

1

2010



Vedecký časopis pre potravinárstvo

číslo

[www.potravinarstvo.com](http://www.potravinarstvo.com)

ročník 4  
číslo 1  
január 2010

potravinárstvo 1 (4)  
ISSN 1338-0230 (tlačená verzia)  
ISSN 1337-0960 (elektronická verzia)

## Potravinárstvo

### Vedecký časopis pre potravinárstvo

**Šéfredaktor:**

Ing. Peter Zajác, PhD.  
SPU Nitra

**Zástupca šéf redaktora:**

doc. Ing. Jozef Golian, Dr.,  
SPU Nitra

**Redaktori:**

Ing. Radoslav Židek, PhD.,  
Ing. Jozef Čapla,  
Ing. Vladimír Vietoris, PhD.  
SPU Nitra

**Predseda redakčnej rady:**

doc. Ing. Jozef Golian, Dr.,  
SPU Nitra

**Redakčná rada**

doc. MVDr. Bohuslava Tremlová, PhD.,  
VFU Brno  
prof. Ing. Stanislav Kráčmar, DrSc.,  
UTB Zlín  
prof. MVDr. Jozef Nagy, PhD.,  
UVL Košice  
doc. Ing. Jolana Karovičová, CSc.,  
STU Bratislava  
doc. Ing. Róbert Toman, Dr.,  
SPU Nitra  
prof. Dr. Teresa Fortuna, DSc.,  
UA Krakow, Poľsko  
prof. Tadeusz Trziszka, Ph.D., DSc.,  
Wrocław, Poľsko  
Ing. Roman Labuda, PhD.,  
Tuln, Rakúsko  
Ing. Zuzana Bírošová, CSc.,  
Ministerstvo pôdohospodárstva SR

## Potravinárstvo

### Scientific journal of food science

**Editor:**

Peter Zajác  
SUA Nitra

**Deputy of Editor:**

Jozef Golian  
SUA Nitra

**Sub-Editor:**

Radoslav Židek,  
Jozef Čapla,  
Vladimír Vietoris  
SUA Nitra

**Chairman, Editorial Board:**

Jozef Golian,  
SUA Nitra

**Editorial Board:**

Bohuslava Tremlová,  
UVPS Brno, Czech Republic  
Stanislav Kráčmar,  
TBU Zlín, Czech Republic  
Jozef Nagy,  
UVM Košice, Slovakia  
Jolana Karovičová,  
SUT Bratislava, Slovakia  
Róbert Toman,  
SUA Nitra, Slovakia  
Teresa Fortuna,  
UA Krakow, Poland  
Tadeusz Trziszka,  
Wrocław, Poland  
Roman Labuda,  
Tuln, Austria  
Zuzana Bírošová,  
Ministry of Agriculture SR

• **Potravinárstvo**® • **Ročník:** 4, č. 1/2010 • Vedecký časopis pre potravinárstvo • Scientific journal of food science • **Vydavateľ:** Ing. Peter Zajác, HACCP Consulting. Slivková 12, 951 01 Nitrianske Hrnčiarovce. Vydavateľ úzko spolupracuje s Katedrou hygieny a bezpečnosti potravín, FBP, SPU v Nitre • **Nakladateľ:** Združenie HACCP Consulting. Slivková 12, 951 01 Nitrianske Hrnčiarovce • **Periodicita:** vychádza 4x do roka • **Internetová stránka časopisu:** www.potravinarstvo.com • **Adresa redakcie:** Slivková 12, 951 01 Nitrianske Hrnčiarovce • **E-mail:** info@potravinarstvo.com • **Tel.:** +421908164361, +421904138562 • **Jazyková úprava:** Publikované články neprešli jazykovou úpravou • **Grafická úprava:** Flame-studio Nitra • **Tlač:** SPU Nitra • **Cena čísla:** nepredajné • **Distribuuje:** Združenie HACCP Consulting • **Náklad:** 150 ks • **Miesto vydania:** Nitra • **Právne informácie a autorské práva:** Za obsah jednotlivých článkov zodpovedajú autori. Za obsah inzerátov zodpovedajú inzerenti • Časopis je excerptovaný do medzinárodného systému AGRIS FAO.

Všetky práva vyhradené, © 2010 Potravinárstvo®  
Evidenčné číslo Ministerstva kultúry SR: 3771/09  
ISSN 1338-0230 (tlačná verzia)  
ISSN 1337-0960 (elektronická verzia)



Katedra hygieny a bezpečnosti  
potravín



## VÝSKYT TOXINOGENNÝCH DRUHOV RODU *PENICILLIUM* V PŠENICI SLOVENSKEHO PÔVODU Z ÚRODY 2008 A ICH MOŽNÝ VPLYV NA ZDRAVIE KONZUMENTA

### INCIDENCE OF TOXIGENIC *PENICILLIUM* IN WHEAT GRAINS OF SLOVAK ORIGIN AND THEIR POTENTIAL IMPACT ON CONSUMER HEALTH

Zuzana Barboráková, Soňa Felšöciová, Dana Tančinová, Mária Dovičičová, Zuzana Mašková, Roman Labuda

#### ABSTRACT

The aim of this study was to monitor potentially toxigenic *Penicillium* species in wheat grains (*Triticum aestivum* L.) of Slovak origin harvested in the year 2008, and also to test the recovered strains by thin layer chromatography (TLC) for their ability to produce selected mycotoxins *in vitro* – citrinin, griseofulvin, cyclopiazonic acid, ochratoxin A, penitrem A, patulin and roquefortin C. A total of 21 samples representing the west, east and central regions of Slovakia were analysed. The *Penicilia* were present in 20 samples (95.2 %). A total of 323 isolates of *Penicillium* genus were recovered. Selected isolates (97) of potentially toxigenic *Penicillium* species were tested for production of mycotoxins *in vitro*. Out of all the strains tested, production ability of at least a single mycotoxin was noted in 53 (54.6 %) strains. Ten representatives of *Penicillium* (97 isolates) were tested for their ability to produce selected mycotoxins: *P. coprophilum*, *P. griseofulvum*, *P. chrysogenum*, *P. roqueforti*, *P. carneum*, *P. crustosum*, *P. oxalicum*, *P. hordei*, *P. verrucosum* and *P. citrinum*. They were found to produce roquefortin C (48.3 %), griseofulvin (63.6 %), patulin (77.8 %), citrinin (60 %), cyclopiazonic acid (71.4 %) and penitrem A (75 %). None of the tested isolates produced ochratoxin A.

**Keywords:** wheat, mycotoxin, *Penicillium*, toxigenic strain, thin layer chromatography

#### ÚVOD

Pšenica je celosvetovo jedna z najdôležitejších obilnín a má nezastupiteľné miesto vo výžive človeka. Obilné zrná môžu byť už počas rastu kontaminované širokým spektrom vláknitých mikroskopických húb (Scudamore, 2005). Rovnako neadekvátne skladovanie a manipulácia môže spôsobiť stratu ich kvality, ktorá sa prejavuje zvýšenou mykotickou kontamináciou a prítomnosťou hmyzu, zníženou klíčivosťou zŕn, viditeľnou hnilobou, stratou farby, nežiaducim zápachom, zvýšenou teplotou, chemickými i nutričnými zmenami (Lacey et al., 1991).

Zatiaľ čo druhy rodu *Fusarium*, patria medzi patogénne rastlín a produkujú mykotoxíny predovšetkým pred alebo bezprostredne po žatve, druhy rodov *Aspergillus* a *Penicillium* kontaminujú komodity najmä počas sušenia a skladovania (Pitt et al., 2000).

Problematike mykotickej kontaminácie obilnín a produkcie mykotoxínov sa celosvetovo venuje veľká pozornosť (Pitt a Hocking, 1997). Mikromycéty produkujú mykotoxíny, ktoré sú ich sekundárnymi metabolitmi a môžu byť príčinou vzniku akútnych alebo chronických ochorení u ľudí, ak sú prijímané kontaminovanými potravinami (Maribeth et al., 2005). Medzi najvýznamnejšie mykotoxíny produkované rodom *Penicillium* patria: citrinín, patulín, ochratoxín A, penitrém A, kyselina penicilová, kyselina cyklopiazonová, roquefortín C a griseofulvín.

#### MATERIÁL A METODIKA

V rokoch 2008/09 bolo celkovo vyšetrených 21 vzoriek pšenice letnej formy ozimnej (*Triticum aestivum* L.), ktoré

pochádzali z úrody z roku 2008 a boli odobraté po ich naskladnení z veľkokapacitných síl.

*Stanovenie povrchovej kontaminácie a endogénnej mykocenózy*

Na stanovenie povrchovej kontaminácie sa použila platňová zriedovacia metóda. Ako živné médiá boli použité DRBC (agar s dichloranom, bengálskou červenou a chloramfenikolom; Merck, Nemecko) a MEA (agar so sladínovým extraktom; Samson et al., 2002). Na očkovaní médií sa použili riedenia  $10^{-1}$  až  $10^{-3}$  v troch opakovaniach. Endogénna mykocenóza bola zistená priamou kultiváciou 100 kusov povrchovo vysterilizovaných zŕn (0,4 % roztok chloramínu, 2 min.; Samson et al., 2002) na DRBC a DYSG (agar s dichloranom, chloramfenikolom, kvasničným extraktom, sacharózou a glycerolom; Lund et Frisvad, 2003) agaroch. Kultivácia prebiehala 7 dní pri teplote  $25 \pm 1$  °C v tme.

*Identifikácia izolátov*

Vyizolované peniciliá boli preočkované na MEA, CYA (Czapkov agar s kvasničným extraktom; Samson et al., 2002), YES (agar s kvasničným extraktom a sacharózou; Samson et al., 2002) a CREA (agar s kreatínom a sacharózou; Samson et al., 2002). Kultivácia prebiehala 7 - 14 dní pri teplote  $25 \pm 1$  °C (u niektorých druhov aj pri teplote  $37 \pm 1$  °C), v tme. Druhovú identifikáciu bola vykonaná na základe kultivačných a mikromorfologických znakov podľa kľúčov: Samson et Frisvad, 2004; Pitt, 1979; Raper et Thom, 1949.

*Stanovenie toxinogenity*

Reprezentatívne izoláty boli testované *in vitro* na produkciu hlavných mykotoxínov metódou TLC podľa Samson et al. (2002), modifikovanou Labudom et

**Tančinovou (2006).** Kultivácia pre skrining kyseliny cyklopiazonovej, penitrému A a roquefortínu C prebiehala na CYA, pre skrining citrinínu, ochratoxínu A, grizeofulvínu a patulínu na YES 14 dní v tme pri teplote  $25 \pm 1$  °C. Z kolónií boli vyrezané spolu s kultivačným médiom 3 výseky, každý s plochou približne 5 x 5 mm. Výseky boli extrahované 5 min v 500 µl roztoku chloroform:metanol (2:1) vo Vortexe. Tekuté fázy metabolických extraktov jednotlivých izolátov a štandardy skrínovaných mykotoxínov boli nanosené v množstvách 5 µl na chromatografickú platňu a následne vyvíjané v chromatografickej sústave TEF (toluén, etylacetát, kyselina mravčia 5:4:1).

Vizualizácia ochratoxínu A (modrozelená škvrna), grizeofulvínu (modrá škvrna) a citrinínu (žltozelená škvrna s chvostom) prebiehala priamo pod UV svetlom (365 nm), vizualizácia kyseliny cyklopiazonovej pod denným rozptýleným svetlom po nanosení Ehrlichovho činidla (fialová škvrna s chvostom). Patulín bol viditeľný na dennom svetle po postriekaní platne 0,5 % roztokom MBTH (3-metyl-2benzotiazolióňhydrazón hydrochlorid) v metanole a následnom zahriatí na 130 °C na 8 min ako žltoranžová škvrna. Penitrém A bol viditeľný po nanosení 20 %  $AlCl_3$  v 60 % etanole a zahriatí na 130 °C na 8 minút ako tmavozelená až čierna škvrna a roquefortín C po nanosení  $Cu(SO_4)_2 \cdot 4H_2O$  ako oranžová škvrna.

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

V rokoch 2008/09 bolo celkovo mykologicky vyšetrených 21 vzoriek pšenice letnej formy ozimnej (*Triticum aestivum* L.). Zástupcovia rodu *Penicillium* sa vyskytovali v 20 vzorkách, v jednej vzorke (Trenčiansky kraj, Beluša) sa výskyt rodu nezaznamenal. Celkom bolo vyizolovaných 323 izolátov penicilií z endogénnej i povrchovej kontaminácie. Z uvedeného počtu bolo vybraných 97 izolátov potenciálne toxigénnych druhov, ktoré boli následne otestované TLC metódou na produkciu mykotoxínov: citrinín, grizeofulvín, kyselina cyklopiazonová, ochratoxín A, penitrém A, patulín a roquefortín C. Počas tejto štúdie sa zistilo, že 53 izolátov (t.j. 54,6 %) produkovalo v podmienkach *in vitro* minimálne jeden mykotoxín. Prehľad o testovaných izolátoch uvádzame v tabuľke 1.

Na produkciu citrinínu sa testovalo 6 izolátov, pričom 3 z nich (50 %) boli produkčné. Citrinín produkoval 1 izolát *P. verrucosum* a 2 izoláty *P. citrinum*. Citrinín je nefrotoxický, embryotoxický, teratogénny a genotoxický mykotoxín (Scott, 2004). Často sa spája s ochorením, ktoré vzniká nadmernou konzumáciou tzv. "žltej ryže" v Japonsku (Saito et al., 1971).

Samson et Frisvad (2004) uvádzajú, že hlavným producentom grizeofulvínu je *P. griseofulvum*, čo sa zhoduje s našim zistením. Grizeofulvín produkovalo všetkých 7 testovaných izolátov *P. griseofulvum* a ani jeden testovaný izolát *P. coprophilum*. Grizeofulvín sa bežne považuje za antibiotikum. Má veľký význam pri kutánných infekciách zvierat a človeka zapríčinených dermatofytickými hubami. Pôsobí ako mitotický inhibítor deliacich sa buniek, napr. v kostnej dreni, črevnom epiteli a tumoroch (Pitt et Leistner, 1991).

*P. griseofulvum* je tiež potenciálnym producentom kyseliny cyklopiazonovej. V našej štúdii kyselinu

cyklopiazonovú produkovalo 5 izolátov zo 7 testovaných (71,4 %). Všetky izoláty patrili do druhu *P. griseofulvum*. Kyselina cyklopiazonová je silný mykotoxín, ktorý vo vysokých koncentráciách spôsobuje ohniskové nekrózy vnútorných orgánov stavovcov (Jand et al., 2005). Môže spôsobovať patologické zmeny v pečeni, slezine, obličkách, v myokarde a na pankrease (Votava et al., 2003).

**Tabuľka 1:** Prehľad testovaných a pozitívnych izolátov penicilií

Izolát	Testovaný mykotoxín	Počet testovaných izolátov	Počet pozitívnych izolátov
<i>P. coprophilum</i>	RC	4	3
<i>P. griseofulvum</i>		7	3
<i>P. chrysogenum</i>		36	15
<i>P. roqueforti</i>		2	2
<i>P. carneum</i>		1	1
<i>P. crustosum</i>		3	3
<i>P. oxalicum</i>		1	1
<i>P. hordei</i>		4	0
<i>P. griseofulvum</i>		G	7
<i>P. coprophilum</i>	4		0
<i>P. coprophilum</i>	P	1	1
<i>P. griseofulvum</i>		7	6
<i>P. carneum</i>		1	0
<i>P. verrucosum</i>	C	2	1
<i>P. citrinum</i>		4	2
<i>P. verrucosum</i>	OTA	2	0
<i>P. griseofulvum</i>	CPA	7	5
<i>P. crustosum</i>	PA	3	3
<i>P. carneum</i>		1	0

Použité skratky:

RC – roquefortín C, G – grizeofulvín, P – patulín, C – citrinín, OTA – ochratoxín A, CPA – kyselina cyklopiazonová, PA – penitrém A

Hlavným producentom ochratoxínu A je na obilí v podmienkach mierneho klimatického pásma *P. verrucosum* (Pitt, 1987). Tento mykotoxín neprodukoval žiaden z našich dvoch testovaných izolátov. Ochratoxín A je evidovaný ako pravdepodobný ľudský karcinogén zaradený do triedy 2B (JECFA, 2001) vyznačujúci sa nefrotoxickým účinkom.

Penitrém A produkovali 3 testované izoláty *P. crustosum*, izolát *P. carneum* tento mykotoxín neprodukoval. Penitrém A predstavuje silný neurotoxín a je to pravdepodobne najtoxickejšia látka, ktorá je produkovaná peniciliami z podrodu *Penicillium* (Pitt, 1979; Frisvad et Filtenborg, 1989).

Na produkciu patulínu bolo testovaných 9 izolátov, z toho 7 bolo produkčných (77,8 %). Uvedený mykotoxín produkovalo 6 izolátov *P. griseofulvum* a 1 izolát *P. coprophilum*. Hlavný efekt patulínu je antibakteriálny, do istej miery tiež antimykotický, významná je ale i jeho cytotoxicita, karcinogenita a antimitotický účinok voči bunkám cicavcov (Votava et al., 2003).

Z 58 izolátov testovaných na produkciu roquefortínu C produkovalo tento mykotoxín 28 (48,3 %): *P. coprophilum* (3), *P. griseofulvum* (3), *P. chrysogenum* (15), *P.*

*roqueforti* (2), *P. carneum* (1), *P. crustosum* (3), *P. oxalicum* (1). Akútna toxicita roquefortínu C nie je veľmi vysoká, ale je považovaný za neurotoxín (Dijksterhuis et Samson, 2007).

## ZÁVER

V rokoch 2008/09 bolo celkovo mykologicky vyšetrených 21 vzoriek pšenice z úrody roku 2008 pochádzajúcich zo všetkých krajov západného, stredného a východného Slovenska. V 20 vzorkách (95,2 %) bol zaznamenaný výskyt penicílií. Celkovo bolo vyzolovaných 323 izolátov tohto rodu. Vybrané izoláty potenciálne toxigénnych druhov v počte 97 boli otestované na produkciu mykotoxínov metódou TLC v podmienkach *in vitro*. Z celkového počtu otestovaných izolátov až 53, t.j. 54,6 % produkovalo minimálne jeden mykotoxín. Na schopnosť produkovať vybrané mykotoxíny bolo testovaných 10 druhov penicílií: *P. coprophilum*, *P. griseofulvum*, *P. chrysogenum*, *P. roqueforti*, *P. carneum*, *P. crustosum*, *P. oxalicum*, *P. hordei*, *P. verrucosum* a *P. citrinum*. Zistili sme producentov roquefortínu C (48,3 %), grizeofulvínu (63,6 %), patulínu (77,8 %), citrinínu (60 %), kyseliny cyklopiazonovej (71,4 %) a penitrému A (75 %). Žiaden z testovaných izolátov neprodukoval ochratoxín A. Najčastejšie testovaným druhom bolo *P. chrysogenum*, potenciálny producent roquefortínu C. Z 36 testovaných izolátov *P. chrysogenum* produkovalo tento mykotoxín 15 izolátov. Táto štúdia priniesla nové poznatky o výskyte potenciálne toxigénnych druhov penicílií v zrnách pšenice letnej formy ozimnej (*Triticum aestivum* L.). Cieľom štúdie bolo poukázať na nebezpečenstvo výskytu toxigénnych druhov penicílií v pšenici slovenského pôvodu.

## LITERATÚRA

- DIJKSTERHUIS, J., SAMSON, R. A., 2007. *Food Mycology & Multifaceted Approach to Fungi and Food*. Boca Raton : CRC Press Taylor & Francis Group, 2007, 403 s. ISBN 0-8493-9818-5.
- FRISVAD, J. C., FILTENBORG, O., 1989. Terverticilate penicillia: chemotaxonomy and mycotoxin production. In J. W. DeVries, M. W. Trucksess, L. S. Jackson (ed.), *Mycotoxins and Food Safety*. New York : Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2002, 295 s. ISBN 0-3064-6780-1.
- JAND, S. K., KAUR, P., SHARMA, N. S., 2005. Mycoses and mycotoxicosis in poultry. In *Ind. J. Anim. Sci.*, roč. 75, 2005, s. 465-476.
- JECFA (JOINT FAO/WHO Expert Committee on Food Additives), 2001. *Safety Evaluation of Certain Mycotoxins in Food*. Prepared by the Fifty-sixth meeting of the JECFA, FAO Food and Nutrition Paper 74, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy.
- LACEY, J., RAMAKRISHNA, N., HAMER, A., MAGAN, N., MATFLEET, C., 1991. Grain fungi. In D. K. Arora, K. G. Mukerji, E. H. Marth (ed.) *Handbook of Applied Mycology: foods and feeds*. New York : Marcel Decker.
- LUND, F., FRISVAD, J. C., 2003. *Penicillium verrucosum* in wheat and barley indicates presence of ochratoxín A. In *J. Appl. Microbiol.*, roč. 95, 2003, s. 117-123.
- PITT, J. I., 1979. *Penicillium crustosum* and *Penicillium simplicissimum*, the correct names for two common species

producing tremorgenic mycotoxins. In J. W. DeVries, M. W. Trucksess, L. S. Jackson (ed.), *Mycotoxins and Food Safety*. New York : Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2002, 295 s. ISBN 0-3064-6780-1.

PITT, J. I., 1987. *Penicillium viridicatum*, *Penicillium verrucosum* and production of ochratoxín A. In *Appl Environ Microbiol.*, roč. 53, 1987, s. 266-269.

PITT, J. I., LEISTNER, L., 1991. Toxigenic *Penicillium* species. In D. Tančinová (ed.), *Vláknité mikroskopické huby a kvalita krmív* (habilitačná práca), Nitra, 2004, 100 s.

PITT, J. I., HOCKING, A. D., 1997. *Fungi and food spoilage*. 2nd ed. London : Blackie Academic & Professional, 1997, 593 s. ISBN 0-8342-1306-0.

PITT, J. I., BASÍLICO, J. C., ABARCA M. L., LÓPEZ, C., 2000. Mycotoxins and toxigenic fungi. In *Medical Mycology*, roč. 39, 2000, Supplement I., s. 41-46.

RAPER, K. B., THOM, CH., 1949. *A Manual of the Penicillia*. Baltimore : Williams and Wilkins, 1949, 875 s.

SAMSON, R. A., HOEKSTRA, E. S., LUND, F., FILTENBORG, O., FRISVAD, J. C., 2002. Method for the detection, isolation and characterisation of food-borne fungi. In R. A. Samson, E. S. Hoekstra, J. C. Frisvad, O. Filtenborg (ed.), *Introduction to food- and airborne fungi*. Utrecht : Centraalbureau voor Schimmelcultures, 2002, s. 283-297.

SAMSON, R. A., FRISVAD, J. C., 2004. *Penicillium subgenus Penicillium: new taxonomic schemes and mycotoxins and other extrolites*. Utrecht : Centraalbureau voor Schimmelcultures, 2004, 260 s. ISBN 90-70351-53-6.

SAITO, M., ENOMOTO, M., TATSUNO, T., 1971. Yellowed rice toxins: luterokyryín and related compounds, chlorine-containing compounds and citrinin, s. 299-380 In A. Ciegler, S. Kadis, and S. J. Ajl (ed.), *Microbial toxins*, vol. VI: fungal toxins, New York : Academic Press, 1971.

SCOTT, P. M., 2004. Other mycotoxins. In N. Magan, M. Olsen (ed.), *Mycotoxins in Food*. Cambridge : Woodhead Publishing Limited, 2004, 460 s. ISBN 0-8493-2557-9.

SCUDAMORE, K. A., 2005. Identifying Mycotoxins is Paramount in the fight against their spread. In *Word Grain*, roč. 23, 2005, s. 36-39.

TANČINOVÁ, D., LABUDA, R., 2006. Mykotická kontaminácia vybraných surovín rastlinného pôvodu. In Kolektív autorov (ed.), *Výživná a technologická kvalita rastlinných produktov a ich potravinárske využitie*. Nitra : SPU, 2006, s. 167-194.

VOTAVA, M. et al., 2003. *Lékařská mikrobiologie speciální*. Brno : Neptun, 2003, 495 s. ISBN 80-902896-6-5.

## PodĎakovanie:

Práca vznikla s podporou projektov GA SPU 739/05330 a VEGA 1/0404/09.

## Kontaktná adresa:

Ing. Zuzana Barboráková, Katedra mikrobiológie, FBP, SPU v Nitre, Tr.A.Hlinku 2, 949 76 Nitra, tel: 037/641 5810, e-mail: zuzana.barborakova@uniag.sk

Ing. Soňa Felšöciová, PhD. Katedra mikrobiológie, FBP, SPU v Nitre, Tr.A.Hlinku 2, 949 76 Nitra, tel: 037/641 5813, e-mail: sona.felsociova@uniag.sk

doc. Ing. Dana Tančinová, PhD. Katedra mikrobiológie, FBP, SPU v Nitre, Tr.A.Hlinku 2, 949 76 Nitra, tel: 037/641 4433, e-mail: dana.tancinova@uniag.sk

Ing. Mária Dovičičová, Katedra mikrobiológie, FBP, SPU v Nitre, Tr.A.Hlinku 2, 949 76 Nitra, tel: 037/641 5810, e-mail: maria.dovicicova@uniag.sk

Ing. Zuzana Mašková, Katedra mikrobiológie, FBP, SPU v Nitre, Tr.A.Hlinku 2, 949 76 Nitra, tel: 037/641 4432, e-mail: zuzana.maskova@uniag.sk

Ing. Roman Labuda, PhD., Romer Labs Division Holding GmbH, Technopark 1, 3430 Tulln, Austria, tel: +43 2272 615 33 216, e-mail: roman.labuda@romerlabs.com

## PROFIL AMINOKYSELÍN V ORECHOVINÁCH AKO POTENCIÁLNYCH KOMPONENTOV PEKÁRENSKÝCH ZMESÍ

### AMINO ACIDS PROFILE IN SOME NUTS AS POTENTIAL INGREDIENTS OF BAKERY MIXTURES

*Alena Bednáriková, Jana Sádecká*

#### ABSTRACT

Edible nuts are globally popular and are valued for their sensory, nutritional and health attributes. Nuts need to be kept dry and well store particularly after shelling due to the high unsaturated fat content of the oil. The current study was designed to analyze and compare amino acid profile in walnuts and hazelnuts after irradiation treatment for reduction/elimination of undesirable micro-flora. A simple, reliable and rapid LC-MS method was used for determination of 20 free amino acids. It was found that there were insignificant differences in amino acid profile after irradiation treatment at dose of 5 kGy when the nuts had been packed in paper cover although the selected dose of irradiation (5 kGy) caused dramatic increase of “off-flavour” compound amounts.

**Keywords:** amino acid, HPLC, nut

#### ÚVOD

Orechy patria k najstarším potravinám a sú dôležitým zdrojom živín nielen pre človeka ale aj pre zvieratá. Skladajú sa z požívateľného jadra obklopeného pevnou škrupinou. Vyznačujú sa vysokým obsahom tukov, hlavne nenasýtených mastných kyselín, zároveň obsahujú širokú škálu stopových prvkov a vitamínov a ich konzumácia môže pôsobiť ako prevencia proti rizikám kardiovaskulárnych chorôb. K hlavným zložkám orechov patria aj proteíny, voľné aminokyseliny, bielkoviny a sacharidy (Maga, 1991). Aminokyseliny, ktoré si nevie ľudské telo samé syntetizovať, sa označujú ako esenciálne a orechy sú pre nás ich vhodným zdrojom, preto sú konzumované v surovom stave, pražené alebo ako súčasť tepelne upravených potravín.

Skladujú sa buď sušené v pôvodnom obale (škrupine) alebo vylúpané, pričom v priebehu skladovania dochádza k vzájomným reakciám medzi jednotlivými zložkami, ktoré sú ovplyvňované rôznymi fyzikálnymi faktormi (teplo, mechanická sila, žiarenie) (Velíšek, 2002). Ošetrovanie radiačným žiarením sa skúša ako šetrný spôsob redukcie nežiadúcej mikroflóry (Sádecká, zaslané na publikovanie). Potravinársky významná, avšak v negatívnom zmysle slova, by mohla byť oxidácia aminokyselín organickými zlúčeninami, ktoré v molekule obsahujú elektronegatívne funkčné skupiny (napr. hydroperoxydy mastných kyselín, vznikajúce nielen pôsobením zvýšenej teploty na vzorku, t.j. nevhodným skladovaním, ale aj pôsobením radiačného žiarenia).

V moderných metódach separácie a kvantifikácie voľných aminokyselín dominovala donedávna vysokoúčinná kvapalinová chromatografia (HPLC) s predkolónovou alebo pokolónovou derivatizáciou sledovaných analytov detegovaných spektrofotometricky alebo fluorescenčne (Alegria, 1999). Aminokyseliny obsahujú vo svojich molekulách kyslú (karboxylovú) skupinu a aj bázičú

aminoskupinu a súčasne neobsahujú žiaden chromofór (vynímajúc aromatické aminokyseliny), čo spôsobovalo problémy pri ich priamom stanovení (Petritis, 2002). Rozvoj spojenia HPLC s hmotnostnou spektrometriou ponúka možnosť jednoduchej, rýchlej a spoľahlivej metódy ich stanovenia v reálnych potravinových maticiach (Chaimbault, 1999; Petritis, 2002; Özcan, 2006).

V predloženej práci sa porovnáva profil voľných aminokyselín v orechoch bežne produkovaných na Slovensku (t.j. vlašské orechy, lieskové orechy) neošetrených a ošetrených radiačným žiarením.

#### MATERIÁL A POUŽITÉ METÓDY

##### Chemikálie

L-amino acids kit (obsahujúci p.a. štandardy (98%) kyseliny asparagovej (Asp), asparagínu (Asn), kyseliny glutamovej (Glu), glutamínu (Gln), alanínu (Ala), arginín monohydrochloridu (Arg), glycínu (Gly), monohydrát histidín monohydrochloridu (His), trans-4-hydroxyprolínu (Hyp), isoleucínu (Ile), leucínu (Leu), lysín monohydrochloridu (Lys), methionínu (Met), phenylalanínu (Phe), prolínu (Pro), serínu (Ser), treonínu (Thr), tryptofanu (Trp), tyrosínu (Tyr), valínu (Val)) boli vyrobené firmou Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany) a štandard o-tyrosínu (o-Tyr) (96,0 %) bol vyrobený firmou Fluka (Steinheim, Germany). Štandard kyseliny d3-glutamovej (d3-Glu) (97 %) bol vyrobený firmou Cambridge Isotope Laboratories (Andover, USA). Ľadová kyselina octová (čistota pre HPLC reagent grade) bola vyrobená firmou Fisher Scientific (Loughborough, UK). Kyselina perfluorooktanová (PFOA) (96 %) a acetonitril (HPLC gradient grade) a n-hexán (pre HPLC) boli vyrobené firmou Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany). Deionizovaná voda bola pripravená systémom PUR1TE Select (Oxon, UK) a použitá na prípravu roztokov

aminokyselín a ión-párového činidla (súčasť mobilnej fázy). Mobilná fáza bola po príprave odplynená.

*Prístroje*

LC/ESI-MS-MS analýzy kvantitatívneho stanovenia voľných aminokyselín sa vykonali na HPLC systéme Agilent 1200 (Waldbronn, Germany) pozostávajúceho z binárnej pumpy, autosamplera a termostatu kolón, spojeného s Agilent 6410 Triple Quad detektorom a ESI interfacom. Analytická separácia sa uskutočnila na kolóne Purospher® STAR RP-8ec (150 mm x 4.6 mm, 3 µm) a pri izokratrickej elúcii. Ako mobilná fáza sa použila zmes 100 ml acetonitrilu a 500 ml vodného roztoku PFOA (0.05 mmol/l) pri prietoku 0,5 ml.min<sup>-1</sup>. a pri teplote 25°C. Nastavené parametre pre ESI-MS-MS systém v tzv. MRM-móde (MRM= multiple reaction monitoring) umožňovali meranie tzv. "in-source generation" protonizovaných molekulových iónov sledovaných analytov aj použitého vnútorného štandardu (d3-Glu), a tiež umožňovali produkciu kolízne indukovaných fragmentových iónov sledovaných analytov (Tab. 1). Pre stanovenie aminokyselín boli nastavené nasledujúce parametre iónového zdroja: prietok sušiacего plynu (N<sub>2</sub>) 8 l/min., teplota sušiacего plynu 320°C, tlak v nebulizéri 50 psi, napätie v kapiláre 3 kV, fragmentor 50, dwell 50.

**Tabuľka 1:** MRM prechody a použitý vnútorný štandard pre stanovenie voľných aminokyselín

Amino-kyselina	Kolízna energia	Prekursorový ión [M+H] <sup>+</sup>	Produkto-vý ión quantifier ( <i>qualifier</i> )	Vnú-torný štandard
Asn	12	133	74 (87)	d3-Glu
Asp	12	134	74 (88)	d3-Glu
Ala	6	90	44 (90)	d3-Glu
Arg	10	175	116 (158)	d3-Glu
Cys	12	122	76 (122, 105)	d3-Glu
Gln	12	147	84 (130)	d3-Glu
Glu	12	148	84 (102)	d3-Glu
d3-Glu	12	151	87 (105)	
Gly	6	76	30 (76)	d3-Glu
His	12	156	110 (83)	d3-Glu
Hyp	12	132	86 (68)	d3-Glu
Ile	8	132	86 (69)	d3-Glu
Leu	8	132	86 (69)	d3-Glu
Lys	12	147	84 (130)	d3-Glu
Met	8	150	104 (133)	d3-Glu
Phe	10	166	120 (103)	d3-Glu
Pro	6	116	70 (116)	d3-Glu
Ser	12	106	60 (106)	d3-Glu
Thr	8	120	74 (102)	d3-Glu
Trp	10	205	146 (188)	d3-Glu
o-Tyr	8	182	136 (119)	d3-Glu
p-Tyr	8	182	165 (123)	d3-Glu
Val	6	118	72 (118)	d3-Glu

*Príprava vzorky*

Zásobné roztoky aminokyselín 1000 µg.ml<sup>-1</sup> boli pripravené rozpustením 25 mg každej aminokyseliny v 25 ml deionizovanej vody. Pracovné štandardy boli pripravené zriedením zásobných roztokov aminokyselín

tak, aby vznikli roztoky s koncentráciou 0,02 – 4,00 µg.ml<sup>-1</sup>. Každý roztok pracovného štandardu obsahoval 0.5 µg/ml vnútorného štandardu (d3-Glu). Obsah jednotlivých aminokyselín vo vzorke bol určený z lineárnej kalibračnej závislosti pre príslušnú aminokyselinu (*r*<sup>2</sup> > 0,99) a vztiahnutý na návažok vzorky.

Jemne pomletá alebo zhomogenizovaná vzorka (2 g) bola navážaná do 30 ml centrifugačnej skúmavky. Ku vzorke sa pridalo 20 ml z roztoku kyseliny octovej (c= 0,2 mmol/l) a 100 µl vnútorného štandardu zriedeného 1:10. Zmes sa 2 min. miešala na Vortexe a potom sa centrifugovala pri 8720 g a 0°C po dobu 10 min. 8 ml z číreho supernatantu sa prenieslo do deliaceho lievika a extrahovalo 3-krát 4 ml n-hexánu (hexánové vrstvy boli odstránené). Vodná vrstva bola pred LC/MS analýzou filtrovaná cez 0,45 µm nylonový striekačkový filter. (opakovateľnosť prípravy vzorky vyjadrená ako RSD < 10 %).

Zo získaných údajov sa vypočítali základné štatistické parametre (priemer a smerodajná odchýlka) a na určenie štatistickej významnosti rozdielov dvoch priemerov sa použil Lordov test. Kritická hodnota *u*<sub>α</sub> pre 3 merania a hladinu významnosti *α* = 0,05 je 0,636.

**VÝSLEDKY A DISKUSIA**

V rámci tejto štúdie sa pre vzájomné porovnanie analyzovali 2 vzorky vlašských orechov (líšiacich sa stanovišťom aj rokom zberu) a 1 vzorka lieskových orechov (2 typy obalových materiálov). Od producentov orechov sa zistilo, že vzorka vlašských orechov bola zmes odrôd Apollo a Jupiter v nedefinovanom pomere, zatiaľ čo u lieskovcov sa nepodarilo zistiť odrodu.

Na vytvorenie profilu voľných aminokyselín v sledovaných orechoch sa využila metóda kvapalinovej chromatografie v spojení s hmotnostnou detekciou (Özcan, 2006), ktorá je rýchla a umožňuje simultánne stanovenie 22 voľných aminokyselín bez derivatizácie. Esenciálne aminokyseliny (histidín, lyzín, fenylalanín, metionín, leucín, izoleucín, valín a threonín) majú nenahraditeľné miesto v ľudskej výžive a niektoré vykazujú aj organoleptické vlastnosti.

Pre radiačne neošetrené vzorky vlašských a lieskových orechov sa zistili porovnateľné hodnoty obsahu voľných aminokyselín (tab. 2a, b) s údajmi publikovanými Özcanom (2006), s výnimkou obsahu arginínu a histidínu, ktoré sa zaraďujú medzi hydrofilné bázické aminokyseliny. V našich vzorkách sa stanovil približne 10-násobok obsahu arginínu a histidínu v porovnaní s výsledkami publikovanými Özcanom (2006). Malé rozdiely medzi vzorkami vlašských orechov môžu byť spôsobené odrodovým zložením, poveternostnými vplyvmi, stanovišťom, atď.

Ošetrením orechov radiačným žiarením sa sledovala redukcia nežiadúcej mikroflóry, ale zároveň mohli dochádzať k nežiadúcim reakciám medzi voľnými aminokyselinami a oxidovanými lipidmi, pričom k oxylabilným zlúčeninám patria hlavne sírne aminokyseliny (cystein, metionín) (Velíšek, 2002). Z výsledkov senzorickeho hodnotenia je zrejme, že pre 50 % posudzovateľov z 10-členného hodnotiteľského panela je použitie už 5 kGy dávky žiarenia pre ošetrenie vlašských orechov na hrane konzumentskej prijateľnosti v dôsledku prítomnosti potuchnutej, zoxidovanej, nahorklej chuti a



negatívnej vône. So zvyšujúcou sa dávkou žiarenia tieto negatíva narastajú. (Sádecká, zaslané na publikovanie). Po ožiarení sa v profile voľných aminokyselín vo vlašských a lieskových orechoch (v papierovom obale) nepozorovali významné zmeny (hodnota Lordovho kritéria  $u$  bola menšia ako kritická hodnota  $u_a$ ) v obsahu jednotlivých aminokyselín v porovnaní s kontrolnými vzorkami, čo dokumentuje aj fakt, že suma

sledovaných voľných kyselín zostala takmer nezmenená. Porovnaním radiačne ošetrených lieskových orechov v dvoch rôznych obaloch (papier, HDPE), možno konštatovať, že v plastovom obale vzrástla suma voľných aminokyselín z  $(163 \pm 10)$  mg  $\cdot$  100 g<sup>-1</sup> na  $(210 \pm 12)$  mg  $\cdot$  100 g<sup>-1</sup>, pričom najviac sa zmenil obsah základných aminokyselín (arginínu, lyzínu a histidínu).

