit or delay the lipid oxidation that may result in negative sensory and nutritional changes of meat product, thereby extending the shelf life of products. Despite synthetic antioxidants have been used in recent years, the demand for natural antioxidants has been increased mainly because of adverse effects of synthetic antioxidants on human health. Thus, it is still increasing trend to investigate effects of natural antioxidants from plant sources as meat products additives (Shah et al., 2014; Das et al., 2020).

These plant sources could be for example vegetable processing by-products, such as onion peel. Onion (*Allium cepa* L.) is the second most cultivated vegetable in the world

and thousands of tons of waste, generated during its processing, are produced annually only in the European Union (Choi et al., 2015). It was reported that onion peel contains high amounts of dietary fibre, and also polyphenolic antioxidants, mainly quercetin and its derivatives which belong to a group of flavonoids (Jaime et al., 2002; Benítez et al. 2011). Onion flavonoids are widely recognized for their health benefits, which include antioxidant, anti-inflammatory, antimicrobial and anticancer bioactivities and their protective effects against different degenerative pathologies based on oxidative stress, such as cardiovascular and neurological diseases (Ren et al., 2020). Onion peel or onion peel extracts (either water or ethanol) have attracted increasingly more attention during last years as a functional food ingredient, which was incorporated for example into wheat bread (Piechowiak et al., 2020), gluten-free bread (Bedrníček et al., 2020) and meat patties (Chung et al., 2018; Bedrníček et al., 2019; Kurt et al., 2019) to promote health benefits or product shelf life.

Therefore, the aim of this study was to investigate the effects of incorporation of onion peel powder (OPP) into a sausage prepared from separated fish meat on selected chemical, technological and sensory properties.

## **2. MATERIAL AND METHODS**

### **2.1 Raw material**

Dry and soil-free middle layers of onion peels of yellow variety Hybelle were donated by Czech grower of onion (VITAL Czech s.r.o., Všestary, Czech Republic). Onion peels (water content approximately 12 %) were ground into a fine onion peel powder (OPP) with particles equal or smaller than 250 µm and stored at room temperature in dark until further use. OPP was then subjected to analysis of basic chemical composition, antioxidant activity, polyphenols and water holding capacity determination.

Mechanically separated fish meat of common carp (*Cyprinus caprio* L.) was bought frozen at -18 °C (several days old) from a local fish meat producer (FISH MARKET a.s.). The separated meat was prepared from fish skeleton (including spine and ribs without head) with adhered meat that remained after filleting. Eggs and pork belly were bought fresh at local markets 1 day prior to the experiment and stored overnight at 5 °C. Several hours before sausage preparation, pork fatback was put into a freezer (-18 °C) to be frozen and easily chopped in a bowl cutter. Spices used for sausage

production were purchased from GOLDEN WAY spol. s r. o. Natural pork casing (diameter 34 – 36 mm) was purchased from Herold řeznické potřeby s.r.o.

## 2.2 Preparation of fish sausages

Four treatments were performed to determine the effect of addition of OPP on physicochemical and sensory properties of fish-pork sausages. Control group of sausages was prepared according to this recipe (all percentages are w/w): mechanically separated fish meat 49.2%, pork belly 32.8%, garlic 0.4%, salt 1.6%, black pepper 0.2%, caraway seeds 0.1%, marjoram 0.03%, chilli pepper 0.2%, paprika 0.5%, egg 2.7%, ice 12.3%. In experimental groups, all ingredients were replaced by 1, 2 and 3 % (w/w) of OPP. Fish and pork meat was chopped into small pieces and weighed separately according to the recipe. Ingredients were then mixed in a bowl cutter in the following order: firstly, pork belly and fish mechanically separated meat were slowly minced with ice. Secondly, salt with spices was added and finally OPP was added at the end of mixing. Total time of mixing of ingredients was approximately five minutes and the temperature during this process did not exceed 8 °C. Sausage batter was then stuffed into a natural pork casing. After this, raw sausages were left approximately for one hour in the room to let proteins dissolve. Raw sausages were cooked in a water bath for 1.5 hour at 80 °C (to reach internal temperature of 72 °C for 10 minutes) and then smoked for one hour at 70 °C in a smoking chamber. All batches, after cooling down to 5 °C, were then vacuum-packed and stored at 5 °C for 28 days. Cooking loss was determined during processing. Antioxidant activity, total polyphenol content (TPC), and basic composition chemical composition was measured 0<sup>th</sup> day of storage. pH, thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), CIE L\*a\*b\* colour measurement, microbiological and sensory analysis was assessed 0<sup>th</sup>, 7<sup>th</sup>, 14<sup>th</sup> and 28<sup>th</sup> day of storage.

## 2.3 Cooking loss

Sausages were weighted before and after cooking after cooling down. The cooking loss was calculated according to this formula:

$$\text{Cooking loss (\%)} = \frac{\text{Weight before cooking} - \text{Weight after cooking}}{\text{Weight before cooking}} \times 100$$

Cooking loss was calculated for each treatment in triplicate.

## 2.4 Water holding capacity (WHC) of OPP

Water holding capacity of OPP was determined according to method described by Benítez et al. (2017) with slight modification. Briefly, 1 g of OPP was shaken in a laboratory shaker (180 rpm) in 10 ml of distilled water at room temperature for 24 hours in 15 ml centrifuge tube. The mixture was then centrifuged (2500 g for 30 minutes). The supernatant was transferred to graduated 10 ml cylinder, where the volume was measured. Result was expressed as ml of H<sub>2</sub>O held by 1 g of OPP. The analysis was conducted in triplicate.

## 2.5 Microbiological analysis

Prepared fish sausages (before heat treatment, and after heat treatment in storage days: 0, 7, 14, and 28) were aseptically sampled (10 g/sample), mixed with 0.1% peptone (90mL) in a sterile plastic bag and homogenized for 1 min using an electric stomacher. Serial 10-fold dilutions were prepared from each sample using 1 mL in 0.1% peptone (9mL). The total viable counts (TVCs) was determined using the pour plate method according to ISO 4833 (2003) and plates were incubated at 30 °C for 72 h. Horizontal method was used for enumeration of psychrotrophic bacteria (ISO 6730, 2005), and colonies were counted in a solid medium after incubation at 6.5 °C for 10 days. Results were expressed as logarithm of colony forming units per gram of sample (log CFU.g<sup>-1</sup>).

## 2.6 Chemical analyses

### 2.6.1 Chemicals

All chemicals, namely Quercetin dihydrate (purity ≥ 95%), quercetin-3,4'-O-diglucoside (purity ≥ 85%), quercetin-4'-O-glucoside (purity ≥ 95%), gallic acid (purity ≥ 99%), sodium acetate (purity ≥ 99%), acetic acid (purity ≥ 99%), sodium acetate (purity ≥ 99%), sodium carbonate, ferric chloride, hydrochloric acid (HCl; 37%), 2,4,4-tris(2-pyridyl)-1,3,5-triazine (TPTZ, purity ≥ 98%), 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), Trolox (purity ≥ 97%), Trolox (purity ≥ 97%), Folin-Ciocalteu's phenol reagent, thiobarbituric acid (purity ≥ 98%), butylated hydroxytoluene (BHT; purity ≥ 99%), 1,1,3,3-tetraethoxypropane (TEP); trichloroacetic acid (TCA; purity ≥ 99%), *ortho*-phosphoric acid (PA; purity ≥ 99%), Formic acid (LC/MS grade purity 98-100%), acetonitrile and methanol LC/MS grade

and ethanol for spectroscopy were purchased from Sigma-Aldrich (Prague, Czech Republic).

### 2.6.2 Basic chemical composition of onion peel

Water content, ash, crude protein (CP), ether extract (EE), and non-soluble fibre fractions were analysed in OPP. Moisture was determined by drying the sample at 105 °C in an oven to a constant weight, ash content by combustion at 550 °C for 16 hours in a muffle furnace to obtain light grey ash (AOAC, 1991). Crude protein was determined by Kjeldal method using Kjeltex system. The amount of nitrogen was multiplied by factor of 6.25. Lipid content was determined using an ANKOM XT10 extractor (Ankom Technology, USA) with petroleum ether as a solvent. Neutral detergent fibre (NDF), acid detergent fibre (ADF) and acid detergent lignin (ADL) were analysed according to modified method of Van Soest et al. (1991) using ANKOM A200 Fiber Analyzer (Ankom Technology, USA). Afterwards, cellulose, hemicellulose and nitrogen-free extract content was calculated as follows:

$$\text{Hemicellulose} = \text{NDF} - \text{ADF}$$

$$\text{Cellulose} = \text{ADF} - \text{ADL}$$

$$\text{Nitrogen-free extract} = 100 - (\% \text{ of water, ash, crude protein, NDF and ether extract})$$

All analyses of onion peels were assessed in triplicate.

### 2.6.3 Basic chemical composition of fortified fish sausages

Basic chemical composition of sausages (Table 1), namely water, fat, protein, collagen and salt content, of sausages was measured using Fourier transformation near infra-red spectroscopy (FT-NIR) instrumentation (FT-NIR Master™ N500; BÜCHI, Switzerland) according to manufacturer's instructions. Approximately 50 g of sample from each group was homogenised, put into a petri dish and analysed using the NIR Master™, that scanned samples over an NIR range of 4000 – 10000 cm<sup>-1</sup> with a resolution of 4 cm<sup>-1</sup>. Three independent samples per each group were analysed.

Table 1. Chemical composition of fish sausages

OPP (%)	Moisture	Fat	Protein	Collagen	Salt
Control	61.83±1.24	20.15±0.13	14.30±0.03	1.90±0.06	1.62±0.03
1	63.13±0.04	19.95±0.02	13.74±0.03	1.53±0.04	1.51±0.01
2	60.43±0.03	22.63±0.01	13.18±0.04	1.31±0.04	1.55±0.01
3	58.99±0.19	21.62±0.16	15.36±0.01	1.33±0.05	1.56±0.07

Results are expressed as mean ± standard deviation (*n* = 3)

#### **2.6.4 pH measurement**

pH of cooked sausages was measured using pH meter equipped with a spear-type electrode (Spear-type electrode HC 124, Fisher Scientific, Czech Republic). Approximately 25 g of homogenised sample was used to directly measure pH. Three independent samples from each group were measured.

#### **2.6.5 Antioxidant activity**

##### **Extraction of samples**

0.2 g of homogenised sample was extracted in 9.8 ml of 90% methanol (v/v), shaken in a laboratory shaker for 10 minutes and then centrifuged at 7000 RPM at 5 °C for 15 min. Collected supernatant was further used for DPPH and FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) analyses. Two independent samples from each treatment were taken and each sample was extracted twice and analysed in (for DPPH and FRAP) in duplicate ( $n = 8/\text{group}$ ).

##### **DPPH**

A method for measuring antioxidant activity using DPPH as a reaction agent was conducted according to Brand-Williams, Cuvelier & Berset (1995) with modifications. Briefly, 100  $\mu\text{l}$  of extract was added to 4 ml of DPPH solution in methanol (27.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). The reaction mixture was kept in the dark at room temperature for 2 hours. Then the absorbance at 515 nm was measured against a blank. Results are expressed as Trolox equivalents (TE)/g FW (fresh weight).

##### **FRAP**

A slightly modified FRAP method of Dudonné, Vitrac, Coutière, Woillez & Mérillon (2009) was used. The FRAP reagent was prepared by the mixing of 100 ml of 300 mM acetate buffer (pH 3.6) with 10 ml of 10 mM TPTZ in 40 mM HCl and 10 ml of 10 mM ferric chloride. To 4 ml of FRAP reagent, 0.1 ml of sample extract was added. The mixture was kept at 37°C for 30 min. After this, the absorbance was measured at 593 nm with a spectrophotometer against the acetate buffer. Results are expressed as TE/g FW.

### **2.6.6 Total polyphenol content**

5 g of lyophilised sample was extracted in 100 ml of 80% ethanol (v/v) under reflux at 90 °C for 120 min. The TPC was determined by the method described by Lachman, Hosnedl & Pivec (1998) with modifications. Briefly, the obtained extract was filtrated and aliquot (1 ml) was transferred into a 50 ml volumetric flask. Then 10 ml of deionized water, 2.5 ml of Folin-Ciocalteu reagent and 7.5 ml of 20% sodium carbonate were added and properly mixed. Afterwards, the flask was filled with deionized water up to the mark. The mixture was incubated at room temperature for 120 min, followed by the measurement of absorbance at 765 nm. Two independent samples from each treatment were taken and each sample was analysed in duplicate ( $n = 4$ ). Results are expressed as gallic acid equivalents (GAE)/g FW.

### **2.6.7 HPLC-MS/MS quantification of main OPP flavonols**

Extraction and HPLC-MS/MS quantification of main flavonol compounds (quercetin, quercetin-4'-O-glucoside and quercetin-3,4'-O-diglucoside) presented in OPP was assessed according to the method described by Bedrníček et al. (2020). Briefly, 0.25 g of OPP was mixed in 5 ml of methanol and extracted in an ultrasonic bath for 15 min and occasionally shaken. The extract was centrifuged at 4000 rpm for 15 min and kept at -18 °C until analysis.

5 µl of the supernatant was injected into the HPLC-MS/MS system. The analysis was carried out on the HPLC Dionex UltiMate 3000 system coupled with Agilent 6420 triple-quad mass spectrometer (MS) equipped with electrospray ionisation source. Phenomenex Kinetex C18 column with diameters of 150 x 2.1 mm, (particle size of 2.6 µm), maintained at 35 °C, was used for the separation. Mobile phases consisted of mobile phase A (5% acetonitrile and 0.5% formic acid) and B (100 acetonitrile). During the separation, mobile phase B linearly increased from 15% to 70% within 20 min, then decreased back to 15%. The following step was column equilibration for 5 minutes prior to the next injection. Separated analytes were then introduced into the MS operating in negative mode with following settings: 11 L/min of drying gas (N<sub>2</sub>), nebulizer pressure of 35 psi, gas temperature 300 °C, capillary voltage -4kV and cell acceleration voltage of 7 V. Optimised fragmentor voltages, collision energy voltages and transitions were optimised for each compound (Table S1). Calibration curve was prepared with 6 concentration levels in the range between 0.1 µl/ml to 25 µl/ml. The

OPP was extracted twice and each extraction was analysed twice ( $n = 4$ ). Results are expressed as  $\mu\text{g/g}$  of FW.

### **2.6.8 TBARS analysis**

Products of secondary lipid peroxidation (TBARS) were measured according to method of Miller (1998). 1g of homogenised sample (three independent samples from each group) was mixed with 0.2 ml of BHT (0.2 mg/ml in methanol) and 9.1 ml of mixture of TCA/PA (10% TCA in 0.2M PA) using homogeniser T18 basic Ultra-Turrax (IKA, Germany) and then filtrated. To 1.5 ml of filtrate, 1.5 ml of 0.02M TBA was added. This mixture was then vortexed and heated at 85 °C for 35 min. After heating, the mixture was pipetted on a 96-well plate and absorbance was measured at 550 nm on a spectrophotometer (Plate Reader AF 2200; Eppendorf AG, Germany). Standard calibration curve was prepared using TEP and results were expressed as micrograms of malondialdehyde (MDA) per gram of a sample. For this analysis, three independent samples from each group were measured.

### **2.7 Colour measurement**

CIE  $L^*a^*b^*$  colour measurement was measured using a ColorEye XTH Spectrophotometer (Gretag Macbeth, USA). Slices were chosen as a representative part of sausages. Results are expressed in the  $L^*a^*b^*$  scale. Results are presented as mean of three independent samples.

### **2.8 Sensory analysis**

The analysis was assessed by 9 trained panellists (5 men, 4 women, aged 25 – 70 years) from the Faculty of Agriculture, University of South Bohemia in České Budějovice, who were familiar with sensory evaluation of meat products. Sausages were heated in a water bath at 70 °C for 10 min prior to sensory analysis and were served warm. Each panellist received approximately 15 g of each sample (randomly marked with a three-digit number) on a plate at the same time. Appearance, odour, taste, texture and overall acceptability was evaluated on a 100 mm unstructured abscissas (100 = like extremely; 0 = dislike extremely). Intensity of fishy odour was also assessed 28<sup>th</sup> day of storage (100 = very intensive fishy odour; 0 = no fishy odour). Sensory analysis was conducted in a room (temperature approx. 22 °C) equipped with tables for each panellist and



daylight-type bulbs for balanced light. Water and bread were served as a taste neutraliser which were consumed between judging of samples.

## 2.9 Statistical analysis

Data were analysed by the program Statistica CZ 12 (Statsoft CR) using a following model with fixed effect of percentage of OPP, storage and interaction OPP × storage:

$$Y_{ijk} = \mu + OPP_i + S_j + (OPP \times S)_k + \varepsilon_{ijk},$$

where:  $Y_{ijk}$  = dependent variables: pH, TBARS, CIE L\*a\*b\*, sensory characteristics, cooking loss;  $\mu$  = mean;  $OPP_i$  = percentage of onion peel powder ( $i = 4; 0, 1, 2$  and 3% of OPP);  $S_j$  = storage ( $j = 4; 0, 7, 14$  and 28 days),  $\varepsilon_{ij}$  = residual error. Fisher's LSD test was used for group comparisons (*post hoc* test). Pearson's correlation coefficient was used to estimate the association between percentage of OPP addition and antioxidant activity, TPC and also between CIE L\*a\*b\* colour measurement and sensory analysis results.

## 3. RESULTS AND DISCUSSION

### 3.1 Chemical composition of onion peel powder

Basic chemical composition, total polyphenol content, flavonols, antioxidant activity and WHC of OPP is summarized in Table 2. Water accounts for 12.31±0.04% of OPP mass. Thus the remaining part (87.69%) is dry matter, which is mainly represented by structural carbohydrates (fibre), where cellulose is dominant (27.77%), followed by hemicelluloses (2.97%) and lignin (1.26±0.24%). Our finding is consistent with Choi et al. (2015) who also found that cellulose is one of the main structural carbohydrates present in onion peel. However, it is well known that onion peel contains high amounts (up to 28%) of pectin (Jaime et al., 2002; Babbar et al., 2016), predominantly composed of galacturonic acid, galactose, rhamnose and arabinose, which are considered as a part of soluble fraction of fibre (Dhingra et al., 2012). Pectin should be then included in the remaining part of dry matter (nitrogen-free extract) after excluding crude protein, ether extract and ash. Composition of dietary fibre gives the material specific properties that could be beneficial for consumers due to the health reasons, but also for manufacturers of meat products, because, depending on the composition, fibre has the ability to bind water, fat and to create gels in meat products (Das et al., 2020).

Crude protein, ether extract and ash content in OPP is  $2.41\pm 0.61\%$ ,  $0.85\pm 0.03\%$  and  $8.06\pm 0.01\%$  of FW, respectively. Benítez et al. (2011) reported similar values of crude protein and ash. On the other hand, Negesse et al. (2009) measured much lower values not only for crude protein and ash but even for NDF, ADF, lignin and ether extract.

Table 2. Basic chemical composition of onion peel powder

Compound (unit)	Concentration
Proximate chemical composition (%)	
Water	12.31±0.04
Crude protein	2.41±0.61
Ether extract	0.85±0.03
Ash	8.06±0.01
Fibre	
NDF	32.00±0.11
ADF	29.03±0.03
ADL (Lignin)	1.26±0.24
Cellulose (= ADF – ADL)	27.77
Hemicellulose (= NDF – ADF)	2.97
Nitrogen-free extract	44.37
Polyphenols (mg/g FW)	
Quercetin	4.11±0.15
Quercetin-4'-O-glucoside	3.40±0.08
Quercetin-3,4'-O-diglucoside	0.63±0.03
Total polyphenol content*	78.60±1.46
Antioxidant activity (mg TE/g)	
DPPH	84.97±2.61
FRAP	91.47±2.81
Water holding capacity (ml/g)	4.20±0.10
pH of 1 % solution**	4.65±0.06

Results are expressed as mean ± standard deviation based on fresh weight; TE: trolox equivalent; NDF: neutral detergent fibre; ADF: acid detergent fibre; ADL: acid detergent lignin; DPPH: 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazil; FRAP: ferric reducing antioxidant power; FW: fresh weight; \*Expressed as mg Galic acid equivalent/g  
 \*\*pH of 1% solution of dissolved onion peel powder in deionised water

Main flavonols in OPP were also determined by LC-MS/MS together with spectrophotometric determination of TPC. Content of quercetin, quercetin-4'-O-glucoside, quercetin-3,4'-O-diglucoside is  $4.11\pm 0.15$ ,  $3.40\pm 0.08$  and  $0.63\pm 0.03$  mg/g, respectively. Quercetin is the most abundant flavonol in OPP which corresponds to finding of Prokopov et al. (2018) who reported similar concentration of quercetin which was 3.36 mg/g FW. With regard to quercetin-4'-O-glucoside, we found similar

concentration as Suh et al. (1999), who also determined this compound in onion peel as the second most dominant with concentration of 1.9 mg/g FW. Only small concentration of quercetin-3,4'-O-diglucoside was found in OPP. It is foreseeable result, because according to Takama and Hirota (2000) quercetin is mainly presented in onion peel as aglycone due to the presence of glucosidases, that release quercetin from the glycosidic bond. Other authors, however, found concentration of total flavonols, represented mainly by quercetin and only to a smaller extent quercetin-4'-O-glucoside, in onion peel in the range between 2.6 to 6.5% by weight (Slimestad et al., 2007).

Concentration of total polyphenols in OPP is  $78.60 \pm 1.46$  mg GAE/g FW. This value is comparable, but slightly higher, with Chung et al. (2018), who reported concentration of total polyphenols  $69.23 \pm 0.44$  mg GAE/g DM.

Presence of flavonols in onion peel is tightly related to high antioxidant activity using DPPH ( $84.97 \pm 2.61$  mg TE/g FW) and FRAP method ( $91.47 \pm 2.81$  mg TE/g FW). According to Ly et al. (2005), quercetin is the most responsible compound for high antioxidant activity of onion peel.

WHC of dietary fibre is an important technological feature that is important for incorporation of fibre into a meat product recipe. WHC of OPP was found to be  $4.20 \pm 0.10$  ml/g (Table 2). This value seems to be very low compared to onion fibre concentrates, that were analysed by Benítez et al. (2017). They could absorb much more water (7.9 – 10.0 ml/g) than OPP. Also Metha et al. (2015) summarizes WHC of wide range of plant fibres which is in the range of 2.8 ml/g for wheat bran to 35.4 ml/g for sugar beet fibre. In addition, WHC of a fibre is related to its chemical structure, pH, ionic strength and particle size. In regard to pH, 1 % solution of OPP in deionised water has value  $4.65 \pm 0.06$ , indicating its acidic nature, since pectin is an acidic heteropolysaccharide with galacturonic acid (with partly nonmethylated carboxyl groups), as a main structural component (Slavov et al., 2009).

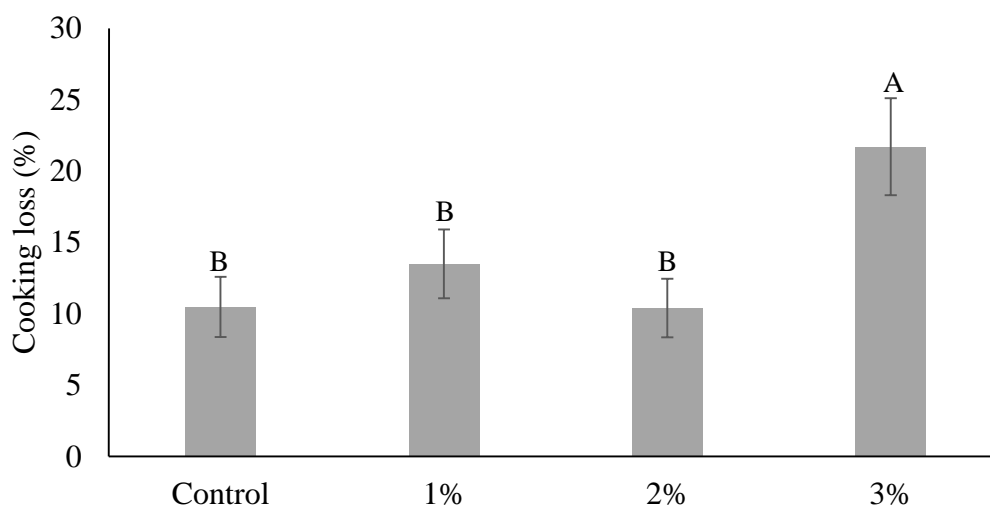
Nevertheless, it is very hard to compare the content of various compounds in onion peel with other authors, since different authors use different layers of onion peel that are closer to or further from the surface of onion, and could differ, for example, in

moisture content. According to Benítez et al. (2011) and Cheng et al. (2013) chemical composition and compound proportions change from inner to outer layers of onion. Another reason could be that the composition is affected by many factors, such as type of cultivar, stage of maturation, environmental and agronomic conditions and storage time (Choi et al., 2015).

### 3.2 Cooking loss

In general, weight loss of meat products during heat treatment could be lowered by addition of plant fibre. According to Ktari et al. (2014), cooking method, type of additives and type and amount of fat affects cooking loss. The influence of addition of different amounts of OPP on cooking loss of fish sausages is given in Figure 1. Cooking loss ranged from 10.5 to 21.7%. The lowest value was found paradoxically in samples with no addition of OPP and highest in group with 3% of OPP. Thus, 3% addition of OPP negatively affected this parameter ( $p < 0.05$ ). Control samples did not differ ( $p < 0.05$ ) from samples with 1 and 2% of OPP.

Figure 1. Cooking loss of fish sausages with different percentage of onion peel powder (OPP).



<sup>A-B</sup> Bars, representing means ( $n = 3$ ), with different letters differ significantly ( $p < 0.05$ )

This is very interesting and results indicate that 2% addition of OPP seems to be a threshold and after further addition of OPP, cooking loss increases. There are several explanations that could clarify this phenomenon. It could be explained by the degradation of polysaccharides (especially pectin) in OPP during thermal treatment of

fish sausages, which can lead to lowered water holding capacity of fibre. Other reason could be the fibre presented in OPP can absorb water much faster than solubilized proteins of meat, but it is not stable at elevated temperatures and it releases the water during cooking and hence increasing cooking loss. It indicates that the bond between water and fibre is not as strong as between meat protein matrix and water. According to Feiner (2006), WHC is also influenced by pH, because drop of pH lowers the amount of water held by meat. Thus, very low pH of group with 3% of OPP (Table 3) could negatively affect the ability to hold water during cooking.

Unlike of many experiments that resulted in enhanced WHC and/or cooking loss of meat products enriched with plant dietary fibre (e.g. Ham et al., 2017; Choi et al., 2015), there have been published several papers that reported the addition of certain types of plant dietary fibre can negatively influence cooking loss (Pettersson et al., 2014; Purohit et al., 2016; Henning et al. 2016; Kim et al., 2019). Similar results were obtained by Chung et al. (2018), who incorporated 0.3 and 0.6% of onion skin powder into Hanwoo Tteok-galbi (traditional Korean beef patties). Cooking loss was the same or slightly higher compared to control samples. Contrary results, on the other hand, were published by Kurt et al. (2019), who added 0, 1.5, 3 and 6% of onion skin powder into cooked chicken meat patties. Cooking loss decreased as concentration of onion skin powder increased. However, the later mentioned author used different recipe of meat product and also they used different particle size of onion skin powder (500  $\mu\text{m}$  vs.  $\leq 250 \mu\text{m}$  in our study), which could affect results, because, according to Jongaroontaprangsee et al. (2007), particle size of plant dietary fibre powder could alter water absorption.

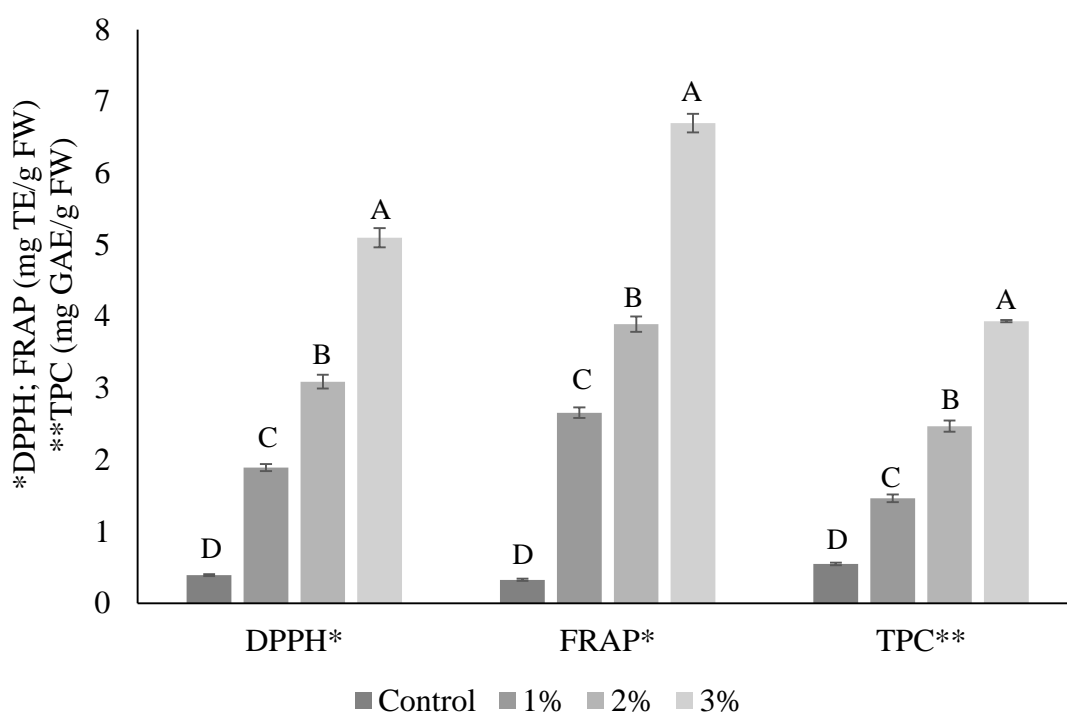
### **3.3 Antioxidant activity and TPC of fish sausages**

Various antioxidants from natural sources were used to increase antioxidant activity of meat or meat products, e.g. rosemary extract (Linhartová et al., 2019) or red grape pomace (Sáyago-Ayerdi et al., 2009) in order to improve shelf life, organoleptic properties or health benefits.