**Tab. 2a:** Výsledky stanovenia voľných aminokyselín vo vlašských orechoch (priemer  $\pm$  SD (z troch meraní)) neošetrených aj ošetrených radiačným žiarením z dvoch rôznych stanovíšť

	Literatura [Özcan] (mg $\cdot$ 100 g <sup>-1</sup> )	1.stanovište		2.stanovište	
		0 kGy (mg $\cdot$ 100 g <sup>-1</sup> )	5 kGy (papier) (mg $\cdot$ 100 g <sup>-1</sup> )	0 kGy (mg $\cdot$ 100 g <sup>-1</sup> )	5 kGy (papier) (mg $\cdot$ 100 g <sup>-1</sup> )
Ala	6,56	<b>10,98 <math>\pm</math> 1,22</b>	10,78 $\pm$ 0,61	<b>11,64 <math>\pm</math> 0,42</b>	9,57 $\pm$ 0,11
Asn	0,71	<b>2,88 <math>\pm</math> 0,10</b>	3,23 $\pm$ 0,18	<b>1,92 <math>\pm</math> 0,09</b>	2,10 $\pm$ 0,17
Asp	7,42	<b>9,10 <math>\pm</math> 0,60</b>	10,59 $\pm$ 0,39	<b>12,90 <math>\pm</math> 0,35</b>	11,17 $\pm$ 0,48
Gln	3,55	<b>4,67 <math>\pm</math> 0,48</b>	4,96 $\pm$ 0,27	<b>5,92 <math>\pm</math> 0,34</b>	5,29 $\pm$ 0,26
Glu	46,8	<b>56,44 <math>\pm</math> 2,34</b>	53,14 $\pm$ 3,72	<b>54,42 <math>\pm</math> 2,15</b>	55,65 $\pm$ 1,73
Gly	1,72	<b>3,87 <math>\pm</math> 0,42</b>	3,65 $\pm$ 0,24	<b>3,30 <math>\pm</math> 0,22</b>	3,06 $\pm$ 0,23
Hyp	0,74	<b>1,25 <math>\pm</math> 0,12</b>	1,92 $\pm$ 0,10	<b>1,59 <math>\pm</math> 0,02</b>	1,41 $\pm$ 0,08
Pro	5,5	<b>4,47 <math>\pm</math> 0,27</b>	5,01 $\pm$ 0,35	<b>5,32 <math>\pm</math> 0,12</b>	4,77 $\pm$ 0,18
Ser	1,44	<b>2,40 <math>\pm</math> 0,18</b>	4,04 $\pm$ 0,66	<b>2,24 <math>\pm</math> 0,11</b>	2,02 $\pm$ 0,09
Thr	1,12	<b>3,01 <math>\pm</math> 0,19</b>	3,48 $\pm$ 0,08	<b>1,97 <math>\pm</math> 0,15</b>	1,70 $\pm$ 0,09
Ile		<b>5,23 <math>\pm</math> 1,18</b>	6,00 $\pm$ 0,56	<b>3,67 <math>\pm</math> 0,38</b>	3,36 $\pm$ 0,21
Leu	1,81	<b>2,84 <math>\pm</math> 0,26</b>	3,03 $\pm$ 0,19	<b>2,05 <math>\pm</math> 0,08</b>	1,94 $\pm$ 0,06
Met	0,52	<b>0,95 <math>\pm</math> 0,27</b>	1,08 $\pm$ 0,09	<b>0,75 <math>\pm</math> 0,03</b>	0,55 $\pm$ 0,08
o-Tyr		<b>0,04 <math>\pm</math> 0,01</b>	0,04 $\pm$ 0,01	<b>0,03 <math>\pm</math> 0,01</b>	0,03 $\pm$ 0,01
Phe	1,09	<b>5,27 <math>\pm</math> 0,75</b>	6,00 $\pm$ 0,57	<b>3,87 <math>\pm</math> 0,15</b>	3,36 $\pm$ 0,14
p-Tyr	1,71	<b>2,62 <math>\pm</math> 0,18</b>	2,82 $\pm$ 0,13	<b>2,21 <math>\pm</math> 0,18</b>	1,99 $\pm$ 0,04
Val	3,01	<b>4,57 <math>\pm</math> 0,45</b>	5,30 $\pm$ 0,45	<b>3,47 <math>\pm</math> 0,35</b>	3,51 $\pm$ 0,09
Arg	2,71	<b>36,46 <math>\pm</math> 4,03</b>	45,95 $\pm$ 3,53	<b>30,95 <math>\pm</math> 0,74</b>	22,58 $\pm$ 0,35
His	0,38	<b>7,25 <math>\pm</math> 1,64</b>	4,32 $\pm$ 0,20	<b>2,50 <math>\pm</math> 0,10</b>	1,43 $\pm$ 0,04
Lys	1,64	<b>3,01 <math>\pm</math> 0,14</b>	3,26 $\pm$ 0,15	<b>2,57 <math>\pm</math> 0,12</b>	2,29 $\pm$ 0,03
Trp	1,75	<b>6,25 <math>\pm</math> 0,28</b>	5,17 $\pm$ 0,37	<b>6,89 <math>\pm</math> 0,41</b>	6,11 $\pm$ 0,13
Suma voľných aminokyselín		174 $\pm$ 14	184 $\pm$ 14	161 $\pm$ 14	144 $\pm$ 14
Suma esenciálnych aminokyselín		31 $\pm$ 4	33 $\pm$ 4	25 $\pm$ 4	23 $\pm$ 4

**Tab. 2b:** Výsledky stanovenia voľných aminokyselín (priemer  $\pm$  SD (z troch meraní)) v lieskových orechoch neošetrených aj ošetrených radiačným žiarením v dvoch rôznych obaloch.

	Literatura [Özcan] (mg $\cdot$ 100 g <sup>-1</sup> )	0 kGy (mg $\cdot$ 100 g <sup>-1</sup> )	5 kGy (papier) (mg $\cdot$ 100 g <sup>-1</sup> )	5 kGy (HDPE) (mg $\cdot$ 100 g <sup>-1</sup> )
Ala	12,98	<b>14,51 <math>\pm</math> 1,08</b>	15,49 $\pm$ 0,45	17,66 $\pm$ 1,05
Asn	2,21	<b>6,38 <math>\pm</math> 0,19</b>	4,57 $\pm$ 0,19	6,07 $\pm$ 0,26
Asp	13,05	<b>14,10 <math>\pm</math> 0,38</b>	10,62 $\pm$ 0,27	14,33 $\pm$ 1,18
Gln	0,51	<b>4,56 <math>\pm</math> 0,11</b>	2,08 $\pm$ 0,20	6,91 $\pm$ 0,62
Glu	21,01	<b>40,21 <math>\pm</math> 1,42</b>	39,06 $\pm$ 0,25	36,99 $\pm$ 2,24
Gly	2,57	<b>4,30 <math>\pm</math> 0,10</b>	3,56 $\pm$ 0,17	4,04 $\pm$ 0,31
Hyp	<LOD	<LOQ	<LOQ	<LOQ
Pro	5,38	<b>5,60 <math>\pm</math> 0,14</b>	4,03 $\pm$ 0,15	6,47 $\pm$ 0,35
Ser	3,84	<b>5,81 <math>\pm</math> 0,10</b>	3,58 $\pm$ 0,16	5,68 $\pm$ 0,58
Thr	2,38	<b>7,67 <math>\pm</math> 0,07</b>	4,48 $\pm$ 0,12	5,77 $\pm$ 0,31
Ile		<b>7,12 <math>\pm</math> 0,17</b>	7,98 $\pm$ 0,84	11,05 $\pm$ 1,00
Leu	3,24	<b>5,27 <math>\pm</math> 0,03</b>	4,65 $\pm$ 0,38	5,93 $\pm$ 0,47



Tab. 2b: pokračovanie.

	Literatura [Özcan] (mg · 100 g <sup>-1</sup> )	0 kGy (mg · 100 g <sup>-1</sup> )	5 kGy (papier) (mg · 100 g <sup>-1</sup> )	5 kGy (HDPE) (mg · 100 g <sup>-1</sup> )
Met	<LOD	1,64 ± 0,05	1,22 ± 0,14	1,98 ± 0,21
o-Tyr		<LOQ	<LOQ	<LOQ
Phe	2,41	7,19 ± 0,14	8,99 ± 0,90	11,40 ± 0,73
p-Tyr	3,69	5,42 ± 0,03	5,38 ± 0,47	6,64 ± 0,54
Val	4,08	8,07 ± 0,10	6,42 ± 0,51	8,22 ± 0,65
Arg	1,28	17,12 ± 0,92	31,49 ± 1,22	43,27 ± 0,55
His	<LOD	2,31 ± 0,10	1,87 ± 0,05	3,55 ± 0,16
Lys	2,06	3,15 ± 0,11	2,31 ± 0,11	8,01 ± 0,40
Trp	2,16	4,69 ± 0,22	4,51 ± 0,15	5,81 ± 0,13
Suma voľných aminokyselín		165 ± 10	163 ± 10	210 ± 12
Suma esenciálnych aminokyselín		45 ± 5	41 ± 5	58 ± 6

## ZÁVER

Prínosom danej práce je fakt, že svojimi výsledkami prehľadila vedeckú poznatkovú bázu v oblasti štúdia chemicko-fyzikálnych a organoleptických zmien orechovín ošetrených ionizujúcim žiarením a vyhodnotila vplyv metódy „studenej sterilizácie“ na zastúpenie voľných aminokyselín ako signifikantnej zložky orechov.

## LITERATÚRA

- ALEGRIA, AMPARO, BARBERA, REYES, FARRE, ROSAURA, LAGARDA, MARIA J., LOPEZ, J., 1999. Amino Acid Contents of Infant Formulas, In *J.Food Composit. Anal.* 1999, 12, s.137-146
- CHAIMBAULT, PETER, PETRITIS, KONSTANTINOS, ELFAKIR, CLAIRE, DREUX, MICHEL, 1999. Determination of 20 underivatized proteinic amino acids by ion-pairing chromatography and pneumatically assisted electrospray mass spectrometry, In *J.Chromatogr.*, 1999, 855, s.191-202
- MAGA, JOSEPH A., 1991. Chapter 18: Nuts, In *Volatile Compounds in Food and Beverages* (edited by Maarse H., Marcel Dekker inc., 1991, ISBN 0-824-8390-5, pg.671-685
- ÖZCAN,SUREYYA, SENYUVA, HAMIDE Z., 2006. Improved and simplified liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry method for the analysis of underivatized free amino acids in various foods, In *J.Chromatogr.* 2006, A 1135, s.179-185
- PETRITIS, KONSTANTINOS, ELFAKIR, CLAIRE, DREUX, MICHEL, 1999. A comparative study of commercial liquid chromatographic detectors for the analysis of underivatized amino acids, In *J.Chromatogr.*, 2002, 961, s. 9-21

SÁDECKÁ, JANA, KOLEK, EMIL, KOREŇOVÁ, JANKA, LOPAŠOVSKÁ, JANKA, „Studená sterilizácia“ orechovín ako potenciálnych komponentov pekárenských produktov, (nepublikované)

VELÍŠEK, JAN, 2002. Kapitola 2: Aminokyseliny, peptidy a bielkoviny, In *Chemie potravín* (OSSIS., 2002, ISBN 80-86659-03-8, pg.55-56

VENKATACHALAM, MARESH, SATHE, SHRIDHAR K., 2006. Chemical composition of selected edible nut seeds, In *J.Agric. Food Chem.* 2006, 54, s.4705-4714

## Pod'akovanie:

Táto práca bola vytvorená realizáciou projektu "Vybudovanie HiTech centra pre výskum vzniku, eliminácie a hodnotenia prítomnosti kontaminantov v potravinách", na základe podpory operačného programu Výskum a vývoj financovaného z Európskeho fondu regionálneho rozvoja. Táto práca bola riešená v rámci projektu VMSP –P- 0089-09 podporovaného agentúrou APVV a Štátnej úlohy výskumu a vývoja s názvom "Rozvoj progresívnych metód a postupov pre zabezpečenie procesu kontinuálneho zvyšovania kvality a bezpečnosti vo výrobe a kontrole potravín".

## Kontaktná adresa:

Ing. Alena Bednáriková, PhD., Výskumný ústav potravinársky, Priemyselná 4, Bratislava, Tel.: 02 50237196, E-mail: bednarikova@vup.sk

Ing. Jana Sádecká, Výskumný ústav potravinársky, Priemyselná 4, Bratislava, Tel.: 02 50237197, E-mail: sadecka@vup.sk

**MOŽNOSTI VYUŽITIA POHÁNKY PRI VÝROBE CHLEBA A VÝHODY JEHO KONZUMÁCIE****POSSIBILITY OF EXPLOITATION OF BUCKWHEAT IN BREAD-MAKING AND ADVANTAGES OF ENRICHED BREAD CONSUMPTION**

*Tatiana Bojňanská, Helena Francáková, Peter Chlebo, Radovan Gažar*

**ABSTRACT**

The study aims at the evaluation of enriched bread prepared with the addition of buckwheat as a source of biologically active components in nutrition. From the overall acceptability rating, it was concluded that bread with the addition of 30 % of buckwheat could be baked with satisfactory results. A clinical study based on consumption of enriched bread was conducted on A group of volunteered experimental persons (n = 33) for a period of four weeks. The loaves with an addition of buckwheat of 30 % contained 4.2 g rutin in 200 g of bread in the consumable form; this equals to the daily dosage of rutin in the clinical study provided that the experimental subjects consume the complete dosage. The results have confirmed the increase of the total antioxidant status thanks to the buckwheat enriched bread consumption from the value of 1.14 mmol.dm<sup>-3</sup> at the beginning of the study to 1.46 mmol.dm<sup>-3</sup> at the end of the study, i.e. the difference was statistically significant. The daily consumption of buckwheat enriched bread caused a significant decreased of the triglyceride content, too (from the value of 2.15 mmol.dm<sup>-3</sup> at the beginning of the study to 1.78 mmol.dm<sup>-3</sup> at the end of the study), the total cholesterol was found to decrease, but insignificantly.

**Keywords:** buckwheat, baking, rutin, clinical study, blood parameter

**ÚVOD**

Pri vývoji ľudskej spoločnosti má potrava významnú úlohu a v konečnom dôsledku ovplyvňuje zdravotný stav celej ľudskej populácie. Našu súčasnú stravu je možné v porovnaní s predchádzajúcimi mnohoročnými (prípadne až mnohotisícročnými) potravinovými zvykmi charakterizovať ako affluentnú, prinášajúcu nadbytok kuchynskej soli, jednoduchých rafinovaných cukrov a nasýtených mastných tukov živočíšneho pôvodu (a v dôsledku toho príliš energeticky bohatú), a nedostatočnú čo sa týka komplexných sacharidov, vlákniny, esenciálnych mikroelementov, antioxidantov, vitamínov a bioflavonoidov, ktorých hlavným zdrojom je predovšetkým rastlinná zložka potravy. Výsledky dlhodobých epidemiologických pozorovaní a klinických a intervenčných štúdií jednoznačne dokázali, že súčasný spôsob stravovania je v priamom pozitívnom vzťahu k frekventnému výskytu civilizačných ochorení. Kardiovaskulárne choroby sú vo vyspelých krajinách na prvých miestach celkovej úmrtnosti ich obyvateľstva. Hlavnou príčinou je ateroskleróza, s ktorou súvisia rizikové faktory ako hypercholesterolémia, vysoký krvný tlak, fajčenie, cukrovka a obezita. Nepriaznivo vysokou hladinou krvných tukov, aj čo sa týka ich kvalitatívneho profilu, trpia takmer dve tretiny obyvateľstva Slovenska (Hrabák 1996).

Významnou a aktuálnou problematikou potravinového reťazca sú aj voľné kyslíkové radikály, ktoré sú považované za iniciátory vzniku a progresie aterosklerózy, je im pripisovaný kauzálny účinok na vznik cukrovky a katarakty, v priamej asociácii účinkov voľných radikálov na genetický materiál bunky je aj vznik a progresia zhubných novotvarov a proces starnutia vplyvom na apoptózu (programovanú smrť) bunky. (Hrabák 1996). Ľudský organizmus sa s nadbytkom voľných kyslíkových radikálov vyrovnáva vlastnými obrannými enzymatickými

systémami, ktoré pomocou sekvenčných reakcií zneškodňujú voľné radikály, a ktorých priebeh je účinne podporovaný podávaním látok s antioxidantnou aktivitou (vychytávače/lapače/zhášače voľných radikálov).

Významnou skupinou látok s potenciálnym antioxidantným využitím sú flavonoidy, ktorých bolo doteraz identifikovaných okolo 4 000 a ich antioxidantný účinok závisí od chemickej štruktúry – čím je viac fenolových skupín, tým je výraznejší antioxidantný účinok. Medzi najvýznamnejšie flavonoidy patria kamferol, kvercetin, hesperidín, rutin, antokyanidíny, katechín, fenylypropanoidy atď. (Morand et al. 1998, Zachar 2004), v pohánke boli identifikované rutin, orientín, vitexín, quercetin, izovitexín a izoorientín (Dietrich-Szostak a Oleszek 1999).

Snaha o zlepšenie zdravotného stavu vedie jednotlivcov, ale aj štátne organizácie, k hľadaniu možností ako zvrátiť reálnu situáciu, ktorá nie je dobrá, a za jednu z týchto ciest je možné považovať aj obohacovanie bežných potravín každodennej spotreby o prírodné zdroje biologicky účinných látok. Veľmi dobrým zdrojom je pohánka, ktorú je možné využiť okrem iného aj na výrobu chleba v zmesiach so pšeničnou múkou.

Pohánka (*Fagopyrum esculentum* Moench.) bola v minulosti významnou surovinou používanou na výrobu potravín, veľmi obľúbenou ešte v 16. storočí, potom začalo jej pestovanie ustupovať intenzívnejším plodinám. V ostatných rokoch získava opäť väčšiu popularitu, predovšetkým v súvislosti so zaujímavým nutričným zložením, priaznivou skladbou bielkovín, minerálnych látok, vysokým obsahom vlákniny a významným obsahom flavonoidov, predovšetkým rutínu (Francisci et al. 1994, Steadman et al. 2001, Stibilj et al. 2004, Christa a Soral-Smietana 2008). V Európe sa v súčasnosti pestuje predovšetkým v Rusku, na Ukrajine, Poľsku, Bielorusku, vo Francúzsku, Rakúsku a Slovinsku. Okrajovo je

pestovaná aj v Maďarsku, Česku, Luxembursku, severnom Taliansku a na Slovensku – u nás sa pestuje na výmere približne 250 ha a povolené sú dve odrody: “Pyra” a “Spačinská 1”.

V rámci prezentovanej výskumnej práce boli skúmané možnosti využitia pohánky pri výrobe chleba s dobrými technologickými a senzorickejšími vlastnosťami a vplyv konzumácie takéhoto chleba na zdravotný stav konzumentov zisťovaný analýzou krvných vzoriek (celkový antioxidantný stav organizmu, obsah cholesterolu, triglyceridov a ďalších parametrov).

### MATERIÁL A METODIKA

Na výrobu chleba, ktorý bol následne konzumovaný probandmi v rámci klinickej štúdie, bola použitá pšeničná múka T 650 a termicky lúpané krúpy pohánky upravené (homogenizované) na jemný šrot v množstve 30 %, čo bol prídavok odporúčaný na základe predchádzajúcich výskumov. Pokusný chlieb bol pripravovaný zo zmesi, prídavku vody podľa väznosti múky, soli, sacharózy a droždia. Cesto kyslo v kysiarňi v stanovených teplotných podmienkach 45 minút a následne boli pokusné bochníky upečené pri teplote 220 – 230 °C. Pekársky pokus bol vykonaný bez použitia pekárskych zlepšovacích činidiel alebo enzýmovo aktívnych prípravkov. Chlieb bol vyhodnotený objektívnymi aj subjektívnymi metódami. Bol stanovený objem výrobku (cm<sup>3</sup>), klenutie (pomer medzi výškou a šírkou bochníka), merný objem výrobku (cm<sup>3</sup>.100g<sup>-1</sup>), objemová výdatnosť (cm<sup>3</sup>.100g<sup>-1</sup> múky), výťažnosť pečiva (%), straty pečením (%), pórovitosť striedky (%) štandardnými postupmi a výpočtami používanými na riešiteľskom pracovisku (**Muchová et al. 2008**), kyslosť striedky (mmol.kg<sup>-1</sup>) titračne, obsah hrubého proteínu (N.5,7, %) Kjeldahlovou metódou, obsah minerálnych látok (%) spaľovaním v muflovej peci (t = 900°C ± 50°C) a obsah rutínu (mg.kg<sup>-1</sup>) chromatograficky (kolóna Lichrospher 100RP- 18). Posudzované boli aj senzoricke ukazovatele upečených bochníkov: farba kôrky, farba striedky, pružnosť striedky (0 – 5 bodov, intenzitná stupnica), vzhľad povrchu bochníka, vzhľad striedky, vôňa, chuť a celková prijateľnosť (0 - 9 bodov, hedonická stupnica).

Klinická štúdia bola založená na konzumácii chleba s prídavkom pohánky 30 % v množstve 200 g denne skupinou pokusných osôb (probandov, n = 33) počas štyroch týždňov. U pokusných osôb boli zrealizované tri venózne odbery krvi: pred začatím klinickej štúdie, hneď po ukončení klinickej štúdie (po 4 týždňoch konzumácie chleba) a následne po ďalších 4 týždňoch (od ukončenia konzumácie chleba). Krvné parametre (celkový antioxidantný stav organizmu, cholesterol, triglyceridy, ale aj Ca, Mg, Fe, kreatinín, urea, chlorid a ďalšie) boli stanovené na analyzátoe LISA 200 (Biocode-Hycel). Údaje boli spracované štatisticky (ANOVA, Studentov test, Shapiro-Wilkov test, Kruskal-Wallisov test).

### VÝSLEDKY A DISKUSIA

Chlieb pripravený s prídavkom pohánky 30 % svojimi technologickými aj senzorickejšími vlastnosťami spĺňal požiadavky na kvalitný chlieb. Výsledky technologických ukazovateľov pekárskeho pokusu pre kontrolný chlieb a chlieb s prídavkom pohánky 30 % sú uvedené v tabuľke 1

a výsledky chemických, resp. nutričných ukazovateľov pre kontrolný chlieb a chlieb s prídavkom pohánky 30 % sú uvedené v tabuľke 2.

Hodnoty objemu, merného objemu, a objemovej výdatnosti chleba s prídavkom pohánky boli síce približne o 45 % nižšie ako pri kontrolnom chlebe zo pšeničnej múky bez prídavku pohánky, ale tieto nedostatky boli plne kompenzované zvýšenou nutričnou hodnotou pokusného chleba a jeho pozitívnym vplyvom na organizmus.

**Tabuľka 1:** Výsledky technologických ukazovateľov pokusného pečenia

	Väznosť múky, %	Objem výrobku, cm <sup>3</sup>	Merný objem, cm <sup>3</sup> .100 g <sup>-1</sup> výrobku	Objemová výdatnosť, cm <sup>3</sup> .100 g <sup>-1</sup> múky
Kontrolný chlieb	70	970	223	323
Chlieb s pohánkou 30 %	70	530	121	177

Ďalšie parametre, napr. väznosť vody a výťažnosť pečiva, sa prídávaním pohánky nezmenili, straty pečením boli dokonca nižšie. V porovnaní s kontrolným chlebom sa zvýšil podiel hrubého proteínu, a to dosť výrazne, až o viac ako 16 %, obsah minerálnych látok o viac ako 11 % a kyslosť striedky chleba s pohánkou vzrástla až o 43,7 %.

**Tabuľka 2:** Výsledky chemických (nutričných) ukazovateľov pokusného pečenia

	Kyslosť striedky, mmol.kg <sup>-1</sup>	Hrubý proteín, %	Popol, %	Rutín, mg.kg <sup>-1</sup> v sušine
Kontrolný chlieb	48	11,36	1,26	5,2
Chlieb s pohánkou 30 %	69	13,21	1,40	39,9

Prídavok pohánky zvýšil nutričnú hodnotu chleba vďaka svojmu výnimočnému zloženiu. Pre pohánku je špecifický vysoký obsah vitamínov, predovšetkým skupiny B (**Fabjan et al. 2003**), pohánka je dôležitým zdrojom mikroelementov (Zn, Cu, Mn, Se) a makroelementov (K, Na, Ca, Mg) (**Bonafacia a Fabjan 2003, Stibilj et al. 2004**) a jej bielkoviny majú vysokú nutričnú kvalitu (**Kreft et al. 1996, Watanabe 1998, Guo a Yao 2006, Christa a Soral-Smietana 2008**) charakterizovanú vysokým obsahom arginínu a lyzínu. Bielkoviny pohánky na rozdiel od bielkovín pšenice, jačmeňa a raže majú veľmi nízky podiel prolaminov, a tým sú vhodné na konzumáciu aj pre pacientov trpiacich celiakiou. Zaujímavý je aj obsah vlákniny a retrogradovaného škrobu (**Skrabanja a Kreft 1998**), ktoré majú veľký protektívny význam pred viacerými civilizačnými ochoreniami.

Nutrične bol v chleboch významný aj obsah rutínu a s tým súvisela antioxidantná aktivita tejto potravy, ktorá bola nižšia ako v pohánke, surovine použitej pri výrobe chleba,

ale významne vyššia ako v čistom pšeničnom chlebe (Bojňanská et al. 2008, Bojňanská a Fikselová 2009).

V chlebe konzumovanom probandmi bol obsah rutínu stanovený na úrovni  $39,9 \pm 0,6 \text{ mg.kg}^{-1}$  v sušine, čo je po prepočte na konzumnú formu hodnota  $21,01 \text{ mg.kg}^{-1}$  a keďže denná dávka bola 200 g chleba, pokusné osoby skonzumovali v pohánkovom chlebe 4,2 mg rutínu denne. Rutín je vzhľadom na svoje účinky súčasťou viacerých liekov, napr. ascorutín obsahuje v jednej tabletky 20 mg rutosidu a kyselinu askorbovú (100 mg), ktorá podporuje účinok rutínu. Liek sa používa na liečbu zvýšenej lámavosti a priepustnosti krvných vlásočnic. Z uvedeného je zrejmé, že obsah rutínu v pohánke zo zdravotného hľadiska nie je zanedbateľný. Konzumácia výrobkov s obsahom rutínu sa môže uplatňovať pri znižovaní LDL cholesterolu v krvi, ako prevencia aterosklerózy, na zvyšovanie pevnosti cievnych stien, ako prevencia krvácania pri diabetickej retinopatii, prevencia srdcovo – cievnych ochorení a pod. (Dietrych-Szostak a Oleszek 1999, Santos et al. 1999).

Aj po senzorickej stránke bol chlieb s prídavkom pohánky 30 % považovaný za dobrý. Farba kôrky bola gaštanová, s primeranou intenzitou, striedka bola tmavá a v porovnaní s kontrolou menej pružná, vôňa, chuť a celková prijateľnosť bola ohodnotená ako primeraná. Pri posudzovaní boli zrejmé zaujímavé chuťové profily, ktoré robili výrobok iným, odlišným od kontrolného bochníka. Zvýšená kyslosť striedky sa prejavila intenzívnejšou chuťou a jemne kyslou dochuťou, ktorá konzumentom neprekážala. Na základe vyhodnotenia dotazníkov, ktoré probandi na záver klinickej štúdie spracovali je možné skonštatovať, že pohánkový chlieb plne nahradil konzumáciu bežného chleba v dennej diéte počas celého štvortýždňového obdobia.

Účastníci klinickej štúdie konzumovali denne chlieb obohatený pohánkou, stravovali sa zvyčajným spôsobom a nemali špeciálne upravený jedálny lístok. Pred prvým dňom konzumácie im bola odobratá 1. vzorka venóznej krvi a táto bola použitá na porovnanie zmien hodnotených ukazovateľov spôsobených konzumáciou pohánky po dobu 4 týždňov a po ďalších 4 týždňoch od ukončenia konzumácie.

Z mnohých realizovaných krvných analýz sme na prezentáciu v tomto príspevku vybrali parametre, ktoré kauzálne najvýznamnejšie mali ovplyvňovať kardiovaskulárne ochorenia, konkrétne množstvo cholesterolu a triglyceridov v krvi a celkový antioxidačný stav organizmu.

Najvýznamnejšie bol dennou konzumáciou pohánkového chleba ovplyvnený antioxidačný stav organizmu (ďalej TAS) tak, ako to dokumentuje obrázok 1. Medzi prvým a druhým odberom krvi, teda po 4 týždňoch konzumácie pohánkového chleba, sa priemerná hodnota TAS zvýšila z  $1,14 \text{ mmol.dm}^{-3}$  na  $1,24 \text{ mmol.dm}^{-3}$ , čo je zvýšenie

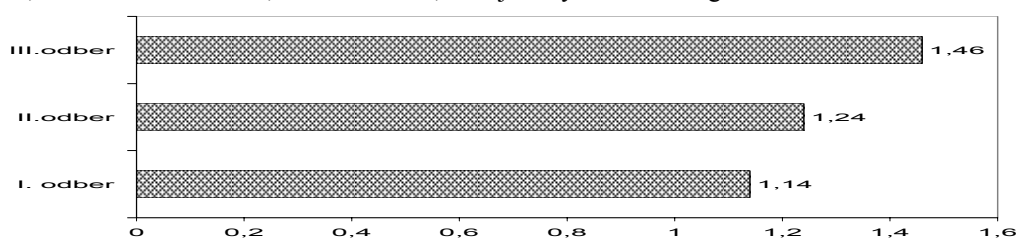
o takmer 9 %. Zaujímavé však bolo vyhodnotenie tretieho odberu, tj. odberu po 4 týždňoch od ukončenia konzumácie pohánkového chleba, ktoré potvrdilo ďalšie zvyšovanie TAS a teda vlastnosť organizmu reagovať s oneskorením. Na základe zisteného predpokladáme, že nie je možné očakávať zmenu stravy okamžité zlepšenie požadovaných parametrov charakterizujúcich zdravotný stav organizmu, na to je treba dlhší čas, a aj naopak, po ukončení určitého režimu stravovania jeho pozitívne vplyvy pretrvávajú dlhšiu dobu. Celková zmena hodnôt TAS po ôsmich týždňoch od začiatku klinickej štúdie bola veľmi pozitívna, došlo k zvýšeniu TAS z priemernej hodnoty  $1,14 \text{ mmol.dm}^{-3}$ , čo je hodnota nižšia ako referenčná, požadovaná pre optimálny stav organizmu ( $1,3 - 1,77 \text{ mmol.dm}^{-3}$ ), na priemernú hodnotu  $1,46 \text{ mmol.dm}^{-3}$ .

Veľmi zaujímavé bolo hodnotenie jednotlivých probandov, resp. skupín probandov. U niektorých bol vzostup TAS veľmi významný, až o 50 %, u niektorých pozvoľný a u dvoch nebol vzostup zaznamenaný vôbec, dokonca sme zistili mierny pokles ich TAS. Probandov sme rozdelili do skupín podľa zvolených kritérií (veku, vstupnej hodnoty TAS a režimu konzumácie chleba) a zistili sme, že najvýznamnejší vzostup TAS po ôsmich týždňoch od začiatku klinickej štúdie bol vo vekovej skupine od 18 do 34 rokov (takmer o 30 %). Na základe Kruskal-Wallisovho testu výsledného (posledného) merania na hladine významnosti  $\alpha = 0,1$  je možné tvrdiť, že vek konzumentov bol faktor, ktorý štatisticky významne ovplyvňoval záverečné hodnoty TAS.

Na konzumáciu pohánkového chleba najlepšie reagovala skupina probandov s nízkou počiatočnou hodnotou TAS, v ktorej bol zistený nárast priemerne o 40 %, čo je v porovnaní so skupinou s vysokou počiatočnou hodnotou TAS výrazne viac (u skupiny s vysokou počiatočnou hodnotou TAS sme zistili nárast o 6 %).

Tí probandi, ktorí priznali nedodržanie predpísaného režimu konzumácie chleba (išlo predovšetkým o nedodržanie množstva skonzumovaného pohánkového chleba) mali nižšiu konečnú hodnotu TAS ako tí, ktorí konzumovali celé množstvo pohánkového chleba pravidelne (zvýšenie o 27 %, resp. 45 %).

Na základe vyhodnotenia výsledkov je možné konštatovať, že konzumácia chleba s prídavkom pohánky vo všeobecnosti zvyšovala TAS organizmu, príčinou čoho bol v najväčšej miere obsah flavonoidov v semenách pohánky. Podľa Holasovej et al. (2002) sú vzťahy medzi antioxidačnou aktivitou a obsahom celkových polyfenolov, rutínu a tokoferolov v pohánke štatisticky preukazné, sú však aj autori (Oomah a Mazza 1996), ktorí zistili len miernu závislosť medzi obsahom flavonoidov a antioxidačnou aktivitou v pohánke. Na základe našich výsledkov môžeme podporiť názor o preukaznej závislosti konzumácie pohánky a celkového antioxidačného stavu organizmu.



**Obrázok 1:** Hodnoty celkového antioxidačného stavu organizmu, všetci probandi (n=33), priemerné hodnoty v  $\text{mmol.dm}^{-3}$

Pri ostatných hodnotených ukazovateľoch sme očakávali v dôsledku pravidelnej konzumácie pohánkového chleba zníženie ich hodnôt. Za veľmi pozitívne je možné považovať zníženie množstva triglyceridov v krvi, čo je žiaduce predovšetkým v súvislosti s významom vplyvu vysokej hladiny triglyceridov na rozvoj kardiovaskulárnych ochorení (Patrick 2007). Štatisticky preukazné bolo toto zníženie medzi 1. odberom (vstupným odberom) a 3. odberom, ktorý bol realizovaný po ôsmich týždňoch od začiatku konzumácie pohánkového chleba, resp. štyri týždne po jej ukončení. Priemerný obsah triglyceridov na začiatku klinickej štúdie bol 2.15 mmol.dm<sup>-3</sup> a na jej konci bol 1.78 mmol.dm<sup>-3</sup>, čo je zníženie o 17 % (zo zdravotného hľadiska by nemala byť prekročená hodnota 2,2 mmol.dm<sup>-3</sup>). Opäť sa potvrdilo to, čo aj v prípade TAS, a síce, že znižovanie množstva triglyceridov v krvi pokračovalo aj po ukončení konzumácie pohánkového chleba a maximálne zníženie bolo zistené až pri treťom odbere, teda 4 týždne po ukončení konzumácie. Hodnoty tohto ukazovateľa boli pri jednotlivých probandoch značne odlišné a pohybovali sa v rozpätí od 1,21 mmol.dm<sup>-3</sup> do 6,13 mmol.dm<sup>-3</sup>. Pri prvom odbere bolo u jedenástich probandov zistené prekročenie odporúčaného limitu 2,2 mmol.dm<sup>-3</sup>, v jednom prípade až 2,8 násobne (priemerná hodnota triglyceridov u probandov s nadlimitnými hodnotami bola 3,04 mmol.dm<sup>-3</sup>). Pri poslednom odbere mali stále ešte siedmi probandi hodnotu triglyceridov nad 2,2 mmol.dm<sup>-3</sup> (priemerne 2,79 mmol.dm<sup>-3</sup>), aj u nich však došlo k zníženiu, aj keď ho ešte nemožno považovať za dostatočné. V dvoch prípadoch bola hodnota triglyceridov pri treťom odbere vyššia ako pri druhom, nevystúpila však až na úroveň vstupnej hodnoty.

Cholesterol je pre náš organizmus nevyhnutnou zložkou, ktorú si telo produkuje samo alebo ho prijíma potravou. Pri jeho nadbytku v krvnom riečišti dochádza k jeho prenikaniu do cievnych stien a k vzniku plátov, ktoré cievy postupne zužujú (ateroskleróza). Cholesterol je v organizme transportovaný vo forme lipoproteínov, a síce LDL (low density lipoprotein) a HDL (high density lipoprotein). LDL častice transportujú cholesterol do tkanív, kde plní svoju funkciu, ale pokiaľ je ich množstvo v krvi nadmerné, spôsobujú ukladanie cholesterolu v cievnych stenách („zlý“ cholesterol). HDL častice transportujú nadbytočný cholesterol z tkanív do pečene, kde sa spracúva na žlčové kyseliny („dobrý“ cholesterol) (Wats 1990).

Na základe výsledkov krvných analýz po štvortýždňovej konzumácie chleba s pohánkou nie je možné urobiť záver, že množstvo celkového cholesterolu u probandov bolo preukazne nižšie ako pred konzumáciou. Kurčitému zníženiu síce prišlo, ale bolo nevýznamné. Z 33 probandov malo na začiatku klinickej štúdie hladinu celkového cholesterolu vyššiu ako 5,2 mmol.dm<sup>-3</sup> 24 (takmer 73 %), čo považujeme za veľmi nepriaznivý až alarmujúci výsledok. Po štvortýždňovej konzumácii chleba s pohánkou bol počet účastníkov klinickej štúdie s množstvom celkového cholesterolu nad 5,2 mmol.dm<sup>-3</sup> stále veľmi vysoký, (21) a o ďalšie štyri týždne sa tento počet ešte mierne zvýšil (22). Napriek v literatúre veľmi často uvádzanej informácii, že konzumácia pohánky priaznivo vplyva na znižovanie cholesterolu v krvi, my

s uvedeným tvrdením nemôžeme súhlasiť, pretože u našich probandov napriek pravidelnej konzumácii pohánky k žiaducemu efektu nedošlo. Rovnaké výsledky, teda nepreukazné zmeny, sme zistili aj pri hodnotách LDL a HDL (tabuľka 3).

Tabuľka 3

Ukazovateľ, mmol.dm <sup>-3</sup>	I. odber (priemer)	II. odber (priemer)	III. odber (priemer)
Celkový cholesterol	5,96	5,87	5,78
HDL	1,27	1,18	1,17
LDL	3,47	3,43	3,36

Opäť sme použili aj kritériá veku probandov a režimu konzumácie chleba, ale ani pri týchto výsledkoch neboli hodnoty preukazné. Najväčší pokles celkového cholesterolu bol zistený v skupine najmladších probandov (18 - 34 rokov), kedy klesla hodnota z priemerne 5,46 mmol.dm<sup>-3</sup> na 5,20 mmol.dm<sup>-3</sup>, ale o ďalšie 4 týždne už opäť stúpila na 5,37 mmol.dm<sup>-3</sup>. U probandov vo vekovej kategórii od 35 do 54 rokov dokonca došlo po 4 týždňoch k miernemu nárastu celkového cholesterolu, ale o ďalšie 4 týždne sa hodnota vrátil na úroveň vstupnej. U najstarších probandov (55 - 75 rokov) množstvo celkového cholesterolu klesalo s každým ďalším odberom (6,9 mmol.dm<sup>-3</sup> - 6,87 mmol.dm<sup>-3</sup> - 6,64 mmol.dm<sup>-3</sup>), ale hodnoty boli stále vysoko nad limit.

Tí, ktorí skonzumovali denne stanovených 200 g chleba mali výraznejší pokles celkového cholesterolu ako tí, ktorí dávkovanie presne nedodržiali, ale ani v jednej skupine neboli výsledky uspokojivé.

## ZÁVER

Na základe výsledkov zistených v rámci klinickej štúdie založenej na dennej konzumácii 200 g chleba s prídavkom pohánky 30 %, čo je množstvo akceptovateľné z technologického aj senzorického hľadiska, je možné takýto chlieb považovať za potravinu každodennej spotreby s pozitívnymi účinkami na zdravie a jednoznačne ho odporučiť. Najvýznamnejšie sa jeho konzumácia prejavila na zvýšení celkového antioxidačného stavu organizmu účastníkov klinickej štúdie, ktoré bolo štatisticky preukazné. Významné bolo aj zníženie obsahu triglyceridov v krvi, na zníženie obsahu celkového cholesterolu a LDL cholesterolu štvortýždňová konzumácia chleba s prídavkom pohánky 30 % však nebola dostatočná a očakávané preukazné zníženie hladiny cholesterolu v krvi nebolo zistené.

## LITERATÚRA

BOJŇANSKÁ, T., HORNA, A., HABÁNOVÁ M. 2008. Buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench.) – a source of rutin in human nutrition. In *Vitamins 2008*, 9. – 11. 9. 2008, Zlín, Pardubice: Univerzita Pardubice 2008, s. 44 – 45, ISBN 978-80-7318-708-8

BOJŇANSKÁ, T., FIKSELOVÁ, M 2009. Antioxidačný účinok a obsah rutínu v pšeničných chleboch s rozličným prídavkom pohánky. In *Antioxidanty 2009*, Zborník z I. ročníka vedeckej konferencie s medzinárodnou účasťou 6.5.2009, Nitra, Nitra: SPU, CD nosič, s. 19 – 25, ISBN 978-80-552-0209-9.



- BONAFACIA, G., FABJAN, N. 2003. Nutritional comparison of tartary buckwheat with common buckwheat and minor cereals. In *Reports Biotechnological Faculty of the University of Ljubljana*, roč. 81, s. 349-355
- CHRISTA, K., SORAL-SMIETANA, M. 2008. Buckwheat grains and products – nutritional and prophylactic value of their components – e review. In *Czech Journal of Food Science*, roč. 26, 2008, s. 153-162
- DIETRICH-SZOSTAK, D., OLESZEK, W. 1999. Effect of processing on the flavonoid content in buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) grain. In *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, roč. 47, s. 4383-4387
- FABJAN, N., RODE, J., KOSIR, I. J., ZHANG, Z., KREFT, I. 2003. Tartary buckwheat (*Fagopyrum tartaricum* Gaertn.) as a source of dietary rutin and quercetin. In *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, roč. 51, s. 6452-6455
- FRANCISCI DE, M. L. P., SALGADO, J. M., LEITAO, R. F. F. 1994. Chemical, nutritional and technological characteristics of buckwheat and non-prolamine buckwheat flours in comparison of wheat flour. In *Plant Foods for Human Nutrition*, roč. 46, s. 323-329
- GUO, X., YAO, H. 2006. Fractionation and characterization of tartary buckwheat flour proteins. In *Food Chemistry*, roč. 98, s. 90-94
- HOLASOVA, M., FIEDLEROVA, V., SMRCINOVA, H., ORSAK, M., LACHMAN, J., VAVREINOVA, S. 2002. Buckwheat – the source of antioxidant activity in functional foods. In *Food Research International*, roč. 35, 2002, s. 207-211
- HRABÁK, P. 1996. Afluentní strava – rizikový faktor civilizačných nemocí. In *Alternativní a maloobjemové plodiny pro zdravou lidskou výživu*. Praha, 1996, VURV
- KREFT, I., SKRABANJA, V., IKEDA, S., BONAFACCIA, G. 1996. Dietary value of buckwheat. In *Research Reports Biotechnological Faculty of the University of Ljubljana*, roč. 67, s. 73-78
- MORAND, CH., CRESPI, V., MANCH, C. et al. 1998. Plasma Metabolites of quercetin and their antioxidant properties. In *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, čís. 275, s. 212-219
- MUCHOVÁ, Z., FRANČÁKOVÁ, H., BOJŇANSKÁ, T., BAJČI, P. 2008. *Hodnotenie surovín a potravín rastlinného pôvodu*. ISBN 978-80-552-0127-6, piate upravené vydanie, Nitra: SPU, 217 s.
- OOMAH, B. D., MAZZA, G. 1996. Flavonoids and antioxidative activities in buckwheat. In *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, roč. 44, s. 1746-1750
- PATRICK, E. 2007. Triglycerides and risk for coronary heart disease. In *Journal of American Medical Association*, roč. 198, s. 336-338
- SANTOS, K. F. R., OLIVEIRA, T. T., NAGEM, T. J. et al. 1999. Hypolipidaemic effects of narigenin, rutin, nicotinic acid and their associations. In *Pharmaceutical Research*, roč. 40, s. 493-496
- SKRABANJA, V., KREFT, I. 1998. Resistant starch formation following autoclaving of buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench.) groats. An in vitro study. In *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, roč. 46, s. 2020-2023
- STEADMAN, K. J., BURGOON, M. S., LEWIS, B. A. et al. 2001. Minerals, phytic acid, tannin and rutin in buckwheat seed milling fractions. In *Journal of the Science of Food and Agriculture*, roč. 81, s. 1094-1100
- STIBILJ, V., KREFT, I., SMRKOLJ, P. et al. 2004. Enhanced selenium content in buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench.) and pumpkin (*Cucurbita pepo* L.) seeds by foliar fertilization. In *European Food Research Technologies*, roč. 219, 2004, s. 142-144
- WATANABE, M. 1998. Catechins as antioxidants from buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench.) groats. In *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, roč. 46, s. 839-845
- WATS, G.F. 1990. *Cholesterol and Coronary Heart Disease*. London: Current Medical Literature Ltd, 1990, 142 s., ISBN 1 85009 037 8
- ZACHAR, D. 2004. *Humánna výživa II. Živiny*. Zvolen: TU, 2004, 218 s.

**Kontaktná adresa:**

doc. Ing. Tatiana Bojňanská, CSc. Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre, FBP, KSSRP, Trieda Andreja Hlinku 2. Tel. 037 6414 703, e-mail: Tatiana.Bojnanska@uniag.sk

doc. Ing. Helena Frančáková, CSc. Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre, FBP, KSSRP, Trieda Andreja Hlinku 2. Tel. 037 6414 311, e-mail: Helena.Francakova@uniag.sk

MUDr. Peter Chlebo, PhD. Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre, FAPZ, KVL, Trieda Andreja Hlinku 2. Tel. 037 6414 883, e-mail: Peter.Chlebo@uniag.sk

Ing. Radovan Gažar, Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre, FBP, KSSRP, Trieda Andreja Hlinku 2. Tel. 037 641 5815, e-mail: rado.gazar@gmail.com

**ZHODNOTENIE VYBRANÝCH BIOCHEMICKÝCH UKAZOVATEĽOV MLIEKA DOJNÍC A ICH KORELÁCIE**

**EVALUATION OF SELECTED BIOCHEMICAL MILK PARAMETERS OF DAIRY COWS AND THEIR CORRELATIONS**

*Terézia Filipejová, Jaroslav Kováčik, Marcela Capcarová, Adriana Kolesárová, Katarína Kirchnerová, Vladimír Foltýs*

**ABSTRACT**

The aim of this study was to evaluate selected biochemical parameters in milk and their correlations. Ten dairy cows from chosen agricultural farms were divided into two groups. I. group: 3-4 weeks after calving (the beginning of lactation), II. group: 3-4 months after calving (the middle of lactation). Concentrations of some biochemical parameters: fats, proteins, lactose, solids, Somatic Cell Count, urea, freezing point of milk and rennetability in milk were analyzed. In this study, high

positive significant correlation has been detected between fats-solids ( $r = 0.96$ ), fats-SCC ( $r = 0.88$ ), proteins-solids ( $r = 0.67$ ), solids-SCC ( $r = 0.82$ ), REN-urea ( $r = 0.76$ ), high negative correlation between solids-urea ( $r = -0.75$ ), SCC-urea ( $r = -0.77$ ) at the beginning of lactation. Moreover, high positive significant correlations has been found between fats-solids ( $r = 0.99$ ), fats-urea ( $r = 0.96$ ), fats-REN ( $r = 0.82$ ), proteins-SCC ( $r = 0.99$ ), solids-urea ( $r = 0.92$ ), solids-REN ( $r = 0.75$ ), urea-REN ( $r = 0.95$ ), and high negative correlation between proteins-lactose ( $r = -0.87$ ) and SCC-lactose ( $r = -0.84$ ) in the middle lactation. In conclusion, we found some positive and negative high and middle significant correlations between parameters of milk at the beginning of lactation and in the middle of lactation.

**Keywords:** biochemical parameter; metabolic disorder; milk quality; correlation

---

## INTRODUCTION

Quality of cow milk and its composition is influenced by several factors. One of the important exogenous factors is nutrition of dairy cows. According to many authors (**Kirst and Jakobi, 2002; Kirchnerová, 2002; Kološta, 2001; Kováčik, 1999**), exactly nutrition can influence the production and quality of milk. It is known that qualitative nutrition is necessary for maintenance of adequate performance in high-yielding dairy cows rearing. As it was published, some deficiencies in nutrition and inadequate technological facilities may lead to depression in milk production (**Kirchnerová, 2002; Hanuš et al., 2002; Kováčik, 1999**). Deficiencies in dairy cows nutrition have effect on many biochemical and physiological processes. Disturbed relationship between metabolic capacity of animals dedicated to production and metabolic disorders can appear as a consequence of nutrition insufficiency (**Kováčik, 1999**). However, from the economic point of view the most serious disorder of high – yielding dairy cows presents acid-base unbalance related to energy metabolism (**Kirst and Jakobi, 2002**).

The objective of this study was to evaluate selected biochemical parameters, their correlations and to examine the influence of metabolic disorders of dairy cows on composition and quality of milk.

## MATERIAL AND METHODS

Ten dairy cows from selected agricultural farm – Ostrov near Piešťany were divided into three groups: group I: 3-4 weeks after calving (the beginning of lactation), group II: 3-4 months after calving (the middle of lactation). Samples of milk were cooled down until 6 °C was reached. Milk samples were collected by hand milking in early. Samples were kept at the same temperature during the determination of milk quality parameters: Determination of milk fat, proteins and lactose content (ISO 9622:1999, infrared analyzer Milkoscan FT 120 fi FOSS Electric ) Somatic Cell Counts (Fossomatic device), urea (photocolorimetric device with Ehrlich's reagent, 530 nm wavelength), rennetability (time the precipitation of milk at 35 °C after the addition of rennet Fromase220 TL fi GIST – BROCADES), freezing point (cryoscopic thermistor device Cryostar fi. Funke Gerber, ISO 5764:2002 Milk – Determination of freezing point). Significant differences between groups of dairy cows were evaluated by t – test with using programme SAS. Differences between the groups at  $p < 0.01$  were considered as significant. In this study correlation of milk biochemical parameters in cows using correlation analyses were analysed.

## RESULTS AND DISCUSSION

The milk yields of cows occur as the result of combined effects of genotype and environmental condition. Milk yield is generally standardized as milk produced in a 305 day, mature age and milking frequency (**Cilek and Tekin, 2006**). Milk yield is increased until first 55 days during lactation, gets to peak and amount of milk produced daily decreases until the end of lactation (**Cilek and Kaygisiz, 2008**). This general trend of the curve formed by amount of test day milk yield during the lactation is also called lactation curve. Cows that are fat or over conditioned at calving may be at risk for lower yield and increased reproductive and health problems (**Gearhart et al., 1990**). Correlations between the concentrations of biochemical parameters in milk in dairy cows at the beginning of lactation, in the middle of lactation are recorded in Tables 1–2. Studies on influences of the milk yield increase on cow's health status and milk quality becoming more and more important (**Sawa and Piwczynski, 2002; Ayadi et al., 2003; Remond et al., 2004; Junqueira, et al., 2005**). Dairy cattle, like most lactating mammals, are usually in negative energy balance in the first few weeks of lactation (**Nielsen, 1999**). High yielding dairy cows express more severe prolonged negative energy balance, which results in greater biological stress (**Berry et al., 2002**). This stress may impact upon the reproduction and immune systems leading to fertility and health problems during and beyond the negative energy balance period. However, it is possible only for a limited number of milk indicators, such as the milk yield, fat, protein, lactose and urea contents and somatic cell counts. The milk yield is an important economic and health factor closely connected with the health status of dairy cows, their reproduction performance, longevity and milk composition and properties (**Janů et al., 2007**). As it is shown in Table 1, correlation analysis detected some positive high correlation between fats-solids ( $r = 0.96$ ), fats-SCC ( $r = 0.88$ ), proteins-solids ( $r = 0.67$ ), solids-SCC ( $r = 0.82$ ), REN-urea ( $r = 0.76$ ), and middle positive correlation has been found between fats-proteins ( $r = 0.47$ ) and FP-proteins ( $r = 0.62$ ). According to **Pavic, et al. (2002)** significant correlations were established between total solids and fat content ( $r = 0.96$ ), protein ( $r = 0.70$ ), lactose ( $r = -0.31$ ) and the freezing point of milk ( $r = 0.31$ ). It is also known, that the high yielding dairy cow requires a great amount of glucose mainly to synthesize lactose, and for the synthesis of milk fat and to maintain the nervous system as well (**Tóth and Schmidt, 2004**). Negative high correlation has been detected between solids-urea ( $r = -0.75$ ) and SCC-urea ( $r = -0.77$ ). Negative middle significant correlation has been found between fats-urea ( $r = -0.64$ ), fats-REN ( $r = -0.48$ ), proteins-lactose ( $r = -0.66$ ),



proteins-urea ( $r = -0.41$ ), solids-REN ( $r = -0.55$ ), SCC-REN ( $r = -0.44$ ), FP-urea ( $r = -0.38$ ).

Positive high correlations (Table 2) has been found between fats-solids ( $r = 0.99$ ), fats-urea ( $r = 0.96$ ), fats-REN ( $r = 0.82$ ), proteins-SCC ( $r = 0.99$ ) ( $p < 0.01$ ), solids-urea ( $r = 0.92$ ), solids-REN ( $r = 0.75$ ), urea-REN ( $r = 0.95$ ). Phenotypic correlations among all constituents (fat, protein, lactose, ash, total solids solids-not-fat and casein percentages) were positive, ranging from 0.28 to 0.97 (Rosami, et al., 2002). Middle correlation has been detected between fats-SCC ( $r = 0.36$ ), fats-FP ( $r = 0.64$ ), proteins-solids ( $r = 0.37$ ), proteins-urea ( $r = 0.43$ ), proteins-REN ( $r = 0.52$ ), solids-SCC ( $r = 0.41$ ), solids-FP ( $r = 0.61$ ), SCC-urea ( $r = 0.45$ ), SCC-REN ( $r = 0.53$ ). A microbial infection of the mammary gland causes a rapid increase in the somatic cell count (SCC) in milk, and therefore SCC has been used as an indirect measure of udder health. (Koivula, et al., 2004).

Negative high correlation has been detected between proteins-lactose ( $r = -0.87$ ) and SCC-lactose ( $r = -0.84$ ). Strong correlations between lactose yield and protein yield and milk volume ( $r = 0.92$  and  $r = 0.98$  respectively) have been reported in cattle (Miglior et al., 2007). Negative middle correlation has been found only between lactose-REN ( $r = -0.53$ ). Lactose, the major carbohydrate of milk, controls milk volume by maintaining its osmolarity. Therefore, the rate of lactose synthesis in the epithelial cells of the mammary gland serves as a major factor influencing milk volume (Cant et al., 2002; Zhao and Keating, 2007). The higher lactose production is accompanied by higher milk volume production, higher protein and other solids (except fat) secretion into the milk to leave protein and total solid content and milk concentration almost unchanged. Therefore, although milk

yield is increased, concentration of its constituents is decreased (Shahbazkia, 2009).

**CONCLUSION**

In conclusion, we found some positive and negative high and middle correlations between some parameters of milk at the beginning of lactation and in the middle of lactation. In this study, positive high correlation between fats-solids ( $r = 0.96$ ), fats-SCC ( $r = 0.88$ ), proteins-solids ( $r = 0.67$ ), solids-SCC ( $r = 0.82$ ), REN-urea ( $r = 0.76$ ), but also middle correlation between fats-proteins ( $r = 0.47$ ) and FP-proteins ( $r = 0.62$ ) has been found at the beginning of lactation. Negative high correlation has been detected between solids-urea ( $r = -0.75$ ) and SCC-urea ( $r = -0.77$ ). Negative middle correlation has been found between fats-urea ( $r = -0.64$ ), fats-REN ( $r = -0.48$ ), proteins-lactose ( $r = -0.66$ ), proteins-urea ( $r = -0.41$ ), solids-REN ( $r = -0.55$ ), SCC-REN ( $r = 0.44$ ), FP-urea ( $r = -0.38$ ). Moreover, in the middle of lactation, positive significant proteins-SCC ( $r = 0.99$ ) ( $p < 0.01$ ) were found, but also high correlations between fats-solids( $r = 0.99$ ), fats-urea ( $r = 0.96$ ), fats-REN ( $r = 0.82$ ), solids-urea ( $r = 0.92$ ), solids-REN ( $r = 0.75$ ), urea-REN ( $r = 0.95$ ) were detected. Middle correlation has been detected between fats-SCC ( $r = 0.36$ ), fats-FP ( $r = 0.64$ ), proteins-solids ( $r = 0.37$ ), proteins-urea ( $r = 0.43$ ), proteins-REN ( $r = 0.52$ ), solids-SCC ( $r = 0.41$ ), solids-FP ( $r = 0.61$ ), SCC-urea ( $r = 0.45$ ), SCC-REN ( $r = 0.53$ ). On the other hand, negative high correlation has been detected between proteins-lactose ( $r = -0.87$ ) and SCC-lactose ( $r = -0.84$ ). Negative middle correlation has been found only between lactose-REN ( $r = -0.53$ ). Obtained results could serve to better understanding of biochemical processes in dairy cows for estimating their physiological status.

**Table 1:** Correlations between the concentrations of milk biochemical parameters in dairy cows at the beginning of lactation

	FATS	PROTEINS	LACTOSE	SOLIDS	SSC	UREA	FP	REN
FATS	1	0.47	-0.23	0.96	0.88	-0.64	-0.16	-0.48
PROTEINS		1	-0.66	0.67	0.17	-0.41	0.62	-0.29
LACTOSE			1	-0.27	0.25	-0.31	-0.02	-0.1
SOLIDS				1	0.82	-0.75	0.12	-0.55
SSC					1	-0.77	-0.12	-0.44
UREA						1	-0.38	0.76
FP							1	-0.08
REN								1

SCC - Somatic Cell counts, FP – freezing point, REN – rennetability

**Table 2:** Correlations between the concentrations of milk biochemical parameters in dairy cows in the middle of lactation

	FATS	PROTEINS	LACTOSE	SOLIDS	SSC	UREA	FP	REN
FATS	1	0.32	-0.07	0.99	0.36	0.96	0.64	0.82
PROTEINS		1	-0.87	0.37	0.99**	0.43	0.33	0.52
LACTOSE			1	-0.06	-0.84	-0.3	-0.27	-0.53
SOLIDS				1	0.41	0.92	0.61	0.75
SSC					1	0.45	0.25	0.53
UREA						1	0.74	0.95
FP							1	0.7
REN								1

SCC - Somatic Cell counts, FP – freezing point, REN – rennetability, \*\* $p < 0.01$

REFERENCE

AYADI, M., CAJA, G., SUCH, X., KNIGHT, CH. 2003. Effect of omitting one milking weekly on lactation performances and morphological udder changes in dairy cows. In *Journal of Dairy Science*, 2003, vol. 86, p. 2352-2358.

BERRY, D. P., BUCKLEY, F., DILLON, P., EVENS, R. D., RATH, M., VERKAMP, R. F., 2002. Genetic parameters for level and change of body condition score and body weight in dairy cows. In *Journal of Dairy Science*, vol. 85, 2002. p. 2030-2039.

CANT, J. P., TROUT, D. R., QIAO, F., PURDIE, N. G. 2002. Milk synthetic response of the bovine mammary gland to an increase in the local concentration of arterial glucose. In *Journal of Dairy Science*, vol. 85, p. 494-503.

CILEK, S., TEKIN, M. E., 2006. Calculation of Adjustment Factors for Standardizing Lactations to Mature Age and 305-Day and Estimation of Heritability and Repeatability of Standardized Milk Yield of Simmental Cattle Reared on Kazova State Farm. In *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, vol. 30, p. 283-289.

CILEK, S., KAYGISIZ, A., 2008. Breeding Value Estimation of Dairy Cattle Using Test Day Milk Yields In *Journal of Veterinary and Animal Advance*, 2008. p. 7 (6);. in press

GEARHART, M. A., CURTIS, C. R., ERB, H. N., SMITH, R. D., SNIFFEN, C. J., CHASE, L. E., COOPER, M. D. 1990. Relationship of changes in condition score to cow health in Holsteins. In *Journal of Dairy Science*. vol.73, 1990, p. 3132.

HANUŠ, O., ŘÍHA, J., POZDÍŠEK, J., FRELICH, J. 2002. Ketosis, a serious problem of high milking herds. In *Our Breeding*, vol. 62, 2002, no. 3, p. 27–29.

JUNQUEIR, F. S., MADALE, F. E., REIS, G. L. 2005. Production and economic comparison of milking F-1 Holstein × Gir cows with and without the stimulus of the calf. In *Livestock Production Science*, vol. 97, 2005, p. 241-252.

KIRCHNEROVÁ, K. 2002. The qualitative and technological properties of milk, depending on the intensity of nutrition of dairy cows in preparation for lactation In *Nutrition and food for the 3 millennium*. Nitra : SPU, 2002, vol. 10 p. 403–410.

KIRST, E., JACOBI, U., ELSCHNER, M., RÖTTGER, K., HUTH, R. 2002. Der Gefrierpunkt der Rohmilch. In *Deutsche Molkerei Zeitung*, vol. 12, 2002, no 17, p. 732–738.

KOIVULA, M., NEGUSSIE, E., MANTYSAARI, E. A. 2004. Genetic parameters for test-day somatic cell count at different lactation stages of Finnish dairy cattle. In *Livestock Production Science*, vol. 90, 2004, p. 145-157.

KOLOŠTA, M. 2001. Technologická kvalita mlieka dojníc na pastve. In *Mliekarstvo*, roč. 32, 2001, č. 1, s. 4–8. ISSN 1210-3144.

KOVÁČIK, J. 1999. Physiological aspects of nutrition in relation to dairy production and milk quality. In *New systems to measure the quality of raw cow's milk*. 1999. p. 41-45

MIGLIOR, F., SEWALEM, A., JAMROZIK, J., BOHMANOVA, J., LEFEBVRE, DM, MOORE, RK. 2007. Genetic Analysis of Milk Urea Nitrogen and Lactose and Their Relationships with Other Production Traits in Canadian Holstein Cattle. In *Journal of Dairy Science*, vol. 90, p. 2468–2479

NIELSEN, B. L. 1999. Perceived welfare issues in dairy cattle, with special emphasis on metabolic stress. Pages 1-8 In *Metabolic Stress in Dairy Cows*. J. D. Oldham, G. Simm, A.

F. Groen, B. L. Nielsen, J. E. Pryce, and T. L. J. Lawrence, In *British Society of Animal Science*, Occasional Publ. 24.

PAVIĆ, V., ANTUNAC, N., MIOČ, B., IVANKOVIĆ, A., HAVRANEK, J. L. 2002. Influence of stage of lactation on the chemical composition and physical properties of sheep milk In *Czech Journal of Animal Science*, vol. 47, 2002, no.2, p. 80–84

REMOND, B., POMIES, D., DUPONT, D., CHILIARD, Y. 2004. Once a day milking of multiparous Holstein cows throughout the entire lactation: milk yield and composition, and nutritional status. *Animal Research*, vol. 53, 2004, p.201-212.

ROSAMI, A., VAN VLECK, L. D. 2002. Estimation of genetic parameters for milk, fat, protein and mozzarella cheese production for the Italian river buffalo *Bubalus bubalis* population, In *Livestock Production Science*, vol. 74, 2002, p. 185–190

SHAHBAZKIA, H. R., AMINLARI, M., TAVASOLI, A., MOHAMADNIA, A. R., CRAVADOR, A. 2009. Associations among milk production traits and glycosylated haemoglobin in dairy cattle; importance of lactose synthesis potential. In *Veterinary Research Communications*, vol. 10, p.1539-1549.

SAWA, A., PIWCZYNSKI, D. 2002. Somatic cell count and milk yield and composition in White × Holstein-Friesian cows. In *Medycyna Weterynaryjna*, vol. 8, 2002, no. 28, p.636-640.

TÓTH, T., SCHMIDT, J. 2004. Effect of different chemical treatments on ruminal starch degradability of corn and wheat. In *Acta Agronomica Óváriensis*, vol.46, 2004, no 2. p. 177-185.

ZHAO, F. Q., KEATING, A. F. 2007. Invited review: Expression and regulation of glucose transporters in bovine mammary gland. In *Journal of Dairy Science*, vol. 90,2007. p.76–86

Contact address:

Ing. Terézia Filipejová, Slovak University of Agriculture Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Department of Animal Physiology, Trieda Andreja Hlinku 2; SK-949 76 Nitra, email: filipejova@gmail.com, +421- 37-641 4288,

prof. Ing. Jaroslav Kováčik, PhD., Slovak University of Agriculture, Faculty of Biotechnology & Food Science, Department of Animal Physiology, Trieda Andreja Hlinku 2; SK-949 76 Nitra, email: jaroslav.kovacik@uniag.sk,

Ing. Marcela Capcarová, PhD., Slovak University of Agriculture, Faculty of Biotechnology & Food Science, Department of Animal Physiology, Trieda Andreja Hlinku 2; SK-949 76 Nitra, email: marcela.capcarova.@uniag.sk, +421-37-6414343

Ing. Adriana Kolesárová, PhD., Slovak University of Agriculture, Faculty of Biotechnology & Food Science, Department of Animal Physiology, Trieda Andreja Hlinku 2; SK-949 76 Nitra, email: adriana.kolesarova@yahoo.com

Ing. Katarína Kirchnerová, PhD., Animal Production, Research Centre Nitra, Institute of Nutrition, + 421-37- 6546 289, email: kirchnerova@scpv.sk,

Ing. Vladimír Foltýs, PhD., Animal Production Research Centre Nitra, Institute of Nutrition, +421- 37- 6546 281, email: foltys@scpv.sk

## PEKÁRSKA KVALITA A REOLOGICKÉ VLASTNOSTI JAČMENNO-PŠENIČNÝCH MÚK

### BREADMAKING QUALITY AND RHEOLOGICAL PROPERTIES OF BARLEY-WHEAT FLOURS

Soňa Gavurníková, Lubomír Mendel, Michaela Havrlentová, Katarína Zirkelbachová, Magdaléna Bieliková, Katarína Bojňanská

#### ABSTRACT

The aim of this work was to study the effect of barley flour addition at 5, 10, 15, 20, 25 and 30 % levels to wheat flour on breadmaking quality and also to determine the optimal portion of barley flour for consumer acceptability. The study involves determination of protein content, starch content and total dietary fibre content in wheat flour and one barley genotype (KM 2283, *Hordeum distichon* subsp. *nudum*). Effect of barley flour on the flour properties, rheological properties of dough by farinograph, the quality of final products and their sensory evaluation was determined. Barley has higher nutritional value especially in total dietary fibre content compared to wheat. Addition of up to 20 % barley flour to wheat flour is acceptable for technological quality, rheological properties of dough and final products in overall flavour and appearance and texture for consumers. Bread and flour with addition of barley flour at 5 % level was comparable to wheat flour and wheat bread for all determined quality parameters.

**Keywords:** barley, wheat, breadmaking quality, rheology of dough, dietary fibre

#### ÚVOD

V posledných rokoch sú skúmané obilniny vzhľadom na ich potencionálne použitie vo vývoji funkčných potravín. Obilniny sú pestované na viac ako 73 % celkovej svetovej pestovateľskej plochy. Možné aplikácie obilnín alebo ich zložiek do funkčných potravín predstavujú fermentovateľné substráty pre rast probiotických organizmov, zvlášť laktobacilly a bifidobaktérie; potravinovú vlákninu propagujúcu niekoľko priaznivých fyziologických účinkov; prebiotiká, nakoľko obsahujú špecifické nestráviteľné uhl'ohydráty; uzatvorené materiály pre probiotiká, ktoré sú určené na zlepšenie ich stability (Charalampopoulos *et al.*, 2002).

Jačmeň (*Hordeum vulgare vulgare* L.) je dôležitou obilninou a radí sa podľa množstva produkcie na desiate miesto vo svete medzi všetkými pestovanými plodinami za plodiny ako sú napr. kukurica, pšenica, ryža, sója, zemiaky, cukrová repa (FAO, 2007). V súčasnosti okolo dvoch tretín úrody jačmeňa sa využíva na kŕmenie, jedna tretina v sladovníctve a okolo 2 % v potravinárstve (Newman, Newman, 2006). V potravinárstve sa z jačmenných produktov najviac konzumujú jačmenné krúpy, ale využíva sa aj jačmenná múka, ktorá môže byť zapracovaná do pšeničných produktov vrátane chleba, koláčov, sušienok, rezancov a extrudovaných snack výrobkov (Newman, Newman, 1991). Zvyšujúca konzumácia produktov obsahujúcich jačmeň je zaznamenaná hlavne kvôli obsahu zdraviu prospešných bioaktívnych zložiek. Jačmeň je najviac známy pre jeho vysoké množstvo potravinovej vlákniny (zvlášť betaglukánu) a fenolytických zložiek, často uvádzaných ako antioxidanty (Manach *et al.*, 2004, Holtekjølen *et al.*, 2008).

Trendy širšieho využívania obilnín v ľudskej výžive súvisia predovšetkým so snahou zvýšiť spotrebu vlákniny, a tým podporiť jeden z faktorov zohrávajúcich dôležitú

úlohu v boji proti niektorým, tzv. civilizačným chorobám (Prugar, Hraška, 1989).

Podľa údajov o spotrebe potravín je konzumácia vlákniny vo vyspelých krajinách sveta nízka a pohybuje sa pod dolnou hranicou odporúčenej dávky. Podľa Chudíkovej (TASR, 2006) z Úradu verejného zdravotníctva Slovenskej Republiky jej Slováci na deň prijímajú iba 10-12 g, čo je len 47 % odporúčanej dávky. Svetová zdravotnícka organizácia (WHO) odporúča denný príjem celkovej potravinovej vlákniny 27-40 g (Guillon *et al.*, 2000). Za zdravotne únosné maximum sa považuje 50-60 g potravinovej vlákniny denne (Kováčiková *et al.* 2003).

Potravinová vláknina má aspoň jednu z nasledujúcich vlastností: podporuje tvorbu stolice, stimuluje fermentáciu v hrubom čreve, znižuje hladinu cholesterolu v sére, znižuje hladinu glukózy a inzulínu v sére (Miko *et al.*, 1996).

Okrem priaznivého preventívneho vplyvu na vznik a priebeh chorôb tráviaceho traktu, akými sú rakovina hrubého čreva a konečníka, chronický zápal hrubého čreva, príp. ochorenia žlčníka, má vláknina veľký význam v prevencii a terapii diabetes mellitus 2. typu, obezity, srdcovo-cievnych chorôb a podobne (Champ *et al.*, 2003). Zvýšenie príjmu vlákniny je veľká a náročná výzva do budúcnosti. Potravinový priemysel by mal produkovať vysoko-vlákninové výrobky s vysoko-vlákninovými prísadami, ktoré by sa vyznačovali lepšou chuťou a lákavejším vzhľadom (Tungland, Meyer, 2002). Prídavok vlákniny do výrobkov je dôležitý a dnes má dve príčiny, a to: zvýšiť príjem vlákniny do organizmu a znížiť kalorické zaťaženie pekárskych produktov (Stauffer, 2001, Gómez, 1997).

Chlieb je hlavnou potravinou, a preto v princípe je ideálnym výrobkom, aby sa v ňom zvýšil obsah potravinovej vlákniny (Trough, 2005).

Cieľom našej práce bolo zistiť vplyv jačmeňa nahého na pekársku kvalitu pšeničnej múky v rôznom percentuálnom

zastúpení a stanoviť optimálny hmotnostný pomer múk pri zachovaní vyhovujúcej pekárskej kvality a senzorických vlastností pekárskeho výrobku.

## MATERIÁL A METÓDY

Na analýzy bola použitá hladká múka špeciál zo pšenice letnej (*Triticum aestivum L.*) zabezpečená z trnavského mlyna firmy PENAM a.s. a zrna jačmeňa nahého (*Hordeum distichon subsp. Nudum L.*) genotyp KM 2283.

### Príprava vzorky

Jačmeň nahý bol zošrotovaný na laboratórnom šrotovníku Laboratory Mill 3100 (Pertin Instruments, Švédsko) na celozrnnú múku.

V pšeničnej múke a v pšenično-jačmenných múkach boli vykonané a stanovované:

### Chemické analýzy

Na analyzátoře (CNS 2000, LECO Corp., USA) bol stanovený obsah dusíka Dumasovou metódou a prepočítaný bol faktorom 5,7 pre pšenicu a 6,25 pre zmesi múk, čím sme dostali obsah bielkovín. Škrob bol stanovený polarimetricky metódou podľa Ewersa STN 46 1011-37 (polarimeter T 3001 RS, Grüss). Celková potravinová vlákna bola stanovená enzymaticky a použitím kitu „Total dietary fibre assay kit“ (Megazyme International Ireland).

### Vlastnosti múky

Obsah popola bol stanovený podľa STN ISO 2171 (2006). Mokrý lepok a napučívanie lepku boli stanovované podľa STN ISO 5531 (1994) na šesťmiestnom vypierači lepku, sedimentačný index, Zelenyho test podľa STN ISO 5529 (2000), číslo poklesu bolo stanovované podľa STN ISO 3093 (2006).

### Vlastnosti cesta

Účinky vlákniny na reológiu cesta počas miesenia boli stanovované pomocou farinografu (Brabender, Duisburg, Nemecko), podľa metódy ICC Standard No. 115/1 (1992). Hodnotili sme väznosť vody, čo je potrebné množstvo vody, ktoré je treba pridať, aby sme dosiahli hodnotu konzistencie 500 Brabenderových jednotiek (BJ), vývin cesta, stabilitu cesta, mäknutie cesta (ICC), farinografické číslo kvality.

### Pekársky test

Pekársky test pozostával zo základnej receptúry: 500 g pšeničnej múky, 25 g kvasníc, 5 g cukru, 7,5 g soli, 5 g bravčovej masti a množstva vody zistenej na farinografe. Pšeničná múka bola nahradená jačmennou múkou v podiele 5, 10, 15, 20, 25 alebo 30 %. Ako kontrola bola použitá vzorka bez prídania jačmennej múky.

### Hodnotenie kvality chleba

Kvalitatívne parametre chleba zahŕňali: hmotnosť bochníkov po upečení a špecifický objem bochníka na 100 g výrobku. Senzorické hodnotenie bochníkov bolo vykonané 4 hodiny a 24 hodín po upečení. V hedonickom 5 bodovom systéme bol sedemčlennou komisiou zhodnotený objem bochníka, tvar bochníka, kôrka (farba, hrúbka, tvrdosť), striedka (farba, tvrdosť, veľkosť a pravidelnosť pórov, lepivosť), vôňa a chuť bochníkov.

### Štatistické zhodnotenie

Výsledky boli štatisticky vyhodnotené jednofaktorovou analýzou rozptylu mnohonásobné porovnanie skupín bolo hodnotené Tukeyovým testom (SPSS 13.0).

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

Pred vykonanými pekárskymi testami bol analyzovaný východiskový rastlinný materiál na obsah nutričných zložiek (tabuľka 1). Múka z jačmeňa nahého vykazovala vyššiu nutričnú hodnotu v porovnaní so pšeničnou múkou a to vo všetkých nami sledovaných parametroch. Výrazne vykazovala vyššie hodnoty v obsahu celkovej potravinovej vlákniny. Oproti pšeničnej múke, ktorá mala obsah celkovej potravinovej vlákniny 3,8 %, jačmenná múka obsahovala až takmer 15 % celkovej potravinovej vlákniny.

**Tabuľka 1:** Priemerné zastúpenie obsahových látok v použitých rastlinných materiáloch

Rastlinný materiál	Bielkoviny [%]	Škrob [%]	Celková potravinová vlákna [%]
Základná pšeničná múka	13,8	58,2	3,8
Jačmeň nahý KM 2283	14,3	65,4	14,96

### Vplyv múky z jačmeňa na vlastnosti pšeničnej múky

Tabuľka 2 sumarizuje vplyv múky z jačmeňa nahého v rôznom percentuálnom zastúpení (5, 10, 15, 20, 25, 30) na kvalitatívne parametre pšeničnej múky. Získané výsledky nám ukazujú, že vo vzorkách vo všetkých prípadoch sa zvýšil obsah popola oproti kontrolnej vzorke. Zastúpenie 5 % jačmennej múky nemalo štatisticky významný vplyv na obsah popola. Obsah mokrého lepku sa po pridaní jačmennej múky znižoval a takisto aj napučivosť lepku štatisticky významne klesala, ale až po pridaní 15 % jačmennej múky. Vo vzorke s prídavkom 5 % jačmennej múky bola napučivosť vyššia (20 cm<sup>3</sup>) a pri zastúpení jačmennej múky 10 % bola totožná s kontrolnou vzorkou. Hodnoty sedimentačného indexu sa so zvyšujúcim podielom jačmennej múky štatisticky významne znižovali, iba v podiele 5 % jačmennej múky sa táto hodnota nemenila. Veľmi nízke hodnoty sedimentačného indexu boli zaznamenané pri 25 a 30 % podiele jačmennej múky, kedy tieto múky nedosiahli minimálnu požadovanú hodnotu 22 cm<sup>3</sup>, čo je hodnota daná STN pre potravinársku pšenicu. Číslo poklesu, ktoré je ukazovateľom enzymatickej aktivity, sa pohybovalo v rozmedzí 227 s až 262 s. Kontrolná vzorka mala hodnotu 236 s. Hodnoty čísla poklesu sa pri pridaní jačmennej múky mierne znižovali, ale iba pri prídavkoch do 15 %. Štatisticky významne rozdiely boli zaznamenané až po pridaní 20 % jačmennej múky, kedy sa so zvyšujúcim podielom jačmennej múky hodnoty čísla poklesu zvyšovali.

### Vplyv múky z jačmeňa na reologické vlastnosti pšeničného cesta

Farinografické vlastnosti pšeničnej múky sú silne ovplyvňované obsahom bielkovín a ich kvalitou (Khatkar et al., 1996, Skendi et al., 2009). Namerané farinografické ukazovatele zobrazuje tabuľka 3. Hodnoty väznosti vody sa oproti kontrolnej vzorke (56,2 %) zvyšovali s narastajúcim podielom jačmennej múky a ich hodnoty sa pohybovali od 58,6 do 62,1 %. Izydorczyk et al. (2005)

vo svojej práci uvádzajú, že po pridaní na vlákninu bohatých frakcií získaných z nahého jačmeňa do rezancov, sa zvýšila väznosť vody a tmavá farba cesta. Prídavky jačmennej múky od 10 % vo výraznej miere zvyšovali stabilitu cesta, hodnoty mäknutia cesta sa znižovali, čo sa

odzrkadlilo na farinografickom čísle kvality, výrazne sa zvýšilo oproti kontrole pri 10, 15, 20, 25 a 30 % podiele jačmennej múky. Zastúpenie 5 % jačmennej múky veľmi priebieha farinografickej krivky neovplyvnilo.

**Tabuľka 2:** Kvalitatívne parametre pšeničnej múky s prídavkom jačmennej múky

	Popol [%]	Mokrý lepok [%]	Napúčavosť lepku [cm <sup>3</sup> ]	Sedimentačný index [cm <sup>3</sup> ]	Číslo poklesu [s]
Kontrola (základná múka)	0,52 a	31,2 a	15 a	29 a	236 ab
5 % KM 2283	0,54 a	30,7 b	20 b	29 a	227 a
10 % KM 2283	0,64 b	29,5 c	16 a	26 b	231 b
15 % KM 2283	0,69 c	28,5 d	13 c	24 c	246 b
20 % KM 2283	0,79 d	28,7 d	12,5cd	22 d	252 cd
25 % KM 2283	0,85 e	26,3 e	11,5 d	20,5eb	251 cd
30 % KM 2283	0,93 f	24,5 f	10 e	18 f	262 d

Hodnoty s rozdielnymi písmenami sú štatisticky významné ( $P \leq 0,05$ ) vyhodnotené Tukeyovým testom (priemerné hodnoty dvoch meraní)

**Tabuľka 3:** Reologické vlastnosti pšenično-jačmenného cesta merané farinografom

	Väznosť vody [%]	Vývin cesta [min]	Stabilita cesta [min]	Mäknutie cesta podľa ICC [BJ]	Farinografické číslo kvality
Kontrola (základná múka)	56,2	1,7	2,7	82	34
5 % KM 2283	58,6	1,7	3,2	73	45
10 % KM 2283	59,2	2,2	8,3	57	103
15 % KM 2283	60,1	1,5	7,7	63	93
20 % KM 2283	60,9	1,7	8,0	60	99
25 % KM 2283	61,9	1,9	8,4	57	105
30 % KM 2283	62,1	2,7	8,3	53	112

*Vplyv múky z jačmeňa na hodnotenie kvality chleba*

Jačmennou múkou obohatené chleby vykazovali vyššiu hmotnosť oproti pšeničnému chlebu (tabuľka 4). Štatisticky významný rozdiel sa prejavil pri podiele 15-30 % jačmennej múky. Špecifický objem bochníka bol naopak nižší oproti pšeničnému chlebu, so zvyšujúcim podielom jačmennej múky sa objem bochníka znižoval, avšak štatisticky významné rozdiely sme zaznamenali až pri podiele 20-30 % jačmennej múky (tabuľka 4).

Pri nahradení základnej pšeničnej múky 40 % múky z nahého jačmeňa sa znížil objem takéhoto chleba na 68 % objemu chleba vyrobeného zo pšeničnej múky (Trogh, 2004). Chlieb pripravený zo zmesi základnej pšeničnej múky s prídavkom jačmennej múky sa vyznačuje dobrými senzorickými vlastnosťami, predovšetkým chuťou,

chrumkavou kôrkou, a však suchšou, drobivou striedkou, pri vyššom prídavku vytvára tvrdšiu hutnejšiu nedotatočne pórovitú striedku. V našej práci s nárastom prídavkov múky z jačmeňa sme nezaznamenali efekt tmavnutia kôrky a striedky, na druhej strane však autori **Dhingra a Jood, (2004), Swanson a Penfield, (1988), Baik a Ullrich, (2008)** vo svojich prácach uvádzajú, že pšeničný chlieb s pridanou jačmennou múkou v podiele 15-20 % bol akceptovateľný v chuti a vône, vzhľade a textúre, ale zvyšujúci pomer jačmennej múky zapríčinil zníženie objemu bochníka, matnú hnedú farbu a tvrdú textúru striedky. **Ereifej et al. (2006)** vyhlasuje, že pšeničný chlieb Balady s obsahom 15-30 % jačmennej múky bol akceptovateľný, ale sa stal tvrdším, tmavším a mal nerovnomerný tvar.

**Tabuľka 4:** Parametre upečených pšenično-jačmenných bochníkov

	Hmotnosť bochníkov po upečení [g]	Špecifický objem bochníka [cm <sup>3</sup> /100g]
Kontrola (základná múka)	180,2 a	319 a
5 % KM 2283	180,9 a	302 ab
10 % KM 2283	181,2 a	304 ab
15 % KM 2283	184,0 b	291 ab
20 % KM 2283	184,6 b	271 bc
25 % KM 2283	187,5 c	240 cd
30 % KM 2283	188,9 d	224 d

Hodnoty s rozdielnymi písmenami sú štatisticky významné ( $P \leq 0,05$ ) vyhodnotené Tukeyovým testom (priemerné hodnoty dvoch meraní).