The addition of OPP into fish sausages had significantly positive effect ( $p < 0.05$ ) on antioxidant activity (DPPH and FRAP) and TPC compared to control (Figure 2). As the content of OPP increased, antioxidant activity and TPC raised. Thus, the lowest

values were observed in control samples and highest in samples with 3% of OPP. This is supported by a very strong and statistically significant correlation ( $p < 0.05$ ), which was found between percentage of OPP in fish sausages and DPPH ( $r = 0.993$ ), FRAP ( $r = 0.991$ ), and TPC ( $r = 0.993$ ) values. It points out that OPP addition contributed significantly on the improvement of antioxidant activity and higher TPC. The same trend was already observed in our previous work (Bedrníček et al., 2019) focused on onion skin water extracts addition into pork patties.

Figure 2. Antioxidant activity (DPPH, FRAP) and total polyphenol content (TPC) of fish sausages with different percentage of onion peel powder (OPP).



Bars represent means ( $n = 8$  for DPPH and FRAP;  $n = 4$  for TPC)  $\pm$  standard deviation; <sup>A-D</sup>Bars within the same analysis with different letters differ significantly ( $p < 0.05$ )

Results show that OPP is a very rich source of antioxidants and even at very low concentration (1%) it can significantly increase antioxidant activity of certain meat products, especially due to the presence of considerable amounts of quercetin and its derivatives (e.g. glucosides).

### **3.4 Changes in physicochemical, microbiological and sensory properties of fish sausages during storage**

#### **3.4.1 Physicochemical properties**

Maintaining stability and superior quality of a meat product during storage period is of utmost importance (Metha et al., 2015). According to Leistner and Gorris (1995), pH is one of the most important factors influencing food preservation and safety. Generally, a reduced pH value suppresses growth of bacteria, while strong growth is seen in a pH range between 6.2 and 6.4 in different types of meat such as beef, chicken and pork, however, optimal pH for bacteria growth is seen in a range of 6.1 to 6.7 for fish meat (Feiner, 2006). It can be seen that OPP addition significantly ( $p < 0.05$ ) lowered pH of fortified fish sausages in a dose dependent manner compared to control samples (Table 3). This reduction of pH in samples with OPP could be caused by the acidic nature of OPP, as shown in Table 2 (pH of 1% solution of OPP is  $4.65 \pm 0.06$ ). As mentioned earlier, onion peels contain high amounts of pectin, primarily composed of galacturonic acid, giving it acidic nature. The same results were reported by Kurt et al. (2019), who incorporated 1.5-6% of onion skin powder into patties. The higher the concentration of onion skin powder, the lower pH was observed. On contrary, Chung et al (2018) obtained different results. With increasing content of onion skin powder pH of Hanwoo Tteok-galbi grew up.

Storage time also significantly ( $p < 0.05$ ) affected pH of sausages. pH of all the sausages continuously decreased during storage with highest value for control samples ( $5.91 \pm 0.00$ ) and lowest for samples with 3% of OPP ( $5.56 \pm 0.03$ ). This decrease of pH for all the samples might be due to spoilage lactic acid bacteria (O'Neill et al., 2018), that have suitable environment for growth in vacuum packed meat products. Although, significant ( $p < 0.05$ ) interaction between percentage of OPP incorporation and storage time was found, suggesting that OPP also contributed to this decrease over time.

Concentration of secondary lipid oxidation products (TBARS) were also determined (Table 3). The addition of OPP significantly ( $p < 0.05$ ) lowered concentration of MDA. Even 0<sup>th</sup> day of storage (after cooking), control samples showed signs of oxidation ( $0.44 \pm 0.06$   $\mu\text{g MDA/g}$ ), compared to sausages with OPP, where the oxidation was suppressed ( $0.26 \pm 0.10$  -  $0.32 \pm 0.04$   $\mu\text{g MDA/g}$ ). This oxidation is probably a result of the exposure of fats that are prone to oxidation at high temperatures during cooking.

Similarly, this phenomenon was described by Kurt et al. (2019) and by our previous work (Bedrníček et al. 2019).

Storage time also significantly ( $p < 0.05$ ) affected TBARS values. During the 28-day storage period, concentration of MDA in control samples grew up to values above 0.71  $\mu\text{g MDA/g}$ , while in samples with OPP remained stably low and did not show any increasing trend. Our results are consistent with Kurt et al. (2019), Chung et al. (2018) and with Bedrníček et al. (2019). In addition, strong significantly ( $p < 0.05$ ) negative correlation ( $r = -0.703$ ) was found between % of OPP and MDA concentration in all days of storage. All these facts indicate that the OPP is a promising additive for meat products that is effective in suppression of fat oxidation in meat products, owing its strong antioxidant properties to high amounts of quercetin.



Table 3. Changes in pH, TBARS (thiobarbituric acid reactive substances) and colour measurement values (L, a, b) of fish sausages with different percentage of onion peel powder (OPP) during storage

OPP (%)	Storage (days)				<i>P</i>		
	0	7	14	28	OPP	Storage	OPP × storage
<i>pH</i>							
Control	6.29±0.02	6.31±0.01	6.14±0.04	5.91±0.00			
1	6.14±0.02	6.15±0.01	5.95±0.01	5.65±0.02	<0.001	<0.001	<0.001
2	5.94±0.01	5.98±0.02	5.80±0.05	5.58±0.02			
3	5.88±0.00	5.90±0.01	5.84±0.04	5.56±0.03			
<i>TBARS (µg MDA/g FW)</i>							
Control	0.44±0.06	0.75±0.05	0.73±0.33	0.71±0.05			
1	0.26±0.10	0.30±0.01	0.14±0.11	0.30±0.08	<0.001	0.0464	0.0092
2	0.32±0.04	0.38±0.10	0.31±0.10	0.21±0.05			
3	0.28±0.02	0.28±0.07	0.21±0.03	0.21±0.00			
<i>L value</i>							
Control	55.34±0.44	56.84±1.04	56.39±0.77	55.82±0.57			
1	48.76±0.69	51.71±0.22	50.36±1.11	49.90±0.17	<0.001	0.0002	0.1736
2	48.38±0.95	48.60±1.22	48.34±0.33	48.33±0.39			
3	44.18±0.59	46.08±1.90	46.35±0.16	46.15±0.12			
<i>a value</i>							
Control	16.91±0.47	18.09±0.47	18.80±0.42	19.90±0.78			
1	16.78±0.25	15.70±0.25	15.45±0.43	14.60±0.50	<0.001	0.3339	<0.001
2	15.72±1.30	15.49±1.30	16.11±0.75	16.21±1.69			
3	16.58±0.42	14.93±0.42	14.50±0.31	13.19±0.20			
<i>b value</i>							
Control	31.96±0.62	32.62±0.68	32.90±2.03	33.46±3.33			
1	21.83±0.41	26.61±0.65	26.59±0.61	25.08±0.58	<0.001	0.6626	0.4891
2	25.04±1.84	24.39±1.68	24.73±1.07	24.43±2.41			
3	22.96±0.41	21.01±0.90	22.49±2.10	21.75±3.30			

Results are expressed as a mean (n = 3) ± standard deviation  
FW: fresh weight

Variation in colour other than expected norm may be due to the physical characteristics of meat, concentration and chemical state of pigments therein and presence of non-meat ingredients (Das et al. 2020). Colour analysis, using the CIE L\*a\*b system, is summarized in Table 3. OPP addition had significant effect ( $p < 0.05$ ) on lightness of fish sausages ( $L^*$  value). Lightness of fish sausages proportionally decreased with increasing percentage of OPP, except for the 0<sup>th</sup> day. The difference between samples with 1 and 2% of OPP was small, however, sample with 3% of OPP had very dark

colour. Lightness was affected also by storage time ( $p < 0.05$ ).  $L^*$  values of control samples and samples with 1 and 2% of OPP changed with only small alterations, but samples with 3 % were increasingly lighter over time. Also  $a^*$  value (redness) was affected by OPP ( $p < 0.05$ ). Values at the 0<sup>th</sup> day slightly differed (between  $15.72 \pm 1.30$  and  $16.91 \pm 0.47$ ) but these differences among treatments were more obvious in later days of storage, where these values were lower with higher addition of OPP. Again, samples with 1 and 2% of OPP were very similar. It indicates, that OPP can cover the typical red colour of a meat product. The same trend was also observed in case of  $b^*$  value (yellowness), which was also affected by the addition of OPP ( $p < 0.05$ ). This value was also much lower in samples with OPP. However, this is unexpected result to some extent, because our presumption was that the incorporation of OPP could increase  $b^*$  value, because peels of yellow onion varieties contain quercetin (as mentioned in chapter 3.1), which has yellow colour (Li et al., 2016). Neither redness nor yellowness was affected by storage time ( $p > 0.05$ ).

### **3.4.2 Microbiological analysis**

The initial microbial loads in separated fish meat were  $5.76 \pm 0.02$  log CFU.g<sup>-1</sup> for TVCs and  $5.52 \pm 0.02$  log CFU.g<sup>-1</sup> for psychrotrophic bacteria. These relatively high amounts could probably influence the microbial levels in fish sausages before heat treatment, which ranged from  $5.29 \pm 0.04$  log CFU.g<sup>-1</sup> (3% OPP sample) to  $6.03 \pm 0.04$  log CFU.g<sup>-1</sup> (1% OPP sample) for TVCs, and from  $5.66 \pm 0.04$  log CFU.g<sup>-1</sup> (control sample) to  $7.02 \pm 0.03$  log CFU.g<sup>-1</sup> (3% OPP sample) for psychrotrophic bacteria (Table S2). Except meat, microorganisms could also gain into sausage from other ingredients like spices, and further from environment, equipment, and handlers during processing (Sachindra et al., 2005). In our case, the addition of onion peel powder may also have played a role in the initial contamination. On the other hand, similar microbial levels were also found in the control sample. Heat treatment was effective for most of the fish sausage samples examined. Microbial levels on 7<sup>th</sup> day of storage ranged from  $4.77 \pm 0.07$  log CFU.g<sup>-1</sup> (control sample) to an uncountable amount (3% OPP sample) for TVCs, and from  $6.30 \pm 0.10$  log CFU.g<sup>-1</sup> (control sample) to an uncountable amount (3% OPP sample) for psychrotrophic bacteria. These results suggest the development of spore-forming microorganisms. According to Raju et al (2003), fish sausages are considered as an ideal environment for spores and spoilage microorganisms and heat treatment is not usually effective for all of them. In this

context, it should also be taken into account that onion skins are in close contact with the soil, which is known as a rich source of bacterial spores (Heyndrickx, 2011). On 14th day of storage, the lowest microbial counts were observed in the 2% OPP sample for both indicator groups, TVC ( $5.39 \pm 0.03$  log CFU.g<sup>-1</sup>) and psychrotrophic bacteria ( $5.71 \pm 0.02$  log CFU.g<sup>-1</sup>). On 28th day of storage, all examined samples were found as uncountable.

### **3.4.3 Sensory analysis**

Although the diet enhanced by antioxidants may have considerable health effects, sensory properties should not be neglected. Sensory characteristics, particularly taste and appearance, have a great impact on consumers' preference. Results of analysis of appearance, odour, taste, texture and overall acceptability are presented in Figure 3. Intensity of fishy odour at 28<sup>th</sup> day of storage is depicted in Figure S1. The incorporation of OPP significantly ( $p < 0.05$ ) influenced all evaluated sensory parameters.

It is evident that addition of more than 1% of OPP negatively influenced appearance of fish sausage. The addition of OPP caused darker colour, compared to control (Table 3), which is not usual for meat products. This is supported by a strong correlation coefficient ( $r = 0.762$ ,  $p < 0.05$ ), suggesting that the lighter the sausage is, the more pleasant appearance it has. Together with this, there was also found a significant correlation between appearance and redness ( $r = 0.662$ ;  $p < 0.05$ ). Even though there were slight changes in appearance over time, they were not statistically significant ( $p > 0.05$ ).

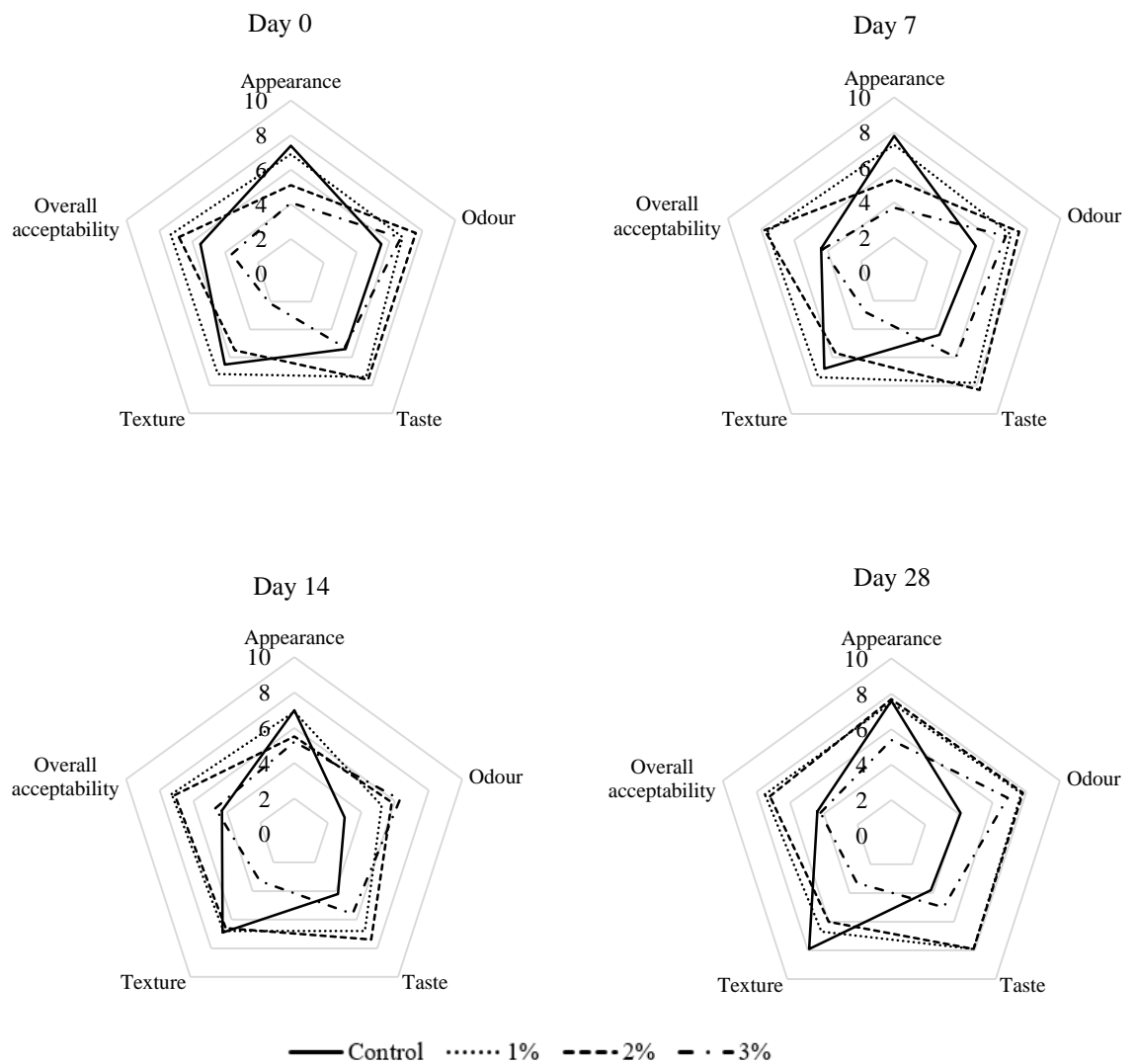
The worst score in case of odour evaluation received control samples in all days. The addition of OPP positively affected odour pleasantness. Also storage time significantly affected ( $p < 0.05$ ) odour. The pleasantness of odour of control samples continuously decreased over time. This could be related to the presence of fishy odour. It is attributed to compounds including alcohols, aldehydes, ketones, pyrazine, furan and trimethylamine (Pan et al., 2018). Also lipid oxidation is associated with the development of undesirable fishy odour in fish stored for an extended time (Sea-leaw and Benjakul, 2014). As shown in Figure S1, after 28 days of storage, the most intensive fishy odour was perceived in control group. This means that OPP could cover

or inhibit the development of fishy odour. This shows an advantage of utilization of OPP in fish sausages, since some consumers do not like fish products because of the fishy smell (Leek et al., 2002; Vanhonacker et al., 2013). Intensity of fishy odour strongly correlates ( $r = 0.999$ ;  $p < 0.001$ ) with concentration of MDA at 28<sup>th</sup> day of storage.

Taste is also very important sensory parameter. Assessors evaluated samples with 1 and 2% of OPP as tastiest samples over the whole storage period. Control samples and samples with 3% of OPP received similar values and did not statistically ( $p < 0.05$ ) differ from each other. Taste score of control samples decreased over time, however, these changes were not significant ( $p > 0.05$ ).

Sensory evaluation showed that the most pleasant texture had control samples and samples with 1% of OPP. Samples with 2 and 3% of OPP were evaluated very negatively. This study confirms with previous findings of Kurt et al. (2019). The texture of cooked sausages is usually soft, however, OPP contains considerable amounts of non-soluble fibre (Table 2), mainly represented by cellulose. According to Metha et al. (2015), cellulose is responsible for mechanical strength of food. Harder and less preferred texture is, unfortunately, a consequence of the incorporation of OPP. Storage time had no significant effect on texture ( $p > 0.05$ ).

Figure 3. Changes in sensory characteristics of fish sausages with onion peel powder during storage.



In general, among all the samples, the sensory panel preferred those with 1 or 2% of OPP. These samples received the highest score of overall acceptability. This is a satisfactory result, since some consumers do not like the typical fish smell (Vanhonacker et al., 2013), which could be still presented in control samples. On the other hand, 3% of OPP addition is also below the acceptability threshold. Results of sensory analysis demonstrate that only small amount (e.g. 1%) of OPP could enhance palatability of sausages prepared from mechanically separated fish meat.

#### 4. CONCLUSION

Based on results, it is evident that OPP could extend shelf life of sausage prepared from separated fish meat. Formation of MDA was suppressed by the addition of OPP and also overall acceptability was prolonged during storage. Unfortunately, OPP with particle size  $\leq 250 \mu\text{m}$  is not appropriate source of dietary fibre that could enhance technological properties (such as WHC and cooking loss) of fish sausage which is tightly related to the economical aspect of production. However, this problem could be solved e.g. with reformulation of meat product recipe. Overall, results of this study can be useful example of valorisation of fish processing by-product together with onion processing by-product that could show a possible way to prevent the loss of valuable nutrients and biologically active substances from the food chain.

#### REFERENCES

- Miller, D.D. (1998) Lipid peroxidation. In *Food chemistry: A Laboratory Manual*. Miller, D.D Ed.; Wiley-Interscience, John Wiley & Sons Ltd., New York, USA, 1998, pp 57–67.
- Brand-Williams, W.; Cuvelier, M. E.; Berset, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT – Food. Sci. Technol.* **1995**, 28, 25-30.
- Dudonné, S.; Vitrac, X.; Coutière, P.; Woillez, M.; Mérillon, J.-M. Comparative study of antioxidant properties and total phenolic content of 30 plant extracts of industrial interest using DPPH, ABTS, FRAP, SOD and ORAC Assays. *J. Agr. Food. Chem.* **2009**, 57, 1768-1774.
- Bedrníček, J.; Jirotková, D.; Kadlec, J.; Laknerová, I.; Vrchotová, N.; Tříška, J.; Samková, E.; Smetana, P. Thermal stability and bioavailability of bioactive compounds after baking of bread enriched with different onion by-products. *Food Chem.* **2020**, 319, 126562.
- Van Soest, P.J.; Robertson, J.B.; Lewis, B.A. Methods for dietary fibre, neutral detergent fibre and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J. Dairy Sci.* **1991**, 74, 3583 – 3597.
- Official Methods of Analysis of AOAC International. 1991, Method 923.03.
- Dhingra, D.; Michael, M.; Rajput, H.; Patil, R.T. Dietary fibre in foods: a review. *J. Food Sci. Tech.* **2012**, 49, 255-266.
- Jaime, L.; Mollá, E.; Fernández, A.; Martín-Cebrejas, M.A.; López-Andréu, F.J. Structural carbohydrate differences and potential source of dietary fiber of onion (*Allium cepa* L.) tissues. *J. Agr. Food Chem.* **2002**, 50, 122-128.
- Choi, I.S.; Cho, E.J.; Moon, J.-H.; Bae, H.-J. Onion skin waste as a valorization source for the by-products quercetin and biosugar. *Food Chem.* **2015**, 188, 537-542.
- Babbar, N.; Baldassarre, S.; Maesen, M.; Prandi, B.; Dejonghe, W.; Sforza, S.; Elst, K. Enzymatic production of pectic oligosaccharides from onion skins. *Carbohydr. Polym.* **2016**, 146, 245-252.
- Cheng, A.; Chen, X.; Jin, Q.; Wang, W.; Shi, J.; Liu, Y. Comparison of phenolic content and antioxidant capacity of red and yellow onions. *Czech J. Food Sci.* **2013**, 31, 501-508.

- Benítez, V.; Mollá, E.; Martín-Cabrejas, M.A.; Aguilera, Y.; López-Andréu, F.J.; Cools, K.; Terry, L.A.; Esteban, R.M. Characterization of industrial onion wastes (*Allium cepa* L.): dietary fibre and bioactive compounds. *Plant Food. Hum. Nutr.* **2011**, *66*, 48-57.
- Das, A.K.; Nanda, P.K.; Madane, P.; Biswas, S.; Das, A.; Zhang, W.; Lorenzo J.M. A comprehensive review on antioxidant dietary fibre enriched meat-based functional foods. *Trends Food Sci. Tech.* **2020**, *99*, 323-336.
- Prokopov, T.; Slavov, A.; Petkova, N.; Yanakieva, V.; Bozadzhiev, B.; Taneva, D. Study of onion processing waste powder for potential use in food sector. *Acta Aliment. Hung.* **2018**, *47*, 181-188.
- Takama, U.; Hirota, S. Deglucosilation of quercetin glucosides to the aglycone and formation of antifungal agents by peroxidase-dependent oxidation of quercetin on browning of onion scales. *Plant Cell Physiol.* **2000**, *41*, 1021-1029.
- Suh, H.J.; Lee, J.M.; Cho, J.S.; Kim, Y.S.; Chung, S.H. Radical scavenging compounds in onion skin. *Food Res. Int.* **1999**, *32*, 659-664.
- Slimstad, R.; Fossen, T.; Vågen, I.M. Onions: A source of unique dietary flavonoids. *J. Agr. Food Chem.* **2007**, *55*, 10067-10080.
- Ly, N.T.; Hazama, C.; Shimoyamada, M.; Ando, H.; Kato, K.; Yamauchi, R. Antioxidative compounds from the outer scales of onion. *J. Agr. Food Chem.* **2005**, *53*, 8183-8189.
- Benítez, V.; Mollá, E.; Martín-Cabrejas, M.A.; Aguilera, Y.; Esteban, R.M. Physicochemical properties and *in vitro* antidiabetic potential of fibre concentrates from onion by-products. *J. Funct. Food.* **2017**, *36*, 34-42.
- Ktari, N.; Smaoui, S.; Trabelsi, I.; Nasri, M.; Salah, B.R. Chemical composition, techno-functional and sensory properties and effects of three dietary fibers on the quality characteristics of Tunisian beef sausage. *Meat Sci.* **2014**, *96*, 521-525.
- Purohit, A.S.; Reed, C.; Mohan A. Development and evaluation of quail breakfast sausage. *LWT – Food Sci. Technol.* **2016**, *69*, 447-453.
- Kim, D.H.; Shin, D.M.; Seo, H.G.; Han, S.G. Effects of konjac gel with vegetable powders as fat replacers in frankfurter-type sausages. *Asian-Austral. J. Anim.* **2019**, *32*, 1195-1204.
- Petterson, K.; Godard, O.; Eliasson, A.-C.; Tornberg, E. The effects of cereal additives in low-fat sausages and meatballs. Part 2: Rye bran, oat bran and barley fibre. *Meat Sci.* **2014**, *96*, 503-508.
- Henning, S.S.C.; Tshalibe, P.; Hoffman, L.C. Physico-chemical properties of reduced-fat beef species sausage with pork back fat replaced by pineapple dietary fibres and water. *LWT – Food Sci. Technol.* **2016**, *74*, 92-98.
- Choi, Y.-S.; Kim, H.-W.; Hwang, K.-E.; Song, D.-H.; Jeong, T.-J.; Kim, Y.-B.; Jeon, K.-H.; Kim, C.-J. Effects of fat levels and rice bran fiber on the chemical, textural and sensory properties of frankfurters. *Food Sci. Biotechnol.* **2015**, *24*, 489-495.
- Ham, Y.-K.; Hwang, K.-E.; Song, D.-H.; Kim, Y.-J.; Shin, D.-J.; Kim, K.-I.; Lee, H.-J.; Kim, N.-R.; Kim, C.-J. Lotus (*Nelumbo nucifera*) rhizome as an antioxidant dietary fiber in cooked sausages: Effects on physicochemical and sensory characteristics. *Korean J. Food Sci. An.* **2017**, *37*, 219-227.
- Kurt, Ş.; Ceylan, H.G.; Akkoç, A. The effects of onion skin powder on the quality of cooked chicken meat patties during refrigerated storage. *Acta Aliment. Hung.* **2019**, *48*, 423-430.
- Chung, Y.-K.; Choi, J.-S.; Yu, S.-B.; Choi, Y.-I. Physicochemical and storage characteristics of Hanwoo Tteokgalbi treated with onion skin powder and black currant powder. *Korean J. Food Sci. An.* **2018**, *38*, 737-748.

- Jongaroontaprangsee, S.; Tritrong, W.; Chokanaporn, W.; Methacanon, P.; Devahastin, S.; Chiewchan, N. Effects of drying temperature and particle size on hydration properties of dietary fiber powder from lime and cabbage by-products. *Int. J. Food Prop.* **2007**, *10*, 887-897.
- Linhartová, Z.; Lunda, R.; Dvořák, P.; Bárta, J.; Bártová, V.; Kadlec, J.; Samková, E.; Bedrníček, J.; Pešek, M.; Laknerová, I.; Možina, S.S.; Smetana, P.; Mráz, J. Influence of rosemary extract (*Rosmarinus officinalis*) Inolens to extend the shelf life of vacuum-packed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fillets stored under refrigerated conditions. *Aquacult. Int.* **2019**, *27*, 833-847.
- Bedrníček, J.; Laknerová, I.; Linhartová, Z.; Kadlec, J.; Samková, E.; Bárta, J.; Bártová, V.; Mráz, J.; Pešek, M.; Winterová, R.; Vrchatová, N.; Tříška, J.; Smetana, P. Onion waste as a rich source of antioxidants for meat products. *Czech J. Food Sci.* **2019**, *37*, 268-275.
- Verma, A.K.; Sharma, B.D.; Banerjee, R. Quality characteristics and storage stability of low fat functional chicken nuggets. *Fleischwirtschaft International*, **2009**, *24*, 63-68.
- Sáyago-Ayerdi, S.G.; Brenes, A.; Goñi, I. Effect of grape antioxidant dietary fiber on the lipid oxidation of raw and cooked chicken hamburgers. *LWT – Food Sci. Technol.* **2009**, *42*, 971-976.
- Leistner, L.; Gorris, L.G.M. Food preservation by hurdle technology. *Trends Food Sci. Tech.* **1995**, *6*, 41-46.
- Feiner, G. Meat products handbook: Practical science and technology. Woodhead Publishing Limited, Cambridge, England, 2006, pp. 648.
- Metha, N.; Ahlawat, S.S.; Sharma, D.P.; Dabur, R.S. Novel trends in development of dietary fiber rich meat products – a critical review. *J. Food Sci. Tech.* **2015**, *52*, 633-647.
- O'Neill, C.M.; Cruz-Romero, M.C.; Duffy, G.; Kerry, J.P. Shelf life extension of vacuum-packed salt reduced frankfurters and cooked ham through the combined application of high pressure processing and organic acids. *Food Packaging Shelf* **2018**, *17*, 120-128.
- Slavov, A.; Garnier, C.; Crépeau, M.-J.; Durand, S.; Thibault, J.-F.; Bonin, E. Gelation of high methoxy pectin in the presence of pectin methylesterases and calcium. *Carbohydr. Polym.* **2009**, *77*, 876-884.
- Li, Y.; Yao, J.; Han, C.; Yang, J.; Chaudhry, M.T.; Wang, S.; Liu, H.; Yin, Y. Quercetin, Inflammation and Immunity. *Nutrients*, **2016**, *8*, 167.
- Tilami, S.K.; Sampels, S. Nutritional value of fish: lipids, proteins, vitamins and minerals. *Rev. Fish. Sci. Aquac.* **2018**, *26*, 243–253.
- Food and Agriculture Organisation. The state of world fisheries and aquaculture. 2018, pp. 210.
- Arvanitoyannis, I.S.; Tserkezou, P. Fish waste management. In *Seafood Processing – Technology, Quality and Safety*; I. S. Boziaris, Ed.; Wiley-Blackwell, John Wiley & Sons Ltd., Hoboken, New Jersey, USA, 2014, pp. 263–309.
- Palmeira, K.R.; Marsico, E.T.; Monteiro, M.L.G.; Lemos, M.; Conte, C.A. Ready-to-eat products elaborated with mechanically separated fish meat from waste processing: challenges and chemical quality. *CyTa-J. Food* **2016**, *14*, 227-238.
- Jayathilakan, K.; Sultana, K.; Radhakrishna, K.; Bawa, A.S. Utilization of byproducts and waste materials from meat, poultry and fish processing industries: a review. *J. Food Sci. Tech.* **2016**, *49*, 278–293.
- Leek, S.; Maddock, S.; Foxall, G. Situational determinants of fish consumption. *Brit. Food J.* **2000**, *102*, 18-39.