## ZÁVER

Jačmeň nahý sa vyznačuje priaznivým nutričným zložením, v porovnaní so pšenicou letnou má vyššiu nutričnú hodnotu hlavne v obsahu celkovej potravinovej vlákniny. Na základe nami získaných výsledkov nepriamych a priamych ukazovateľov pekárskej kvality - kvalitatívnych parametrov múky, reologických vlastností cesta a fyzikálnych parametrov chleba možno z technologického hľadiska za najprijateľnejšie považovať zmesi do 20 % prídavku múky z jačmeňa nahého. Chleby s 5 % zastúpením jačmennej múky sa vo všetkých sledovaných kvalitatívnych parametroch vyznačovali rovnakými vlastnosťami ako chleby z pšeničnej múky.

## LITERATÚRA

BAIK, B., K., ULLRICH, S. E., 2008. Barley for food: characteristics, improvement, and renewed interest. In *Journal of Cereal Science*, roč. 48, 2008, s. 233–242.

DHINGRA, S., JOOD, S. 2004. Effect of flour blending on functional, baking and organoleptic characteristics of bread. In *International Journal of Food Science & Technology*, roč. 39, 2004, s. 213–222.

EREIFEJ, K. I., AL-MAHASNEH, M. A., RABABAH, T.M., 2006. Effect of barley flour on quality of balady bread. In *International Journal of Food Properties*, roč. 9, 2006, s. 39–49.

FAO, 2007. Dostupné na internete [ <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx> ] 2.11.2009

GUILLON, F., CHAMP, M., THIBAUT, J. F. 2000. Dietary fibre functional products. In GIBSON, G. R., WILLIAMS, M. Functional foods. Concept to product. Woodhead Publishing Limited, England, 2000, s. 315-343, ISBN 18-55735-03-2

GÓMEZ, C., NAVARRO, A., MANZANARES, P., HORTA, A., CARBONELL, J. V. 1997. Physical and structural properties of barley (1→3),(1→4)-β-glucan. Part I. Determination of molecular weight and macromolecular radius by light scattering. In *Carbohydrate Polymers*, roč. 32, 1997, s 7.

HOLTEKJØLEN, A. K., BÆVRE, A. B., RØDBOTTEN, M., BERG, H., KNUTSEN, S. H. 2008. Antioxidant properties and sensory profiles of breads containing barley flour. In *Food Chemistry*, roč. 110, 2008, s. 414-421

CHAMP, M., LANGKILDE, A. M., BROUNS, F., KETLITZ, B., COLLET, Y. I. B. 2003. Advances in dietary fibre characterisation. 1. Definition of dietary fibre, physiological relevance, health benefits and analytical aspects. In *Nutrition research reviews*, roč. 16, 2003, s. 71.

CHARALAMPOPOULOS, D., WANG, R., PANDIELLA, S.S., WEBB, C. 2002. Application of cereals and cereal components in functional foods: a review. In: *International Journal of Food Microbiology*, roč. 79, 2002, s. 131-141.

IZYDORCZYK, M. S., LAGASSE, S. L., HATCHER, D. W., DEXTER, J. E., ROSSNAGEL, B. G., 2005. The enrichment of Asian noodles with fibre-rich fractions derived from roller milling of hull-less barley. In *Journal of the Science and Food Agriculture*, roč. 85, 2005, s. 2094–2104.

KHATKAR, B. S., BELL, A. E., & SCHOFIELD, J. D. 1996. A comparative study of the interrelationships between mixograph parameters and bread-making qualities of wheat flours and glens. In *Journal of the Science of Food and Agriculture*, roč. 72, 1996, č. 1, s 71–85.

KOVÁČIKOVÁ, E. ET AL., 2003: Potravinová vláknina v potravinách: Odborná príručka. Nitra: ÚVTIP, 2003. 30 s. ISBN 80-89088-27-9

MANACH, C., SCALBERT, A., MORAND, C., REMESY, C., JIMENEZ, L. 2004. Polyphenols: food sources and bioavailability. In *American Journal of Clinical Nutrition*, roč. 79, 2004, č. 5, s. 727–747.

MIKO, M., JANÍČEK, I., KAJABA, I. 1996. *Základy výživy*. 1996. STU Bratislava, 132. ISBN 80-227-0856-9.

NEWMAN, C. W., NEWMAN, R. K., 2006. A brief history of barley foods. In *Cereal Foods World*, roč. 51, 2006, s. 4–7.

NEWMAN, R. K., NEWMAN, C. W., 1991. Barley as a food grain. In *Cereal Foods World*, roč. 36, 1991, s. 800–805.

PRUGAR, J., HRAŠKA, Š. 1989. Kvalita jačmeňa. Príroda: Bratislava, 1. vyd., 1989, 228 s.

SKENDI, A., BILIADERIS, C. G., PAPAGEORGIOU, M., IZYDORCZYK, M. S. 2009. Effects of two barley β-glucan isolates on wheat flour dough and bread properties. In *Food Chemistry*, 2009, article in press, doi:10.1016/j.foodchem.2009.08.030

STAUFER, C. E. 2001. Functional additives for bakery foods. Van Nostrand Reinhold, New York

SWANSON, R. B., PENFIELD, M. P., 1988. Barley flour level and salt level selection for a whole-grain bread formula. In *Journal of Food Science*, roč. 53, 1988, s. 896–901.

TASR. 2006. – Dostupné na internete [ <http://www.medicus.sk/modules.php?op=modload&name=News&file=article&sid=707> ] 16.10.2009

TROGH, I., COURTIN, M., GOESAERT, H., DELCOUR, J. A., ANDERSSON, A. A. M., ÅMAN, P., FREDERIKSSON, H., PYLE, D. L., SØRENSEN, J. F. 2005. From hull-less barley and wheat to soluble dietary fiber-enriched bread. In *Cereal Foods World*, roč. 50, 2005, č. 5, s. 253-260

TROGH, I., COURTIN, M., ANDERSSON, A. A. M., ÅMAN, P., SØRENSEN, J. F. DELCOUR, J. A. 2004. The combined use of hull-less barley flour and xylanase as a strategy for wheat/hull-less barley flour breads with increased arabinoxylan and (1→3, 1→4)-β-D-glucan levels. In *Journal of Cereal Science*, roč. 40, 2004, s. 257

TUNGLAND, B. C., MEYER, D. 2002. Nondigestible oligo- and polysaccharides (dietary fibres): Their physiology in human health and food. In *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, roč. 1, 2002, s. 73.

## Pod'akovanie:

Táto práca vznikla za podpory rezortnej úlohy výskumu a vývoja: 2006 UO 27/091 05 01/091 05 11 „Biologické faktory podmieňujúce efektívnu a konkurencieschopnú rastlinnú výrobu“ ČÚ 03 VE 02 „Charakterizácia a využitie netradičných plodín pri výrobe potravín za účelom zvýšenia výživovej a senzorickej kvality“

a úlohy: VMSP-P-0047-09 : “Tvorba rezistentných typov rastlín jačmeňa siateho f. jarná a pšenice letnej f. ozimná so zlepšenými vlastnosťami genómu pre zvýšenie pridanej hodnoty”.

Naše pod'akovanie patrí pani Ing. Kateřine Vaculovej a firme Agrotest fyto, s.r.o., za poskytnutie línie jačmeňa jarného s bezplevnatým znom KM 2283, ktorá bola vytvorená a študovaná v rámci riešenia projektov MZe ČR č. QD0057, QF3133, QF3291.



### Kontaktná adresa:

Ing. Soňa Gavurníková, Centrum výskumu rastlinnej výroby Piešťany, Bratislavská cesta 122, 921 68 Piešťany, tel.: 033/7722326, e-mail: gavurnikova@vurv.sk

Ing. Ľubomír Mendel, PhD., Centrum výskumu rastlinnej výroby Piešťany, Bratislavská cesta 122, 921 68 Piešťany, tel.: 033/7722326, e-mail: mendel@vurv.sk

RNDr. Michaela Havrentová, PhD., Centrum výskumu rastlinnej výroby Piešťany, Bratislavská cesta 122, 921 68 Piešťany, tel.: 033/7722326, e-mail: havrentova@vurv.sk

Ing. Katarína Zirkelbachová, Centrum výskumu rastlinnej výroby Piešťany, Bratislavská cesta 122, 921 68 Piešťany, tel.: 033/7722326, e-mail: zirkelbachova@vurv.sk

Ing. Magdaléna Bielíková, Centrum výskumu rastlinnej výroby Piešťany, Bratislavská cesta 122, 921 68 Piešťany, tel.: 033/7722326, e-mail: bielikova@vurv.sk

Ing. Katarína Bojnanská, Centrum výskumu rastlinnej výroby Piešťany, Bratislavská cesta 122, 921 68 Piešťany, tel.: 033/7722326, e-mail: bojnanska@vurv.sk

## **NUTRIČNÁ A TECHNOLOGICKÁ KVALITA FAREBNÝCH GENOTYPOV PŠENICE LETNEJ FORMY OZIMNEJ (*TRITICUM AESTIVUM* L.)**

## **NUTRITIVE AND TECHNOLOGICAL QUALITY OF COLOURED BREAD WHEAT GENOTYPES (*TRITICUM AESTIVUM* L.)**

*Milan Chňapek, Zdenka Gálová, Marián Tomka, Ľubomír Rückschloss*

### ABSTRACT

Bread wheat is one of the most important cereals for human nutrition. Genotypes of bread wheat with unusual colour of grain is characterized by presence of phenolic compounds that have antioxidative properties. The main goal of this work was to compare the technological and nutritive quality of coloured bread wheat genotypes with traditional cultivars. Obtained results show that coloured bread wheat genotypes are similar with common bread wheat cultivars so far as the contents of total protein (11.82%), cytoplasmatic protein (25.41%) and coefficient of nutritive quality (76.15%) are concerned. Analysis of high molecular weight glutenin subunits (HMW-GS) by SDS-PAGE and Glu-score calculation showed the high technological quality of 9 out of 14 lines of coloured bread wheat. HMW-GS were also determined for the Slovak wheat cultivars (20, 7, 14+15). Coloured bread wheat genotypes can be used as the donors for higher technological quality as well as the source of bioactive components in breeding programmes.

**Keywords:** coloured bread wheat, technological quality, SDS-PAGE

### ÚVOD

Požiadavky na diverzifikáciu výživy populácie sa premietajú aj do inovácií v potravinárskom priemysle a vedú k rozvoju najrôznejších druhov technológií a uplatnení nových surovín. Nedávne výskumy zaoberajúce sa sledovaním zloženia zrna netradične sfarbených genotypov pšenice potvrdili zvýšenú prítomnosť biologicky aktívnych látok patriacich do skupiny fenolických zlúčenín (Collins 1989; Heim et al., 2002; Martinek et al., 2006; Pennington et al. 2002).

Výskum, ktorý viedli Dykes a Rooney (2007) potvrdil, že konzumácia celého zrna pomáha znižovať riziko kardiovaskulárnych chorôb, ischemické poruchy, diabetes II typu, poruchy metabolizmu a rakovinu hrubého čreva, nakoľko okrem vlákniny obsahuje aj vitamíny, minerálne látky a fenolické zložky ako sú fenolové kyseliny, kondenzované taníny, kumaríny a flavonoidy, ku ktorým sa zaraďujú aj antokyány.

Bolo dokázané, že fenolické látky obsiahnuté v rastline ovplyvňujú jej vzhľad, chuť, vôňu, vyznačujú sa antioxidáciami vlastnosťami a slúžia ako prevencia voči civilizáčnym ochoreniam (Rhodes et al., 1997; Harborne et al., 2000; Naczk et al., 2004).

Antokyány sú zložky flavonoidov rozpustné vo vode, ktoré dávajú zrnu charakteristické modré, červené alebo purpurové zafarbenie. Lokalizované sú hlavne v perikarpe (červené a purpurové genotypy), alebo v aleuronovej vrstve (modré genotypy) zrna. Obsah antokyánov v modro

sfarbených genotypoch koliše v rozsahu 106-153  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ , kým v červených a purpurových genotypoch od 13 do 139  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  (Abdel-Aal et al., 2003 a 2006; Escribano-Bailón et al. 2004; Hu et al., 2007).

V nadväznosti na uvedené sa v práci hodnotila nutričná a technologická kvalita farebných genotypov pšenice letnej formy ozimnej (*Triticum aestivum* L.) na základe niektorých biochemických a molekulárnych markerov (Liang et al., 2009; Tosi et al., 2005).

### MATERIÁL A METODIKA

V práci bolo analyzovaných 12 farebných genotypov a 4 konvenčné odrody pšenice letnej formy ozimnej (*Triticum aestivum* L.), ktoré boli získané z Génovej banky semenných druhov SR CVRV VÚRV v Piešťanoch (Tabuľka 1).

#### *Výpočet obsahu bielkovín a koeficienta nutričnej kvality.*

Percentuálne zastúpenie hrubých bielkovín bolo vypočítané prepočtom z obsahu dusíka stanoveného podľa Kjeldahla (Michalík et al., 2006), ktorý bol vynásobený prepočítacím koeficientom (%N x 5,7). Koeficient nutričnej kvality bol vypočítaný zo zastúpenia bielkovinových frakcií: (Albumíny + Globulíny + Zvyšok/gliadiny)x100

#### *Metóda diskontinuálnej frakcionácie bielkovinového komplexu zrna podľa Osborna*



Bielkovinové frakcie (albumíny, globulíny, gliadíny, gluteníny) boli determinované extrakciou v príslušných

rozpúšťadlách podľa unifikovanej Golenkovej metódy - ICC metóda podľa **Michalíka (2002)**.

**Tabuľka 1:** Analyzované genotypy pšenice letnej (*Triticum aestivum* L.)

Názov	Krajina pôvodu	Farba zrna
<b>Konvenčné genotypy pšenice letnej</b>		
Samanta	SVK	žltá
Lívia	SVK	žltá
Astela	SVK	žltá
Torysa	SVK	žltá
<b>Farebné genotypy pšenice letnej</b>		
Modré zrno	ČR	modrá
Koniny - červená	ČR	červená
UC 66094	USA	modrá
Tr. Etiopicum Araratica - červená	Etiópia	purpurová
Tr. Etiopicum Jakubz	Etiópia	purpurová
Mnohokvietková	Čína	červená
Trojzrnka	ČR	červená
Barevná 25 - modrá	ČR	modrá
UC 66049 - modré TC	USA	modrá
Purple feed-červená iné gény	Austrália	purpurová
F2 52/09 - Akteur x červená	USA	červená
Barevná 9	ČR	modrá

**Elektroforetická frakcionácia zásobných bielkovín (SDS PAGE)**

Elektroforetická separácia gluténových bielkovín bola uskutočnená v systéme diskontinuálnej SDS-PAGE podľa štandardnej metodiky ISTA (**Wrigley, 1992**).

Vizualizácia elektroforeogramov bola realizovná v roztoku pripravenom zmiešaním kyseliny trichlóroctovej a Comassie Brilliant Blue R250. Elektroforetické profily sa načítali pomocou čierno-bielej CCD kamery UVP s filtrom a šošovkami H6x8-II 8-48 mm. Vyhodnocovací systém ďalej pozostáva z UV/VIS tmavej komory, transiluminátora a termocitlivej tlačiarne. Načítané bielkovinové gély boli vyhodnotené pomocou dokumentačného a vyhodnocovacieho systému Grab-It a GelWorks 1D pre Windows. Ako štandardy boli použité odrody pšenice letnej (*Triticum aestivum* L.) Chinese Spring a Marquis. Genetickú interpretáciu alelickej zostavy v lokusoch Glu – 1A, Glu – 1B a Glu – 1D a následný výpočet Glu – hodnotenia sa realizoval podľa katalógu alel (**Payne et. al. (1987)**).

**VÝSLEDKY A DISKUSIA**

Nutričná a technologická kvalita pšenice letnej je komplexnou veličinou súvisiacou s chemickým zložením zrna a predovšetkým s percentuálnym zastúpením jednotlivých frakcií bielkovín, od ktorého závisí smer využitia zrna (pšenica na mlynsko – pekárske spracovanie, pšenica krmna, pšenica na špeciálne potravinárske využitie). Zloženie zásobných bielkovín endospermu zrna,

ktoré tvoria komplex nazývaný lepok vyznačujúci sa viskoelastickými vlastnosťami, je genotypovou záležitosťou a determinuje spracovanie a využitie múky (**Novotný a Jureček, 2000**).

Obsah bielkovín v zrne pšenice je dôležitý kvalitatívny ukazovateľ. Z našich výsledkov vyplýva (Tabuľka 2), že priemerný obsah bielkovín v konvenčných odrodách bol 11,11%, pričom najvyšší obsah dosiahla odroda Torysa (13,75%) a najnižší Samanta (7,99%). Pri hodnotení farebných genotypov pšenice letnej, možno konštatovať, že priemerný obsah bielkovín bol 11,88%, pričom pri jednotlivých kultivaroch varíroval v rozsahu od 10,80% do 13,04%.

Uvedené výsledky potvrdzujú závery viacerých autorov (**Shewry et al., 2002; Skylas et al., 2005; Michalík et al., 2006; Šramková et al., 2009**), ktorí v sledovaných kolekciách pšenice letnej stanovili obsah celkových bielkovín v rozsahu 10-18%. Uvedené výsledky potvrdzujú závery viacerých autorov (**Shewry et al., 2002; Skylas et al., 2005; Michalík et al., 2006; Šramková et al., 2009**), ktorí v sledovaných kolekciách pšenice letnej stanovili obsah celkových bielkovín v rozsahu 10-18%.

Nutričná kvalita zrna pšenice je ovplyvnená okrem iného aj zastúpením albumínov a globulínov, ktoré sa vyznačujú najvhodnejším aminokyselinovým zložením, nakoľko sa v nich nachádza najviac esenciálnych aminokyselín (**Michalík et al., 2006**). Z našich výsledkov v tabuľke 2 vyplýva, že najvyššie zastúpenie albumínov a globulínov v konvenčných odrodách vykázala odroda Samanta

(29,1%), najnižšie Lívia (22,24%), s priemerom ostatných odrôd 25,20%, z čoho vyplýva, že z hľadiska nutričného je najlepšia odroda Samanta. Obsah nutrične najvýznamnejších bielkovín vo farebných pšeniciach bol

v priemere 25,41%, s najvyšším zastúpením v genotype Koniny (25,75 %), čo je o 17,47% viac v porovnaní najnižším obsahom v genotype Mnohokvietkova (21,25%).

**Tabuľka 2:** Obsah a frakčná skladba bielkovín v pšenici letnej (%).

Názov vzorky	Obsah bielkovín	Alb+Glob	Gliadíny	Gluteníny	Zvyšok
<i>Konvenčné genotypy pšenice letnej</i>					
Samanta	7,99	29,01	33,00	28,01	8,98
Lívia	11,35	22,24	43,67	27,16	6,42
Astela	11,35	25,10	36,67	31,34	6,80
Torysa	13,75	24,45	39,93	29,93	5,69
Priemer	11,11	25,20	38,32	29,11	6,97
<i>Farebné genotypy pšenice letnej</i>					
Modré zrno	11,19	25,41	43,13	21,74	8,55
Koniny - červená	12,80	25,75	43,74	22,49	7,26
UC 66094	11,83	25,67	42,97	22,30	8,38
Tr. Etiopicum Araratica- červená	11,04	25,21	42,77	22,47	8,99
Tr. Etiopicum Jakubz	10,80	23,71	39,12	29,20	7,39
Mnohokvietkova	12,80	21,25	42,14	29,49	6,99
Trojzrnka	13,04	22,08	41,71	29,43	6,65
Barevná 25 - modrá	11,04	23,19	39,15	30,01	7,54
Barevná 9	11,99	24,00	41,35	25,33	8,27
Priemer	11,88	25,41	43,13	21,74	8,55

Vysvetlivky: Alb+Glob – albumíny a globulíny

Technologická kvalita pšenice sa posudzuje predovšetkým z obsahu lepkových bielkovín, ktoré sú tvorené frakciami gliadínov a glutenínov a sú významné spolu so škrobom pri spracovaní pšenice pre pekárenské využitie, sa v konvenčných odrodách pohyboval od 61.01% (Samanta) - 70.83% (Lívia), čo potvrdzuje predchádzajúce konštatovanie, že technologicky najvhodnejšou sa ukázala odroda Lívia. Vo farebných pšeniciach zastúpenia lepkových bielkovín variovalo od 64,87% do 71,63% s priemerom 67,54%, čo je porovnateľné s konvenčnými pšeniciami.

Zo zastúpenia jednotlivých bielkovinových frakcií je možné vypočítať koeficient nutričnej kvality zrna (KNK), ktorý je dôležitým znakom pre posúdenie výživnej kvality zrna. Hodnota KNK sa v konvenčných vzorkách pohybovala v rozpätí od 65,63 – 115,12% s priemerom 85,81%, kým vo farebných pšeniciach od 67,01% do 79,96%, s priemernou hodnotou 76,15%, z čoho vyplýva, že z hľadiska hodnoty koeficienta nutričnej kvality sa ako lepšie ukázali konvenčné pšenice.

Dosiahnuté výsledky potvrdzujú práce viacerých autorov (Bojňanská, 1995; Gálová et al., 2003; Michalík et al., 2006), ktorí uvádzajú, že pomer jednotlivých zložiek bielkovinového komplexu zrna a ich množstvo je veľmi variabilné, mení sa v značných rozmeroch so zmenou obsahu celkových bielkovín, v závislosti od podmienok

pestovania, genetických zvláštností a tiež v procese dozrievania zrna.

Základnú charakteristiku analyzovaných genotypov pšenice letnej je možné dokresliť elektroforetickými analýzami na PAGE v prítomnosti SDS, pomocou ktorých sa gluténové bielkoviny rozdelia na monoméne gliadíny (alfa-, beta-, gama- a omega-gliadíny) a agregované gluteníny tvorené vysokomolekulárnymi (HMW-GS) a nízkomolekulárnymi glutenínovými podjednotkami (LMW-GS). HMW-GS vystupujú ako molekulárne markery, ktoré predikujú technologickú kvalitu pšenice. Poznanie genetického pozadia jednotlivých genotypov pomáha šľachtiteľom v procese kríženia získavať potomstvá s požadovanými akostnými parametrami (Bushuk a Bekes, 2002). V nadväznosti na uvedené sa realizovala detekcia individuálnych vysokomolekulárnych glutenínových podjednotiek (HMW-GS), pričom sa sledovala variabilita elektroforetického spektra HMW-GS vo vzťahu k technologickej kvalite zrna v analyzovaných konvenčných a farebných genotypoch pšenice.

Z dosiahnutých výsledkov vyplýva (Tabuľka 3), že konvenčné odrody sa vyznačujú rozdielnym zastúpením individuálnych HMW-GS, čo sa odzrkadlilo aj na hodnote Glu-skóre, z ktorého vyplýva, že najvyššiu technologickú kvalitu vykázala odroda Astela, potom Samanta, Lívia a najnižšiu hodnotu dosiahla Torysa, v ktorej bola

detegovaná podjednotka 2+12, ktorá vystupuje ako marker nevhodnej technologickej kvality zrna pšenice.

Z elektroforeogramov farebných genotypov pšenice letnej formy ozimnej vyplýva, že 10 analyzovaných kultivarov bolo homogénnych jednolíniových, pričom bolo zistených celkovo 11 elektroforetických profilov. V dvoch

kultivaroch Koniny a Barevná 9 bola detegovaná dvojlíniovosť, pričom v odrode Koniny boli stanovené technologicky veľmi rozdielne podjednotky s Glu-hodnotením 8 resp. 4, čo signalizuje nevyhovujúcu technologickú kvalitu. Odroda Barevná 9 vykazala Glu-skóre 7 a 9, čo predikuje dobrú pekársku kvalitu.

**Tabuľka 3:** Zastúpenie glutenínových podjednotiek a Glu-skóre v pšenici letnej.

Názov	HMW-GS			Glu-skóre
	Glu-A1	Glu-B1	Glu-D1	
<i>Konvenčné genotypy pšenice letnej</i>				
Samanta	0	7+8	5+10	8
Lívia	0	7+9	5+10	7
Astela	2*	7+9	5+10	9
Torysa	0	7+8	2+12	6
<i>Farebné genotypy pšenice letnej</i>				
Modré zrno	1	20	5+10	8
Koniny - červená	2*	7	5+10	8
	0	7	2+12	4
UC 66094	1	7+8	5+10	10
Tr. Etiopicum araratica - červená	0	7+8	5+10	8
Tr. Etiopicum Jakubz	0	7+8	5+10	8
Mnohokvietková	0	7+8	5+10	8
Trojzrnka	0	7+8	2+12	6
Barevná 25 - modrá	0	20	5+10	6
UC 66049 - modré TC	1	7+8	5+10	10
Purple feed-červená iné gény	1	7+8	2+12	8
F2 52/09 - Akteur x červená	2*	14+15	2+12	6
Barevná 9	1	7+9	5+10	9
	1	7+9	2+12	7

Majoritný podiel (17%) z analyzovanej kolekcie predstavovali genotypy s komponentnou skladbou HMW-GS 0, 7+8, 5+10 a genotypy s komponentnou skladbou HMW-GS 1, 7+9, 5+10 (11%). Uvedené je v súlade s výsledkami zistenými inými autormi, ktorí analyzovali domáci sortiment pšeníc ako **Gregová et al. (1995)**, **Kraic et al. (1999)**, **Gálova et al. (2002, 2003)** a ďalšími, ktorí svojimi analýzami potvrdili jednolíniovosť pšenice letnej formy ozimnej a teda aj vhodnosť glutenínových bielkovín pri identifikácii, charakteristike a diferenciacii jednotlivých genotypov. Elektroforetický profil individuálnych genotypov pšenice letnej formy ozimnej môžeme považovať za tzv. „fingerprinting“.

Z výsledkov ďalej vyplýva (Tabuľka 3), že z génov kódovaných lokusom Glu-A1 sa najčastejšie vyskytovala nulová alela (47% genotypov), potom bola identifikovaná podjednotka 1 v 9 kultivaroch a podjednotka 2\* v dvoch líniiach.

Lokus Glu-B1 bol najčastejšie reprezentovaný HMW - gluténovými subjednotkami 7+8 (38% genotypov), pri šiestich kultivaroch boli detegované podjednotky 7+9.

Podjednotky 17+18, 20 a 7 boli detegované zhodne vždy v 2 genotypoch a genotyp F2 52/09 obsahoval dvojicu podjednotiek 14+15.

Najvyšší vplyv na technologickú kvalitu múky zrna pšenice majú alely lokalizované na lokuse Glu-D1, ktoré sa však pozitívne prejavajú len v kombinácii s vysokokvalitnými HMW-GS kódovanými lokusmi Glu-A1 a Glu-B1 (**Kolster 1992**). Z dosiahnutých výsledkov vyplýva, že na pekársku kvalitu múky kladne vplyvajúca dvojica podjednotiek 5+10 bola identifikovaná v 11 genotypoch (52%), kým v 8 genotypoch (38%) bola stanovená dvojica subjednotiek 2+12, resp. v dvoch genotypoch podjednotky 3+12 (10%), ktoré negatívne ovplyvňujú technologickú kvalitu zrna pšenice.

V porovnaní s konvenčnými pšenicami možno konštatovať, že vo farebných pšenicách boli identifikované podjednotky, ktoré sa bežne nevyskytujú v sortimente slovenských pšeníc ako sú podjednotky 20, 7, 14+15, ktoré môžu slúžiť ako donory pri šľachtení na vyššiu technologickú kvalitu.

Uvedené výsledky sú v súlade s inými autormi, ktorí variabilitu HMW-GS kódovaných jednotlivými lokusmi pripisujú predovšetkým agroklimatickým podmienkam pestovania v danom geografickom území (**Branlard et al., 2003, Demir et al., 2004, Sun et al., 2006**).

Zo zastúpenia jednotlivých HMW glutenínových podjednotiek možno predigovať technologickú kvalitu zrna pšenice vypočítaním Glu-hodnotenia (**Payne et al. 1987**), ktorého najvyššia hodnota môže byť 10. V tomto smere najvyššie bodové Glu-hodnotenie (10) dosiahli genotypy UC 66049 a UC 66094, kým najnižšiu hodnotu (4) dosiahla jedna z línií genotypu Koniny (Tabuľka 3). Uvedené je v zhode s rozsiahlymi prácami venovanými vplyvu bielkovín na technologickú kvalitu realizované **Veraverbekom et al. (2002) a Laszitym (2003)** a ďalšími.

## ZÁVER

Zloženie HMW-GS a na ich základe vypočítané Glu-skóre je rýchlym a presným nástrojom vhodným na predikciu technologickej kvality pšenice v procese šľachtenia a nákupu osiva. Na základe našich výsledkov môžeme skonštatovať, že využitie farebných genotypov pšenice letnej formy ozimnej (*Triticum aestivum* L.) je aj napriek nižšiemu obsahu hrubých bielkovín veľmi perspektívne v procese kríženia. Technologická kvalita hodnotených genotypov pšenice letnej na základe elektroforetických analýz HMW-GS a Glu-skóre vykázala dobrú až veľmi dobrú kvalitu, pričom boli detegované HMW-GS, ktoré sa bežne nevyskytujú v sortimente slovenských pšeníc (20, 7, 14+15), a ktoré môžu slúžiť ako donory pri šľachtení na vyššiu technologickú kvalitu zrna.

Farebné pšenice letnej sú významné aj z hľadiska zvýšeného obsahu fenolických látok, hlavne antokyánov, ktoré vystupujú ako bioaktívne látky majúce pozitívny vplyv pri prevencii kardiovaskulárnych a karcinogénnych ochorení.

## LITERATÚRA

ABDEL-AAL, E-S., M. a HUCL, P., 2003. Composition and stability of anthocyanins in blue-grained wheat. In *J. Agric. Food Chem.*, č. 51, 2003, s. 2174

ABDEL-AAL, E-S., YOUNG, J. C., RABALSKI, I. 2006. Anthocyanin composition in black, blue, pink, and red cereal grains. In *J. Agric. Food Chem.* č. 54, 2006, s. 4696

BOJŇANSKÁ, T. 1995. Vzťahy medzi vybranými ukazovateľmi technologickej kvality a bielkovinovými frakciami ozimnej pšenice. In *Aktuálne problémy riešené v poľnohospodárstve*, 1995, s. 60 – 64

BRANLARD, G., DARDEVER, M., AMIOUR, N., IGREJAS, G. 2003. Allelic diversity of HMW and LMW glutenin subunits and omega-gliadins In *French bread wheat (Triticum aestivum L.). Genetic Resources and Crop Evolution*, č. 50, 2003, s. 669-679

BUSHUK, W., BEKES, F. 2002. Contribution of protein to flour quality, In *Proceedings of the ICC Conference "Novel Row Materials, Technologies and Products - new Callange for the Quality Control" Budapešť* č. 14-19

COLLINS, F. W. 1989. Oat phenolics: avenanthramides, novel substituted N-cinnamoylanthranilate alkaloids from oat groats and hulls. In *J. Agric. Food Chem.* č. 37, 1989, s. 60

DYKES, L., ROONEY, L. W. 2006. Sorghum and millet phenols and antioxidants. In *J. Cereal Sci.*, č. 44, 2006, s. 236

DEMIR, Z., ATLI, A., BARAN, I. 2004. Glutenin subunits composition of some old and new wheat varieties in winter wheat growing regions of Turkey. In *9th International Wheat Genetics Symposium Saskatoon*, 2004

ESCRIBANO-BAILÓN, M. T., SANTOS-BUELGA, C., RIVAS-GONZALO, J. C. 2004. Anthocyanins in cereals. In *Journal of Chromatography A*, č. 1054, 2004, s. 129-141

GÁLOVÁ, Z., MICHALÍK, I., KNOBLOCHOVÁ, H., GREGOVÁ, E. 2002. Variation in HMW glutenin subunits of different species of wheat. In *Rostlinná výroba*, č. 44, 2002, s. 111-116

GÁLOVÁ, Z., STAROVIČOVÁ, M., KNOBLOCHOVÁ, H., GREGÁŇOVÁ, Ž. 2003. Biochemical and molecular characterization of new wheat genotypes. In *Biologia*, č. 58, 2003, s. 1061-1066

GREGOVÁ, E., KRAIC, J., ŽÁK, I. 1995. Charakterizácia odrôd pšenice pomocou glutenínov. In *Biochemické, molekulárne a morfológické techniky v identifikácii odrôd rastlín*, ÚKSÚP, 1995, s. 11-14

HARBORNE, J. B., WILLIAMS, C. A. 2000. Advances in flavonoids research since 1992. In *Phytochemistry*, č. 55, 2000, s. 481

HEIM, K. E., TABLIAFERRO, A. R., BOBILYA, D. J. 2002. Flavonoid antioxidants: Chemistry-metabolism and structure-activity relationships. In *J. Nutr. Biochem.*, č. 13, 2002, s. 572

HU, C., CAI, Y. Z., LI, W., CORKE, H., KITTS, D. D. 2007. Anthocyanin characterization and bioactivity assessment of a dark blue grained wheat (*Triticum aestivum* L. cv. Hedong Wumai) extract. In *Food Chemistry*, č. 104, 2007, s. 955-961

KOLSTER, P., KRECHTING, C. F., Van GELDER, W. M. J. 1992. Quantification of individual high molecular weight glutenin subunits of wheat using SDS-PAGE and scanning densitometry. In *Journal Cereal Science*, č. 15, 1992, s. 49-61

KRAIC, J. 1999. Molekulárna diferenciácia a charakterizácia genotypov rastlín. In *Doktorandská dizertačná práca*, VÚRV Piešťany, 1999, 109 s.

LIANG, D., TANG, J., PEŇA, R. J., SINGH, R., HE, X., SHEN, X., DANIAN, Y., XIA, X., HE, Z. 2009. Characterization of CIMMYT bread wheats for high and low molecular weight glutenin subunits and other quality related genes with SDS-PAGE, RP-HPLC and molecular markers. In *Eupytica*, č. 171, 2009, In Press

MARTINEK, P., COUFALOVÁ, O., KUREČKA, R., NOVÁKOVÁ, E., MIKULCOVÁ, J. 2006. Netradiční barva obiliek pšenice (*Triticum aestivum*, L.), její genetická podmíněnost a možnost využití v potravinářství. In *Nové poznatky z genetiky a šľachtenia poľnohospodárskych rastlín*. Zborník z 13. vedeckej konferencie, Piešťany, VURV, 2006

MICHALÍK, I. 2002. Unifikovaná metóda diskontinuálnej frakcionácie bielkovinového komplexu zrna obilnín. In *Agriculture*, č. 48, 2002, s. 333-341

MICHALÍK, I. 2006. Výživná a technologická kvalita rastlinných produktov a ich potravinárske využitie. In *Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre*, vedecká monografia, 2006, 198 s.

NACZK, M., SHAHIDI, F. 2004. Extraction and analysis of phenolics in food. In *J. Chromatogr. A*, č. 95, 2004, 1054

NOVOTNÝ, F., JUŘEČKA, D. 2000. Odrůdová skladba a technologická jakost pšenice a ječmene, In *Sb. semináře ZVU Kroměříž*, 2000, s. 68-74

LASZTITY, R. 2003. Prediction of wheat quality – success and doubts, In *Periodica Polytechnica*, č. 46, 2003, s. 39-49

PAYNE, P. I., NIGHTINGALE, M. A., KRATTIGER, A. F., HOLT, L. M., 1987. The relationship between HMW glutenin subunit composition and the bread-making quality of British-grown wheat varieties, In *Journal of the Science of Food and Agriculture*, č. 40, 1987, s. 51-65

PENNINGTON, J. A. T., 2002. Food composition databases for bioactive food components. In *J. Food Comp. Anal.*, č. 15, 2002, s. 419

RHODES, M. J. C., PRICE, K. R., 1997. Identification and analysis of plant phenolic antioxidants. In *Eur. J. Cancer Prev.*, č. 6, 1997, s. 518

SHEWRY, P. R., HALFORD, N. G., 2002. Cereal seed storage proteins: structures, properties and role in grain utilization, In *Journal of Experimental Botany*, roč. 53, 2002, č. 370, s. 947-958.

SKYLAS, D. J., Van DYK, D., WRIGLEY, C. W., 2005. Proteomics of wheat grain, In *Journal of Cereal Science*, 2005, č. 41, s. 165-179.

SUN, X., HU, S., LIU, X., QIAN, W., 2006. Characterization of the HMW glutenin subunits from *Aegilops searsii* L. and identification of a novel variant HMW glutenin subunit. In *Theoretical and Applied Genetics*, č. 113, 2006, s. 631-641

ŠRAMKOVÁ, Z., GREGOVÁ E., ŠTURDÍK E., 2009. Chemical composition and nutritional quality of wheat grain, In *Acta Chimica Slovaca*, roč. 2, 2009, č. 1, s. 115-138.

TOSI, P., MASCI, S., GIOVANGROSSI, A., D'OIDIO, R., BEKES, F., LARROQUE, O., NAPIER, J., SHEWRY, P., 2005. Modification of the low molecular weight (LMW) glutenin composition of transgenic durum wheat: effect on glutenin polymer size and gluten functionality. In *Molecular Breeding*, č. 16, 2005, s. 113-126

VERAVERBEKE, W. S., DELCOUR, J. A. 2002. Wheat protein composition and properties of wheat glutenin in relation to breadmaking functionality, In *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, roč. 42, 2002, s. 179-208

WRIGLEY, C. W. 1992. Identification of cereal varieties by gel electrophoresis of the grain proteins. In *Seed Analysis*, 1992, s. 17 – 41

### Pod'akovanie:

Táto práca bola riešená v rámci grantovej výskumnej úlohy VEGA č. 1/0471/09 „Genetické a molekulárne markery kvality cereálií a pseudocereálií“. Kolektív autorov ďakuje Génovej banke semenných druhov SR SCPV VÚRV v Piešťanoch za poskytnutie vzoriek.

### Kontaktná adresa:

Ing. Milan Chňapek, PhD., Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre, FBP, KBB, Trieda Andreja Hlinku 2, 949 76 Nitra., E-mail: chnapek@afnet.uniag.sk, Tel.: 037 641 4277

prof. RNDr. Zdenka Gálová, CSc., Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre, FBP, KBB, Trieda Andreja Hlinku 2, 949 76 Nitra. Tel.: 037 641 4596, E-mail: zdenka.galova@uniag.sk

Ing. Marian Tomka, Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre, FBP, KBB, Trieda Andreja Hlinku 2, 949 76 Nitra. Tel.: 037 641 4277, E-mail: tomka@afnet.uniag.sk

Ing. Ľubomír Rückschloss, Výskumno-šľachtiteľská stanica Vigľaš-Pstruša, Malý Šariš, CVRV-VÚRV Piešťany, 962 02 Vigľaš-Pstruša, tel.: +421 45 5394541

## KVALITA MÄSA A MLIEKA TRANSGÉNNÝCH KRÁLIKOV TRANSGENIC RABBIT MILK AND MEAT QUALITY

*Peter Chrenek, Alexander Makarevich, Jozef Bulla*

### ABSTRACT

This review summarizes our recent data based on the analyses of rabbit milk and meat from four generations of transgenic animals. Rabbit transgenic founders were generated by the microinjection of foreign DNA (mammary gland specific transgenic over-expression of hFVIII) into the egg and several generations of transgenic rabbits were obtained after mating of transgenic founders with non-transgenic rabbits. Our results from several reports showed that milk and meat performance of transgenic rabbit over several generations did not differ significantly from those of non-transgenic animals.

**Keywords:** rabbit, transgenic, milk and meat yield, mWAP-hFVIII gene

### INTRODUCTION

Despite more than 50 reports on transgenic rabbit generations, there are a few data on the quality of obtained recombinant proteins and on possible effects of transgenesis on meat and milk performance of genetically modified animals.

The need of systematic study of biological properties in transgenic animals is a consequence of their spread and commercial utilization in various spheres of human activity. Possible interactions of integrated genes of transgenic organisms with the existed genotype are one of the intensive by discussed problems. Emigration of

integrated foreign gene from the experimental population into production herds can markedly affect performance with possible consequences in food chain. Therefore better knowledge of relations between performance indexes and expression of integrated gene gives precondition for objective evaluation of application benefits from transgenesis.

### MILK QUALITY FROM TRANSGENIC RABBITS

The use of transgenic animals as bioreactors (“pharmaceutical farming”) is cost-effective and variability

in post-translational modification is an alternative to cell culture methods (**Bosze 2003, Chrenek and Makarevich, 2008**).

Animals automatically supplement their body fluids with fresh nutrients, remove waste products, reliably regulate their internal temperature and pH and resist pathogens. By targeting the expression of the transgene product, so that the secretory cells of lactating mammary gland produce it, "farmers" may collect and process body fluids with minimal effort. The mammary gland probably is the most promising target tissue because it produces large amounts of protein in a temperature-regulated fluid, that may be collected daily in a non-invasive fashion. Transgenic animals are not only cost-effective bioreactors, but with the complex secretory cell types and organs of the mammalian organism, can perform much more complicated protein modifications than simply cultured cells. Recombinant proteins can be produced in prokaryotic or eukaryotic systems, so they are derived from bacterial cells, yeast cells, transformed plant and animal cells, and even from live bioreactors (transgenic animals). Difficulty in obtaining transgenic individuals producing high levels of recombinant, biologically active proteins in required form, with subsequent washing and clinical testing are the largest disadvantages of using farm animals for such purposes (**Chrenek and Makarevich, 2008**).

The use of transgenic animals allows the production of valuable human proteins, enzymes, hormones and growth factors in the milk. By targeting the expression of the transgene product to the secretory cells of animals we may collect and process body fluids with minimal effort. Transgenic rabbit system is a lower cost alternative primarily because rabbits are smaller and thus less expensive to maintain but also because the rabbit reproductive cycle is much shorter than that of the large domesticated animals (**Bozse et al., 2003**).

Production of recombinant proteins in the mammary gland of transgenic animals is dependent on gene promoters used in transgene constructs. Most of the studies have been carried out with the ovine  $\beta$ -lactoglobulin, bovine  $\alpha$ -lactalbumin, caprine  $\beta$ -casein or mouse whey acidic protein (WAP) promoter (**Pollock et al., 1999**). The mouse WAP promoter has been used in basic biological studies, as well as for the synthesis of pharmacologically active human proteins, to direct the expression of heterologous genes to alveolar epithelial cells (**Van Cott et al., 2001, Palmer et al., 2003, Chrenek et al., 2002, 2005, 2007a**).

The lactation specificity of the regulatory regions used for control of mammary gene expression in transgenic animals is very important in case of expression of foreign biologically active proteins, because these proteins may exhibit their biological functions in the animal if secreted prior to the tight junction formation in the mammary epithelial cells (**Chen et al., 2002**). The effects of expressing growth factors, hormones, oncogenes, ECM components and receptors on mammary gland development and differentiation have been well documented (**Jhappan et al., 1993**). These effects range in phenotype from impaired lobulo-alveolar development, to decreased milk protein synthesis during lactation, without

effects on glandular epithelium in activated Ha-ras mice, constitutive milk protein gene transcription in c-myc mice, reduction in milk protein synthesis and lactation deficiency in transgenic mice (**Nemir et al., 2000**), to premature dedifferentiation of secretory epithelial cells and a decrease in milk protein mRNA levels in beta1-integrin mice, to hyperplasia and delayed involution in human FGF4 transgenic mice (**Morini et al., 2000**).

Transgenic animals, used as bioreactors to produce human proteins, represent new horizon in animal husbandry often followed by low viability of newborn animals. Repercussion of that can be also irregular secretion and alteration of milk composition. Milk is usually the sole source of nourishment of young mammals, therefore offspring growth and development depends on milk. Rabbit milk yield may be affected by breed of doe (**Lukafahr et al., 1983**), nutrition (**Fraga et al., 1989; Chrastinova et al., 1997**), number of kids suckling and their age of weaning (**Lukafahr et al., 1983; Taranto et al., 2003**) and pregnancy during lactation (**Lukafahr et al., 1983**). Intensive recombinant human protein production by mammary gland of transgenic rabbit necessitates the knowledge of the lactation curve and quality (composition) of milk, as a possible effect of transgenesis on milk yield (**Chrenek et al., 2007b**).

Stable transgene integration in transgenic rabbits using different gene constructs (hPC, hFVIII) in different generations was proved in our laboratory (**Chrenek et al., 2002, 2005**). **Zinovieva et al. (1998)** obtained six generations of transgenic rabbits with stable integration and production of biologically active IGF-1 without any negative effect on their physiological or reproductive performance. Phenotypic and genotypic stability of hPC and hFVIII gene expression has been reported in several multiple lines of transgenic animals including mouse and pigs (**Chen et al., 2002, Chrenek et al., 2007b**).

Milk production of transgenic rabbit females (mWAP-hFVIII) was comparable with those of non-transgenic does (**Chrenek et al., 2007b**). **Schranner (1993)** reported similar results and this observation is in agreement with previously published reports by other authors (**Chrastinova et al., 1997, Dragin et al., 2004, 2006, Chrenek et al., 2006**). Generally, rabbit milk yield shows gradual increase until 20<sup>th</sup> day of lactation, afterwards it decreases by next 10 days (**Lukafahr et al., 1983, Chrastinova et al., 1997**). This observation is in agreement with our recent data on transgenic and non-transgenic rabbit milk yield in both of the investigated lactations (**Chrenek et al., 2007b**).

Rabbit milk composition varies depending on various factors, such as breed, nutrition, lactation stage or number of pups (**Chrastinova et al., 1997**). Analysis of transgenic rabbit milk samples have showed that all the transgenic females tested in this work produced lower or higher concentration of rhFVIII depending on transgenic females with confirmed biological activity and no significant differences were found in the content of milk fat, protein and lactose (**Chrenek et al. 2007b**). This concentration was lower compared to our previous results (**Chrenek et al., 2005, 2007a**). The higher variability and lower rhFVIII concentration in the F4 generation may be explained by

different copies of integrated gene, the site of transgene insertion or its genomic environment, which could influence its expression (Salvo-Garrido et al., 2004).

#### Meat quality from transgenic rabbits

In practice specialized rabbit lines are used for the meat production that maximize heterosis and complementary effects in the generation of commercial hybrids within hybridisation schemes. Lines are created on the basis of multi-breed crossing and various types of selection. Results of such processes are populations of animals with fixed genes for the complex of maternal properties (maternal lines) and population bred for intensive growth and fattening capacity (paternal lines) (Mach et al., 2004). Harmonized criteria that enable comparison of parameters among various groups of animals are used to evaluate the level of performance (Rafay et al., 2008).

Usage of the gene construct (WAP-hFVIII) should provide expression of recombinant protein into the mammary gland only. Since transgenic rabbits should have integrated gene in each cell with nucleus, the objective of this work was to evaluate the possible effect of the gene integration on 1) complex of growth and carcass traits, 2) qualitative meat parameters and 3) concentrations of selected constituents in rabbit meat.

Values of studied characteristics of growth, carcass characteristics and meat quality mentioned in our reported papers are comparable with values in zootechnical literature (Ludewig et al., 2003). In most cases the presence of WAP-hFVIII gene in genotype of rabbits generally did not influence milk and meat performance. More important differences were noticed in meat quality characteristics only.

In previous article (Rafay et al., 1996) we found content of water in rabbit meat (m. long. dorsii) in value corresponding with data obtained from muscle of leg in both groups in this study. Similarly Szendrő et al., (1996) assessed water content in samples of muscle from hind legs of rabbits weighing 2.500 – 2.590 kg. Statistically significant difference in water content in muscles of legs between transgenic and non-transgenic animals found in our work represents 0.81 %, and it can be taken for artefact connected with manipulation of samples before analysis and low degree of statistical group variability. Muscular fat consists of phospholipides of muscular contractile fibres, fibroblasts and membranes of adipocytes, glycerides located on adipocytes around fibres and free fatty acids. It stimulates nutritive value and organoleptic properties in meat.

According to Lambertini et al., (1996) and Hernandez et al., (1998), differences in meat quality parameters among genotypes of rabbits are constant. Content of fat improves at the expense of water content (Battaglini et al., 1994). It was found in some cases that in older rabbit glycolytical metabolism is increased, concentration of myoglobin and pH value decreases (Hulot and Ouhayoun, 1999). Changes observed in content of water, fat, energy and water holding capacity are connected with the change of histological structure and level of metabolic processes. It is possible that these changes are caused by pleiotropic effect of the integrated gene.

#### CONCLUSION

In conclusion, present review documents that recombinant hFVIII can be steadily secreted over multiple generations without any interference on milk and meat production and quality. Our results from several reports showed that milk and meat performance of transgenic rabbit over several generations did not differ significantly from those of non-transgenic animals.

#### REFERENCE

- BATTAGLINI, M., CASTELLINI, C., LATTAIOLI, P. 1994. Rabbit carcass and meat quality: effect of strain, rabbitry and age. *Ital. J. Food Sci.*, 1994, vol. 2, p. 157 – 166.
- BOŽSE, Z., HIRIPI, L., CARNWATH, J. W., NIEMAN, H. 2003. The transgenic rabbit as model for human diseases and as a source of biologically active recombinant proteins. In: *Transgenic Res.*, vol. 12, 2003, p. 541-553.
- CHEN, S. H., VAUGHT, T. D., MONAHAN, J. A., BOONE, J., EMSLIE, E., JOBST, P. M., LAMBORN, A. E., SCHNIEKE, A., ROBERTSON, L., COLMAN, A., DAI, Y., POLEJAEVA, A., AYARES, D. L. 2002. Efficient production of transgenic cloned calves using preimplantation screening. In: *Biol. Reprod.*, vol. 67, 2002, p. 1488-1492.
- CHRASTINOVA, L., A. SOMMER, J. RAFAY AND M. SVETLANSKA. 1997. Avotan exploitation in rabbit nutrition. II. Nutrient digestibility and lactation performance of does rabbit. *J. Farm Anim. Sci.* 30:80-86.
- CHRENEK, P., VASICEK, D., MAKAREVICH, A. V., UHRIN, P., PETROVICOVA, I., LUBON, H., BINDER, B. R., BULLA, J. 2002. Integration and expression of the WAP-hPC gene in three generations of transgenic rabbits. In: *Czech J. Anim. Sci.*, vol. 47(2), 2002, p. 44-49.
- CHRENEK, P., VASICEK, D., MAKAREVICH, A. V., JURCIK, R., SUVEGOVA, K., PARKANYI, V., BAUER, M., RAFAY, J., BATOROVA, A., PALEYANDA, R. K. 2005. Increased transgene integration efficiency upon microinjection of DNA into both pronuclei of rabbit embryos. In: *Transgenic Res.*, vol. 14, 2005, p. 417-428.
- CHRENEK, P., RYBAN, L., VETR, H., MAKAREVICH, A.V., UHRIN, P., PALEYANDA, R. K., BINDER, B. R. 2007. Expression of recombinant human factor VIII in milk of several generations of transgenic rabbits. *Transgenic Res.*, vol. 16, 2007a, p.353-361.
- CHRENEK P., CHRASTINOVA L., KIRCHNEROVA, K., MAKAREVICH A.V. AND FOLTYS V.: The Yield and Composition of Milk from Transgenic Rabbits. *Asian-Australasian. J. Anim. Sci.*, 20, 2007b, 482-485.
- CHRENEK, P., MAKAREVICH, A.V., PIVKO, J., MASSANYI, P., LUKAC N. 2009. Characteristics of Rabbit Transgenic Mammary Gland Expressing Recombinant Human Factor VIII. *Anat. Histol. Embryol.*, 38 (1), 2009, p. 85-88.
- CHRENEK, P., MAKAREVICH, A. V. 2008. Transgenic rabbits – production and application. *Slovak J. Anim. Sci.*, vol. 3, 2008, p. 113-120.
- DRAGIN, S., A. BOZIC AND P. CHRENEK. 2004. Effect of transgenesis on F2 and F3 rabbit offspring generations. 5th. scientific conference of PhD. students, University of Constantine Philosophie, Nitra, Slovakia, pp. 28-32.
- DRAGIN, S., J. PIVKO, P. MASSANYI, N. LUKAC, A. MAKAREVICH AND P. CHRENEK. 2006. Ultrastructural morphometry of mammary gland in transgenic and non-transgenic rabbits. *Anat. Histol. Embryol.*, 35:in press.



- FRAGA, M. J., M. LORENTE, R. M. CARABANO AND J. C. DE BLAS. 1989. Effect of diet and of remaining interval on milk production and milk composition of the doe rabbit. *Anim. Prod.* 48:459-465.
- HERNANDEZ, P., PLA, M., BLASCO, A. 1998. Carcass characteristics and meat quality of rabbit lines selected for different objectives: II. Relationships between meat characteristics. *Livestock Prod. Sci.*, 1998, vol. 54, p. 115 – 123.
- HULOT, F., OUHAYOUN, J. 1999. Muscular pH and related traits in rabbits: a review. *World Rabbit Sci.*, 1999, vol. 7, p. 15 – 36.
- JHAPPAN, C., GEISER, A. G., KORDON, E. C., BAGHERI, D., HENNIGHAUSEN, L., ROBERTS, A. B., SMITH, G. H. - MERLINO, G. 1993. Targeting expression of a transforming growth factor beta 1 transgene to the pregnant mammary gland inhibits alveolar development and lactation. *Embo j.*, vol 12 (5), 1993, p. 1835–1845
- LAMBERTINI, L., BERGOGLIO, G., MASOERO, G., GRAMENZI, A. 1996. Comparison between Provisal and Hyla rabbit strains. I. Slaughtering performances and muscle composition. Proc. 6th WRSA Congres, Toulouse, 1996, vol. 3, p. 195 – 199.
- LUDEWIG, M., TREEL VAN, N., FEHLHABER, K. 2003. Schlachtausbeute und Fleischqualität von Mastkaninchen in Abhängigkeit vom Alter. *Fleischwirtschaft*, 2003, vol. 3, p. 101 – 103.
- LUKEFAHR, S., W. D. HOHENBOKEN, P. R. CHEEKE AND N. M. PATTON. 1983. Doe reproduction and preweaning litter performance of straightbred and crossbred rabbits. *J. Anim. Sci.* 57:1090-1096.
- MACH, K., MAJZLIK, I., DEDKOVA, L., HERMANOVA, B. 2004. Growth and feed consumption of HYPlus broiler rabbits, final hybrids F<sub>1</sub>, F<sub>11</sub> and F<sub>2(3)</sub> - generation in operational conditions (in Czech republic), Proc. XXII Conf. RIAP Nitra, p. 5 – 11.
- MORINI, M., ASTIGIANO, S., MORA, M., RICOTTA, C., FERRARI, N., MANTERO, S., LEVI, G., ROSSINI, M., BARBIERI, O. 2000. Hyperplasia and impaired involution in the mammary gland of transgenic mice expressing human FGF4. *Oncogene*, vol. 19 (52), 2000, p. 6007-6014.
- NEMIR, M., BHATTACHARYYA, D., LI, X., SINGH, K., MUKHERJEE, A. B., - MUKHERJEE, B. B. 2000. Targeted inhibition of osteopontin expression in the mammary gland causes abnormal morphogenesis and lactation deficiency. *J. Biol. Chem.*, vol., 275 (2), 2000, p. 969-976.
- PALMER, C. A., H. LUBON AND L. MCMANAMAN. 2003. Transgenic mice expressing recombinant human protein C exhibit defects in lactation and impaired mammary gland development. *Transgenic Res.* 12:283-292.
- RAFAY, J., MOJTO, J., PALANSKÁ, O. 1999. Characteristics of meat quality of domestic rabbit. *Agriculture*, 1999, vol. 45, p. 388 – 396.
- RAFAY J., NOVOTNA K., MOJTO J., BOZIC A., CHRENEK P.: Some meat utility and quality traits of transgenic rabbit. *Slovak J. Anim. Sci.*, 41, (3), 2008, 121-125.
- SALVO-GARRIDO, H., S. TRAVELLA, L. J. BILHAM, W. A. HARWOOD J. W. SNAPE. 2004. The distribution of transgene insertion sites in barley determined by physical and genetic mapping. *Genet*, 167:1371-1379.
- TARANTO, S., C. DI MEO, G. STANCO, G. PICCOLO, M. P. GAZANEO AND A. NIZZA. 2003. Influence of age at weaning on caecal content characteristics and post-weaning performance and health of rabbits. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 16(10):1540-1544.
- Schranner, S. 1993. Untersuchungen zum maschinellen Milchentzug beim Kaninchen als Grundlage zur Bestimmung von Laktationsleistungen und Milchinhaltstoffen. Inaugural-Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München, Germany, pp 142.
- SZENDRŐ, ZS. , RADNAI, I., BIRÓ-NÉMETH, E., ROMVÁRI, R., MILISITS, G. 1996. Changes in water, protein, fat and ash content in the meat of rabbits between 2.2 – 3.5 kg live weight. Proc. 6th WRSA Congres, Toulouse, 1996, vol. 3, p. 269 – 272.
- VAN COTT, E. K., H. LUBON, F. C. GWAZDAUSKAS, J. J. KNIGHT, W. N. DROHAN AND W. H. VELANDER. 2001. Recombinant human protein C expression in milk of transgenic pigs and effect on endogenous milk immunoglobulin and transferin levels. *Transgenic Res.* 10:43-51.

**Acknowledgment:**

This study was supported by the Slovak Research and Development Agency APVV under contracts No.LPP-0126-06 and APVV-0514-07. These results were presented on the conference “Fuctional genomics and its application in meat and milk quality” organized by ANIMBIOGEN in EU in Jastrzebiec, IGAB, PAS, Poland, October 2009.

**Contact address:**

Peter Chrenek, Alexander Mackarevich: Institute of Genetics and Animal Reproduction, Animal Production Research Centre Nitra, 951 41 Lužianky, Slovak Republic, chrenekp@yahoo.com.

Peter Chrenek, Jozef Bulla: Department of Biochemistry and Biotechnology, Faculty of Biotechnology and Food Science, Slovak University of Agriculture in Nitra, 949 72 Nitra, Slovak Republic.

## VPLYV TEPLoty NA FAREBNÚ A OXIDAČNÚ STABILITU OLEJOV BOHATÝCH NA OBSAH POLYNEASÝTENÝCH MASTNÝCH KYSELÍN

### THE EFFECT OF TEMPERATURE ON COLOUR OF OILS RICH IN POLYUNSATURATED FATTY ACIDS

*Kita Agnieszka, Pluciennik Ewa*

#### ABSTRACT

The aim of this work was to study the influence of heating temperature and time on physico-chemical properties of cold-pressed oils rich in polyunsaturated fatty acids. The materials used for investigation were: two flaxseed oils (high linolenic and low linolenic – Linola) and walnut oil. All oils were heated at three temperatures: 80, 140 and 180 °C for maximum 120 minutes. In fresh oils, as well as after heating for 15, 30, 60 and 120 min, colour (L,a,b) and oxidative changes (PV, AnV, oxidative stability – Rancimat test) were analysed. It has been stated that heating affected colour of all examined oils. The changes, observed as colour darkening, increased with heating time and temperature. During heating of oils **L** and **b** values were decreased and **a** value was increased. The biggest colour changes were observed for walnut oil, while the most stable colour was observed in low-linolenic flaxseed oil. Under the same conditions (180°C/120min)  $\Delta E$  value of walnut oil was 3 times higher than that of Linola oil. The colour changes were correlated with oxidative degradation of heated oils. Oxidative stability decreased with increasing of heating temperature and the time. At highest heating temperature the oxidative stability of high-linolenic flaxseed and walnut oils decreased by 75% and 60%, while low-linolenic flaxseed oil by 30%. The best properties, independent of heating temperature and time, were exhibited by low-linolenic flaxseed oil (Linola).

**Keywords:** flaxseed oils, walnut oil, temperature, colour, oxidative stability

#### INTRODUCTION

Flaxseed and walnut oils are recognized and accepted as a healthful, edible oils with an outstanding content of  $\alpha$ -linolenic acid (ALA). This fatty acid, belonging to a type of n-3 fatty acid, as well as its metabolites (EPA and DHA) may protect against heart disease and their illnesses. Oils high in n-3 fatty acid should be processed at the lower temperatures possible to maintain high quality and storage life. Consequently such oils are screw-pressed with little or no pre-treatment and little or no external heating to press. Furthermore, the oil undergoes no refining beyond sedimentation or filtration. Fresh, unrefined flaxseed and walnut oils from good seed or nut have an attractive golden colour, a pleasant, nut-like flavour and mild odour (Hossenian at al. 2004, Oomah 2009; Sabudak at al. 2007; Tzang at al. 2009; Wiesenborn, 2005). Preparation of different food products – also containing polyunsaturated fatty acids, often involves heating or frying. When foods are heated or fried in oil occur many complex chemical reactions resulting in the production of degradation products. These new products influence functional, sensory and nutritional quality of the oil. One of the easy to observe changes in heated oil is colour darkening (Maskan 2003). The changes in colour of heated oils are the signs of oil deterioration. The colour may darken as heating proceeds. This is mainly the result of oxidative reactions. Therefore, colour has been widely used as an index of oil quality and it can be monitored using single or multiple wavelengths with a spectrophotometer, using colour standards, Hunter L,a,b values or using a Lovibond Tintometer (red, yellow and blue) (Maskan 2003).

The increasing popularity of cold-pressed oils (especially flaxseed oils) cause that they are used also in thermal short processes however there is a lack of information about their stability during heating (Wroniak at al. 2006). Because of that the aim of this work was to study the influence of heating temperature and time on physico-chemical properties of cold-pressed oils rich in polyunsaturated fatty acids.

#### MATERIAL AND METHODS

##### Material

The material used for investigation were three kind of cold-pressed oils: flaxseed oil, linola oil (low-linolenic flaxseed oil) and walnut oil. All oils were obtained from producing plant in Lower Silesia (Poland) as fresh oils (after pressing and purification by filtration). Characteristics of used oils is presented in Table 1.

##### Thermal processing procedures

Household fryers were used for controlled heating of oils under laboratory conditions. The heating was simultaneously conducted in three fryers to check the repeatability of the results. 1000 cm<sup>3</sup> of oils were heated at three temperatures: 80°C, 140°C and 180°C for maximum 120 minutes. Samples of oils were taken after 15, 30, 60 and 120 minutes of heating at each temperature. The experiment was carried out in three replications. The data are the mean results obtained in the 3 replications.

### Colour measurements

Colour measurements were carried out using a Minolta CR-200 colorimeter. The instrument was standardized each time with a black and white ( $L=93,01$ ,  $a=-1,11$ ,  $b=1,3$ ) tile. The colour values were expressed as  $L$  (indicating lightness),  $a$  (indicating hue on the green (-) to red (+) axis) and  $b$  (indicating hue on the blue (-) to yellow (+) axis). Next, colour difference ( $\Delta E$ ) was calculated as  $\Delta E = [(L_0-L)^2 + (a_0-a)^2 + (b_0-b)^2]^{1/2}$ , where  $L_0$ ,  $a_0$  and  $b_0$  are the colour parameters of the fresh (no heated) oil samples.

### Oxidative stability

The oxidative stabilities of oil samples were determined by the Rancimat 679 (Metrohm, Herisau, Switzerland). In brief, 2,5g of oil were heated into reaction vessel in triplicate and heated to 110°C with an air flow of 20L/h. Volatile products released during the oxidation process were collected in a flask containing distilled water due to formation of volatile compounds. The oxidative stability (OSI) is defined as the point of rapid change in the rate of oxidation, and the results are expressed in hours (h).

### Statistical analysis

The data were analysed statistically using Statistica ver. 6 programme (2001). For comparison, the results obtained were subjected to one-way analysis of variance with the application of Duncan's test ( $p \leq 0.05$ ).

Results of work

#### *Characteristics of oils used in experiment*

All used in experiment cold-pressed oils exhibited typical fatty acids content and physico-chemical properties (Table 1). The predominant in oils were polyunsaturated fatty acids: linoleic acid (from 12,9% in flaxseed oil to 69,02% in linola oil) and  $\alpha$ -linolenic acid (from 2,59% in linola oil to 65,77% in flaxseed oil). Other chemical parameters showed good quality of oils.

#### *Effect of heating parameters on colour of oil*

Table 2 shows the change in Hunter parameters  $L$ ,  $a$ ,  $b$  values of used oils before and after heating. The fresh oils differed significantly in lightness. The most light colour exhibited low-linolenic flaxseed oil (Linola) ( $L=43,18$ ), while the darkest - walnut oil ( $L=37,37$ ). Heating decreased lightness of all analysed oils. Significant changes in lightness of flaxseed and walnut oils were observed at 140°C, while in linola oil at 180°C. The time of heating influenced lightness only in the case of walnut oil. According with increasing heating time oil became darker.

The  $a$  (redness and greenness) value for fresh oils amounted from -0,67 (flaxseed oil) to 2,71 (walnut oil). The heating parameters influenced  $a$  value of flaxseed and walnut oils only. The  $a$  value increased with increasing heating temperature and time. The  $b$  (yellowness) value of examined oils before heating amounted from 21,76 (walnut oil) to 33,05 (linola oil). The heating temperature significantly influenced on  $b$  value of all oils. Together with increasing heating temperature  $b$  value decreased,

while heating time only in few case decreased yellowness of analysed oils. At 180°C the biggest decrease of  $b$  value was observed for walnut oil (about 59%), while for flaxseed oil 27% and linola oil 13%.

The  $\Delta E$  values for heated oils were shown on Figure 1. The  $\Delta E$  values for oils heated at lowest temperature (80°C) were very low (below 2) and similar for all oils. At higher temperatures the biggest changes of  $\Delta E$  values were observed for walnut oil (especially at 180°C when  $\Delta E$  increased to 15,9), while the most stable colour exhibited linola oil ( $\Delta E=4,5$ ).

#### *Effect of heating parameters on oxidative stability of oils*

The highest oxidative stability exhibited linola oil (1,67h) while the lowest flaxseed oil (1,13h) (Figure 2). Heating decreased this quality parameter of all analysed oils. Heating of linola oil at 80°C decreased its oxidative stability by 6%, but for flaxseed oil the decrease was on a level of 60%. The biggest changes were observed at highest heating temperature (180°C), when oxidative stability of linola oil decreased by 33%, walnut oil by 60% and flaxseed oil by 75%.

## DISCUSSION

#### *Effect of heating parameters on colour of oils*

The colour of oils has been widely used as a subjective or objective index to determine the quality of used oil. When oils are heated, they rapidly change from a light yellow to an orange brown colour. This is the combined result of oxidation, polymerisation and other chemical changes. In described experiment heating of oils influenced their colour by darkening. The decrease of  $L$  and  $b$  values of analysed oils were in agreement with the observations of **Choo et al. (2007)** and **Maskan (2003)**. The darkening may be due to reduction of natural pigments (mostly carotenoids) present in the oil resulting in oxidation or decomposition during heating. Walnut oil exhibited the lowest  $L$  value (as fresh oil) in comparison with two flaxseed oils. The bigger amount of pigments as well as different composition made it more sensitive for colour changes. It could be also associated with decomposition of fatty acids – especially polyunsaturated fatty acids. As was observed oils with higher level of  $\alpha$ -linolenic acid (ALA) were more sensitive on colour changes than linola oil (with reduced ALA content below 3%). The better stability of flaxseed oil than walnut oil could be also explained by presence of natural antioxidant present in this oil (as lignans) (**Abuzaytoun et al., 2006; Bozan et al. 2008**).

However the temperature was the main factor influencing colour changes of analysed oils, also the time was significant parameter. Longer time prolonged bigger colour changes. The influence of time on colour of cold-pressed oils could be observed also at room temperatures. **Sikorska et al. (2007)** stored extra-virgin olive oil during 12 months and observed that if oil was stored in the light the  $\Delta E$  values increased to 16 (while in the darkness were below 2).

**Table 1.** Characteristics of fresh cold-pressed oils.

	Kind of oil		
	flaxseed	walnut	linola
FFA (%)	0,85	0,70	0,93
PV (meq O <sub>2</sub> .kg <sup>-1</sup> )	0,66	1,18	0,22
AnV	0,52	4,07	0,48
Oxidative stability (h) (110°C)	1,1	1,27	1,67
Major fatty acids content (%)			
C 16:0	4,87	6,16	7,08
C 18:0	2,27	2,45	3,15
C 18:1	12,75	17,64	16,41
C 18:2	12,90	57,95	69,02
C 18:3	65,77	14,37	2,59

**Table 2.** Evolution of the colour parameters of oils rich in polyunsaturated fatty acids during heating.

Kind of oil	Time of heating (min.)	L		
		80°C	140°C	180°C
Flaxseed	0	40,59±0,34 D		
	15	40,11±0,28 Db	38,07±0,21 Ca	36,82±0,13 Ca
	30	39,91±0,31 Db	38,57±0,18 Ca	36,37±0,19 Ca
	60	39,39±0,25 Db	39,16±0,26 Db	36,76±0,12 Ca
	120	39,40±0,19 Db	38,07±0,28 Ca	36,49±0,21 Ca
Walnut	0	37,37±0,22 C		
	15	37,51±0,26 Cb	36,37±0,26 Cb	33,22±0,22 Ba
	30	37,85±0,15 Cb	36,32±0,28 Cb	32,19±0,14 Aa
	60	37,93±0,13 Cb	35,76±0,17 Bb	29,71±0,21 Aa
	120	37,30±0,15 Cb	34,79±0,16 Bb	29,08±0,22 Aa
Linola	0	43,18±0,31 E		
	15	43,36±0,26 Ea	43,22±0,24 Ea	42,36±0,21 Ea
	30	43,58±0,28 Ea	43,14±0,19 Ea	41,96±0,28 Da
	60	43,57±0,30 Ea	42,50±0,26 Ea	41,93±0,23 Da
	120	43,89±0,25 Ea	42,64±0,22Ea	42,45±0,25 Ea

## Potravinarstvo

**Table 2. (continue)**

Kind of oil	Time of heating (min.)	a		
		80°C	140°C	180°C
Flaxseed	0	-0,67±0,11 A		
	15	-0,70±0,09 Aa	0,15±0,10 Ba	0,36±0,10 Ba
	30	-0,83±0,10 Aa	-0,52±0,08 Aa	1,03±0,10 Ba
	60	-0,63±0,12 Aa	-0,30±0,09 Aa	1,00±0,11 Ba
	120	-0,85±0,08 Aa	0,25±0,09 Ba	1,54±0,13 Bb
Walnut	0	2,71±0,13 C		
	15	2,47±0,10 Ca	2,22±0,12 Ba	5,06±0,12 Db
	30	2,31±0,11 Ca	2,36±0,11 Ba	5,62±0,10 Db
	60	2,45±0,09 Ca	3,55±0,12 Ca	6,73±0,10 Db
	120	1,65±0,11 Ba	3,78±0,15 Cb	7,30±0,09 Dc
Linola	0	-0,99±0,09 A		
	15	-0,99±0,08 Aa	-1,60±0,12 Aa	-1,84±0,10 Aa
	30	-1,10±0,09 Aa	-1,70±0,11 Aa	-1,67±0,09 Aa
	60	-1,15±0,09 Aa	-1,34±0,09 Aa	-1,84±0,11 Aa
	120	-1,22±0,11 Aa	-1,86±0,10 Aa	-2,35±0,13 Aa

**Table 2. (continue)**

Kind of oil	Time of heating (min.)	b		
		80°C	140°C	180°C
Flaxseed	0	28,12±0,26 D		
	15	27,35±0,25 Dc	24,14±0,15 Cb	21,84±0,19 Ca
	30	27,37±0,28 Dc	24,87±0,21 Cb	20,76±0,24 Ca
	60	26,24±0,23 Db	25,89±0,23 Db	21,29±0,22 Ca
	120	26,21±0,19 Dc	23,66±0,20 Cb	20,50±0,19 Ca
Walnut	0	21,76±0,21 C		
	15	21,27±0,22 Cc	18,80±0,26 Bb	15,16±0,16 Ba
	30	20,95±0,17 Cc	18,70±0,21 Bb	13,93±0,13 Aa
	60	20,19±0,21 Cbc	18,63±0,22 Bb	12,08±0,15 Aa
	120	19,44±0,20 Bbc	17,79±0,22 Bb	9,01±0,14 Aa
Linola	0	33,05±0,29 E		
	15	33,30±0,28 Eb	32,87±0,30 Eb	30,97±0,24 Ea
	30	33,80±0,30 Eb	32,81±0,31 Eb	30,15±0,26 Ea
	60	33,65±0,23 Ec	31,53±0,24 Eb	29,75±0,21 Ea
	120	33,96±0,24 Ec	31,61±0,29 Eb	28,77±0,27 Da

a,b,c – significant differences within columns (for each oil),  $\alpha \leq 0.05$

A,B,C – significant differences in columns,  $\alpha \leq 0.05$

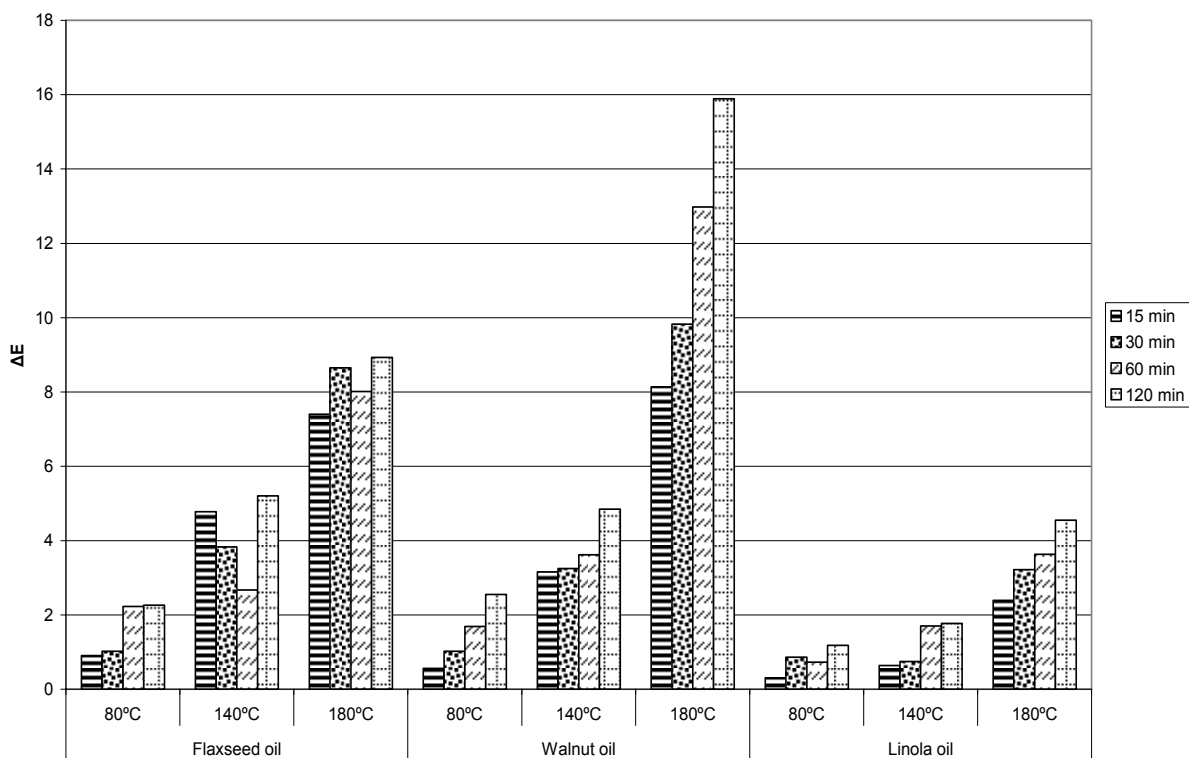


Figure 1. Colour changes ( $\Delta E$ ) of oils rich in polyunsaturated fatty acids during heating at different temperatures.

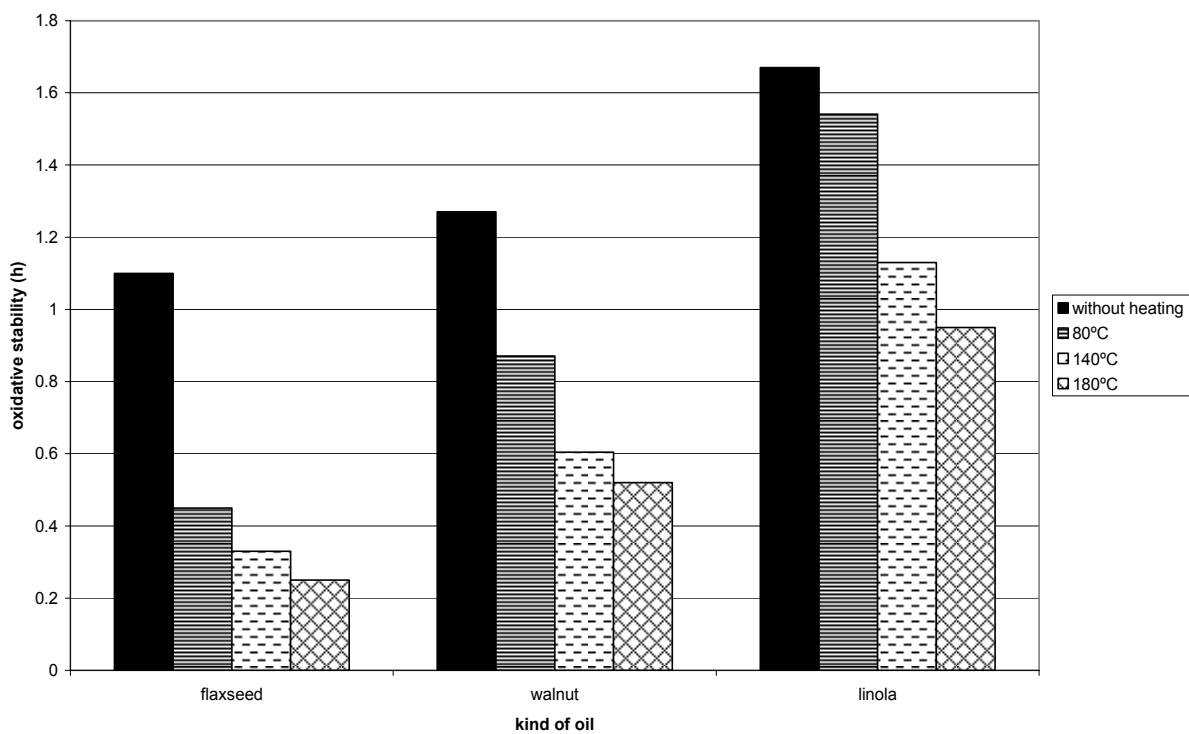


Figure 2. Oxidative stability of oils rich in polyunsaturated fatty acids after heating for 120 minutes at different temperatures.

*Effect of heating parameters on oxidative stability of oils*

Oxidative stability is an important parameter in evaluating the quality of oils and fats and is greatly affected by their fatty acid composition and minor components such as tocopherol and tocotrienols. Induction period (IP, h) for fresh as well as heated oils was in order: flaxseed oil < walnut oil < linola oil. It is correlated with polyunsaturated fatty acids content (especially with linolenic acid). The large degree of linolenic acid in flaxseed oil reduced its stability. Obtained results are with agreement with other authors, who compared oxidative stability of different cold-pressed oils. **Bozan at al. (2008)** stated that flaxseed oil exhibited the lower oxidative stability in comparison with safflower and poppy oils. **Savage at al (1999)** showed that walnut oils were more unstable in the Rancimat test when compared to hazelnut oil and that their oxidative stability depended significantly on walnut variety. Such results suggest that minor components play very important role and their natural composition could significantly influence this quality parameter. Because of that its quite popular to stabilize oils with addition of natural or synthetic antioxidants (**Rudnik at al. 2001; Tabee at al. 2008**).

Thermal degradation of fatty acids as well as other compounds significantly decrease oxidative stability of oils – especially rich in polyunsaturated fatty acids. This changes could be correlated with colour changes, but it should be followed by additional tests.

**CONCLUSION**

It has been stated that heating effected colour of all examined oils. The changes, observed as colour darkening, increased with heating time and temperature. During heating of oils decreased L and b values and increased a value. The biggest colour changes were observed for walnut oil while the most stable colour had low-linolenic flaxseed oil. At the same conditions (180°C/120min) ΔE of walnut oil was 3 times higher than of linola oil.

Oxidative stability of oils decreased with increasing heating temperature and time. At highest heating temperature the oxidative stability of high-linolenic flaxseed and walnut oils decreased 2 times faster than low-linolenic flaxseed oil. The best properties, regardless of heating temperature and time, exhibited low-linolenic flaxseed oil (linola).

**REFERENCE**

BOZZAN BERRIN, TEMELLI FERL. 2008. Chemical composition and oxidative stability of flax, safflower and poppy seed and seed oils. In *Bioresource Technology*, 2008, 99, s. 6354-6359.

CHOO W. S., BIRCH E. J., DUFOUR J. P. 2007. Physicochemical and stability characteristics of flaxseed oils during pan-heating. In *Journal of American Oil Chemist's Society*, 2007, 84, s. 735-740 .

CHOO, WEE-SIM., BIRCH, JOHN, DUFOUR, JEAN-PIERRE. 2007. Physicochemical and quality characteristics of

cold-pressed flaxseed oils. In *Journal of Food Composition and Analysis*, 2007, 20, s. 202-211.

HOSSEINIAN F. S., ROWLAND G. G., BHIRUD P. R., DYCK J. H., TYLER R. T. 2004. Chemical composition and physicochemical and hydrogenation characteristics of high-palmitic acid solin (low-linolenic acid flaxseed oil). In *Journal of American Oil Chemist's Society*, 2004, 81, s. 185-188.