- Shah, M.A.; Bosco, S.J.D.; Mir, S.A. Plant extracts as natural antioxidants in meat and meat products. *Meat Sci.* **2015**, *98*, 21-33.
- Piechowiak, T.; Grzelak-Błaszcyk, K.; Bonikowski, R.; Balawejder, M. Optimization of extraction process of antioxidant compounds from yellow onion skin and their use in functional bread production. *LWT – Food Sci. Tech.* **2020**, *117*, 108614.
- Ren, F.; Nian, Y.; Perussello, C.A. Effect of storage, food processing and novel extraction technologies on onions flavonoid content: A review. *Food Res. Int.* **2020**, *132*, 108953.
- Vanhonacker, F.; Pieniak, Z.; Verbeke, W. European consumer perceptions and barriers for fresh, frozen, preserved and ready-meal fish products. *Brit. Food J.* **2013**, *115*, 508-525.
- Pan, J.; Jia, H.; Shang, M.; Li, Q.; Xu, C.; Wang, Y.; Wu, H.; Dong, X. Effects of deodorization by powdered activated carbon,  $\beta$ -cyclodextrin and yeast on odor and functional properties of tiger puffer (*Takifugu rubripes*) skin gelatin. *Int. J. Biol. Macromol.* **2018**, *118* (Part A), 116-123.
- Sea-leaw, T.; Benjakul, S. Fatty acid composition, lipid oxidation, and fishy odour development in seabass (*Lates calcarifer*) skin during iced storage. *Eur. J. Lipid Sci. Tech.* **2014**, *116*, 885-594.
- ISO 4833: 2003. Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the enumeration of microorganisms - Colony-count technique at 30 °C.
- ISO 6730: 2005. Milk - Enumeration of colony-forming units of psychrotrophic microorganisms - Colony-count technique at 6.5 °C.
- Raju, C.V., Shamasundar, B.A., Udupa, K.S. The use of nisin as a preservative in fish sausage stored at ambient ( $28 \pm 2$  °C) and refrigerated ( $6 \pm 2$  °C) temperatures. *Int. J. Food Sci. Technol.* **2003**, *38*, 171-185.
- Sachindra, Nm., Sakhare, P.Z., Yashoda, K.P., Narasimha Rao, D. Microbial profile of buffalo sausage during processing and storage. *Food Control*, **2005**, *16*, 31-35.
- Heyndrickx, M. The Importance of Endospore-Forming Bacteria Originating from Soil for Contamination of Industrial Food Processing. *Appl. Envi. Soil Sci.*, **2011**, *11* pp., doi:10.1155/2011/561975.

## SUPPLEMENTARY MATERIAL

Supplementary Table 1. Settings of Multiple Reaction Monitoring for quantification of selected flavonoids.

Compound	Quantification transition (amu)	Fragmentor (V)	Collision energy (eV)	Polarity
Q-3,4'-dgs	625 → 463	100	10	Negative
Q-4'-mgs	463 → 301	100	10	Negative
Quercetin	301 → 151	130	20	Negative

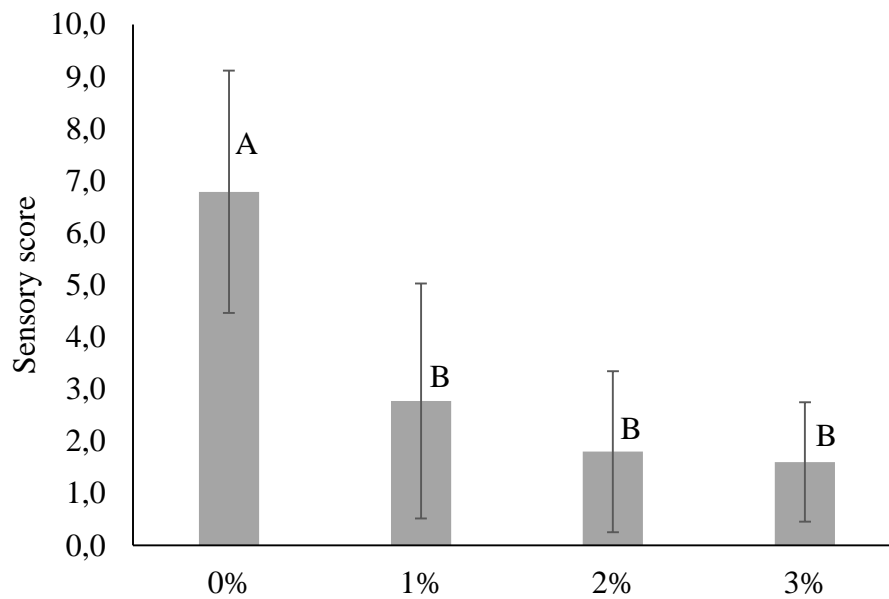
Q-3,4'-dgs: Quercetin-3,4'-O-diglucoside; Q-4'-mgs: Quercetin-4'-O-glucoside; Q: Quercetin

Supplementary Table 2. Total viable counts and counts of psychrotrophic bacteria in fish sausages with different percentage of onion peel powder (OPP).

OPP (%)	Before heat treatment	After heat treatment				<i>P</i>	
		Storage (days)					
		0	7	14	28	OPP	storage
<i>Total viable counts (log CFU/g)</i>							
Control	5.89±0.02	<1	4.77±0.07	6.90±0.02	N		
1	6.03±0.04	3.06±0.15	6.36±0.05	7.66±0.04	N	0.024	<0.001
2	5.88±0.01	<1	7.31±0.08	5.39±0.03	N		
3	5.29±0.04	3.18±0.11	N	7.16±0.09	N		
<i>Psychrotrophic bacteria (log CFU/g)</i>							
Control	5.66±0.04	<1	6.30±0.10	8.48±0.16	N		
1	5.70±0.04	<1	6.90±0.01	7.87±0.02	N	0.499	<0.001
2	6.00±0.05	<1	7.36±0.05	5.71±0.02	N		
3	7.02±0.03	<1	N	7.14±0.15	N		

N-uncountable, CFU- colony forming units; *n* = 2

Supplementary Figure 1. Intensity of fishy odour of fish sausages with different percentage of onion peel powder (OPP) evaluated at 28<sup>th</sup> day of storage.



Bars represent means (*n* = 9) ± standard deviation  
<sup>A,B</sup> Bars with different letters differ significantly (*p* < 0.05)

## 6 ZÁVĚR

Tato práce se zabývala fortifikací běžných potravin surovinami rostlinného původu bohatými na polyfenolické antioxidanty. Z dosavadních poznatků lze vyvodit tyto závěry:

- Fortifikace všech vybraných potravin surovinami bohatými na antioxidanty vedla ke zvýšení antioxidační aktivity.
- Cibulové slupky i rozmarýnový extrakt dokázaly prodloužit trvanlivost masných výrobků.
- Zvýšená antioxidační aktivita fortifikovaných vzorků potravin omezila oxidaci lipidů u masných výrobků, v případě mouky ze slupek cibule byl účinný již 1% přídavek.
- Využívání vodných výluhů z cibulových slupek jakožto zdroje polyfenolů se ukázalo být poměrně neefektivní, protože takto připravené výluhy měly oproti slupkové mouce více než 20x menší antioxidační aktivitu.
- Tepelné opracování výrobků ve většině případů výrazně snížilo antioxidační aktivitu, což dokládá rozpad polyfenolických látek během zpracování.
- U obohacených bezlepkových chlebů bylo prokázáno, že dochází k tepelnému rozkladu glykosidů kvercetinů i jeho dimerů a trimeru, kvercetin samotný je však dostatečně tepelně stabilní a zůstává i v hotovém upečeném výrobku.
- Rozklad dimerů a trimeru kvercetinů způsobilo uvolnění kvercetinů (aglykonů) a zvýšení jeho koncentrace, s čímž souviselo i zvýšení antioxidační aktivity v pečeném chlebu s cibulovými slupkami oproti těstu.
- Pokud je kvercetin vázaný jako dimer či trimer, má menší antioxidační aktivitu.
- Výluhy z cibulových slupek nemají výrazný vliv na sensorické vlastnosti masného výrobku.
- Mouka z cibulových slupek v masných výrobcích v přídávku větším než 2 % negativně ovlivnila sensorické vlastnosti, zejména texturu.
- Cibulové slupky ovlivnily negativně texturu i u bezlepkového chleba, který byl výrazně tvrdší než ostatní vzorky chlebů.
- Výluhy z cibulových slupek není možné použít jako přírodní barvivo pro masné výrobky.
- Do budoucna je třeba zaměřit se podrobněji na mikrobiologickou kvalitu cibulových slupek, vzhledem k tomu, že masné výrobky se tepelně opracovávají při nižší teplotě než pekařské výrobky, a tak mohou slupky do určité míry pro masné výrobky představovat větší riziko kontaminace.

## 7 SOUHRN

Během skladování probíhají v potravinách oxidační procesy, které negativně ovlivňují jejich zdravotní nezávadnost a sensorické vlastnosti. Pro zamezení těchto nežádoucích procesů mohou být do potravin přidávány přírodní polyfenolické antioxidanty. Cílem této práce bylo studium vlivu přídatku surovin bohatých na polyfenolické antioxidanty na chemické a sensorické vlastnosti běžně konzumovaných potravin. Jako zdroj polyfenolů byly vybrány vedlejší produkty vznikající při zpracování cibule kuchyňské (*Allium cepa* L.) a extrakt z rozmarýnu lékařského (*Rosmarinus officinalis* L.). Konkrétně se jednalo o cibulové slupky a rozmarýnový extrakt Inolens 4.

Přídavek surovin obsahující polyfenolické látky vždy zvýšil antioxidační aktivitu obohacených potravin a v případě masných výrobků zabránil oxidaci lipidů. V některých případech však byly negativně ovlivněny některé sensorické vlastnosti (textura). Týkalo se to hlavně přídatku mletých cibulových slupek. Na druhou stranu sensorické hodnocení ukázalo, že přídavek mletých cibulových slupek dokázal účinně překrýt nebo zabránit vzniku nepříjemného rybího pachu, který vzniká při dlouhodobém skladování. Tento jev doposud nebyl popsán. Pomocí HPLC-MS/MS analýzy bylo zjištěno, že se v cibulových slupkách vyskytují látky, které doposud nebyly v jiných rostlinách detekovány. Jde o 4 druhy dimeru kvercetinu a jeden trimer. Navíc bylo zjištěno, že během tepelného opracování obohacené potraviny dochází k jejich rozkladu, což doposud ve vědecké literatuře popsáno nebylo.

Po shrnutí všech výsledků lze konstatovat, že přírodní polyfenoly mají potenciál zabránit zhoršení kvality potravin v důsledku jejich skladování.

## 8 SUMMARY

Oxidation reactions, that can negatively affect safety and sensory properties, take place during food storage. To inhibit such an unwanted process, natural polyphenolic antioxidants can be added to food. The aim of this thesis was to study the effects of the addition of polyphenol rich plant materials on chemical and sensory properties of commonly consumed food products. Two types of polyphenol rich plant material were chosen: onion (*Allium cepa* L.) peel, which is processing by-product and rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) extract Inolens 4.

The addition of polyphenol rich material (both, onion peel and rosemary extract) increased antioxidant activity of food and also delayed lipid oxidation in meat products. Unfortunately, in some cases the addition caused deterioration of sensory properties leading to poor consumers' acceptance. This was observed mainly after the addition of onion peel powder in higher amounts. The addition negatively affected hardness of texture. On the other hand, onion peel powder can effectively cover or reduce formation of unpleasant fishy odour, that is typical for fish products stored for long period of time. Additionally, several compounds occurring only in onion peel were identified (4 types of quercetin dimer and 1 type of trimer) and their stability during thermal treatment of fortified food was elucidated. This was first study that described this phenomenon.

Overall, it can be concluded that plant polyphenols have the potential to extend shelf life of food products.

## 9 SEZNAM LITERATURY

- Acosta-Estrada, B.A., Gutiérrez-Urbe, J.A., Serna-Saldívar, S.O. 2014. Bound phenolics in foods, a review. *Food Chemistry*, 152: 46-55.
- Ahmad, S.R., Gukulakrishnan, P., Giriprasad, R., Yattoo, M.A. 2015. Fruit-based natural antioxidants in meat and meat products: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 55.11: 1503-1513.
- Ahmed, M., Pickova, J., Ahmad, T., Liaquat, M., Farid, A., Jahangir, M. 2016. Oxidation of lipids in foods. *Sarhad Journal of Agriculture*, 32.3: 230-238.
- Ahn, J., Grün, I.U., Mustapha, A. 2007. Effects of plant extracts on microbial growth, color change, and lipid oxidation in cooked beef. *Food Microbiology*, 24.1: 7-14.
- Ajila, C.M., Brar, S.K., Verma, M., Tyagi, R.D., Godbout, S., Valéro, J.R. 2011. Extraction and analysis of polyphenols: Recent trends. *Critical Reviews in Biotechnology*, 31.3: 227-249.
- Albishi, T., John, J.A., Al-Khalifa, A.S., Shahidi, F. 2013. Antioxidative phenolic constituents of skins of onion varieties and their activities. *Journal of Functional Foods*, 5: 1191–1203.
- Ali, M., Imran, M., Nandeem, M., Khan, M.K., Sohaib, M., Suleira, H.A.R., Bashir, R. 2019. Oxidative stability and sensoric acceptability of functional fish meat product supplemented with plant-based polyphenolic optimal extracts. *Lipids in Health and Disease*, 18.1: 35.
- Andrade-Eiroa, A., Canle, M., Leroy-Cancellieri, V., Cerdà. 2016. Solid-phase extraction of organic compounds: A critical review (Part I). *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 80: 641-654.
- Arvanitoyannis, I.S., Tserkezou, P. 2014. Fish waste management. s. 263–310. In: S. Boziaris, I. (ed.). *Seafood processing – Technology, quality and safety*. Wiley-Blackwell, John Wiley & Sons Ltd. 488 s. ISBN 978-1-118-34621-1.
- Augustyniak, A., Bartosz, G., Čipak, A., Duburs, G., Horáková, L., Łuczaj, W., Majekova, M., Odysseos, A.D., Rackova, L., Skrzydlewska, E., Stefek, M., Štrosová, M., Tirzitis, G., Venskoutonis, P.R., Viskupicova, J., Vraka, P.S., Žarković, N. 2010. Natural and synthetic antioxidants: An updated overview. *Free Radical Research*, 44.10: 1216-1262.
- Azmir, J., Zaidul, I.S.M., Rahman, M.M., Sharif, K.M., Mohamed, A., Sahena, F., Jahurul, M.H.A., Ghafoor, K., Norulaini, N.A.N., Omar, A.K.M. 2013. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *Journal of Food Engineering*, 117.4: 426-436.
- Babbar, N., Baldassarre, S., Maesen, M., Prandi, B., Dejonghe, W., Sforza, S., Elst, K. 2016. Enzymatic production of pectic oligosaccharides from onion skins. *Carbohydrate Polymers*, 146: 245-252.

- Bahadoran, Z., Mirmiran, P., Azizi, F. 2013. Dietary polyphenols as potential nutraceuticals in management of diabetes: A review. *Journal of Diabetes & Metabolic Disorders*, 12.1: 43.
- Banerjee, S. 2006. Inhibition of mackerel (*Scomber scombrus*) muscle lipoxygenase by green tea polyphenols. *Food Research International*, 39.4: 486-491.
- Bartosz, G., Kołakowska, A. 2011. Lipid oxidation in food systems. s. 163 – 184. In: Sikorski, Z., Kołakowska, A. (eds.). *Chemical, biological, and functional aspects of food lipids*. CRC Press, 484 s. ISBN 978-1-4398-0238-0.
- Benítez, V., Mollá, E., Martín-Cabrejas, M.A., Aguilera, Y., López-Andréu, F.J., Cools, K., Terry, L.A., Esteban, R.M. 2011. Characterization of industrial onion wastes (*Allium cepa* L.): Dietary fibre and bioactive compounds. *Plant Foods for Human Nutrition*, 66.1: 48-57.
- Bhagwat, S., Haytowitz, D.B., Holden, Joanne M. 2014. USDA database for the flavonoid content of selected foods. Vydání 3.1. *US Department of Agriculture*. Beltsville, MD, USA.
- Biesiada, A., Tomczak, A. 2012. Biotic and abiotic factors affecting the content of the chosen antioxidant compounds in vegetables. *Vegetable Crops Research Bulletin*, 76.2012: 55-78.
- Birben, E., Sahiner, U.M., Sacksesen, C., Erzurum, S., Kalayci, O. 2012. Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organization Journal*, 5.1: 9-19.
- Bohn, T. 2014. Dietary factors affecting polyphenol bioavailability. *Nutrition Reviews*, 72.7: 429-452.
- Bojňanská, T., Frančáková, H., Vollmannová, A. 2009. Rutin content in buckwheat enriched bread and influence of its consumption on plasma total antioxidant status. *Czech Journal of Food Sciences*, 27: S236-S240.
- Carocho, M., Barreira, J.C.M., Antonio, A.L., Bento, A., Morales, P., Ferreira, I.C.F.R. 2015. The incorporation of plant materials in “Serra da Estrela” cheese improves antioxidant activity without changing the fatty acid profile and visual appearance. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 117.10: 1607-1614.
- Cook, N.C., Samman, S. 1996. Flavonoids—Chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 1996, 7.2: 66-76.
- Cory, H., Passarelli, S., Szeto, J., Tamez, M., Mattei, J. 2018. The role of polyphenols in human health and food systems: A mini-review. *Frontiers in Nutrition*, 5: 87.
- Crowe, K.M., Francis, C. 2013. Position of the academy of nutrition and dietetics: functional foods. *Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics*, 113.8: 1096-1103.

- D'Archivio, M., Filesi, C., Di Benedetto, R., Gargiulo, R., Giovannini, C., Masella, R. 2007. Polyphenols, dietary sources and bioavailability. *Annali-Istituto Superiore di Sanita*, 43.4: 348.
- Das, L., Raychaudhuri, U., Chakraborty, R. 2013. Herbal fortification of bread with fennel seeds. *Food Technology and Biotechnology*, 51.3: 434.
- Das, A.K., Nanda, P.K., Madane, P., Biswas, S., Das, A., Zhang, W., Lorenzo, J.M. 2020. A comprehensive review on antioxidant dietary fibre enriched meat-based functional foods. *Trends in Food Science & Technology*, 99: 323-336.
- de Camargo, A.D., Martins Vidal, C.M., Canniatti-Brazaca, S.G., Shahidi, F. 2014. Fortification of cookies with peanut skins: Effects on the composition, polyphenols, antioxidant properties, and sensory quality. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62.46: 11228-11235.
- de Oliveira, V.S., Ferreira F.S., Ramos Cople, M.C., da Silva Labre, T., Augusta, I.M., Domingues Gamallo, O., Saldanha, T. 2018. Use of natural antioxidants in the inhibition of cholesterol oxidation: A review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 17.6: 1465-1483.
- del Baño, M.J., Lorente, J., Castillo, J., Benavente-García, O., del Río, J.A., Ortuño, A., Quirin, K.-W., Gerard, D. 2003. Phenolic diterpenes, flavones, and rosmarinic acid distribution during the development of leaves, flowers, stems, and roots of *Rosmarinus officinalis*. Antioxidant activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51.15: 4247-4253.
- Devatkal, S.K., Thorat, P., Manjunatha, M. 2014. Effect of vacuum packaging and pomegranate peel extract on quality aspects of ground goat meat and nuggets. *Journal of Food Science and Technology*, 51.10: 2685-2691.
- Di Donato, P., Taurisano, V., Tommonaro, G., Pasquale, V., Silván Jiménez, J.M., de Pascual-Teresa, S., Poli, A., Nicolaus, B. 2018. Biological properties of polyphenols extracts from agro industry's wastes. *Waste and Biomass Valorization*, 9.9: 1567-1578.
- Domínguez, R., Pateiro, M., Gagaoua, M., Barba, J.F., Zhang, W., Lorenzo, J.M. 2019. A comprehensive review on lipid oxidation in meat and meat products. *Antioxidants*, 8.10: 429.
- Dugas Jr., A.J., Castañeda-Acosta, J., Bonin, G.C., Price, K.L., Fisher, N.H., Winston, G.W. 2000. Evaluation of the total peroxy radical-scavenging capacity of flavonoids: Structure–activity relationships. *Journal of Natural Products*, 63.3: 327-331.
- Dvořák, J., Dostálek, P., Štěrba, K., Čejka, P., Kellner, V., Čulík, J., Horák, T., Jurková, M. 2006. Význam oxidu siřičitého v pivu. *Kvasný Průmysl*, 52, 346-348.
- Dziki, D., Rózyło, R., Gawlik-Dziki, U., Świeca, M. 2014. Current trends in the enhancement of antioxidant activity of wheat bread by the addition of plant materials rich in phenolic compounds. *Trends in Food Science & Technology*, 40.1: 48-61.



- Elias, R.J., Kellerby, S.S., Decker, E.A. 2008. Antioxidant activity of proteins and peptides. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 48.5: 430-441.
- El-Sayed, S.M., Youssef, A.M. 2019. Potential application of herbs and spices and their effects in functional dairy products. *Heliyon*, 5.6: e01989.
- Esposito, S., Taticchi, A., Di Maio, I., Urbani, S., Veneziani, G., Selvaggini, R., Sordini, B., Servili, M. 2015. Effect of an olive phenolic extract on the quality of vegetable oils during frying. *Food Chemistry*, 176: 184-192.
- Falowo, A.B., Fayemi, P.O., Muchenje, V. 2014. Natural antioxidants against lipid–protein oxidative deterioration in meat and meat products: A review. *Food Research International*, 64: 171-181.
- FAOSTAT. Onion production. Dostupné na:  
<http://www.fao.org/faostat/en/#data/qc/visualize>, dne 13.7.2020.
- Feiner, G. 2006. Meat products handbook: Practical science and technology. CRC Press, 648 s. ISBN 978-0-8493-8010-5.
- Damodaran, S., Parkin, K.L., Fennema, O.W. (eds.). 2008. Fennema's food chemistry. 4. vydání. CRC Press 1144 s. ISBN 978-0-8247-2345-3.
- Ferretti, G., Bacchetti, T., Masciangelo, S., Saturni, L. 2012. Celiac disease, inflammation and oxidative damage: A nutrigenetic approach. *Nutrients*, 4.4: 243-257.
- FAO. 2018. Food and Agriculture Organisation. The state of world fisheries and aquaculture, 210 s. ISBN 978-92-5-130562-1.
- Fraga, C.G., Croft, K.D., Kennedy, D.O., Tomás-Barberán, F.A. 2019. The effects of polyphenols and other bioactives on human health. *Food & Function*, 10.2: 514-528.
- Fuerst, E.P., Okubara, A.P., Anderson, J.V., Morris, C.F. 2014. Polyphenol oxidase as a biochemical seed defense mechanism. *Frontiers in Plant Science*, 2014, 5: 689.
- Gawlik-Dziki, U., Świeca, M., Dziki, D., Baraniak, B., Tomiło, J., Czyż, J. 2013. Quality and antioxidant properties of breads enriched with dry onion (*Allium cepa* L.) skin. *Food Chemistry*, 138.2-3: 1621-1628.
- Gianfredi, V., Nucci, D., Salvatori, T., Dallagiacomma, G., Fatigoni, C., Moretti, M., Realdon, S. 2019. Rectal cancer: 20% risk reduction thanks to dietary fibre intake. Systematic review and meta-analysis. *Nutrients*, 11.7: 1579.
- Giménez-Bastida, J.A., Piskula, M., Zieliński, H. 2015. Recent advances in development of gluten-free buckwheat products. *Trends in Food Science & Technology*, 44.1: 58-65.
- Gordon, M. 2001. The development of oxidative rancidity in foods. s. 7-21. In: Pokorný, J., Yanishlieva, N., Godron, M. (eds.). *Antioxidants in food: Practical application*. CRC Press. 380 s. ISBN 0-8493-1222-1.

- Guo, Y., Mah, E., Davis, G.C., Jalili, T., Ferruzzi, M.G., Chun, O.K., Bruno, R.S. 2013. Dietary fat increases quercetin bioavailability in overweight adults. *Molecular Nutrition & Food Research*, 57.5: 896-905.
- Gupta, D. 2015. Methods for determination of antioxidant capacity: A review. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 6.2: 546.
- Halliwell, B. 2007. Biochemistry of oxidative stress. *Biochemical Society Transactions*, 35.5: 1147-1150.
- Han, J., Britten, M., St-Gelais, D., Champagne, C.P., Fustier, P., Salmieri, S., Lacroix, M. 2011. Polyphenolic compounds as functional ingredients in cheese. *Food Chemistry*, 124.4: 1589-1594.
- Hampikyan, H., Bingol, E.B., Colak, H., Aydin, A. 2009. The evaluation of microbiological profile of some spices used in Turkish meat industry. *Journal of Food, Agriculture & Environment*, 7.3&4: 111-115.
- Harmatha, J. 2005. Strukturní bohatství a biologický význam lignanů a jim příbuzných rostlinných fenylpropanoidů. *Chemické Listy*, 99, 622-632.
- Harnly, J.M., Doherty, R.F., Beecher, G.R., Holden, J.M., Haytowitz, D.B., Bhagwat, S., Gebhardt, S. 2006. Flavonoid content of us fruits, vegetables, and nuts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54.26: 9966-9977.
- Hematyar, N., Rustad, T., Sampels, S., Dalsgaard, T.K. 2019. Relationship between lipid and protein oxidation in fish. *Aquaculture Research*, 50.5: 1393-1403.
- Herrero, M., Cifuentes, A., Ibañez, E. 2006. Sub- and supercritical fluid extraction of functional ingredients from different natural sources: Plants, food-by-products, algae and microalgae: A review. *Food Chemistry*, 98.1:136-148.
- Hygreeva, D., Pandey, M.C., Radhakrishna, K. 2014. Potential applications of plant based derivatives as fat replacers, antioxidants and antimicrobials in fresh and processed meat products. *Meat Science*, 98.1: 47-57.
- Chang, W.C.-W., Wu, H.-Y., Yeh, Y., Liao, P.-C. 2020. Untargeted foodomics strategy using high-resolution mass spectrometry reveals potential indicators for fish freshness. *Analytica Chimica Acta*, 1127: 98-105.
- Chouhan, S., Sharma, K., Zha, J., Guleria, S., Koffas, A.G.M. 2017. Recent advances in the recombinant biosynthesis of polyphenols. *Frontiers in Microbiology*, 8: 2259.
- Ignat, I., Volf, I., Popa, V.I. 2011. A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food Chemistry*, 126.4: 1821-1835.
- Jayathilakan, K., Sultana, K., Radhakrishna, K., Bawa, A.S. 2011. Utilization of byproducts and waste materials from meat, poultry and fish processing industries: A review. *Journal of Food Science and Technology*, 49, 278–293.

- Jomova, K., Lawson, M., Valko, M. 2014. Mechanism of antioxidant activity. 325-342. In: Bartosz, G. (ed.). *Food oxidants and antioxidants, chemical, biological and functional properties*. CRC Press. 550 s. ISBN 978-1-4398-8242-9.
- Joven, J., Micol, V., Segura-Carretero, A., Alonso-Villavarde, C., Menéndez, J.A. 2014. Polyphenols and the modulation of gene expression pathways: can we eat our way out of the danger of chronic disease? *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 54.8: 985-1001.
- Khlebnikov, A. 2007. Improved quantitative structure–activity relationship models to predict antioxidant activity of flavonoids in chemical, enzymatic, and cellular systems. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 15.4: 1749-1770.
- Kiassos E., Mylonaki S., Makris D.P., Kefalas P. 2009. Implementation of response surface methodology to optimise extraction of onion (*Allium cepa* L.) solid waste phenolics. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 10: 246–252.
- Kołodowska, A., Bartosz, G. 2014. Oxidation of food components: An introduction. s. 1-20. In: Bartosz, G. (ed.). *Food oxidants and antioxidants, chemical, biological and functional properties*. CRC Press. 550 s. ISBN 978-1-4398-8242-9.
- Koponen, J.M., Happonen, A.M., Mattila, P.H., Törrönen, R. 2007. Contents of anthocyanins and ellagitannins in selected foods consumed in finland. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55.4: 1612-1619.
- Kopp, W. 2019. How western diet and lifestyle drive the pandemic of obesity and civilization diseases. *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy*, 12: 2221.
- Kuppusamy, S., Thavamani, P., Megharaj, M., Naidu, R. 2015. Bioremediation potential of natural polyphenol rich green wastes: A review of current research and recommendations for future directions. *Environmental Technology & Innovation*, 4: 17-28.
- Laguette, M., Lecomte, J., Villeneuve, P. 2007. Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: existing methods, new trends and challenges. *Progress in Lipid Research*, 46.5: 244-282.
- Landete, J.M. 2012. Plant and mammalian lignans: a review of source, intake, metabolism, intestinal bacteria and health. *Food Research International*, 46.1: 410-424.
- Leek, S., Maddock, S., Foxall, G. 2000. Situational determinants of fish consumption. *British Food Journal*, 102: 18-39.
- Leistner, L., Gorris, L.G.M. 1995. Food preservation by hurdle technology. *Trends in Food Science & Technology*, 6: 41-46.
- Leopoldini, M., Russo, N., Toscano, M. 2011. The molecular basis of working mechanism of natural polyphenolic antioxidants. *Food Chemistry*, 125.2: 288-306.