MASKAN MEDENI. 2003. Change in colour and rheological behaviour of sunflower seed oil during frying and after adsorbent treatment of used oil. In *European Food Research Technology*, 2003, 218, s. 20-25.

OOMAH B. DAVE, SITTER LAURIE. 2009. Characteristics of flaxseed hull oil. In *Food Chemistry*, 2009, 114, s. 623-628.

RUDNIK E., SZCZUCINSKA A., GWARDNIAK H., SZULC A., WINIARSKA A. 2001. Comparative studies of oxidative stability of linseed oil. In *Thermochemica Acta*, 2001, 370, s. 135-140.

SABUDAK TEMINE. 2007. Fatty acid composition of seed and leaf oils of pumpkin, walnut, almond, maize, sunflower and melon. In *Chemistry of Natural Compounds*, 2007, 43, s. 465-467.

SAVAGE G. P., DUTTA P. C., McNEIL D. L. 1999. fatty acid and tocopherol contents and oxidative stability of walnut oils. In *Journal of American Oil Chemist's Society*, 1999, 76, s. 1059-1063.

SIKORSKA, EWA, CAPONIO, FRANCESCO, BILANCIA, MARIA T., SUMMO, CARMINE, PASQUALONE ANTONELLA, KMELINSKII, IGOR V., SIKORSKI, MAREK. 2007. Changes in colour of extra-virgin olive oil during storage. In *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 2007, 57, s. 495-498.

TABEE ELHAM, AZADMARD-DAMIRCHI SODEIF, JÄGERSTAD MARGERITA, DUTTA PARESH. 2008. Effects of α-tocopherol on oxidative stability and phytosterol oxidation during heating in some regular and high-oleic vegetable oils. In *Journal of American Oil Chemist's Society*, 2008, 85, s. 857-867.

TZANG BOR-SHOW, YANG SHUN-FA., FU SHIH-GUEI., YANG HUI-CHUN. , SUN HAI-LUN., CHEN YI-CHEN. 2009. Effects of dietary flaxseed oil on cholesterol metabolism of hamsters. In *Food Chemistry*, 2009, 114, s. 1450-1455.

WIESENBORN D., KANGAS N., TOSTENSON K., HALL C., Chang K. 2005. Sensory and oxidative quality of screw-pressed flaxseed oil. In *Journal of American Oil Chemist's Society*, 2005, 82, 887-892.

WRONIAK, MAŁGORZATA , KRYGIER KRZYSZTOF. 2006. Oleje tłoczone na zimno. In *Przemysł Spożywczy*, 2006, 7, s. 30-32.

**Contact address:**

Agnieszka Kita (PhD, DSc), Department of Food Storage and Technology, Wrocław University of Environmental and Life Sciences, ul. Norwida 25, 50-375 Wrocław, Poland, tel.: +48 71 3205038, e-mail: Agnieszka.Kita@wnoz.up.wroc.pl fax: +48 71 3205221,

Ewa Pluciennik (MSc), Department of Food Storage and Technology, Wrocław University of Environmental and Life Sciences, ul. Norwida 25, 50-375 Wrocław, Poland

## TESTOVANIE ÚČINNOSTI SANITAČNÝCH PROSTRIEDKOV NA ENTEROKOKY

### TESTING OF SANITARY DETERGENTS EFFECTIVENESS TO ENTEROCOCCI

*Anna Krebs-Artimová, Miroslav Kročko, Viera Ducková, Margita Čanigová*

#### ABSTRACT

The aim of this work was to determine influence of sanitary detergents on enterococci surviving in different model conditions. Enterococci were isolated from rinse water after milking machine sanitation. It was found that alkaline sanitary detergent on chlorine base applied as 0.75 % solution was sufficiently effective on enterococci damage, also at conditions with reduced temperature (40°C), in presence of organic matters (0.1 % of milk) and also with water hardness 45°. Acid sanitary detergent on base of phosphoric acid applied as 0.75 % solution in combination with 40 °C temperature had 100 % effectiveness on enterococci damage only in the environment without organic matters regardless of water hardness. Presence of 0.1 % of milk enabled surviving of tested enterococci strains. Enterococci surviving in the presence of organic matters in acid detergent solution was influenced also with water hardness.

**Keywords:** alkaline and acid sanitary solution, enterococci, surviving

#### ÚVOD

Mlieko je vzhľadom na svoje zloženie a vlastnosti ideálnym substrátom pre široké spektrum mikroorganizmov. To kladie vysoké nároky na proces sanitácie technologických zariadení ako v prvovýrobe, tak aj pri jeho mliekarenskom ošetrovaní a spracovaní. Sanitačný program je preto neoddeliteľnou súčasťou správnej výrobných praxe. Súčasťou sanitačných opatrení je čistenie a dezinfekcia, dva samostatné, ale od seba neoddeliteľné procesy. Čistiace a dezinfekčné prostriedky používané v potravinárstve by sa mali vyznačovať vysokou schopnosťou devitalizácie mikroorganizmov už vo veľmi nízkych koncentráciách, nemali by zanechávať rezíduá, poškodzovať sanitované zariadenia a zaťažovať životné prostredie.

V potravinárskom priemysle sú najčastejšie používané dezinfekčné prostriedky na báze chlóru, kyselín a alkoholov (Aarestrup, Hasman, 2004). Dezinfekčné prostriedky v závislosti na selektívnej toxicite môžu na niektoré mikroorganizmy pôsobiť toxicky, na iné inertne, prípadne i stimulačne. Mechanizmus pôsobenia závisí na chemickom zložení dezinfekčného prostriedku a spôsobe jeho použitia (Novák et al., 2002). Testovanie dezinfekčných prostriedkov v laboratórnych, ale i prevádzkových podmienkach má preto svoje opodstatnenie. Sanitačný prostriedok určený pre povrchy prichádzajúce do kontaktu s potravinami musí podľa Európskej štandardnej metódy EN 1276 preukázať zníženie počtu vybraných kmeňov mikroorganizmov o 99,999 % (redukcia  $10^5$ ) pri 20 °C, dobe pôsobenia 5 min, odporúčanej koncentrácii a pri simulovaných čistých (0,3 g.l<sup>-1</sup> bovinný albumín) a nečistých podmienkach (3 g.l<sup>-1</sup> bovinný albumín). Medzi testované kmene patrí i *Enterococcus hirae* (ATCC 10541, CIP 5855) (<http://www.wipo.int/>).

Enterokoky nachádzajúce sa v potravinách boli dlho považované za indikátor fekálnej kontaminácie a indikátor nedostatočnej úrovne hygieny a sanitácie. Pri nízkych počtoch sú dnes považované za normálnu súčasť

mikroflóry potravín (Franz et al., 1999; Greifová et al., 2003). Významnou vlastnosťou tejto skupiny mikroorganizmov je ich odolnosť ku chemickému a fyzikálnemu stresu. Obavy spôsobujú najmä vankomycín-rezistentné enterokoky, ktoré boli izolované už aj z potravín živočíšneho pôvodu (Kühn et al., 2000). U klinických kmeňov enterokokov sa zistila rôzna tolerancia na testované dezinfekčné prostriedky (obsahujúce chlór, alkohol, glutaraldehyd, kvartérne amóniové zlúčeniny, jód) (Bradley, Fraise, 1996; Anderson et al., 1997). Rovnako i v podmienkach získavania a spracovania mlieka sa vyskytli prípady, kedy boli po ukončení procesu sanitácie izolované z dojacieho zariadenia a chladiacej nádrže kmene enterokokov (Gelsomino et al., 2002; Teixeira et al., 2005).

Cieľom práce bolo v modelových pokusoch otestovať vplyv sanitačných prostriedkov bežne používaných v prvovýrobe mlieka na prežívanie enterokokov, ktoré sa pôvodne izolovali z oplachových vôd po sanitácii dojacieho zariadenia na vybranom poľnohospodárskom družstve. Pri použití štandardných podmienok aplikácie sanitačných roztokov ako koncentrácia roztoku, jeho teplota a doba pôsobenia sa sledoval aj vplyv tvrdosti vody, použitej k príprave roztoku a ochranný vplyv znečistenia vo forme mlieka na prežívanie enterokokov.

#### MATERIÁL A METODIKA

##### *Príprava bakteriálnej suspenzie*

Pre modelové pokusy sa použilo 8 kmeňov enterokokov. Tieto sa náhodne izolovali z oplachových vôd po sanitácii dojacieho zariadenia na vybranom poľnohospodárskom podniku v roku 2008 a následne identifikovali pomocou komerčného EN-COCCUS testu (Lachema, Česká republika). Identifikované bakteriálne kultúry sa rozotrelí na platničky GTKA (HiMedia, India) a kultivovali sa 24 hod pri  $37 \pm 1$  °C. Po inkubácii sa sterilným očkom preniesla časť vyrastených kolónií do skúmavky s fyziologickým roztokom a pripravila sa suspenzia



zodpovedajúca 0,5° McFarlandovej zákalovej stupnici. Intenzita zákalu sa hodnotila prístrojom Densi-la-meter. Mikrobiálna suspenzia sa následne 10-násobne zriedila v sterilnom fyziologickom roztoku, čím sa získala pracovná suspenzia baktérií obsahujúca rádovo 10<sup>6</sup> KTJ.ml<sup>-1</sup>, ktorá sa použila pre modelové pokusy. Presný počet enterokokov sa stanovil zriedovacou kultivačnou metódou na žlč-eskulín-azidovom agare (*Biokar Diagnostic*, Francúzsko) kultiváciou pri 37 ± 1 °C po 24 hodinách.

#### Príprava sanitačných roztokov

Hodnotil sa účinok alkalického a kyslého sanitačného prostriedku, bežne používaných v praxi na sanitáciu dojacieho zariadenia a chladiacich nádrží. Alkalický sanitačný prostriedok obsahoval hydroxid sodný, hydroxid draselný a chlórnan sodný. Kyslý sanitačný prostriedok obsahoval kyselinu fosforečnú a špeciálne aditíva. Sanitačné roztoky sa pripravili rozpustením prostriedku s destilovanou vodou (tvrdosť vody 0°) a s destilovanou vodou, do ktorej sa pridalo 45 mg CaCO<sub>3</sub> na 100 ml vody (tvrdosť vody sa upravila na 45°) tak, aby sa získali roztoky s koncentráciou 0,75 %.

#### Pracovný postup testovania účinku sanitačných roztokov na enterokoky

V prvej sérii pokusov sa k 9 ml dezinfekčného roztoku (koncentrácia 0,75 %, teplota 40 °C) napipetoval 1 ml bakteriálnej suspenzie enterokokov. Po premiešaní sa nechali skúmavky vo vodnom kúpeli pri teplote 40 °C po dobu 15 minút. Počet enterokokov prežívajúcich pôsobenie sanitačného roztoku sa stanovil kultiváciou na žlč-eskulín-azidovom agare (*Biokar Diagnostic*, Francúzsko) pri 37 ± 1 °C po dobu 24 hodín.

V druhej sérii pokusov sa k 8,9 ml dezinfekčného roztoku (koncentrácia 0,75 %, teplota 40 °C) napipetovalo – 0,1 ml obnoveného polotučného sušeného mlieka a 1 ml bakteriálnej suspenzie. Ďalší postup bol totožný s postupom v prvej sérii pokusov.

Pokusy s každým izolátom enterokokov v oboch sériách sa zopakovali trikrát.

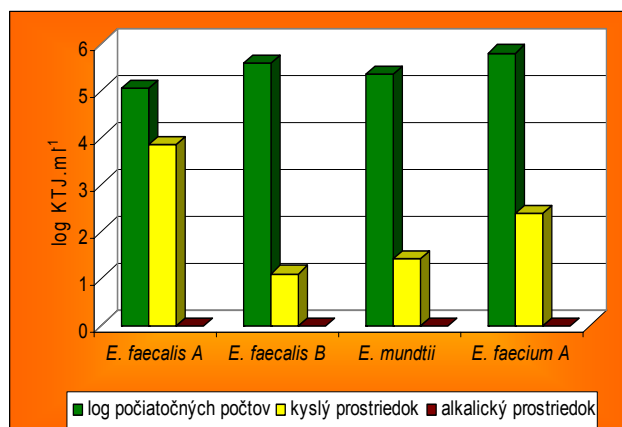
### VÝSLEDKY A DISKUSIA

Chemická dezinfekcia je zložitý proces, ktorého účinnosť závisí od viacerých faktorov, napr. od odolnosti mikroorganizmov, účinnosti samotného dezinfekčného prostriedku (jeho koncentrácie, množstva roztoku na dezinfikovanú plochu, počtu aplikácií, doby pôsobenia, teploty roztoku), ale i od vlastností dezinfikovaného prostredia (konzistencie, prítomnosti organických látok, reakcie a teploty prostredia) (**Laktičová et al., 2006**).

V prvej sérii modelových pokusov sa overovalo prežívanie enterokokov po aplikácii kyslého a alkalického sanitačného roztoku s koncentráciou 0,75 %, čo je koncentrácia v rámci rozsahu odporúčania výrobcu sanitačných prostriedkov (0,5-1 %). V snahe priblížiť sa reálnym podmienkam praxe sa zvolila teplota sanitačných roztokov 40 °C. Teplota sanitačných roztokov sa totiž v prvovýrobe často nedodržiava, čo potvrdzujú aj zistenia **Foltysa (1999)**. Z výsledkov **Feldmanna et al. (2006)** v tejto súvislosti vyplýva, že pokles teploty oplachovej

vody pod 42 °C vedie k zvýšenej kontaminácii dojacieho zariadenia koliformnými baktériami a *Pseudomonas spp.* Okrem teploty sa v modelových pokusoch hodnotil vplyv tvrdosti vody (0 a 45°), keďže v rámci SR sa vyskytuje voda rôznej kvality a v prípade tvrdej vody nie vždy je v praxi zabezpečené jej zmäkčovanie. Doba pôsobenia sanitačného roztoku bola v zhode s odporúčaniami výrobcu (15 minút).

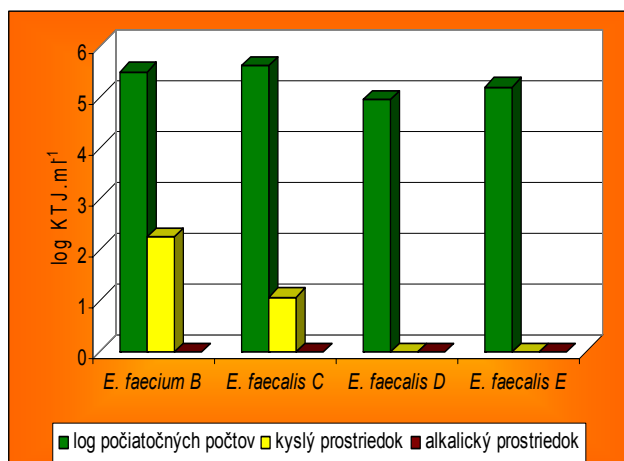
Z výsledkov prvej série pokusov vyplynulo, že kyslý aj alkalický sanitačný roztok boli pri uvedených podmienkach 100 % účinné a devitalizovali všetky testované kmene enterokokov.



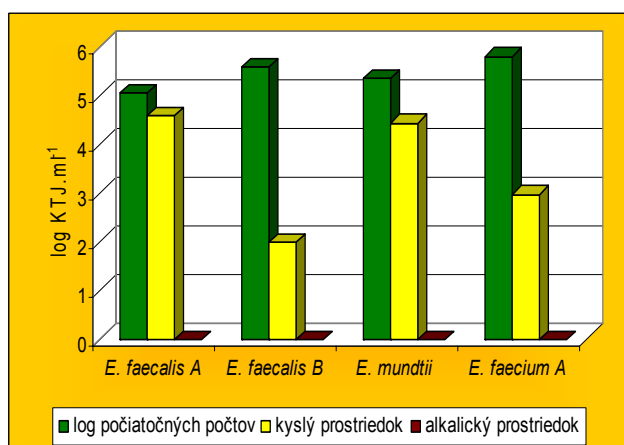
**Obrázok 1:** Prežívanie enterokokov po aplikácii kyslého a alkalického sanitačného roztoku (koncentrácia 0,75 %, teplota 40 °C, doba pôsobenia 15 minút, tvrdosť vody 0°, organická záťaž – 0,1 % mlieka)

V rámci druhej série pokusov sa koncentrácia (0,75 %), teplota dezinfekčných roztokov (40 °C) a doba ich aplikácie (15 minút) nemenili. Opäť sa hodnotil vplyv tvrdosti vody – voda mäkká (tvrdosť 0°) a voda extrémne tvrdá (tvrdosť 45°). Ako ďalší hodnotený faktor sa zaradila prítomnosť organických látok, v prípade našich pokusov išlo o 0,1 % prídavok obnoveného sušeného polotučného mlieka. Prítomnosť reziduí mlieka na sanitovanom zariadení môže viesť k zhoršeniu účinnosti dezinfekčného roztoku a to v zmysle fyzikálnej bariéry alebo deaktiváciou dezinfekčného prostriedku priamou chemickou interakciou (<http://www.wipo.int/>). V súvislosti s tvrdosťou vody - okrem tvorby vodného kameňa je známe, že vápenaté a horečnaté soli vytvárajú s kazeínom nerozpustné komplexy, ktoré tvoria veľmi ťažko odstrániteľné povlaky na čistenom povrchu. Vzniknuté biofilmy sú potencionálnym zdrojom kontaminácie, pretože ako už bolo naznačené, sanitačné látky aktívne voči voľným mikroorganizmom môžu stratiť účinnosť voči mikroorganizmom uzavretým v biofilme (**Laktičová et al., 2006**).

Výsledky účinnosti sanitačných roztokov na prežívanie enterokokov za podmienok druhej série pokusov pre vodu s tvrdosťou 0° sú znázornené na obrázkoch 1 a 2 a pre vodu s tvrdosťou 45° na obrázkoch 3 a 4.

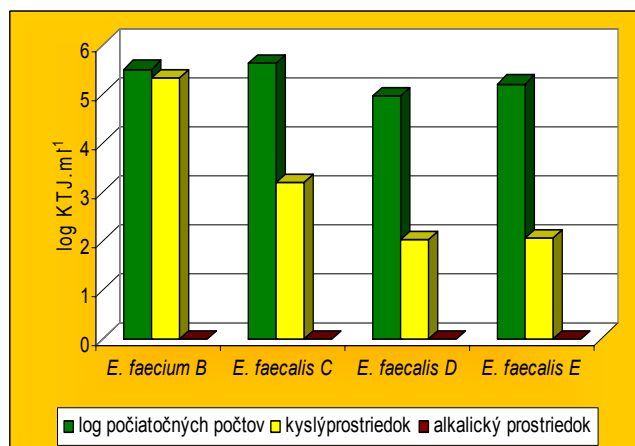


**Obrázok 2:** Prežítie enterokokov po aplikácii kyslého a alkalického sanitáčného roztoku (koncentrácia 0,75 %, teplota 40 °C, doba pôsobenia 15 minút, tvrdosť vody 0°, organická záťaž – 0,1 % mlieka)



**Obrázok 3:** Prežítie enterokokov po aplikácii kyslého a alkalického sanitáčného roztoku (koncentrácia 0,75 %, teplota 40 °C, doba pôsobenia 15 minút, tvrdosť vody 45°, organická záťaž – 0,1 % mlieka)

Ako vidieť z obrázkov, alkalický sanitáčny roztok na báze chlóru bol voči testovaným kmeňom enterokokov dostatočne účinný aj v prítomnosti organickej záťaže a bez ohľadu na tvrdosť použitej vody. Kyslý sanitáčny roztok na báze kyseliny fosforečnej pri použití vody s tvrdosťou 0° a v prítomnosti organickej záťaže mal znížený devitalizačný účinok na testované kmene enterokokov s výnimkou dvoch kmeňov *E. faecalis* D a E, na ktoré bol za týchto podmienok 100 % účinný. Ostatné testované kmene enterokokov redukoval o 1,19 až o 4,54 log radov. Ešte výraznejšie sa pokles účinnosti kyslého sanitáčného roztoku prejavil pri použití vody s tvrdosťou 45° a v prítomnosti organickej záťaže. V tomto prípade sa úplná redukcia počiatočných počtov enterokokov nezaznamenala ani u jedného z testovaných kmeňov. Najvyššia tolerancia ku kyslému sanitáčnemu roztoku sa za spomínaných podmienok zistila u kmeňa *E. faecium* B, u ktorého nastala redukcia počiatočného počtu len o 0,17 log radov. Najúčinnjší bol kyslý sanitáčny roztok na kmeň *E. faecalis* B, ktorého počty sa redukovali o 3,58 log radov.



**Obrázok 4:** Prežítie enterokokov po aplikácii kyslého a alkalického sanitáčného roztoku (koncentrácia 0,75 %, teplota 40 °C, doba pôsobenia 15 minút, tvrdosť vody 45°, organická záťaž – 0,1 % mlieka)

V laboratórnych podmienkach hodnotili účinnosť 6 dezinfekčných prostriedkov na rôzne mikroorganizmy **Wirtanen et al. (1997)**. V prítomnosti 1 % odstredeného mlieka, vody s tvrdosťou 30° a pri najnižšej odporúčanej koncentrácii dezinfekčných prostriedkov sa dosiahla redukcia kmeňa *E. faecium* u 5 testovaných dezinfekčných prostriedkov  $\geq$  log 5 a v prípade prostriedku P-3 OXONIA AKTIV to bola redukcia o 3,6 log radov. Testovaný kmeň *E. faecium* bol najcitlivejší z testovaných kmeňov. Nárast koncentrácie odstredeného mlieka na 10 % redukoval účinok väčšiny dezinfekčných prostriedkov, ale v rozdielnom stupni. Redukcia enterokokov bola o 0,5 log radov pre P-3 TOPAX 99 až o > 5 log radov pre HYPOKLORAN SP, VIRKON S a IPA 300.

Relatívne nízky vplyv organickeho materiálu na aktivitu UMONIUM<sup>38</sup> na testované baktérie, medzi ktorými bol i kmeň *Enterococcus hirae* uvádza **Raffo et al. (2007)**.

Účinnosť sanitácie sa okrem laboratórnych podmienok hodnotí aj priamo v podmienkach praxe. Z výsledkov **Kostolníkovej et al. (2007)**, ktorí hodnotili účinnosť dezinfekcie v ovčiarskych prevádzkach vyplýva, že po bežnej sanitácii (detergent a dezinfekčný prostriedok s obsahom NaClO) nastala na nerezových povrchoch redukcia enterokokov max. o 1,5 log radov a na plastových povrchoch o 0,5 – 1 log rad.

## ZÁVER

Na základe uvedených výsledkov možno konštatovať, že jednotlivé kmene enterokokov prejavili rôznu toleranciu k dezinfekčným prostriedkom, pričom nedodržanie niektorých z faktorov sanitácie podporuje ich prežítie. K týmto faktorom možno zaradiť prítomnosť organickej záťaže, ale i tvrdosť používanej vody. Zistila sa nižšia účinnosť kyslého sanitáčného prostriedku na báze kyseliny fosforečnej voči enterokokom v porovnaní s alkalickým sanitáčnym prostriedkom na báze chlóru, ktorý bol 100 % účinný pri všetkých testovaných podmienkach.

## LITERATÚRA

AARESTRUP, F. M., HASMAN, H. 2004. Susceptibility of different bacterial species isolated from food animals to

copper sulphate, zinc chloride and antimicrobial substances used for disinfection. In *Veterinary Microbiology*, roč. 100, 2004, s. 83-89.

ANDERSON, R. L., CARR, J. H., BOND, W. W. et al. 1997. Susceptibility of vancomycin-resistant enterococci to environmental disinfectants. In *Infection Control and Hospital Epidemiology*, roč. 18, 1997, č. 3, s. 195-199.

BRADLEY, C. R., FRAISE, A. P. 1996. Heat and chemical resistance of enterococci. In *Journal of Hospital Infection*, roč. 34, 1996, č. 3, s. 191-196.

FELDMANN, M., ZIMMERMANN, A., HOEDEMAKER, M. 2006. Influence of milking technique, milking hygiene and environment on microbial contamination of milking machine. In *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift*, roč. 113, 2006, č. 7, s. 274-281.

FOLTYS, V. 1999. Problematika získavania kvalitného mlieka. In *Zborník referátov pri príležitosti osláv svetového dňa mlieka*, „Súčasnosť a perspektíva Slovenského mliekarstva“, Nitra: Agroiňtitút, 1999, s. 68-70.

FRANZ, C. M. A. P., HOLZAPFEL, W. H., STILES, M. E. 1999. Enterococci at the crossroads of food safety? In *International Journal Food Microbiology*, roč. 47, 1999, s. 1-24.

GELSOMINO, R., VANCANNEYT, M., COGAN, T. M. et al. 2002. Sources of Enterococci in Farmhouse Raw-Milk Cheese. In *Applied and Environmental Microbiology*, roč. 68, 2002, č. 7, s. 3560-3565.

GREIFOVÁ, M., GREIF, G., LEŠKOVÁ, E. et al. 2003. Enterokoky – ich hodnotenie v mliekarenskej technológii. In *Mliekarstvo*, roč. 34, 2003, č. 2, s. 42-45.

<http://www.wipo.int/> Non-chlorinated concentrated all-in-one acid detergent and method for using the same.

KÜHN, I., IVERSEN, A., BURMAN, L. G. et al. 2000. Epidemiology and ecology of enterococci, with special reference to antibiotic resistant strains, in animal, human and the environment. Example of an ongoing project within European research programme. In *International Journal of Antimicrobial Agents*, roč. 14, 2000, s. 337 – 342.

KOSTOLNÍKOVÁ, M., KOREŇOVÁ, J., LOPAŠOVSKÁ, J. 2007. Analýza účinnosti bežnej dezinfekcie výrobných zariadení v malých a stredných výrobniach potravín. In *Mikrobiologie potravin* (Sborník ze semináře), Třešť 28. - 30. 5. 2007, Akademie věd ČR, s. 45-52, ISBN 978-80-7080-671-5

LAKTIČOVÁ K., ONDRAŠOVIČ, M., ONDRAŠOVIČOVÁ, O. et al. 2006. Čistenie a dezinfekcia v potravinárskom priemysle. In *Slovenský veterinársky časopis*, roč. 31, 2006, č. 3, s. 150-152.

NOVÁK et al. 2002. citované z LAKTIČOVÁ K., ONDRAŠOVIČ, M., ONDRAŠOVIČOVÁ, O. et al. 2006. Čistenie a dezinfekcia v potravinárskom priemysle. In *Slovenský veterinársky časopis*, roč. 31, 2006, č. 3, s. 150-152.

RAFFO, P., SALLIEZ, A. C., COLLIGNON, C. et al. 2007. Antimicrobial activity of a formulation for the low temperature disinfection of critical and semi-critical medical equipment and surfaces. In *New Microbiologica*, roč. 30, 2007, č. 4, s. 463-469.

TEIXEIRA, P., LOPES, Z., AZEREDO, J. et al. 2005. Physico-chemical surface characterization of a bacterial population isolated from a milking machine. In *Food Microbiology*, roč. 22, 2005, č. 2-3, s. 247-251.

WIRTANEN, G., SALU, S., MANKONEN, J. et al. 1997. *NORDFOOD. Sanitation in dairies*. Espoo 1997, Technical Research Centre of Finland, VTT Publications 302, s. 47+app.22 s. ISBN 951-38-5055-2.

### Pod'akovanie

Práca bola riešená za finančnej podpory grantovej výskumnej úlohy VEGA projektu č. 1/0410/09

### Kontaktná adresa:

Ing. Anna Krebs-Artimová Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre, FBP, KHSŽP, Tr. A. Hlinku č. 2, 949 01 Nitra

doc. Ing. Margita Čanigová, CSc. Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre, FBP, KHSŽP, Tr. A. Hlinku č. 2, 949 01 Nitra, E-mail [margita.canigova@uniag.sk](mailto:margita.canigova@uniag.sk)

Ing. Miroslav Kročko, PhD., Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre, FBP, KHSŽP, Tr. A. Hlinku č. 2, 949 01 Nitra, E-mail: [mirokrocko@yahoo.com](mailto:mirokrocko@yahoo.com)

Ing. Viera Ducková, PhD., Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre, FBP, KHSŽP, Tr. A. Hlinku č. 2, 949 01 Nitra, E-mail: [viera.duckova@uniag.sk](mailto:viera.duckova@uniag.sk)

## KVANTITATÍVNA ANALÝZA RASTU *CANDIDA MALTOSA* A *GEOTRICHUM CANDIDUM*: VPLYV TEPLoty A PRÍTOMNOSTI *LACTOBACILLUS RHAMNOSUS GG*

### QUANTITATIVE ANALYSIS OF THE GROWTH OF *CANDIDA MALTOSA* AND *GEOTRICHUM CANDIDUM*: THE EFFECT OF TEMPERATURE AND *LACTOBACILLUS RHAMNOSUS GG*

Denisa Liptáková, Anna Hudecová, Eubomír Valík, Alžbeta Medved'ová

#### ABSTRACT

*Geotrichum candidum* is associated with the microflora of soft and semi-hard cheeses, but in fresh cheeses, the presence of *G. candidum* may lead to the product spoilage. The oxidative yeast *Candida maltosa* firstly isolated from the spoiled fruit yoghurts surface in Slovakia belongs to the yeast contaminants of fermented dairy products.

The inhibitory relation between *G. candidum* growth rate and incubation temperature was modelled by Ratkowsky square root model according to following equations for pure and mixed culture, respectively:  $\sqrt{Gr_{Gc}} = 0.011T + 0.081$  ( $R^2 = 0.928$ ),  $\sqrt{Gr_{Gc\_LGG}} = 0.012T + 0.005$  ( $R^2 = 0.823$ ). The effect of different *Lb. rhamnosus* GG addition and the incubation temperature on the *C. maltosa* growth dynamics was described by using following equations:  $\ln Gr_{CM1} = -5.3674 + 0.2341T + 0.2599N_0 - 0.0032T^2 - 0.0492N_0^2 - 0.0068T \cdot N_0$  and  $\ln Gr_{CM2} = -9.5457 - 0.249T + 2.3823N_0 + 0.0099T^2 - 0.2324N_0^2 + 0.0098T \cdot N_0$ .

It is supposed that relationship between *Lb. rhamnosus* GG and both yeast strains, *G. candidum* and *C. maltosa*, is determined by the production of lactic acid, phenyllactic or pyroglutamic acid, but also by mutual competition for nutrients or oxygen. Similar results of inhibitory activity were obtained during the co-culture of *C. maltosa* with *Lb. rhamnosus* VT1.

**Keywords:** spoilage yeast, predictive microbiology, lactic acid bacteria

#### ÚVOD

Kvasinky a vláknité huby sú bežné kontaminanty mlieka a mliečnych výrobkov spôsobujúce ich kazenie (Jakobsen, Narvhus, 1996; Vasdinyei, Deák, 2003). Na druhej strane, špecifické kmene týchto eukaryotických mikroorganizmov, sú esenciálne pre tvorbu typických vlastností istých výrobkov, akými sú napríklad fermentované mlieka (kefir, kumys, villi atď.) a syry (Camembert a Brie). Kvôli ich tolerancii voči nízkemu pH (3,0 až 4,0), nízkkej aktivite vody, vysokým koncentráciám soli a chladiarenským teplotám, môžu fungálne druhy dobre rásť počas výroby a zrenia mliečnych výrobkov. Mnohé dokážu utilizovať kyselinu mliečnu spôsobujú tak zvýšenie pH, čo stimuluje rast sekundárnej pH-senzitívnej mikroflóry. Napríklad oxidatívne kvasinky z rodov *Candida* spp., *Debaryomyces* spp., *Metschnikowia* spp., *Pichia* spp., *Torulaspora* spp. a *Yarrowia* spp., zúčastňujúce sa na kazení jogurtov, dokážu rásť na rozhraní jogurtu a vzduchu a zvyčajne sa prejavujú prítomnosťou hladkých kolónií alebo ich povlakom na povrchu jogurtu. Biochemicky sa tieto kvasinky vyznačujú oxidatívnym odbúraním kyseliny mliečnej za vzniku oxidu uhličitého a vody (Varnan, Sutherland, 1994; Roostita, Fleet, 1996; Lopandic et al., 2006; Álvarez-Martín et al., 2007). Okrem technologicky nežiaducich vlastností vykazujú niektoré druhy vláknitých húb schopnosť produkovať za určitých podmienok mykotoxíny, a tým predstavujú aj zdravotné riziko pre ľudí (Valík, Piecková, 2001).

Značné množstvo publikovaných štúdií (Gadaga et al., 2001; Abdelgadir et al., 2001; Corbo et al., 2001) spája zvýšený obsah kvasiniek a mikromycét vo

fermentovaných mliečnych výrobkoch s nedostatočnou hygienou a sanitáciou technologických zariadení v prevádzke, kontamináciou z ovzdušia, nedodržaním podmienok pasterizácie ako aj s nedostatočnou mikrobiologickou kvalitou použitých prísad. Preto tieto mikroorganizmy spĺňajú indikátorové funkcie a využívajú sa pri posudzovaní hygienických podmienok výroby kyslomliečnych produktov ako aj analýzy kritických kontrolných bodov v procese výroby (Görner et al., 1972; Addis et al., 2001; Lopandic et al., 2006).

Jedným zo spôsobov ako zabrániť, alebo spomaliť rozvoj nežiaducej fungálnej mikroflóry, je aplikácia tzv. ochranných kultúr. Druh, o ktorý existuje v tomto smere záujem, je aj *Lactobacillus rhamnosus*, predovšetkým jeho probiotický kmeň *L. rhamnosus* GG, ktorý zlepšuje aj liečebno-dietetické vlastnosti mliečnych výrobkov. Servin (2004) vo svojej štúdii zistil, že *Lactobacillus lactis*, *Lb. casei* Shirota a *Lb. rhamnosus* GG dokázali potláčať rast *Salmonella typhimurium* a enterohaemoragickej *Escherichia coli* O157:H7. Viacerí autori popísali vo svojich prácach antifungálnu aktivitu viacerých druhov *Lactobacillus* spp. (Plocková et al., 2001; Magnusson et al., 2003; Lavermicocca et al., 2003; Valerio et al., 2004).

#### CIEĽ PRÁCE

Matematicky popísať vplyv probiotického kmeňa *Lb. rhamnosus* GG na rast nami izolovanej oxidatívnej kvasinky *Candida maltosa* a kvasinkovej huby *Geotrichum candidum* v UHT mlieku pri rôznych teplotách inkubácie s využitím princípov prediktívnej mikrobiológie.

## MATERIÁL A METÓDY

## Mikroorganizmy

Kmeň *Candida maltosa* bol izolovaný z povrchu znehodnoteného ovocného jogurtového krému (Lauková et al., 2003). Jeho identifikáciu potvrdilo pracovisko Zbierky kvasinkových kultúr Chemického ústavu SAV v Bratislave (Ing. E. Sláviková).

Izolát *Geotrichum candidum* pochádza z ovčieho hrdkového syra vyrobeného zo surového mlieka. Rodovú identifikáciu sme uskutočnili na základe morfológie a biochemických testov. Identifikácia druhu *G. candidum* bola potvrdená Ing. E. Pieckovou, PhD., MPH. (SZU, Bratislava).

Kmeň *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG) pochádza od fínskych mikrobiológov Ouwehanda a Salminen a pre účely práce nám ho poskytla Dr. A. Lauková z Veterinárneho ústavu v Košiciach.

Izoláty *G. candidum* a *C. maltosa* boli uchovávané na agare s odstredeným sušeným mliekom (Merck, Darmstadt, Nemecko) pri teplote  $5 \pm 1$  °C a kmeň *Lb. rhamnosus* GG bol udržiavaný v MRS bujone (Merck, Darmstadt, Nemecko) pri tej istej teplote.

## Príprava suspenzie a inokulácia

Na prípravu suspenzie vegetatívnych buniek *C. maltosa* a *G. candidum* sa použil sterilný fyziologický roztok s hodnotou pH upravenou na 6,8 až 7,0. Suspenzie vyšetovaných fungálnych druhov používané pre inokuláciu UHT mliek sa pripravili vytrepaním 48 h kultúry vyrastenej na definovanom povrchu agaru do 5 ml sterilného fyziologického roztoku. Takto pripravené suspenzie sa v jednotlivých pokusoch použili na očkovanie UHT mliek s obsahom tuku 15g.l<sup>-1</sup>. Počiatočná denzita buniek fungálnych mikroorganizmov v mliekach bola  $\leq 10^3$  KTJ.ml<sup>-1</sup> a obsah *Lb. rhamnosus* GG  $10^6$  KTJ.ml<sup>-1</sup>. Zámerne inokulované vzorky mliek suspenziami buniek *C. maltosa* resp. *G. candidum* a *Lb. rhamnosus* GG boli inkubované v termostate pri teplotách od 10 °C do  $25 \pm 0,5$  °C.

Stanovenie celkového počtu *C. maltosa*, *G. candidum* a *Lb. rhamnosus* GG

Celkové počty *G. candidum* a *C. maltosa* sme vo vzorkách mlieka stanovovali zriedňovacou kultivačnou metódou podľa normy STN ISO 7954 ako vláknité huby. Obsah *Lb. rhamnosus* GG sme stanovovali na MRS agare (Merck, Darmstadt, Nemecko) v súlade s normou STN ISO 15214.

## Matematické hodnotenie dynamiky rastu mikroorganizmov

Zo zistených zmien počtov *C. maltosa*, *G. candidum* a *Lb. rhamnosus* v UHT mlieku v závislosti od času inkubácie sme vypočítali pomocou D-modelu (Baranyi et al., 1993) rastové rýchlosti, ktoré boli podrobené analýze v sekundárnej fáze matematického modelovania mikrobiálneho rastu.

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

Rast kvasinky *C. maltosa* sme sledovali v UHT mlieku zámerne inokulovanom kvasinkovým mikroorganizmom a s rôznou počiatočnou koncentráciou *Lb. rhamnosus* GG

( $10^2$ ,  $10^4$ ,  $10^6$  KTJ.ml<sup>-1</sup>) pri teplotách 10, 15, 18, 21 a  $25 \pm 0,5$  °C.

Výsledky parametrov rastu *C. maltosa* poukázali na skutočnosť, že rastová rýchlosť sa so zvyšovaním teploty inkubácie vzoriek zvyšovala a adekvátne dochádzalo ku skracovaniu času zdvojenia a skráteniu lag-fázy. V prípade spoločnej kultivácie *C. maltosa* s *Lb. rhamnosus* GG (LGG) sa inhibičný účinok kultúry menil v závislosti od počiatočnej koncentrácie laktobacila, pričom sme pri koncentracii *Lb. rhamnosus* GG  $10^4$  a  $10^6$  KTJ.ml<sup>-1</sup> (LGG04 a LGG06) pri všetkých testovaných teplotách pozorovali tzv. dvoj-fázové rastové čiary, vyznačujúce sa dvoma fázami prispôbovania (lag-fázami) s nasledujúcimi exponenciálnymi fázami (tab. 1). Napríklad pri teplote 10 °C a koncentracii laktobacila LGG02 ( $10^2$  KTJ.ml<sup>-1</sup>) rástol izolát *C. maltosa* s rýchlosťou 0,03 log KTJ.ml<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>, čomu zodpovedal čas zdvojenia 10 h. Avšak zvýšením koncentrácie na 4 a 6 log poriadkov, sa po ukončení prvej exponenciálnej fázy rast *C. maltosa* výrazne spomalil a bol charakterizovaný druhou lag-fázou trvajúcou 55 a 105 hodín (LGG04 a LGG06, v poradí) a znížením rastovej rýchlosti o 67 a 59 % v porovnaní s prvou rastovou rýchlosťou pri 10 °C (obr.1). Porovnaním hodnôt rastových rýchlostí získaných z mono-kultivácie *C. maltosa* v mlieku so spoločnou kultiváciou kvasinky s laktobacilom vyplynulo, že dynamika rastu *C. maltosa* bola o 60 až 86 % nižšia pri jednotlivých testovaných teplotách. Do druhej fázy rastu vstupovala kvasinka potom, ako kultúra *Lb. rhamnosus* GG dosiahla v mlieku svoje maximálne koncentrácie  $10^8$  až  $10^9$  KTJ.ml<sup>-1</sup> a následne došlo k poklesu aktívnej kyslosti mlieka (obsah kyseliny mliečnej sa zvýšil z počiatočnej koncentrácie 0,16 % na 0,27 %).