- Lesschaeve, I., Noble, A.C. 2005. Polyphenols: factors influencing their sensory properties and their effects on food and beverage preferences. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 81.1: 330s-335s.
- Li, Y.O., Komarek, A.R. 2017. Dietary fibre basics: Health, nutrition, analysis, and applications. *Food Quality and Safety*, 1.1: 47-59.
- Liguori, I., Russo, G., Curcio, F., Bulli, G., Aran, L., Della-Morte, D., Gargiulo, G., Testa, G., Cacciatore, F., Bonaduce, D, Abete, P. 2018. Oxidative stress, aging, and diseases. *Clinical Interventions in Aging*, 13: 757-772.
- Lima Cherubin, D.J., Buzanello Martins, C.V., Fariña, L.O., Silva de Lucca, R.A. 2019. Polyphenols as natural antioxidants in cosmetics applications. *Journal of Cosmetic Dermatology*, 19.1.
- Lin, L.-Y., Liu, H.-M., Yu, Y.W., Lin, S.-D., Mau, J.-L. 2009. Quality and antioxidant property of buckwheat enhanced wheat bread. *Food Chemistry*, 112.4: 987-991.
- Liu, P., Yang, B., Kallio, H. 2010. Characterization of phenolic compounds in chinese hawthorn (*Crataegus pinnatifida* Bunge. var. Major) fruit by high performance liquid chromatography–electrospray ionization mass spectrometry. *Food Chemistry*, 121.4: 1188-1197.
- Liu, Y., Wang, P., Chen, F., Yuan, Y., Zhu, Y., Yan, H., Hu, Y. 2015. Role of plant polyphenols in acrylamide formation and elimination. *Food Chemistry*, 186: 46-53.
- Lombard, K., Peffley, E., Geoffriau, E., Thompson, L., Herring, A. 2005. Quercetin in onion (*Allium cepa* L.) after heat-treatment simulating home preparation. *Journal of Food Composition and Analysis*, 18.6: 571-581.
- Lorenzo, J.M., Pateiro, M., Domínguez, R., Barba, F.J., Putnik, P., Bursac Kovačević, D., Shpigelman, A., Granato, D., Franco, D. 2018. Berries extracts as natural antioxidants in meat products: A review. *Food Research International*, 106: 1095-1104.
- Ly, N T., Hazama, C., Shimoyamada, M., Ando, H., Kato, K., Yamauchi, R. 2005. Antioxidative compounds from the outer scales of onion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53.21: 8183–8189.
- Lykkesfeldt, J. 2007. Malondialdehyde as biomarker of oxidative damage to lipids caused by smoking. *Clinica Chimica Acta*, 380.1-2: 50-58.
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., Jiménez, L. 2004. Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 79.5: 727-747.
- Martins, Z.E., Pinho, O., Ferreira, I. 2017. Food industry by-products used as functional ingredients of bakery products. *Trends in Food Science & Technology*, 67: 106-128.
- Massey, K.A., Nicolaou, A. 2013. Lipidomics of oxidized polyunsaturated fatty acids. *Free Radical Biology and Medicine*, 59: 45-55.

- Mccue, P., Shetty, K. 2004. Health benefits of soy isoflavonoids and strategies for enhancement: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 44.5: 361-367.
- Methan, N., Ahlawat, S.S., Sharma, D.P., Dabur, R.S. 2015. Novel trends in development of dietary fiber rich meat products - A critical review. *Journal of Food Science and Technology*, 52.2: 633-647.
- Mustafa, A., Turner, C. 2011. Pressurized liquid extraction as a green approach in food and herbal plants extraction: A review. *Analytica Chimica Acta*, 703.1: 8-18.
- Nariadení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1924/2006 o výživových a zdravotních tvrzeních při označování potravin. Úřední věstník Evropské unie L 404/9.
- Nariadení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1333/2008 o přídatných potravinářských látkách. Úřední věstník Evropské unie L 354/16.
- Nariadení Komise (EU) č. 1129/2011 kterým se mění příloha II nariadení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1333/2008 vytvořením seznamu potravinářských přídatných látek. Úřední věstník Evropské unie L 295/1.
- Nariadení Komise (EU) č. 432/2012, kterým se zřizuje seznam schválených zdravotních tvrzení při označování potravin jiných než tvrzení o snížení rizika onemocnění a o vývoji zdraví dětí. Úřední věstník Evropské unie L 136/1.
- Nile, S.H., Nile, A.S., Keum, Y.S., Sharma, K. 2017. Utilization of quercetin and quercetin glycosides from onion (*Allium cepa* L.) Solid waste as an antioxidant, urease and xanthinase oxidase inhibitors. *Food Chemistry*, 235, 119–126.
- Nissen, L.R., Byrne, D.V., Bertelsen, G., Skibsted, L.H. 2004. The antioxidative activity of plant extracts in cooked pork patties as evaluated by descriptive sensory profiling and chemical analysis. *Meat Science*, 68.3: 485-495.
- Nollet, L.M.L., Toldrá, F. (ed.). 2008. Handbook of processed meats and poultry analysis. CRC Press. 760 s. ISBN 978-1420045314.
- Olatunde, O.O., Benjakul, S. 2018. Natural preservatives for extending the shelf-life of seafood: A revisit. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 17.6: 1595-1612.
- Oreopoulou, A., Tsimogiannis, D., Oreopoulou, V. 2019. Extraction of polyphenols from aromatic and medicinal plants: An overview of the methods and the effect of extraction parameters. s. 243-259. In: Watson R.R. (ed.). *Polyphenols in Plants*. 2. vydání. Academic Press. 442 s. ISBN 978-0-12-813768-0.
- Ou, J., Wang, M., Zheng, J., Ou, S. 2019. Positive and negative effects of polyphenol incorporation in baked foods. *Food Chemistry*, 284: 90-99.
- Palmeira, K.R., Marsico, E.T., Monteiro, M.L.G., Lemos, M., Conte, C.A. 2016. Ready-to-eat products elaborated with mechanically separated fish meat from waste processing: Challenges and chemical quality. *CyTA – Journal of Food*, 14.2: 227-238.

- Pandareesh, M.D., Mythri, R.B., Bharath, M.M.S. 2015. Bioavailability of dietary polyphenols: Factors contributing to their clinical application in CNS diseases. *Neurochemistry International*, 89: 198-208.
- Panche, A.N., Diwan, A.D., Chandra, S.R. 2016. Flavonoids: An overview. *Journal of Nutritional Science*, 2016, 5: e47.
- Papastergiadis, A., Mubiru, E., Van Langenhove, H., De Meulenaer, B. 2012. Malondialdehyde measurement in oxidized foods: Evaluation of the spectrophotometric thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) test in various foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60.38: 9589-9594.
- Papuc, C., Goran, G.V., Predescu, C.N., Nicorescu, V., Stefan, G. 2017. Plant polyphenols as antioxidant and antibacterial agents for shelf-life extension of meat and meat products: Classification, structures, sources, and action mechanisms. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 16.6: 1243-1268.
- Patisaul, H.B., Jefferson, W. 2010. The pros and cons of phytoestrogens. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 31.4: 400-419.
- Paulová, H., Bochořeková, H. 2004. Metody stanovení antioxidační aktivity přírodních látek *in vitro*. *Chemické Listy*, 98: 174-179.
- Pietta, P.-P. 2000. Flavonoids as antioxidants. *Journal of Natural Products*, 63.7: 1035-1042.
- Pignitter, M., Somoza, V. 2012. Critical evaluation of methods for the measurement of oxidative rancidity in vegetable oils. *Journal of Food & Drug Analysis*, 20.4: 772-777.
- Pisoschi, A.M., Negulescu, G.P. 2011. Methods for total antioxidant activity determination: A review. *Biochemistry and Analytical Biochemistry*, 1.1: 106.
- Poprac, P., Jomova, K., Simunkova, M., Kollar, V., Rhodes, C.J., Valko, M. 2017. Targeting free radicals in oxidative stress-related human diseases. *Trends in Pharmacological Sciences*, 38.7: 592-607.
- Ramos, L.R., Santos, J.S., Daguer, H., Camargo Valesse, A., Gomes Crus, A., Granato, D. 2017. Analytical optimization of a phenolic-rich herbal extract and supplementation in fermented milk containing sweet potato pulp. *Food Chemistry*, 221: 950-958.
- Rhodes, D.N., Nute, G.R. 1980. Acceptability of canned ham of different water content. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 31.9: 935-942.
- Rice-Evans, C.A., Miller, N.J., Paganga, G. 1996. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine*, 20.7: 933-956.
- Rodríguez-Carpena, J.G., Morcuende, D., Jesus Petró, M., Estévez, M. 2012. Inhibition of cholesterol oxidation products (COPs) formation in emulsified porcine

- patties by phenolic-rich avocado (*Persea americana* Mill.) extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60.9: 2224-2230.
- Rohn, S., Buchner, N., Driemel, G., Rauser, M., Kroh, W.L. 2007. Thermal degradation of onion quercetin glucosides under roasting conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55.4: 1568-1573.
- Salta, F.N., Mylona, A., Chiou, A., Boskou, G., Andrikopoulos, N.K. 2007. Oxidative stability of edible vegetable oils enriched in polyphenols with olive leaf extract. *LWT - Food Science and Technology International*, 13.6: 413-421.
- Sampaio Cutrim, C., Sloboda Cortez, M.A. 2018. A review on polyphenols: Classification, beneficial effects and their application in dairy products. *International Journal of Dairy Technology*, 71.3: 564-578.
- Saturni, L., Ferretti, G., Bacchetti, T. 2010. The gluten-free diet: Safety and nutritional quality. *Nutrients*, 2.1: 16-34.
- Saura-Calixto, F. 1998. Antioxidant dietary fiber product: a new concept and a potential food ingredient. *Journal of Agricultural and food ingredient*, 46.10: 4303-4306.
- Serra, D., Almeida, L.M., Dinis, T.C.P. 2018. Dietary polyphenols: A novel strategy to modulate microbiota-gut-brain axis. *Trends in Food Science & Technology*, 78: 224-233.
- Shah, M.A., Bosco, S.J.D., Mir, S.A. 2014. Plant extracts as natural antioxidants in meat and meat products. *Meat Science*, 98.1: 21-33.
- Shahidi, F., Ambigaipalan, P. 2015. Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects—A review. *Journal of Functional Foods*, 18: 820-897.
- Shalaby, E.A., Shanab, S.M.M. 2013. Antioxidant compounds, assays of determination and mode of action. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 7.10: 528-539.
- Shantha, N.C., Decker, E.A. 1994. Rapid, sensitive, iron-based spectrophotometric methods for determination of peroxide values of food lipids. *Journal of AOAC International*, 77.2: 421-424.
- Silva, F.A.P., Estévez, M., Ferreira, V.C.S, Silva, S.A., Lemos, L.T., Ida, E.I., Shimokomaki, M., Madruga, M.S. 2018. Protein and lipid oxidations in jerky chicken and consequences on sensory quality. *LWT - Food Science and Technology*, 97: 341-348.
- Sindhi, V., Gupta, V., Sharma, K., Bhatnagar, S., Kumari, R., Dhaka, N. 2013. Potential applications of antioxidants—A review. *Journal of Pharmacy Research*, 7.9: 828-835.

- Singh, B., Suri, K., Shevkani, K., Kaur, A., Kaur, A., Sing, N. 2018. Enzymatic browning of fruit and vegetables: A review. s. 63-78. In: Kuddus, M. (ed.). *Enzymes in Food Technology*. Springer, Singapore, 419 s. ISBN 978-981-13-1933-4.
- Sivam, A., Sun-Waterhouse, D., Quek, S.Y., Perera, C.O. 2010. Properties of bread dough with added fiber polysaccharides and phenolic antioxidants: A review. *Journal of Food Science*, 2010, 75.8: R163-R174.
- Slavov, A., Garnier, C., Crépeau, M.-J., Durand, S., Thibault, J.-F., Bonin, E. 2009. Gelation of high methoxy pectin in the presence of pectin methylesterases and calcium. *Carbohydrate Polymers*, 77: 876-884.
- Stalikas, C.D. 2007. Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. *Journal of Separation Science*, 30.18: 3268-3295.
- Stevanato, R., Bertelle, M., Fabris, S. 2014. Photoprotective characteristics of natural antioxidant polyphenols. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 69.1: 71-77.
- Stratil, P., Kubáň, V. 2018. Reaktivní kyslíkové radikály, přírodní antioxidanty a jejich zdravotní účinky. 1. vydání. 2theta, 278 s. ISBN 978-80-86380-91-9.
- Taguri, T., Tanaka, T., Kouno, I. 2004. Antimicrobial activity of 10 different plant polyphenols against bacteria causing food-borne disease. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 2004, 27.12: 1965-1969.
- Tapas, A.R., Sakarkar, D.M., Kakde, R.B. 2008. Flavonoids as nutraceuticals: A review. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 7.3: 1089-1099.
- Tejero, I., González-Lafont, A., Lluch, J.M., Eriksson, L.A. 2004. Photo-oxidation of lipids by singlet oxygen: A theoretical study. *Chemical Physics Letters*, 398.4-6: 336-342.
- Thilakarathna, S.H., Rupasinghe, H.P. 2013. Flavonoid bioavailability and attempts for bioavailability enhancement. *Nutrients*, 5.9: 3367-3387.
- Tilami, S.K., Sampels, S. 2018. Nutritional value of fish: lipids, proteins, vitamins and minerals. *Reviews in Fisheries Science & Aquaculture*, 26.2: 243-253.
- Tolinski M. 2015. Additives for polyolefins: Getting the most out of polypropylene, polyethylene and TPO. 2. vydání. Elsevier, 240 s. ISBN: 978-0-323-35884-2.
- Tome-Carneiro, J., Visioli, F. 2016. Polyphenol-based nutraceuticals for the prevention and treatment of cardiovascular disease: Review of human evidence. *Phytomedicine*, 23.11: 1145-1174.
- Torbica, A., Hadnađev, M., Dapčević, T. 2010. Rheological, textural and sensory properties of gluten-free bread formulations based on rice and buckwheat flour. *Food Hydrocolloids*, 24.6-7: 626-632.
- Tresserra-Rimbau, A., Arranz, S., Vallverdu-Queralt, A. 2017. New insights into the benefits of polyphenols in chronic diseases. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*.



- Troszyńska, A., Narolewska, O., Robredo, S., Estrella, I., Hernández, T., Lamparski, G., Amarowicz, R. 2010. The effect of polysaccharides on the astringency induced by phenolic compounds. *Food Quality and Preference*, 21.5: 463-469.
- Tsao, R. 2010. Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients*, 2.12: 1231-1246.
- Tsao, R., Deng, Z. 2004. Separation procedures for naturally occurring antioxidant phytochemicals. *Journal of Chromatography B*, 812.1-2: 85-99.
- Tseng, A., Zhao, Y. 2013. Wine grape pomace as antioxidant dietary fibre for enhancing nutritional value and improving storability of yogurt and salad dressing. *Food Chemistry*, 138.1: 356-365.
- Velíšek, J., Hajšlová, J. (eds.). 2009. *Chemie potravin 2*. 3. vydání. Tábor: Osis, 623 s. ISBN 978-80-86659-16-9.
- Vicente, S.J.V., Sampaio, G.R., Ferrari, C.K.B., Torres, E.A.F.S. 2012. Oxidation of cholesterol in foods and its importance for human health. *Food Reviews International*, 28.1: 47-70.
- Vogrincic, M., Timoracka, M., Melichacova, S., Vollmannova, A., Kreft, I. 2010. Degradation of rutin and polyphenols during the preparation of tartary buckwheat bread. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58.8: 4883-4887.
- Wang, T.-Y., Li, Q., Bi, K.-S. 2018. Bioactive flavonoids in medicinal plants: Structure, activity and biological fate. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 13.1: 12-23.
- Wei, X., Zhuang, L., Wu, C., Chen, W., Li, Z., Xu, B. 2016. Rapid determination of trace EDTA in wines and beers by LC-MS/MS. *LWT - Food Science and Technology*, 72: 485-491.
- Williamson, G. 2017. The role of polyphenols in modern nutrition. *Nutrition Bulletin*, 42.3: 226-235.
- Wu, X., Gu, L., Prior, R.L., McKay, S. 2004. Characterization of anthocyanins and proanthocyanidins in some cultivars of ribes, aronia, and sambucus and their antioxidant capacity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52.26: 7846-7856.
- Xie, J., Van Alstyne, P., Uhlir, A., Yang, X. 2017. A review on rosemary as a natural antioxidation solution. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 119.6: 1600439.
- Xu, L., Zhu, M.-J., Liu, X.-M., Cheng, J.-R. 2018. Inhibitory effect of mulberry (*Morus alba*) polyphenol on the lipid and protein oxidation of dried minced pork slices during heat processing and storage. *LWT – Food Science and Technology*, 91: 222-228.
- Zamora-Ros, R., Cayssials, V., Scalbert, A. 2018. Dietary intake of total polyphenol and polyphenol classes and the risk of colorectal cancer in the European Prospective

- Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) cohort. *European Journal of Epidemiology*, 33.11: 1063-1075.
- Zhang, H., Kong, B., Xiong, L.Y., Sun, X. 2009. Antimicrobial activities of spice extracts against pathogenic and spoilage bacteria in modified atmosphere packaged fresh pork and vacuum packaged ham slices stored at 4 °C. *Meat Science*, 81.4: 686-692.
- Zhang, J., Jinnai, S., Ikeda, R., Wada, M., Hayashida, S., Nakashima, K. 2009. A simple HPLC-fluorescence method for quantitation of curcuminoids and its application to turmeric products. *Analytical Sciences*, 25.3: 385-388.
- Zhang, J., Wen, C., Zhang, H., Duan, Y., Ma, H. 2020. Recent advances in the extraction of bioactive compounds with subcritical water: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 95: 183-195.
- Zhang, Y.-Y., Thakur, K., Wei, C.-K., Wang, H., Zhang, J.-G., Wei, Z.-J. 2019. Evaluation of inhibitory activity of natural plant polyphenols on soybean lipoxygenase by UFLC-mass spectrometry. *South African Journal of Botany*, 120: 179-185.
- Zuo, W., Hu, X., Yang, Y., Jiang, L., Ren, L., Huang, H. 2017. Development of an improved method to determine saturated aliphatic aldehydes in docosahexaenoic acid-rich oil: A supplement to p-anisidine value. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 119.12: 1700243.

## 10 SEZNAM TABULEK, GRAFŮ A OBRÁZKŮ

### Obrázky

Obrázek 1. Schématické rozdělení antioxidantů. ....	10
Obrázek 2. Schématické zobrazení antioxidačního účinku disodno draselné soli ethylendiamintetraoctové kyseliny.....	12
Obrázek 3. Rozdělení polyfenolických antioxidantů. ....	14
Obrázek 4. Chemické struktury polyfenolických antioxidantů.....	16
Obrázek 5. Chemická struktura flavanu, základní stavební jednotky flavonoidů.....	17
Obrázek 6. Schématické zobrazení antioxidačního účinku kvercetinu.....	18
Obrázek 7. Cibulové slupky.....	26
Obrázek 8. Polyfenoly jako chelatační činidla.....	30
Obrázek 9. Identifikace koeluovaných látek v džemu z hlohu peřenoklaného (Crataegus pinnatifida Bunge) pomocí HPLC-MS/MS. ....	43
Obrázek 10. Schéma třídění cibulí a odběr čistých slupek. ....	49
Obrázek 11. Výluhy z cibulových slupek žluté odrůdy Hybelle (vlevo) a červené odrůdy Lisa (vpravo). ....	72
Obrázek 12. Karbanátky s 10 % a 20 % vodných výluhů ze žlutých (Ž) a červených (Č) cibulových slupek. ....	73
Obrázek 13. Mouka z červených cibulových slupek odrůdy Lisa. ....	84
Obrázek 14. Strukturní vzorce studovaných látek (zdroj: Ly et al. 2005). ....	86
Obrázek 15. Bezlepkové chleby vyrobené během experimentu. ....	87
Obrázek 16. Mouka ze žlutých cibulových slupek odrůdy Hybelle. ....	100
Obrázek 17. Klobásy ze strojně odděleného rybího masa s různým podílem cibulových slupek žluté odrůdy Hybelle.....	101

## **Grafy**

Graf 1. Roční světová produkce cibule kuchyňské v letech 1998 až 2018.....	26
Graf 2. Antioxidační aktivita (DPPH) rybích filetů ošetřených rozmarýnovým extraktem.....	54
Graf 3. Antioxidační aktivita (metodou DPPH) a obsah celkových polyfenolů ve vodných extraktech cibulových slupek žluté odrůdy Hybelle. ....	71
Graf 4. Antioxidační aktivita (DPPH) chlebů s přidanými výluhy z cibulových slupek žluté odrůdy (Ž) Hybelle a červené odrůdy (Č) Lisa. ....	83
Graf 5. Změny tvrdosti střídy bezlepkových chlebů během třídenního skladování. ....	88

## **Tabulky**

Tabulka 1. Příklady reaktivních kyslíkových a dusíkových forem.....	20
Tabulka 2. Zdroje a příklady vybraných polyfenolů v potravinách a jejich přibližný obsah.....	22
Tabulka 3. Příklady fortifikace potravin surovinami bohatými na polyfenoly.....	35
Tabulka 4. Aplikace různých forem obohacující složky do potravin. ....	50
Tabulka 5. Přehled provedených analýz u forem cibulových slupek a fortifikovaných potravin.....	51

## 11 PROHLÁŠENÍ SPOLUAUTORŮ

Všichni níže uvedení spoluautoři prohlašují, že se Ing. Jan Bedrníček významnou měrou podílel na publikacích uvedených v této disertační práci. Souhlas jednotlivých autorů byl elektronickou formou zaslán školiteli specialistovi doc. Ing. Pavlu Smetanovi, Ph.D. a byl ověřen předsedou oborové rady Zoohygiena a prevence chorob hospodářských zvířat, doktorského studijního programu Zootechnika, Zemědělské fakulty Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích prof. Ing. Janem Trávníčkem, CSc.

doc. Ing. Jan Bárta, Ph.D.

prof. Ing. Milan Pešek, CSc.

doc. Ing. Veronika Bártová, Ph.D.

Ing. et Ing. Lenka Pecová

Ing. Petr Dvořák, Ph.D.

doc. Ing. Eva Samková, Ph.D.

doc. MVDr. Lucie Hasoňová, Ph.D.

Mgr. Jan Schuster, Ph.D.

Dr. Ing. Jaromír Kadlec

doc. Ing. Pavel Smetana, Ph.D.

Ing. Robert Kala, Ph.D.

prof. Dr. Sonja Smole Možina

Ing. Klára Koubová

Ing. Karolína Straková

Ing. Veronika Lafatová

prof. Ing. Jan Tříška, CSc.

Ing. Ivana Laknerová

doc. Ing. František Vácha, CSc.

Ing. Zuzana Linhartová, Ph.D.

RNDr. Naděžda Vrchotová, CSc.

Ing. Roman Lunda

Ing. Renata Winterová

doc. Ing. Jan Mráz, Ph.D.

V zastoupení všech spoluautorů:

.....

doc. Ing. Pavel Smetana, Ph.D.

Ověřil:

.....

prof. Ing. Jan Trávníček, CSc.

## 12 PŘÍLOHY

### 12.1 PUBLIKACE V ČASOPISE S IMPAKT FAKTOREM

Linhartová, Z., Lunda, R., Dvořák, P., Bárta, J., Bártová, V., Kadlec, J., Samková, E., **Bedrníček, J.**, Pešek, M., Laknerová, I., Smole-Možina, S., Smetana, P., Mráz, J. (2019): Influence of rosemary extract (*Rosmarinus officinalis*) to extend the shelf life of vacuum-packed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fillets stored under refrigerated conditions. *Aquaculture International*, 27.3: 883-847.

**Bedrníček, J.**, Laknerová, I., Linhartová, Z., Kadlec, J., Samková, E., Bárta, J., Bártová, V., Mráz, J., Pešek, M., Winterová, R., Vrchotová, N., Tříška, J., Smetana, P. 2019. Onion waste as a rich source of antioxidants for meat products. *Czech Journal of Food Sciences*, 37: 268-275.

**Bedrníček, J.**, Jirotková, D., Kadlec, J., Laknerová, I., Vrchotová, N., Tříška, J., Samková, E., Smetana, P. 2020. Thermal stability and bioavailability of bioactive compounds after baking of bread enriched with different onion by-products. *Food Chemistry*, 319, 126562.

### 12.2 PUBLIKACE V RECENZOVANÝCH ČASOPISECH

**Bedrníček, J.**, Samková, E., Smetana, P. 2017. Možnosti zvyšování obsahu antioxidantů a antioxidační aktivity masných výrobků přírodními látkami. *Maso*, 28: 41-44.

Samková, E., Hasoňová, L., Lafatová, V., Kala, R., **Bedrníček, J.** 2017. Hodnocení vybraných tavených plátkových sýrů a analogových výrobků mladými spotřebiteli. *Mlékařské listy - Zpravodaj*, 28: 9-12.

Laknerová, I., Winterová, R., **Bedrníček, J.**, Smetana, P. 2017. Hodnocení antioxidační aktivity a obsahu celkových polyfenolů ve vybraných luštěninách. *Úroda*, 12:559-562.

Pešek, M., Schuster, J., Bárta, J., Bártová, V., Kadlec, J., **Bedrníček, J.**, Samková, E., Mráz, J., Linhartová, Z., Laknerová, I., Smetana, P. 2017. Co bychom měli vědět o volných radikálech a antioxidantech (nejen v masných výrobcích). *Maso*, 7:47-50.

**Bedrníček, J.**, Jirotková, D., Smetana, P., Samková, E., Laknerová, I. 2018. Sledování fyzikálně chemických a senzorických parametrů v průběhu skladování loveckého salámu v závislosti na způsobu balení. *Maso*, 5:37-42.

Samková, E., Hasoňová, L., Straková, K., Koubová, K., Pecová, L., **Bedrníček, J.** 2018. Vliv obsahu v sušině na senzorické hodnocení sýrů eidamského typu. *Mlékařské listy – Zpravodaj*, 29.2 :5-7.

### 12.3 PŘÍSPĚVKY NA KONFERENCÍCH A VE SBORNÍCÍCH

**Bedrníček, J.,** Laknerová, I. Samková E., Smetana P. 2017. Možnosti zvyšování obsahu přírodních antioxidantů v masných výrobcích. In: *Hygiena Alimentorum XXXVIII: Bezpečnosť mäsa a mäsových výrobkov v hľadani tradičnej kvality*. Košice: Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, s. 51-54. ISBN 978-80-8077-533-9. (príspevek ve sborníku + prednáška)

**Bedrníček, J.;** Smetana, P. Možnosti zvyšování obsahu antioxidantů a antioxidační aktivity masných výrobků přírodními látkami. 2017. In: *Ingrovy dny*. Brno: Mendelova univerzita v Brně, s. 39-45. ISBN 978-80-7509-479-6. (príspevek ve sborníku)

**Bedrníček, J.,** Samková, E., Smetana, P., Kadlec, J., Bárta, J., Bártová, V., Kolek, J., Mráz, J., Laknerová, I., Pešek, M. 2018. Odpadní produkty cibule kuchyňské jako zdroj antioxidantů v masných výrobcích. In: *Bezpečnosť a kontrola potravín*. Nitra: Slovenská poľnohospodárska univerzita, s. 126-131. ISBN: 978-80-552-1813-7. (príspevek ve sborníku + prednáška)

Straková, K., Hasoňová, L., Koubová, K., Pecová, L., **Bedrníček, J.,** Samková, E. 2018. Senzorické hodnocení polotvrdých sýrů o různé tučnosti v závislosti na pohlaví. In: *Ingrovy dny*. Brno: Mendelova univerzita v Brně, s. 198-204. ISBN 978-80-7509-542-8. (príspevek ve sborníku)

**Bedrníček, J.,** Jirotková, D., Samková, E., Smetana, P., Kadlec, J., Bárta, J., Bártová, V., Kolek, J., Mráz, J., Laknerová, I., Pešek, M. 2018. Sledování kvalitativních ukazatelů loveckého salámu během skladování. In: *Ingrovy Dny*. Brno: Mendelova univerzita v Brně, s. 82-88. ISBN 978-80-7509-542-8. (príspevek ve sborníku)

### 12.4 KAPITOLA V KNIZE

**Bedrníček, J.** 2017. Odpadní produkty cibule kuchyňské (*Allium cepa* L.): potenciální zdroj biologicky aktivních látek pro potravinářství. s. 177-200. In: Pešek, M., Smetana, P. (eds.). *Dietární antioxidanty v praxi*. Polypress s.r.o., Karlovy Vary, 200 s. ISBN 978-80-7394-681-4.

**Bedrníček, J.** 2018. Wasteproducts of onion (*Allium cepa* L.): potential source of biologically active substances for foodstuffs. s. 177-198. In: Pešek, M., Smetana, P. (eds.). *Dietary antioxidants in practise*. Typodesign s.r.o., České Budějovice, 198 s. ISBN 978-80-7394-708-8.

## 12.5 APLIKOVANÉ VÝSLEDKY

Smetana, P., Kadlec, J., Bártová, V., Samková, E., Bárta, J., Pešek, M., Mráz, J., Linhartová, Z., **Bedrníček, J.**, Laknerová, I., Auský, J., Nodes, R., Karda, K. 2017. Suchá směs s obsahem antioxidantů pro obohacení zejména pekařských nebo masných výrobků a pekařský a masný výrobek obohacený touto směsí. UV 31210

Auský, J., Smetana, P., Kadlec, J., Bártová, V., Samková, E., Bárta, J., Pešek, M., Mráz, J., Jirotková, D., **Bedrníček, J.**, Laknerová, I., Nodes, R., Karda, K. 2018. Antioxidační složka pro obohacení zejména pekařských nebo masných nebo mléčných výrobků a pekařský, masný a mléčný výrobek obohacený touto složkou. UV 32058.

Jirotková, D., **Bedrníček, J.**, Smetana, P., Kadlec, J. 2018. Bezlepkové fermentované pečivo obohacené flavonoidy. UV 31813.

**Bedrníček, J.**, Smetana, P., Kadlec, J., Mráz, J., Samková, E., Vácha, F., Jirotková, D., Laknerová, I., Karda, K. 2018. Masný výrobek s obsahem biologicky aktivní složky. UV 32395.

Jirotková D., **Bedrníček J.** 2019. Směs pro přípravu bezlepkové cukrářské pálené hmoty. UV 32901.