Inhibičný efekt baktérii mliečneho kysnutia je ovplyvnený nielen druhom testovaného technologicky nežiaduceho resp. patogénneho mikroorganizmu, ale aj samotnou kyslomliečnou kultúrou a jej metabolizmom. Na porovnanie možno uviesť výsledky zo spoločnej kultivácie *C. maltosa* s *Lb. rhamnosus* kmeň VT1, pričom samotná dynamika rastu kvasinky vykazovala sigmoidálny charakter (Liptáková et al., 2007). Inhibičný účinok kultúry VT1 sa na rozdiel od kultúry GG prejavil predovšetkým predĺžením lag-fázy *C. maltosa*, čo bolo pravdepodobne výsledkom naprodukovanej kyseliny mliečnej. Jej obsah už na začiatku experimentu dosahoval priemerné hodnoty 0,32 %, kým v sub-kultivácii s kultúrou LGG to bolo len 0,16 %. K parciálnej inhibícii rastu oxidatívnej kvasinky *C. maltosa* kultúrami *Lb. rhamnosus* (LGG a VT1) okrem kyseliny mliečnej prispeli aj kyselina pyroglutámová (PCA) a fenylmliečna (FLA), ktoré boli produkované oboma testovanými laktobacilmi v koncentráciách 294 mg/l a 603 mg/l pre PCA a 284 mg/l pre FLA, (Liptáková et al., 2007, 2009). Lavermicocca et al., (2003) a Valerio et al., (2004) potvrdili vo svojich prácach produkciu kyseliny fenylmliečnej a 4-hydroxy-fenylmliečnej druhmi *Lactobacillus rhamnosus*, *Lb. plantarum*, *Lb. sanfranciscensis*, *Lb. brevis* a *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* a jej antifungálny účinok voči *Penicillium* spp., *Aspergillus* spp. a *Fusarium* spp..

Okrem uvedených metabolitov môžu laktobacily parciálne inhibovať rast kvasiniek a vláknitých húb aj inými sekundárnymi metabolitmi. Je známe, že za aeróbných podmienok môže dôjsť počas kyslomliečnej fermentácie aj k oxidačnej disimilácii za vzniku CO<sub>2</sub> a kyseliny octovej. Pritom sa ako medziprodukt tvorí mikrobicídny peroxid vodíka. Podobne môže z kyseliny hipurovej vzniknúť kyselina benzoová, známa konzervačná látka (Görner, Valík, 2004).

V prípade, že sú bunky kvasiniek a kvasinkových organizmov vystavené pôsobeniu slabých organických kyselín, snažia sa o udržanie intracelulárneho pH v neutrálnej oblasti tým, že sa zníži permeabilita plazmatickej membrány voči kyselinám, zvýši sa aktívne vytesnenie kyseliny do prostredia. Rozhodujúcu úlohu v tomto procese zohráva aktivita enzýmu H<sup>+</sup>-ATPáza, ktorý je lokalizovaný na membráne a slúži ako protónová pumpa. Okrem aktivácie plazmatickej H<sup>+</sup>-ATPázy dochádza v bunkách kvasiniek dlhodobo vystavených pôsobeniu slabej organickej kyseliny aj k syntéze PDR12 proteínu, ktorý slúži ako pumpa na transport aniónov uvoľnených z nedisociovaných molekúl slabých organických kyselín v intracelulárnom prostredí buniek do ich extracelulárneho priestoru. Tieto procesy sú však energeticky náročné, a tak odbúraním ATP sa spomaľuje resp. zastavuje rast buniek (Piper et al., 1998; Holyolák et al., 1999; Henriques et al., 1997; Brul et al., 2002).

Vplyv kultúry *Lb. rhamnosus* GG v koncentrácii 10<sup>6</sup> KTJ.ml<sup>-1</sup> (LGG06) na dynamiku rastu *G. candidum* sme sledovali pri ich súběžnej kultivácii v mlieku pri tých istých teplotách ako v prípade spoločných kultivácií s *C. maltosa*. Súčasný prídavok čistej kultúry *Lb. rhamnosus* GG ku kultúre *G. candidum* spôsobil spomalenie rastu a rozmnožovania sledovaného fungálneho druhu. Rast samotného *G. candidum* v mlieku bol charakterizovaný kardinálnymi teplotami: optimálna teplota pre rast 27,9 °C, s minimálnou teplotou 3,0 °C a maximálnou teplotou, pri ktorej bolo možné ešte pozorovať rast huby, 38 °C. Tieto výsledky sú v súlade s výsledkami Boutroua a Guéguena (2005). Podobne ako v prípade spoločnej kultivácie *C. maltosa* a LGG aj pri kultivácii laktobacilov s *G. candidum* sme pozorovali dvojfázovú rastovú čiaru, avšak len pri teplote 10 °C (obr. 2). Porovnaním vplyvu probiotického kmeňa *Lb. rhamnosus* GG na oba sledované fungálne druhy sme zistili intenzívnejší inhibičný účinok kmeňa LGG voči *C. maltosa*. Napríklad pri teplote 10 °C, keď sa oba sledované kontaminanty prispôbovali nevhodným podmienkam v prostredí dvojfázovými rastovými čiarami, bola prvá rastová rýchlosť *C. maltosa* o 70,5 % nižšia ako v prípade *G. candidum* a druhá rastová rýchlosť klesla o 31 %, pričom druhá lag-fáza bola takmer dvojnásobne dlhšia v porovnaní s *G. candidum*. Kým v prípade *C. maltosa* sa parciálna inhibícia rastu a rozmnožovania v spoločnej kultivácii s *Lb. rhamnosus* prejavila dvojfázovým rastom kvasinky aj pri ďalších sledovaných teplotách, v prípade *G. candidum* sme pozorovali typické rastové krivky so sigmoidálnym priebehom. Tento fakt bol pravdepodobne spôsobený odlišnou morfológiou a zložením bunkovej steny sledovaných mikroorganizmov, a tým aj odlišnou citlivosťou voči metabolitom *Lb. rhamnosus*, nakoľko *C.*

*maltosa* patrí k jednobunkovým kvasinkovým mikroorganizmom a *G. candidum* na základe morfológie zaraďujeme k vláknitým hubám tvoriacim substrátové mycélium.

Pri teplote 25 °C, ktorá je blízka optimálnej teplote rastu *G. candidum*, bola nameraná rastová rýchlosť o 79 % vyššia ako pri 15 °C a dĺžka lag-fázy sa skrátila takmer o 11 hodín. Porovnaním dynamiky rastu *G. candidum* v mono-kultúre bol rast huby o 63 % (15 °C), 60 % (20 °C) a 21 % (25 °C) rýchlejší než v súběžnej kultivácii s *Lb. rhamnosus* GG pri tých istých teplotách.

#### Sekundárne modelovanie rastu

Hodnoty rastovej rýchlosti (Gr) oboch sledovaných fungálnych druhov v spoločnej kultivácii s *Lb. rhamnosus* GG boli v druhej fáze matematického hodnotenia analyzované vo vzťahu k teplote inkubácie, ktorá bola hlavným faktorom určujúcim dynamiku rastu a následne aj voči rôznej počiatkovej koncentrácii laktobacila. Pre analýzu závislosti rastovej rýchlosti *G. candidum* od teploty inkubácie pri samotnej i spoločnej inkubácii s LGG sa využil osvedčený Ratkowského model (obr. 3), ktorý linearizuje závislosť rastovej rýchlosti od teploty a je aplikovateľný v širšom rozmedzí teplôt:  $\sqrt{Gr_{Gc}} = 0,011T + 0,081$  ( $R^2 = 0,928$ ),  $\sqrt{Gr_{Gc\_LGG}} = 0,012T + 0,005$  ( $R^2 = 0,823$ ). Následnou internou validáciou Ratkowského modelu podľa Baranyiho et al., (1999) sme zistili nezhody medzi pozorovanými rastovými rýchlosťami *G. candidum* a vypočítanými z príslušného modelu počas samotnej i spoločnej kultivácie v mlieku 13,6 % a 39 %, pričom tieto výsledky sú v súlade s inými autormi (Samapundo et al., 2005; Mellefont et al., 2003; Baranyi et al., 1999), podľa ktorých sa diskrepancie medzi hodnotami rastových rýchlostí najčastejšie pohybujú v intervale od 10 do 30 %, v niektorých prípadoch aj 46 až 52 %.

Pre zhodnotenie kombinovaného vplyvu laktobacila a kultivačnej teploty na prvú a druhú rastovú rýchlosť *C. maltosa* sme použili nasledovné dvojparametrové rovnice:  $\ln Gr_{CM1} = -5,3674 + 0,2341T + 0,2599N_0 - 0,0032T^2 - 0,0492N_0^2 - 0,0068T*N_0$  a  $\ln Gr_{CM2} = -9,5457 - 0,249T + 2,3823N_0 + 0,0099T^2 - 0,2324N_0^2 + 0,0098T*N_0$ . Internou validáciou bolo zistené, že rozdiely medzi pozorovanými a predpovedanými rastovými rýchlosťami nadobúdajú hodnoty od 37,8 do 52,9 % a faktory spoľahlivosti hodnoty od 0,963 do 1,13, čo je v súlade s prácami Neumeyer et al. (1997) a Mellefont et al. (2003), podľa ktorých možno obe rovnice považovať za akceptovateľné ( $B_f = 1,13$ ) až dobré ( $B_f = 0,963$ ) na predpovedanie rastových rýchlostí *C. maltosa* v prítomnosti baktérií mliečného kysnutia.

#### ZÁVER

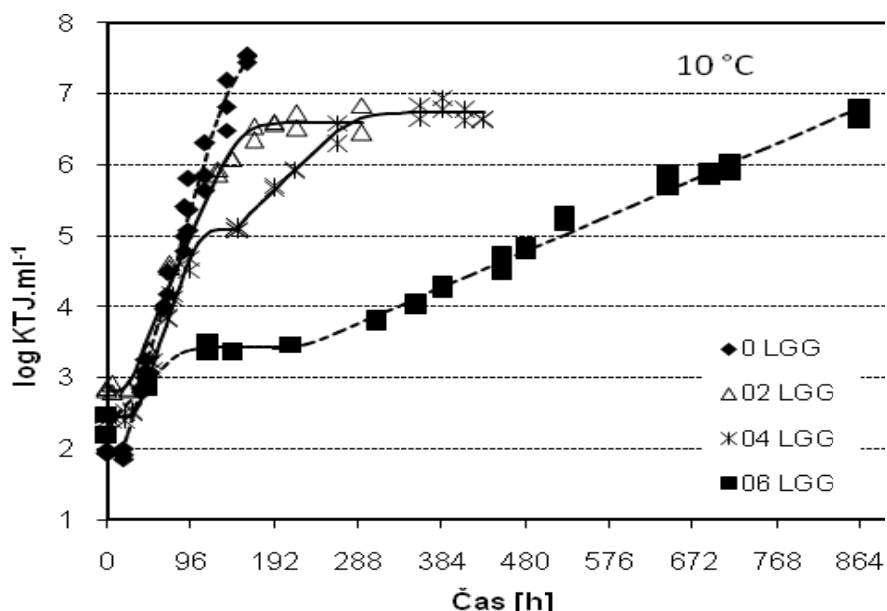
V práci sa matematicky analyzovala dynamika rastu dvoch fungálnych druhov, *C. maltosa* a *G. candidum*, v mlieku v závislosti od teploty kultivácie a prítomnosti probiotického kmeňa *Lb. rhamnosus* GG. Kmeň *Lb. rhamnosus* GG parciálne potláčal rast a rozmnožovanie oboch sledovaných mikroorganizmov, ktoré sa vo fermentovaných mliečnych produktoch, s výnimkou syrov, v ktorých zohráva *G. candidum* úlohu pri tvorbe arómy a chuti, vyskytujú predovšetkým ako kontaminanty.

Nakoľko sa oba izoláty, *C. maltosa* a *G. candidum*, vyznačujú psychrotrofnými vlastnosťami, nevyhnutným predpokladom pri výrobe hygienicky bezchybných produktov, je uchovávanie hotových výrobkov pri nízkych chladiarenských teplotách, ale aj prísne dodržiavanie hygieny a sanitácie v prevádzke. Výsledky získané v prezentovanej štúdii sú príkladom využitia princípov

prediktívnej mykológie v mliekarskej praxi, s cieľom upozorniť na dynamiku rozmnožovania sa kvasiniek a vláknitých húb v kyslomliečnych produktoch v prítomnosti baktérií mliečného kysnutia a probiotických baktérií.

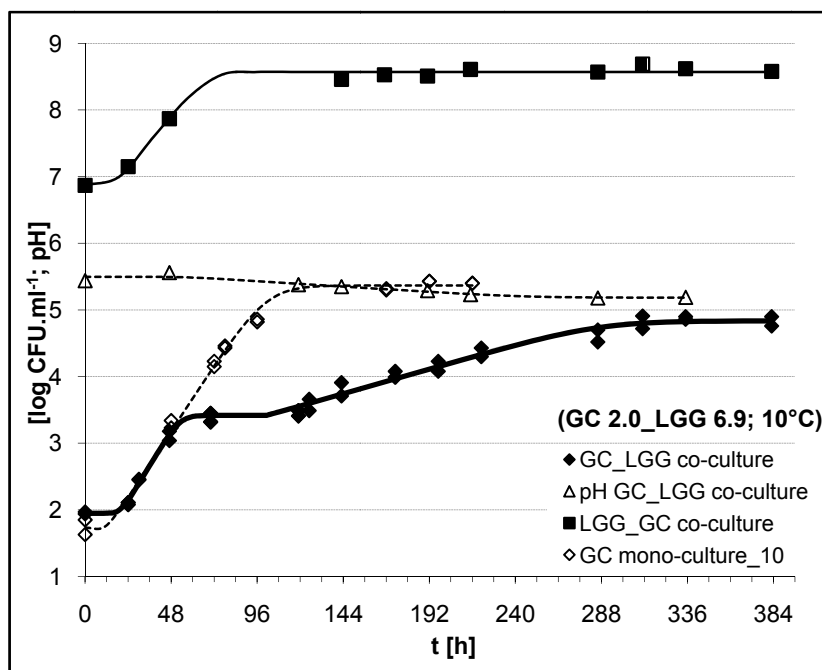
**Tab. 1:** Rastové parametre *C. maltosa* stanovené v mliečnom substráte v závislosti od rôznej počiatočnej koncentrácie kmeňa *Lb. rhamnosus* GG (LGG0 až LGG06) a teploty uchovávania.

T [°C]	LGG [log KTJ]	Gr <sub>1</sub> [log KTJ.ml <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> ]	GT <sub>1</sub> [h]	Gr <sub>2</sub> [log KTJ.ml <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> ]	GT <sub>2</sub> [h]
10	0	0,044	6,8	-	-
10	02	0,030	10,0	-	-
10	04	0,036	8,4	0,012	25,1
10	06	0,013	23,2	0,0053	56,8
15	0	0,072	4,2	-	-
15	02	0,059	5,1	-	-
15	04	0,060	5,0	0,014	21,5
15	06	0,029	10,4	0,013	23,2
18	0	0,095	3,2	-	-
18	02	0,132	2,3	-	-
18	04	0,164	1,8	0,021	14,3
18	06	0,021	14,3	0,0194	15,5
21	0	0,164	1,8	-	-
21	02	0,117	2,6	-	-
21	04	0,082	3,7	0,022	13,7
21	06	0,034	8,9	0,020	15,1
25	0	0,230	1,3	-	-
25	02	0,166	1,8	-	-
25	04	0,183	1,6	0,125	2,4
25	06	0,032	9,4	0,071	4,2

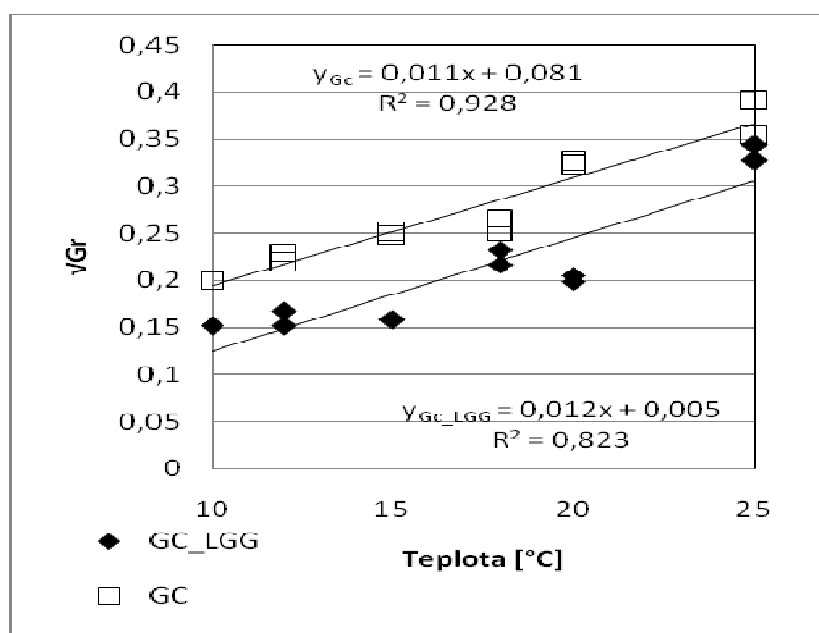


**Obr. 1:** Vplyv rôznych počiatočných koncentrácií čistej kultúry *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG 0, 02, 04, 06) na dynamiku rastu *Candida maltosa* pri teplote 10 °C.





Obr. 2: Vplyv kultúry *Lactobacillus rhamnosus* GG na rast *Geotrichum candidum* v spoločnej kultivácii pri 10 °C.



Obr. 3: Závislosť rastovej rýchlosti *G. candidum* od teploty (Ratkowského model) v mono- a spoločnej kultúre s *Lb. rhamnosus* GG.

## LITERATÚRA

- ABDELGADIR, W. S., HAMAD, S. H., MØLLER, P. L., JAKOBSEN, M. 2001. Characterisation of the dominant microbiota of Sudanese fermented milk Rob. *International dairy Journal*, vol. 11, 2001, p. 63-70.
- ADDIS, E., FLEET, G. H., COX, J. M., KOLAK, D., LEUNG, T. 2001. The growth, properties and interactions of yeasts and bacteria associated with the maturation of Camembert and blue-veined cheeses. *International Journal of Food Microbiology*, vol. 69, 2001, p. 25-36.
- ÁLVAREZ-MARTIN, P., FLÓREZ, A. B., HERNÁNDEZ-BARRANCO, A., MAYO, B. 2008. Interaction between dairy

yeasts and lactic acid bacteria strains during milk fermentation. *Food Control*, vol. 19, 2008, p. 62-70.

BARANYI, J., ROBERTS, T. A., MCCLURE, P. 1993. A non-autonomous differential equation to model bacterial growth. *Food Microbiology*, vol. 10, 1993, p. 43-59.

BARANYI, J., PIN, C., ROSS, T. 1999. Validating and comparing predictive models. *International Journal of Food Microbiology*, vol. 48, 1999, p. 159-166.

BOUTROU, R., GUÉGUEN, M. 2005. Interests in *Geotrichum candidum* for cheese technology. *International Journal of Food Microbiology*, vol. 102, 2005, p. 1-20.

BRUL, S., COOTE, P., OOMES, S., MENSONIDES, F., HELLINGWERF, K., KLIS, F. 2002. Physiological actions of preservative agents: prospective of use of modern

microbiological techniques in assessing microbial behaviour in food preservation. *International Journal of Food Microbiology*, vol. 79, 2002, p. 55-64.

CORBO, M. R., LANCIOTTI, R., ALBENZIO, M., SINIGAGLIA, M. 2001. Occurrence and characterization of yeasts isolated from milks and dairy products of Apulia region. *International Journal of Food Microbiology*, vol. 69, 2001, p. 147-152.

GADAGA, T. H., MUTUKUMIRA, A. N., NARVHUS, J. A. 2001. The growth and interaction of yeasts and lactic acid bacteria isolated from Zimbabwean naturally fermented milk in UHT milk. *International Journal of Food Microbiology*, vol. 68, 2001, p. 21-32.

GÖRNER, F., ŠIMKOVICOVÁ, H., ZDICHAVSKÁ, M. 1972: Zmeny obsahu kontaminujúcich mikroorganizmov pri fermentácii jogurtu. *Československá hygiena*, roč. 17, 1972, s. 141-149.

GÖRNER, F., VALÍK, E. 2004. In: Aplikovaná mikrobiológia požívatin. Bratislava: Malé centrum, 2004, 526 p.

HENRIQUES, M., QUINTAS, C., LOUREIRO-DIAS, M. C. 1997. Extrusion of benzoic acid in *Saccharomyces cerevisiae* by an energy-dependent mechanism. *Microbiology*, vol. 143, 1997, p. 1877-1883.

HOLYOLAK, C. D., BRACEY, D., PIPER, P. W., KUHLER, K., COOTE, P. J. 1999. The *Saccharomyces cerevisiae* weak-acid-inducible ABC transporter PDR12 transports fluorescein and preservative anions from the cytosol by an energy-dependent mechanism. *Journal of Bacteriology*, vol. 181, 1999, p. 4644-4652.

JAKOBSEN, M., NARVHUS, J. 1996. Yeasts and their possible beneficial and negative effects on quality of dairy products. *International Dairy Journal*, vol. 6, 1996, p. 755-768.

LAUKOVÁ, D., VALÍK, E., GÖRNER, F. 2003. Effect of lactic acid on the growth dynamics of *Candida maltosa*. *Czech Journal of Food Sciences*, vol. 21, 2003, p. 43-49.

LAVERMICCOCA, P., VALERIO, F., VISCONTI, A. 2003. Antifungal activity of phenyllactic acid against molds isolated from bakery products. *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 69, 2003, p. 634-640.

LIPTÁKOVÁ, D., VALÍK, E., LAUKOVÁ, A., STROMPOVÁ, V. 2007. Characterisation of *Lactobacillus rhamnosus* VT1 and its effect on the growth of *Candida maltosa* YP1. *Czech Journal of Food Science*, vol. 25, 2007, p. 272-282.

LIPTÁKOVÁ, D., HUDECOVÁ, A., VALÍK, E., MEDVEĐOVÁ, A. 2009. The effect of *Lactobacillus rhamnosus* GG on growth of *Geotrichum candidum* and *Candida maltosa* in milk. In: Flynn, K., Garriga, M., Hofstra, H., Monfort, J. M.: *The Second SAFE International Congress on Food Safety*- Abstract Book, Girona, 2009, p. 156-157.

LOPANDIC, K., ZELGER, S., BÁNSZKY, L. K., ELISKASES-LECHNER, F., PRILLINGER, H. 2006. Identification of yeasts associated with milk products using traditional and molecular techniques. *Food Microbiology*, vol. 23, 2006, p. 341-350.

MAGNUSSON, J., STRÖM, K., ROOS, S., SJÖGREN, J., SCHNÜRER, J. 2003. Broad and complex antifungal activity among environmental isolates of lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Letters*, vol. 219, 2003, p. 129-135.

MELLEFONT, L. A., MCMEEKIN, T. A., ROSS, T. 2003. Performance evaluation of a model describing the effects of temperature, water activity, pH and lactic acid concentration on

the growth of *Escherichia coli*. *International Journal of Food Microbiology*, vol. 82, 2003, p. 45-58.

NEUMEYER, K., ROSS, T., THOMSON, G., MCMEEKIN, T. A. 1997. Validation of a model describing the effects of temperature and water activity on the growth of psychrotrophic pseudomonads. *International Journal of Food Microbiology*, vol. 38, 1997, p. 55-63.

PIPER, P., MAHÉ, Y., THOMPSON, S., PANDJAITAN, R., HOLYOLAK, C., EGNER, R., MÜHLBAUER, M., COOTE, P., KUHLER, K. 1998. The Pdr12 ABC transporter is required for the development of weak organic acid resistance in yeast. *The EMBO Journal*, vol. 17, 1998, p. 4257-4265.

PLOCKOVÁ, M., STILES, J., CHUMCHALOVA, J., HALFAROVÁ, R. 2001. Control of mould growth by *Lactobacillus rhamnosus* VT1 and *Lactobacillus reuteri* CCM 3625 on milk agar plates. *Czech Journal of Food Sciences*, vol. 19, 2001, p. 46-50.

ROOSTITA, R., FLEET, G. H. 1996. The occurrence and growth of yeasts in Camembert and Blue-veined cheeses. *International Journal of Food Microbiology*, vol. 28, 1996, p. 393-404.

SAMAPUNDO, S., DEVLIEGHERE, F., DE MEULENAER, B., GEERAERD, A. H., VAN IMPE, J. F., DEBEVERE, J. M. 2005. Predictive modelling of the individual and combined effect of water activity and temperature on the radial growth of *Fusarium verticillioides* and *F. proliferatum* on corn. *International Journal of Food Microbiology*, vol. 105, 2005, p. 35-52.

SERVIN, A. L. 2004. Antagonistic activities of lactobacilli and bifidobacteria against microbial pathogens. *FEMS Microbiology Reviews*, vol. 28, 2004, p. 405-440.

STN ISO 7954 (56 0087) 1997. Mikrobiológia. Všeobecné pokyny na stanovenie počtu kvasiniek a plesní. Metóda počítania kolónií kultivovaných pri 25 °C. 1997.

STN ISO 15214 2002. Mikrobiológia potravín a krmív: Horizontálna metóda stanovenia mezofilných baktérií mliečného kysnutia. Metóda počítania kolónií kultivovaných pri 30 °C. Bratislava: Slovenský ústav technickej normalizácie, 2002.

VALERIO, F., LAVERMICCOCA, P., PASCALE, M., VISCONTI, A. 2004. Production of phenyllactic acid by lactic acid bacteria: an approach to the selection of strains contributing to food quality and preservation. *FEMS Microbiology Letters*, vol. 233, 2004, p. 289-295.

VALÍK, E., PIECKOVÁ, E. 2001. Growth modelling of heat-resistant fungi: the effect of water activity. *International Journal of Food Microbiology*, vol. 63, 2001, p. 11-17.

VARNAN, A. H., SUTHERLAND, J. P. 1994. In: Milk and Milk Products. Chapman and Hall, London, 1994, 451 p.

VASDINYEI, R., DEÁK, T. 2003. Characterization of yeast isolates originating from Hungarian dairy products using traditional and molecular identification techniques. *International Journal of Food Microbiology*, vol. 86, 2003, p. 123-130.

#### Pod'akovanie:

Touto cestou ďakujeme Dr. E. Slávikovej a Dr. E. Pieckovej za potvrdenie identifikácie oboch použitých fungálnych druhov. Súčasne chceme vysloviť vďaku za poskytnutie kmeňa *Lb. rhamnosus* GG Dr. A. Laukovej.

**Kontaktná adresa:** Ing. Liptáková Denisa, PhD., Fakulta chemickej a potravinárskej technológie STU, Radlinského 9, 812 37 Bratislava; denisa.laukova@stuba.sk.

## VPLYV DORMANCIE NA FORMOVANIE TECHNOLOGICKÝCH PARAMETROV SLADU

## EFFECT OF DORMACY ON FORMATION OF TECHNOLOGICAL PARAMETERS OF MALT

*Miriam Líšková, Helena Frančáková, Ján Mareček*

### ABSTRACT

The aim of this work was to find out the effect of dormancy on formation of technological parameters of malt, which are monitored according to indicators of malting quality (USK). Selected technological parameters of malt considered in this experiment were: extract, relative extract at 45°C, Kolbach index and, apparent final attenuation in relation to physiological parameters of barley grain which were: germination capacity, germination energy, speed of germination and germination index. We tried to find out whether it would be possible to predict malt technological quality according to physiological parameters of barley grains. The results revealed that dormancy markedly influenced formation of technological parameters of malt such as relative extract at 45°C and Kolbach index. Some varieties did not finish their dormancy even six weeks after harvest. After half a year varieties were prepared for malt processing, however, according to their physiological parameters (germination capacity, germination energy, germination speed and germination index) the varieties were already post-harvest ripe after six weeks of harvesting. Germination index and germination speed were the most suitable physiological parameters observed and according to those the correlations between malt technological parameters such as extract and relative extract at 45°C may be considered. Germination index and germination speed could be used in malting industry to predict malting quality.

**Keywords:** barley, dormancy, germination index, malt, technological parameters

### ÚVOD

V súčasnosti medzi najdôležitejšie kvalitatívne požiadavky sladu patria vysoký extrakt, vysoká enzymatická aktivita a dobrá modifikácia. Pre dosiahnutie uvedených požiadaviek musí jačmeň preukázať dostatočnú klíčivosť a minimálnu pozberovú dormanciu (Briggs et al., 1994). Podľa Romagosu et al. (2001), Zimolku et al. (2006) je dormancia definovaná ako neschopnosť živých semien klíčiť i za podmienok, ktoré sú pre klíčenie vhodné. Frančáková (2003) uvádza, že obdobie od zberu jačmeňa do okamihu kedy hodnoty klíčivosti a klíčiwej energie sú zhodné, nazývame obdobím pozberového dozrievania. Hĺbka dormancie závisí od odrody, od poveternostných podmienok a od skladovacích podmienok (Lewis, Young, 2002), (Reuss et al., 2006). U sladovníckych jačmeňov je dĺžka pozberového dozrievania zvlášť dôležitá, pretože jačmene s dlhou dobou pozberového dozrievania majú väčšinou nízky obsah enzýmov, dávajú menej kvalitný slad a kvôli nízkej energii klíčenia sa nemôžu dlhé obdobie po zbere skladovať (Li et al., 2003). Všeobecne je dormancia riadená tak, aby došlo ku jej zániku v priebehu skladovania. Dormancia je kvantitatívne dedená a vo veľkej miere ovplyvnená prostredím (Prada et al., 2004, Zheng et al., 2005, Gubler et al., 2008). Podľa Kosařa et al. (2000), v pozberovom období sú jednotnosť (homogenita) a rýchlosť klíčenia negatívne ovplyvnené. Sú závislé na stupni zrelosti jednotlivých obiliek, ktorá je po zbere značne nevyrovnaná. Pomalé a nejednotné klíčenie obiliek v pozberovom období nasvedčuje tomu, že v danej vzorke obiliek existuje rada „intenzit“ dormancie. Počas sladovníckeho spracovania by zrno malo mať už ukončené obdobie pozberového dozrievania, aby sa dosiahlo

maximálnej rýchlosti klíčenia a vysokej energie klíčenia, čo je predpoklad dobrého rozlúštenia sladu (Psota, 1998).

### MATERIÁL A METODIKA

V práci sa hodnotili tri genotypy jačmeňa jarného sladovníckeho a to kontrolná odroda Nitran a novošlachtenia SK 5734 a SK 5976, ktoré boli zaradené v odrodových skúškach na skúšobných staniciach Sládkovičovo, Veľké Ripňany a Jakubovany. Vzorky boli analyzované od prvého týždňa po zbere až po dvadsiaty piaty týždeň po zbere.

V metodike boli použité uznané metódy stanovení v rámci EBC, ktoré uvádza Basařová (1992). Z fyziologických parametrov zrna sa sledovala: klíčivosť (KL), energia klíčenia (EK), rýchlosť klíčenia (RK) a index klíčenia (IK).

Stanovenie klíčivosti: podľa STN 46 1011-13

Pod pojmom klíčivosť jačmeňa sa rozumie percentuálny podiel všetkých živých zrn schopných klíčiť (optimálna hranica 98 %).

Stanovenie energie klíčenia: podľa STN 46 1011-14

Energia klíčenia je percento vyklíčených zrn v danom čase. Klíčiwa energia sa stanoví obvykle po troch dňoch. Je to hodnota, ktorá udáva zdravotný stav jačmeňa a rovnako jeho vhodnosť pre okamžité spracovanie.

Výpočet rýchlosti klíčenia (z údajov energie klíčenia): podľa STN 46 1011-14

$$RK = \frac{(5a + 3b + c)}{5}$$

Kde:

*RK* - rýchlosť klíčenia (%)

*a* - priemerný počet zrn vyklíčených po 24 hodinách od zahájenia skúšky

*b* - priemerný počet zrn vyklíčených od 24 do 48 hodín trvania skúšky

*c* - priemerný počet zrn vyklíčených od 48 do 72 hodín trvania skúšky.

Výpočet indexu klíčenia: podľa STN 46 1011-14

$$IK = \frac{10 \cdot X}{n_{24} + n_{48} \cdot 2 + n_{72} \cdot 3}$$

Kde:

*IK* - index klíčenia (bezrozmerné číslo)

*X* - energia klíčenia

*n<sub>24</sub>*, *n<sub>48</sub>*, *n<sub>72</sub>* - počet obiliek vyklíčených a odstránených po 24, 48 a 72 hodinách.

Z technologických parametrov sladu sa stanovili: extrakt (E), relatívny extrakt pri 45 °C (RE 45), Kolbachovo číslo (KČ) a dosiahnuteľný stupeň prekvasenia (DSP). Vzorky jačmeňa boli sladované v mikrosladovni na šľachtiteľskej stanici Hordeum Sládkovičovo.

Stanovenie extraktu sladu

Pridavkom sladového výluhu, so známym obsahom extraktu, do vystierky sladového šrotu sa rozštiepia vysokomolekulárne komplexy a u sladiny získanej rmutovaním sa stanoví relatívna hustota. Z analytických tabuliek sa vyhledá príslušná hodnota extraktu v g .100 g<sup>-1</sup> sladiny a vypočíta sa percento extraktu sladu.

Stanovenie relatívneho extraktu pri 45 °C

Jemne rozomletý slad (90 % múčky) sa rmutuje pri teplote 45 °C. V sladine sa stanoví extrakt a vyjadří sa v percentách extraktu, stanoveného u skúšaného sladu kongresnou metódou, t. j. ako relatívny extrakt.

Stanovenie Kolbachovho čísla v slade

Kolbachovo číslo vyjadruje pomer rozpustných dusíkatých látok k celkovému obsahu dusíkatých látok v slade.

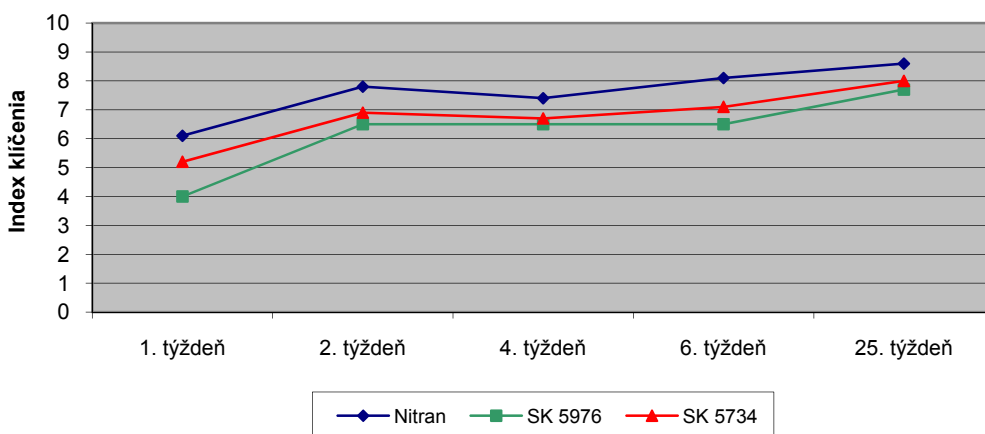
Stanovenie dosiahnuteľného stupňa prekvasenia

Sladina sa zakvasí pivovarskými kvasinkami a nechá sa prekvasiť spôsobom pre danú metódu. V percentách sa vyjadří rozdiel medzi extraktom pôvodnej sladiny a extraktom po prekvasení.

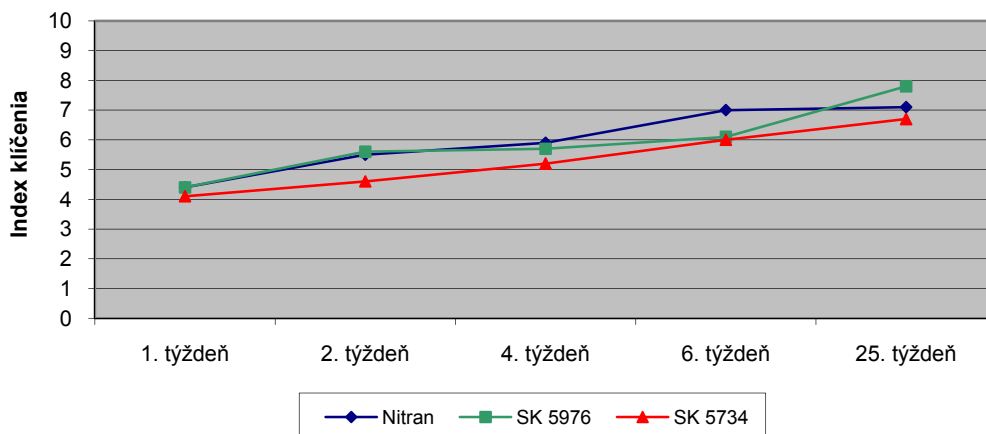
Získané výsledky sa štatisticky vyhodnotili matematicko-štatistickou metódou s použitím programu SAS (Statistical Analysis System, SAS Institute, Cary, NC 1985).

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

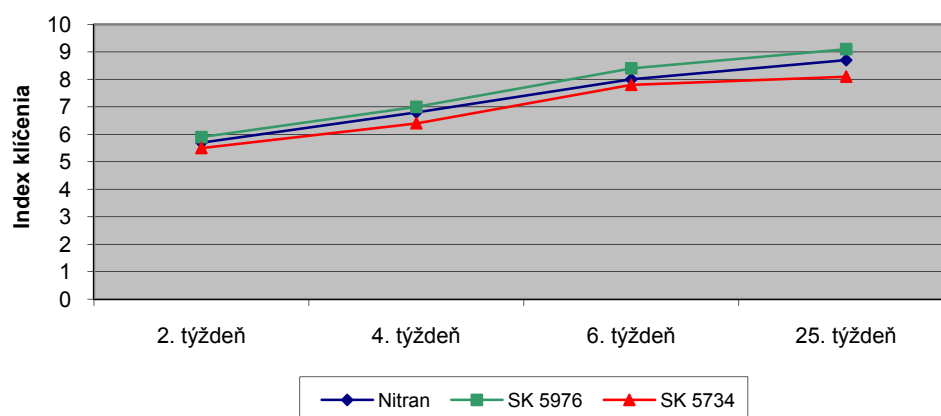
Výsledky ukázali, že pozberové dozrievanie (dormancia) výrazne ovplyvnilo formovanie vybraných technologických parametrov sladu. Niektoré genotypy ani do šiestich týždňov po zbere neukončili dormanciu. Až po pol roku (25. týždeň) po zbere boli jačmene po technologickej stránke pripravené pre sladovnícke spracovanie, aj keď podľa fyziologických parametrov ako sú klíčivosť, energia klíčenia, rýchlosť klíčenia a index klíčenia (graf 1, 2, 3) boli genotypy pozberovo zrelé už šiesty týždeň po zbere (klíčili rýchlo a rovnomerne). Z fyziologických parametrov graficky uvádzame index klíčenia (IK) (graf 1, 2, 3). **Woonton et al. (2005)** uvádza, že index klíčenia sa považuje za najlepší prediktor hĺbky dormancie, sladovníckej kvality, enzymatickej aktivity a zachytáva rozdiely medzi odrodami počas posledných týždňov výstupu zrna z dormancie. Vysoké hodnoty indexu klíčenia poukazujú na vysokú kvalitu a homogénnosť sladu.



Graf 1: Index klíčenia pri genotypoch zo stanice Sládkovičovo



Graf 2: Index klíčenia pri genotypoch zo stanice Veľké Ripňany



Graf 3: Index klíčenia pri genotypoch zo stanice Jakubovany

Zistili sme, že jačmene ukončovali výstup z dormancie v dvadsiatom piatom týždni po zbere, čo sa prejavilo zvýšením hodnôt všetkých vybraných technologických parametrov sladu ako sú: extrakt, relatívny extrakt pri 45 °C a Kolbachovo číslo. Dormancia výrazne neovplyvnila hodnoty extraktu a dosiahnuteľného stupňa prekvasenia (tabuľka 1, 2) ale výraznejšie ovplyvnila hodnoty relatívneho extraktu pri 45 °C a Kolbachovho čísla (tabuľka 1, 2). Dvadsiaty piaty týždeň po zbere v porovnaní so šiestym týždňom sa hodnoty relatívneho extraktu pri 45 °C s dobou skladovania zvýšili (výstup jačmeňov z dormancie). Z pohľadu lokality sa hodnota relatívneho extraktu pri 45 °C najvýraznejšia zvýšila pri genotypoch zo stanice

Sládkovičovo (38,1 %) a z pohľadu odrody, najvyšší relatívny extrakt pri 45 °C preukázala odroda Nitran (38,3 %) (tabuľka 1, 2). Pozberové dozrievanie sa ďalej prejavilo zvýšením hodnôt Kolbachovho čísla v dvadsiatom piatom týždni po zbere. Z pohľadu lokality sa Kolbachovo číslo výrazne zvýšilo pri genotypoch zo stanice Sládkovičovo, aj keď hodnoty Kolbachovho čísla v porovnaní s jačmeňmi z ostatných staníc boli na stanici Sládkovičovo preukazne najnižšie (39,1 %) (tabuľka 1). Z pohľadu odrody, najvyššie hodnoty Kolbachovho čísla preukázali odroda Nitran a genotyp SK 5734 (40,3 %) (tabuľka 2).

Tabuľka 1: Vybrané technologické parametre sladu jednotlivých genotypov z pohľadu lokality v šiestom a v dvadsiatom piatom týždni po zbere

Lokalita \ Znak	RE 45 (%)		KČ (%)		DSP (%)		E (%)	
	6. týždeň	25. týždeň	6. týždeň	25. týždeň	6. týždeň	25. týždeň	6. týždeň	25. týždeň
Sládkovičovo	36,7	38,1	37,7	39,1	80,9	81,2	81,6	81,5
V. Ripňany	35,9	36,8	40,1	40,5	80,3	80,4	81,7	81,4
Jakubovany	37,5	37,5	39,6	40,5	80,4	80,9	81,6	82

Legenda: RE 45 – relatívny extrakt pri 45 °C, KČ – Kolbachovo číslo, DSP – dosiahnuteľný stupeň prekvasenia, E – extrakt

**Tabuľka 2:** Vybrané technologické parametre sladu jednotlivých genotypov z pohľadu odrody v šiestom a v dvadsiatom piatom týždni po zbere

Genotyp	Znak RE 45 (%)		KČ (%)		DSP (%)		E (%)	
	6. týždeň	25. týždeň	6. týždeň	25. týždeň	6. týždeň	25. týždeň	6. týždeň	25. týždeň
Nitran	37,1	38,3	39,3	40,3	80,7	81	81,8	82,1
SK 5976	36,6	37,4	38,7	39,6	80,8	80,9	81,5	81,7
SK 5734	36,3	36,8	39	40,3	80,1	80,5	81,6	81,1

Legenda: RE 45 – relatívny extrakt pri 45 °C, KČ – Kolbachovo číslo, DSP – dosiahnuteľný stupeň prekvasenia, E – extrakt

Ďalej sme skúmali závislosť vybraných technologických parametrov sladu od fyziologických parametrov zrna na základe korelačných vzťahov. Výsledky ukázali, že z pohľadu fyziologických parametrov ako sú klíčivosť a energia klíčenia sa nezistila žiadna preukazná závislosť. Pri použití Pearsonovho korelačného koeficienta z pohľadu rýchlosti a indexu klíčenia sme zistili preukazne pozitívnu koreláciu medzi indexom klíčenia (IK) a relatívnym extraktom pri 45 °C (RE 45) s korelačným koeficientom ( $r = 0,77$ ) (tabuľka 3) a ďalej medzi rýchlosťou klíčenia (RK) a relatívnym extraktom pri 45 °C ( $r = 0,75$ ) (tabuľka 3). Znamená to, že so zvyšujúcou sa rýchlosťou a indexom klíčenia stúpajú hodnoty relatívneho extraktu pri 45 °C. Preukazne pozitívna závislosť sa ďalej potvrdila aj medzi indexom klíčenia a extraktom (E) s korelačným koeficientom ( $r = 0,57$ ) (tabuľka 3) a medzi rýchlosťou klíčenia a extraktom ( $r = 0,57$ ) (tabuľka 3). **Reuss et al. (2006)** vo svojich pokusoch zistil, že skladovanie dormantných jačmeňov spôsobilo zmeny v sladovníckych ukazovateľoch: Kolbachovo číslo, obsah  $\beta$ -glukanov

v sladine, diastatická mohutnosť a dosiahnuteľný stupeň prekvasenia. K podobným záverom dospeli **Sychra, Mareček (2000)**. Štúdie s nedormantnými európskymi jačmeňmi potvrdili, že skladovanie počas jedného roka napomohlo k zvýšeniu sladovníckej kvality v jednotlivých ukazovateľoch ako sú relatívny extrakt a Kolbachovo číslo. Zvýšenie sladovníckej kvality vplyvom skladovania sa potvrdilo aj pri štúdiách s Novozélandskými jačmeňmi (**Coles et al., 1996**). Pri pokusoch s Austrálskymi jačmeňmi sa zistilo, že kvalita sladu a klíčivosť sa počas jedného roka skladovania výrazne nezlepšili, uvádza (**Samuro et al., 1980**).

Podľa našich výsledkov sa index a rýchlosť klíčenia prejavili ako najvhodnejšie fyziologické parametre zrna pre posúdenie korelačných vzťahov s technologickými parametrami sladu ako sú extrakt a relatívny extrakt pri 45 °C. Index klíčenia a rýchlosť klíčenia by mohli byť v oblasti sladovníctva využívané na predikciu sladovníckej kvality. Tejto problematike je potrebné vo výskume venovať zvýšenú pozornosť.

**Tabuľka 3:** Štatistická závislosť fyziologických a technologických parametrov jačmeňa a sladu hodnotená Pearsonovým koeficientom korelácie

		RE	E	KC	DSP	EK	IK	RK	KL
RE	r p	1.00000 0.2469	0.34595 0.2469	0.20918 0.4928	0.36868 0.2151	0.32645 0.2763	0.77494 0.0019	0.75250 0.0030	0.26717 0.3775
E	r p	0.34595 0.2469	1.00000	0.29033 0.3359	0.41156 0.1623	0.23833 0.4330	0.57405 0.0402	0.57684 0.0390	-0.13381 0.6630
KC	r p	0.20918 0.4928	0.29033 0.3359	1.00000	-0.12316 0.6885	-0.20485 0.5020	0.05028 0.8704	-0.00101 0.9974	-0.60992 0.0269
DSP	r p	0.36868 0.2151	0.41156 0.1623	-0.12316 0.6885	1.00000	-0.24902 0.4120	0.26487 0.3818	0.20838 0.4945	0.32038 0.2859
EK	r p	0.32645 0.2763	0.23833 0.4330	-0.20485 0.5020	-0.24902 0.4120	1.00000	0.58406 0.0361	0.69253 0.0087	0.25466 0.4011
IK	r p	0.77494 0.0019	0.57405 0.0402	0.05028 0.8704	0.26487 0.3818	0.58406 0.0361	1.00000	0.98543 <.0001	0.26883 0.3745
RK	r p	0.75250 0.0030	0.57684 0.0390	-0.00101 0.9974	0.20838 0.4945	0.69253 0.0087	0.98543 <.0001	1.00000	0.27390 0.3652
KL	r p	0.26717 0.3775	-0.13381 0.6630	-0.60992 0.0269	0.32038 0.2859	0.25466 0.4011	0.26883 0.3745	0.27390 0.3652	1.00000

Legenda:  
RE – relatívny extrakt pri 45 °C,  
E – extrakt,  
KČ – Kolbachovo číslo,  
DSP – dosiahnuteľný stupeň prekvasenia, EK - energia klíčenia,  
IK - index klíčenia, RK - rýchlosť klíčenia,  
KL - klíčivosť,  
r - korelačný koeficient,  
p - p hodnota

## ZÁVER

Pozberové dozrievanie (dormancia) výrazne ovplyvňuje formovanie technologických parametrov sladu ako sú relatívny extrakt pri 45 °C a Kolbachovo číslo a v menšej miere hodnoty extraktu a dosiahnuteľného stupňa prekvásenia. Ukázalo sa, že na základe fyziologických parametrov zrna, ako sú index klíčenia a rýchlosť klíčenia, by bolo možné dopredu predpokladať technologickú kvalitu sladu, k čomu je však nutné overiť tieto zistenia v ďalších klimaticky rozdielnych ročníkoch a na rôznych genotypoch. Tým by sa v sladovníckom priemysle uľahčilo a skrátilo používanie časovo náročných metód zameraných na zistenie kvality jačmeňa a sladu.

## LITERATÚRA

BASAŘOVÁ, G. 1992. Pivovarsko – sladárška analytika. Praha, 1992, Merkanta s.r.o., 388 s.

BRIGGS D., WOODS, J. L., FAVIER, J. F. 1994. Drying and storage treatments for overcoming dormancy in malting barley. In: *Journal of the Institute of Brewing*, vol. 100, 1994, p. 271-278.

COLES, G., HASLEMORE, R., HAY, A., BOONE, J., FAUTRIER, A. 1996. Barley maltability – definition and prediction. In: Proceedings of the 46<sup>th</sup> Australian Cereal Chemistry Conference, Sydney, NSW, Australia, 1996, p. 176-179.

FRANČÁKOVÁ, H. 2003. Pozberové dozrievanie a dormancia zŕn jačmeňa. In: Jačmeň - biológia, pestovanie, využívanie. Nitra: Agrogenofond, 2003, s.151-152, ISBN 80-69068-2-8.

GUBLER, F., HUGHES, T., WATERHOUSE, P., JACOBSEN, J. 2008. Regulation of Dormancy in Barley by Blue Light and After-Ripening: Effects on Abscisic Acid and Gibberellin Metabolism. In: *Plant Physiology*, vol. 147, 2008, p. 886-896.

KOSAŘ, K. et al. 2000. Technologie výroby sladu a piva. Praha, VÚPS, 2000, 398s. ISBN 80-902658-6-3.

LEWIS, M. J., YOUNG, T. W. 2002. Barley. In: *Brewing*, 2<sup>nd</sup> ed., New York: Plenum Publishers, 2002, 398 p.

LI, C.D., TARR, A., LANCE, R. C. M., HARASYMOV, S., UHLMANN, J., WESTCOT, S., YOUNG, K. J. 2003. A major QTL controlling seed dormancy and pre-harvest sprouting/grain alpha-amylase in two-rowed barley. In: *Australian Journal of agricultural research*, vol. 54, 2003, no. 11-12, p. 1303-1313 <http://wos4.isiknowledge.com/CIW.cgi/>

PRADA, D., ULLRICH, S. E., MOLINA-CANO, J. L., CISTUÉ, L., CLANCY, J. A., ROMAGOSA, I. 2004. Genetic control of dormancy in Triumph/Morex cross in barley. In: *Theoretical and applied genetic*, vol.109, 2004, no.1, p. 62-70. <http://wos4.isiknowledge.com/CIW.cgi>

PSOTA, V. 1998. Dormance odrůd sladovníckého ječmene: výzkumná správa. Brno: ÚKZÚZ, 1998, 23 s.

REUSS, R., CASSELLS, J., GREEN, J., WILLIS, T., NISCHWITZ, R. 2006. In: The effect of storage conditions on post-harvest maturation and maltability of barley, <http://sgrl.csiro.au/news/BTS%20barley%20storage.pdf/> (15.02.2006)

ROMAGOSA, I., PRADA, D., MORALEJO, O. 2001. Dormancy, ABA content and sensitivity of barley mutant to ABA application during seed development and after ripening. In: *Journal of Experimental Botany*, vol. 52, 2001, no. 360, p. 1499 – 1506.

SAMURO, M., MORIOKA, Y., YUMOTO, T., KITAMURA, Y., YAMAZUMI, K. 1980. Observations on the malting quality of clipper and dampier barley varieties. In: Proceedings of the Institute of Brewing, 16<sup>th</sup> Convention, Sydney, NSW, Australia, 1980, p. 81-89.

STN 46 1011-13: 2005, Stanovenie klíčivosti sladovníckeho jačmeňa.

STN 46 1011-14: 2005, Stanovenie energie klíčenia a citlivosti na vodu sladovníckeho jačmeňa.

SYCHRA, L., MAREČEK, J. 2000. Dlouhodobé skladování sladovníckeho ječmene a jeho vliv na kvalitu sladu a zrna jačmene. In: II. Medzinárodná vedecká konferencia mladých. Nitra: SPU, 2000, st. 284-287.

WOONTON, B., SHERKAT, F., MAHARJAN, P. 2005. The influence of barley storage on respiration and glucose-6-phosphate dehydrogenase during malting. In: *Journal of the Institute of Brewing*, vol. 111, 2005, no. 4, p. 388-395.

ZHENG, F., CHEN, G., HUANG, Q., ORION, O. - KRUGMAN, T., FAHIMA, T., KOROL, A. B., NEVO, E., GUTTERMAN, Y. 2005. Genetic basis of barley caryopsis dormancy and seedling desiccation tolerance at the germination stage. In: *Theor. Appl. Genetic* vol. 110, 2005, p. 445-453.

ZIMOLKA, J. et al. 2006. Ječmen formy a užitkové směry v České republice. Profi Press, Praha, 2006, 200 s., ISBN 80-86726-18-5.

### Kontaktná adresa:

Ing. Miriam Lišková PhD., Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre, FBP, KSSRP, Trieda Andreja Hlinku 2. Tel.: 037 641 4779, E-mail: [miriam.liskova@uniag.sk](mailto:miriam.liskova@uniag.sk)

doc. Ing. Helena Frančáková, CSc., Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre, FBP, KSSRP, Trieda Andreja Hlinku 2. Tel.: 037 641 4311, E-mail: [helena.francakova@uniag.sk](mailto:helena.francakova@uniag.sk)

Ing. Ján Mareček PhD., Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre, FBP, KSSRP, Trieda Andreja Hlinku 2. Tel.: 037 641 4379, E-mail: [jan.marecek@uniag.sk](mailto:jan.marecek@uniag.sk)



## VYHODNOCOVANIE ENERGETICKEJ HODNOTY MENU PRE DETI V POLSKÝCH MATERSKÝCH ŠKOLÁCH

### EVALUATION OF ENERGY VALUE FROM KINDERGARTEN MENU OF POLISH CHILDREN

*Maria Dymkowska-Malesa, Weronika Woźniak, Janusz Zakrzewski, Krystyna A. Skibniewska*

#### ABSTRACT

Abstract: A proper diet has a huge impact both on human growth and maintaining a good physical and psychological well-being. The paper presents assessment of correctness and quality of menu in a kindergarten in Koszalin, Poland. Contents of protein, energy, fat and carbohydrate were calculated in 30 daily food rations. Their quality was also assessed. Very high irregularities were noted in relation to standards, the consumption of energy, protein and carbohydrates, which may lead to irregular food/eating habits in the adulthood. The results indicate the need for nutrition education among workers of kindergartens.

**Keywords:** nutrients, kindergarten, food rations, nutritive value

#### INTRODUCTION

It is a life's necessity, as it satisfies the basic needs of the organism, eliminates the feeling of hunger and thirst, positively affects well-being, ability of learning and efficiency of work (Niclas et al., 2001; Jackiewicz, 2007). The nutrition of children is undeniable linked with the condition of their organisms in adulthood. Proper nutrition from an early age gives the chance to reach the opportunity of genetically-based physical and intellectual development (Hamulka et al., 2003). In addition, well-balanced diet can prevent certain civilization diseases or cause their milder course. In Poland there are 40% of children who attend kindergarten, where they spend from six to eight hours a day. Meals, which are given to preschoolers are a base of their daily dining, therefore it is extremely important for children to be given meals which are wholesome, well balanced, providing energy and nutrients in appropriate proportions (Leszczyńska et al., 2007, Koziol-Kozakowska, Schlegel-Zawadzka, 2007). The aim of this work was to assess the energy value and nutritional quality of food received by children, based on the method of calculation, and determination of the reasonableness tested meals given in kindergarten based on the point of qualitative analysis methods.

#### MATERIAL AND METHODS

Material for the work was food rations for consumption by preschool children (4-6 years) who attend to the kindergarten in Koszalin. Rations analyzed included four meals: I breakfast, II, breakfast, lunch and afternoon tea, meals consumed at home were not being evaluated. The ration were collected in a decade system in spring (March, April and May 2009). In total, 30 reasons were analyzed. The energy value, protein content, fat and carbohydrates were calculated on data collected using the "Dietetyk" and "Jadłospis w przedszkolu" (Polish software for dieteticians). The results of calculations of the nutritional value of food, as recommended by the National Institute of

Food & Nutrition, were reduced: 10% of the energy value and contents of fat, carbohydrate and protein were reduced. In addition, food rations have been studied in qualitative terms, using the method of Starzynska [Gawęcki, Hryniewiecki 1998]. The collected data were compared with the nutrition standards for children aged 4-6 years.

#### RESULTS AND DISCUSSION

The results of the energy value and nutrient content and the percentage of protein, fat and carbohydrates in the total amount of energy meals are presented in Table 1, and the average percentage coverage of pre-board standards for energy and nutrients in Table 2.

It is considered that pre-school food should cover 70% of the daily amount of energy and nutrients recommended for children ages 4-6 years. Energy value and content of nutrients in the tested rations was in a wide range, as shown in Table 1. The recommended energy needs of the tested population in Poland is 1500-1900 kcal, average of which is 1700 kcal and the meals served in the kindergarten should provide 1190 kcal (70%). The energy value of the surveyed meals was 1358.65 (Table 1) which represents 114.17% of the recommended standards (Table 2), so the average dietary ration supplied 14% energy more than the recommended norm.

Similar observations have been made by other authors. Kłos and Bertrand [1999] studied the nutritional value of food and energy spent in military pre-schools in Warsaw. The meals contained an average of 1541 kcal, which represents 129% of the recommended standards. Grajeta et al. [2003] examined the energy value of kindergarten meals in Wrocław, they showed that the figure was an average of 1367 kcal and covered in 115% of the recommended standard. Czech and Kęska [2007] examined the content of nutrients in the kindergarten rations in Lublin and have shown that meals contained average 1346 calories which is 113% of the recommended standards.

**Table 1:** The summary of energy value and energy contribution of the main nutrients in tested food rations

menu	energy [kcal]	energy from protein %	energy from fat %	energy from carbohydrate %	protein [g]	fat [g]	carbohydrate [g]
mean	1358,65	12,46	26,53	61	42,17	39,69	202,48
SD	214,22	1,30	3,51	3,90	6,49	5,59	49,20
V%	15,77	10,46	13,22	6,39	15,39	14,10	24,30
Min.	1101,40	10,69	22,16	55,86	31,88	30,50	157,07
Max.	1798,08	14,70	31,16	65,77	50,65	47,16	304,17
Mediana	1281,78	12,06	25,90	60,77	44,35	40,39	184,20

Daily amount of carbohydrates recommended for the researched population is 234 g, and kindergarten meals should provide it in an amount of 164 g. Total carbohydrate content in the tested meals was 202.48 g (table 1) which represents 123.44% of the recommended standards (Table 2) what was an evidence of too high carbohydrate intake.

Also **Gronowska-Seneger et al. (1998)** found similar phenomenon. Analysis of the diets of children in pre-school and school age, based on literature from the years 1980-1995 in Poland, showed that the average dose of nutrition contained excessive amount of carbohydrate in the form of sweets and sugar. **Klos and Bertrand (1999)**

calculated the average content of carbohydrates in food rations as 230.9 g which represented 124% of standard for children aged 4-6 years. **Grajeta et al (2003)** noted similar results: the average amount of carbohydrate was 199.6 g which represented 122% of the recommended standards. Also, the results of **Czech and Kęski (2007)** showed an excessive amount of carbohydrates in the tested food rations. Moreover, **Baginski and Stokowska (2006)** showed that an oversupply of sugar in the examined population may be the cause of dental caries in this age, and thereafter contributes to obesity (**Mc Conahy et al., 2004; Young, Nestle, 2002**).

**Table 2:** The comparison of the obtained results to the standards recommended for children aged 4 -6 years

Energy and nutrient	70% daily norms	Food rations	% of RDI realization
energy [kcal]	1190	1358,65	114,17
protein [g]	38,50	42,17	109,50
fat [g]	60,00	39,69	66,15
carbohydrates [g]	164,00	202,48	123,44

Children aged 4-6 years are recommended to consume proteins in the amount of 55 g of which meals in the kindergarten should provide 38.5 g of this nutrient, therefore, the amount of protein in the tested rations was too high. The average content of total protein in the tested food rations was 42.17 g (Table 1) which covered the recommended amount of this component of 109.53% of the recommended dose.

**Klos and Bertrand (1999)** found that the supply of protein in the meals in nurseries was 51.5 g, i.e. 137% of the recommended standards. Protein content in the study conducted by **Grajeta et al (1998)** was 46.2 g which represented 120% of the recommended standards (Table 2). **Czech and Kęska (2007)** noted an average protein content which was 112% of the recommended standards. Similar results were obtained by **Szponar et al (1996)**, who found an excessive intake of protein by making 24-hour dietary interviews conducted with more than 150

children aged 1-6 years. **Stochacka-Tartar et al (2008)** studied nutrition of preschool children, noted a similar dependence and concluded that even in the long period of intensive growth, an oversupply of protein may contribute to metabolic disorders.

The average content of fat in meals was 39.69 g (Table 1) and covered the standard in average of 66 % (Table 2). Children aged 4-6 years are recommended to consume fat in the amount of 53-68 g a day, to facilitate interpretation of the results the average value was 60 g, while the kindergarten meals should provide an average of 42 g of this component. The analyzed food was consistent with the recommended standards for fat.

Similar results were obtained by **Szponar and Kierzkowska (1985)**, and **Klos and Bertrand and Czech and Kęska (2007)** in their studies showed minor deviations from the total fat content of recommended standards. Different results were obtained by **Gronowska-**

**Seneger et al (1998)** whose research showed the excessive intake of fat in the food rations given to pre-school children. Also **Grajeta et al (2003)** note the excessive supply of fat in food rations amounting 117% of the recommended standards.

The assessment of decade menus was made by using the point method by **Starzynska (Gawęcki, Hryniewiecki, 1998)** based on a specially prepared table distinguishing ie: the number of meals during the day, the amount of animal

protein supply, the incident of milk, cheese, vegetables and fruits in raw form, the incidence of wholemeal bread, meal and legume seeds (Table 3). This method enables to check whether the menu has been correctly composed. Evaluation is based on the scoring of individual menu items using a scale of 5 to 0. Total number of points obtained after the test is compared with a standard grading scale.

**Table 3:** The assessment of the menu according to Starzyńska (Gawęcki, Hryniewiecki, 1998)

Examined category	Points
Amount meals in everyday menu) 4-5 3 less	5 2 0
Amount of meals containing animal proteins): • in every meals • in 75% meals • in smaller number of meals	5 2 0
Frequency of milk and cheese consumption: • every day in 2 meals • every day in at least one meal and in 50% of days in two meals • rarely	5 2 0
Frequency of cooked fruit and vegetables consumption: • every day in at least 3 meals • every day in at least 2 meals • rarely.	5 2 0
Frequency of fresh fruit and vegetables consumption: • every day • in 75% of days • rarely.	5 2 0
Frequency of wholemeal bread, crops and cereals consumption: • every day at least one of mentioned products • in 75% of days one of mentioned products • rarely.	5 2 0
Razem	24

The lowest score was obtained in terms of frequency of consumption of milk and cheese (2 of 5 points), as well as providing animal protein products (2 of 5 points). For the other elements, the menus have been rated with the highest scores (5 of 5 points).The result indicates that dietary mistakes can easily be eliminated. Due to the amount of dietary mistakes, test menus have been evaluated to satisfactory (3).

**Kozioł-Kozakowska and Schlegel-Zawadzka (2007)** have made a qualitative assessment of menus in 7 kindergartens of the Cracow, region Poland. The authors found serious nutrition mistakes, and the average results of the assessment tested by **Starzyńska** was only 14.53 points. Analyzed menus showed a small proportion of dark bread, grits, and legume seeds and a very small share of fruits and vegetables. In the years 1987-1989 **Nowacka et al (1991)** was investigating the nutrition of children from rural areas of the Lodz region, Poland and also concluded that the food rations were created incorrectly. Studies have

shown too little amount of milk and its products, and fruits and vegetables. Too high amount of meat, sugar and sweets was also detected.

### CONCLUSION

selection of products and the total value of daily food ration in the Koszalin, Poland kindergarten aroused objects.

abnormalities of the too high consumption of the energy, proteins and carbohydrates were found; it can lead to irregular eating habits and obesity in adulthood.

### REFERENCE

- BAGIŃSKI , J., STOKOWSKA, W. 2006. Dietary habits and early childhood caries intensity among young children. *Wiad. Lek.*, 2006, 59 (1-2), 5-9 (in Polish with English summary).
- CZECH, A., KEŚKA, A. 2007. Nutrient content in the meals offered on pre-school canteen in spring and autumn

period. *Żyw. Człow. Metab.*, 2007, 34, 1/2, 561-571 (in Polish with English summary).

GAWEŃCKI, J., HRYNIEWIECKI, L. 1998. *Żywność Człowieka. Podstawy nauki o żywieniu*, 1998, PWN, Warszawa (in Polish).

GRAJETA, H., ILOW, R., PRESCHA, A., REGULSKA-ILOW, B., BIERNAT, J. 2003. Evaluation of energy and nutritive value of nursery school meals. *Roczn. PZH*, 2003, 54, 4, 417-425 (in Polish with English summary).

GRONOWSKA-SENEGER A., DRYWIEN, M., HAMUŁKA, J. 1998. Analysis of nutrition of children at preschool age based on reports in literature in 1980-1995. *Roczn. PZH.*, 1998, 49; 377-383 (in Polish with English summary).

ILOW, R., SZYMCZAK, J., 1988, Ocena żywienia dzieci w wybranych przedszkolach i sanatoriach regionu wrocławskiego. *Symposium nt. Wartość odżywcza i zdrowotna żywności oraz żywienia*, Poznań (in Polish).

KŁOS, A., BERTRAND, J. 1999. nutrition of children in the selected military nursery schools in Warsaw. *Lek. Woj.* 1999, 5-6, 275-279 (in Polish with English summary).

KOZIOŁ-KOZAKOWSKA A., SCHLEGEL-ZAWADZKA M. Qualitative estimation of the preschool menus in the Krakow region. *Żyw. Człow. Metab.* 2007, 34, 1/2, 133- 137 (in Polish with English summary).

LESZCZYŃSKA, T., SIKORA, E., KRĘCINA, K., PYSZ K. 2007. meals served in nursery schools and their share in meeting the recommended daily demand for energy and nutrients exemplified by one selected canteen. *Żywność* 2007, 6 (55), 327-334 (in Polish with English summary).

MCCONAHY, K. L., SMICKLAS-WRIGHT, H., MITCHELL, D. C., PICCIANO, M. F. 2004. Portion size of common foods predicts energy intake among preschool-aged children. *J Am Diet Assoc.* 2004, 104, 975-979.

NICLAS, T. A., BARANOWSKI, T., BARANOWSKI, J. C., CULLEN, K., RITTENBERRY, L., OLVERA, N. 2001.

Family and child-care provider influences on preschool children's fruit, juice and vegetable consumption. *Nut. Rev.* 2001, 59, 224-235.

NOWACKA E., ZIMNA-WALENDZIK E., TOPOLA J. 1991. Assessment of nutrition of village children in the province of Łódź. *Med. Wiejska* 1991, 26, 4, 268- 276 (in Polish with English summary).

STOCHACKA-TATAR, E., JACEK, R., SOWA, A., MUSIAŁ, A. 2008. Assessment of preschool children's diet. *Probl. Hig. Epidemiol.* 2008, 89, 3, 398- 394 (in Polish with English summary).

SZPONAR, L., KIERZKOWSKA, E. 1985. Nutrition of children in day care centers. *Pediatr Pol.* 1985 Jul; 60, 7, 519-26 (in Polish with English summary).

SZPONAR, L., TURLEJSKA, H. 1996. Aktualne zagadnienia żywienia zbiorowego dzieci i młodzieży w placówkach oświatowo-wychowawczych. *Żyw. Zdrow.* 1996, 1, 21-26 (in Polish with English summary).

VEREECKEN, C. A., KEUKELIER, E., MAES, L. 2004. Influence of mother's educational level on food parenting practices and food habits of young children. *Appetite* 2004, 43, 93-103.

YOUNG, L. R., NESTLE, M. 2002. The contribution of expanding portion sizes to the US obesity epidemic. *Am J Public Health* 2002, 2, 246-249.

**Contact address:**

Maria Dymkowska-Malesa, Weronika Woźniak, Janusz Zakrzewski, Krystyna A. Skibniewska: Koszalin University of Technology, Mechanical Faculty, Department of Food Technology and Nutrition, Koszalin, Poland

Krystyna A. Skibniewska: University of Warmia & Mazury in Olsztyn, Chair of Commodity Science & Food Analysis, Olsztyn, Poland.

**STABILITA FARBY EXTRAKTOV MIKROBIÁLNEHO FARBIVA ČERVENÁ FERMENTOVANÁ RYŽA**

**COLOR STABILITY OF EXTRACTS FROM MICROBIAL COLORANT RED FERMENTED RICE**

*Dana Marcinčáková, Pavel Mařa, Mária Baranová, Slavomír Marcinčák*

**ABSTRACT**

The aim of this study was to evaluate the colour stability of extracts from Red fermented rice in different pH values (2.5, 7.2, and 11.0) within storage on the light and dark places at 22 °C and under chilling conditions (4 °C). Influence of pH values in relation to thermal treatment (90 °C, 70 °C, 40 °C) on colour stability of extracts from fermented rice was also observed. Extracts of Red fermented rice and carmine stored in the fridge, on the dark place at 4 °C showed the highest stability of colour. Extracts stored under abovementioned conditions in neutral and alkaline environment (pH 7.2 and 11.0) was 100 % within whole period of storage. The most stable were extracts of fermented rice in neutral environment (pH 7.2), less stable were extracts in alkaline environment (pH 11.0) at all temperatures used for thermal treatment. Expressive loss of colour stability at all groups of samples was recorded in case of processing at 90 °C within 30 minutes of treatment. Marked loss of colour stability was also recorded when extracts of Red yeast rice in acidic and alkaline environment was processed at 70 °C during 30 minutes and within 60 minutes thermal treatment of extracts in neutral environment.

**Keywords:** red fermented rice, colour stability, food

## ÚVOD

Farbivá sú dôležitou súčasťou výrobného procesu v potravinárskom priemysle. Farbenie potravín zlepšuje ich prezentáciu a atraktivnosť. Potravinárske farbivá môžu byť prírodné alebo syntetické, často bez nutričnej hodnoty. Väčšinu prírodných farbív tvoria produkty rastlín, ich extrakty, alebo sú produkované mikroorganizmami. Zatiaľ čo počet povolených syntetických farbív sa znižuje kvôli ich nežiaducej toxickému účinku, ktorý zahŕňa mutagenitu a potenciálnu karcinogenitu, zvyšuje sa záujem o potravinárske pigmenty z prírodných zdrojov (**Sabater-Vilar et al., 1999**).

V súčasnosti sú vyhľadávané prírodné potravinárske farbivá, bez škodlivých účinkov na zdravie človeka, schopné udržať svoju farbu pri rôznych podmienkach a ktoré nemajú nepriaznivý vplyv na chuť potraviny. Červená fermentovaná ryža, produkt huby rodu *Monascus purpureus* fermentovanej na ryžovom substráte, je známa ako prídavná látka do potravín a ako produkt používaná v ľudovej medicíne v Číne a Japonsku už po stáročia (**Marcinčáková et al., 2004**). S využívaním červenej fermentovanej ryže súvisí nielen zvýšenie farebnej atraktívnosti potravín a ich organoleptických vlastností, ale nepriamo svojimi hypocholesterolemickými účinkami prispieva aj k ochrane zdravia konzumentov (**Baranová et al., 2008; Cicero et al., 2005**). Používa sa nielen ako potravinárske farbivo pri výrobe mäsových, rybacích, sójových výrobkov, ale rozsiahle využitie má aj pri výrobe nápojov a v kozmetickom priemysle. Výrobky majú stabilnú červenú farbu porovnateľnú s bežnými výrobkami, pri výrobe ktorých boli použité iné prírodné, či syntetické farbivá (**Chairote et al., 2007; Baranová et al., 2001; Fink – Gremmels et al., 1991**).

Cieľom našej práce bolo sledovať stabilitu farby extraktov z červenej fermentovanej ryže v závislosti od pH a rozličných podmienok skladovania.

## MATERIÁL A METODIKA

Na sledovanie stability extraktov fermentovanej ryže sme použili komerčné prípravok: Fermenta (Pěkný Unimex, Česká republika). Ako kontrola boli použité extrakt prírodného farbiva košenila (E 120, **Potravinový kódex SR, 2008**). Prípravu extraktov sme vykonali podľa **Kima et al. (2008)** s určitými úpravami. Do banky sme navážili 10 g farbiva, pridali sme 100 ml metanolu a za stáleho miešania nechali extrahovať 24 hod. Následne sme extrakt prefiltrovali (filtračný papier Whatman 4) a doplnili do 100 ml odmernej banky metanolom. Pripravený zásobný roztok sme riedili vodou (1:25) a zmerali jeho absorbanciu. Pre stanovenie stability farbív, získaných z fermentovanej ryže, v závislosti od pH prostredia sme pripravili extrakty farbív v kyslom prostredí (pH 2,5; 2 % TCA), v zásaditom prostredí (pH 11; 0,1 mol.l<sup>-1</sup> KOH) a extrakty farbiva v neutrálnom prostredí (pH 7,2). Vzorky boli napipetované do skúmaviek s rovnakým priemerom a hrúbkou skla. Množstvo napipetovaného extraktu na jednu vzorku bolo 15 ml. Na sledovanie stability farby v závislosti od podmienok skladovania boli vzorky rozdelené do troch skupín a skladované:

prvá časť vzoriek z každej skupiny (pH 2,5; 11 a 7,2) skladovaná pri intenzívnom svetle a izbovej teplote 22 °C

druhá časť vzoriek z každej skupiny (pH 2,5; 11 a 7,2) skladovaná v tme a pri izbovej teplote 22 °C

tretia časť vzoriek z každej skupiny (pH 2,5; 11 a 7,2) skladovaná v tme pri 4 °C (chladnička)

Vzorky boli skladované 6 dní a stabilita farby bola meraná po 24, 48, 72 a 144 hodinách skladovania.

Na sledovanie stability farbív získaných z fermentovanej ryže v závislosti od intenzity tepelného opracovania bola časť vzoriek z každej skupiny (pH 2,5; 11 a 7,2) vystavená pôsobeniu teploty 40, 70 a 90 °C po dobu 3 hodín vo vodnom kúpeli.

### Meranie stability farby

Pre presné určenie vlnovej dĺžky, pri ktorej vykazujú jednotlivé extrakty (fermentovaná ryža a košenila) maximálnu absorbanciu sme extrakty skenovali vlnovými dĺžkami v rozpätí od 450 – 550 nm. Po zistení vlnovej dĺžky boli jednotlivé extrakty merané na UV spektrofotometri (Helios  $\gamma$  v 4.6, Thermospectronic, Veľká Británia). Stabilita farby, resp. pokles farby, bola vypočítaná podľa rovnice:

$$\text{Stabilita farby (\%)} = (A_1 / A_0) \times 100$$

kde:  $A_0$  – absorbancia farby pred skladovaním /opracovaním,

$A_1$  – absorbancia farby po skladovaní/opracovaní.

Štatistické spracovanie výsledkov bolo vykonané štatistickým programom Graph Pad Prism 3.0 (1999). Výsledky sú vyjadrené ako aritmetický priemer ( $\bar{x}$ ) a štandardná odchýlka (sd). Stabilita farby počas skladovania v jednotlivých skupinách a medzi skupinami bola porovnávaná jednocestným ANOVA testom. Pre porovnanie štatistických rozdielov medzi hodnotami bol použitý Tukeyov porovnávací test a  $P < 0,05$  bolo považované za štatisticky významný rozdiel.

## VÝSLEDKY

Nariedením zásobných roztokov 1:25 destilovanou vodou sme získali pracovné roztoky, u ktorých sme skenovaním zisťovali vlnovú dĺžku, pri ktorej extrakty fermentovanej ryže a košenily dosahujú maximálnu absorbanciu. Meraním sme zistili, že extrakty fermentovanej ryže dosahovali maximálnu absorbanciu pri vlnovej dĺžke 506 nm a košenily pri vlnovej dĺžke 517 nm. Všetky ďalšie merania vykonané na extraktoch boli merané pri týchto vlnových dĺžkach.

Pri sledovaní vplyvu pH a podmienok skladovania sme zistili, že najvyššiu stabilitu farby vykazovali extrakty fermentovanej ryže ako aj košenily skladované v chladničke (v tme a pri 4 °C). Pri týchto podmienkach skladovania bola 100 % stabilita farby extraktov fermentovanej ryže ako aj košenily v neutrálnom a zásaditom prostredí (pH 7,2 a 11,0) počas celej doby skladovania. U vzoriek extraktov fermentovanej ryže s pH 2,5 sme na 6. deň skladovania zaznamenali určitý mierny pokles stability farby (97,5; 97,3 %). Extrakty košenily v kyslom prostredí boli po celý čas skladovania vyvrážené a nemerateľné.

Veľmi dobrá stabilita extraktov fermentovanej ryže bola zaznamenaná aj počas skladovania vzoriek na svetle a v tme pri 22 °C (Tab. 1 a 2). U vzoriek skladovaných pri 22 °C a v tme bola stabilita farby vyššia ako u vzoriek skladovaných na svetle ( $P > 0,05$ ). Vplyv rozdielneho

pH vzoriek bol tiež zaznamenaný. Najvyššia stabilita bola u vzoriek s pH 7,2. Pri vzorkách skladovaných v kyslom prostredí (pH 2,5) bola stabilita najnižšia ( $P < 0,05$ ).

Sledovanie vplyvu teploty opracovania a pH prostredia na stabilitu farby sme sledovali skladovaním vzoriek extraktov Červenej fermentovanej ryže a košenily vo vodných kúpeľoch (40, 70 a 90 °C) po dobu troch hodín. Výsledky stability farby v závislosti od pH prostredia (2,5; 7,2 a 11,0) a teploty opracovania sú uvedené v tabuľkách 3, 4 a 5. Z výsledkov vyplýva, že teplota opracovania má výrazný vplyv na stabilitu farby extraktov červenej fermentovanej ryže počas tepelného opracovania. Na stabilitu farby malo vplyv aj pH extraktov. Najstabilnejšie boli extrakty fermentovanej ryže v neutrálnom prostredí (pH 7,2), najmenej stabilné boli extrakty v zásaditom prostredí (pH 11,0) pri všetkých troch teplotách opracovania.

S výškou teploty klesala aj stabilita farby extraktov fermentovanej ryže po troch hodinách tepelného

opracovania (Fermenta N: 40 °C – 99,1 %; 70 °C – 86,0 %; 90 °C – 76,0 %). S výškou teploty sa zvyšoval aj vplyv dĺžky tepelného opracovania na stabilitu farby extraktov. Pri 90 °C bol už po 30 minútach tepelného opracovania zaznamenaný výrazný pokles stability farby u všetkých troch skupín vzoriek ( $P < 0,05$ ). Pri 70 °C bol výraznejší pokles stability farby zaznamenaný po 30 minútach pre extrakty fermentovanej ryže v kyslom a zásaditom prostredí a po 60 minútach tepelného opracovania pre extrakty v neutrálnom prostredí. Pri 40 °C to bolo až po 3 hodinách tepelného opracovania u vzoriek v kyslom a zásaditom prostredí.

Stabilita farby extraktov košenily bola teplotou opracovania ovplyvnená výrazne menej ako extrakty fermentovanej ryže. Avšak extrakty košenily s pH 2,5 boli hneď vyzrážané a nemerateľné pri 90 a 70 °C. Najstabilnejšie boli pri všetkých teplotách extrakty s pH 7,2. K určitému miernemu poklesu stability farby došlo len pri tepelnom opracovaní vzoriek pri teplote 90 °C.

**Tab. 1:** Stabilita farby extraktov (%) skladovaných na svetle pri 22 °C, čas a pH prostredia<sup>d</sup>

Vzorka	1. deň	2. deň	3. deň	6. deň
Fermenta N*	99,2 ± 0,1 <sup>a1</sup>	98,2 ± 0,2 <sup>a1</sup>	92,6 ± 0,8 <sup>b2</sup>	93,1 ± 0,4 <sup>b1</sup>
Fermenta Z*	99,3 ± 0,1 <sup>a1</sup>	96,5 ± 0,2 <sup>b1</sup>	95,2 ± 0,2 <sup>b1</sup>	91,4 ± 0,4 <sup>c1</sup>
Fermenta K*	100,0 <sup>a1</sup>	96,6 ± 0,4 <sup>b1</sup>	93,6 ± 0,6 <sup>b1</sup>	87,6 ± 0,5 <sup>c2</sup>
Košenila N	97,1 ± 0,2 <sup>a2</sup>	95,1 ± 0,3 <sup>a2</sup>	91,8 ± 0,4 <sup>b2</sup>	91,5 ± 0,1 <sup>b1</sup>
Košenila Z	97,5 ± 0,3 <sup>a2</sup>	96,5 ± 0,5 <sup>a2</sup>	89,9 ± 0,4 <sup>b2</sup>	88,8 ± 0,6 <sup>b2</sup>
Košenila K	- <sup>□</sup>	-	-	-

\*N – pH 7,2; Z – pH 11,0; K – pH 2,5; <sup>□</sup> - výsledky neboli merané pre vyzrážanie extraktov košenily v kyslom prostredí

<sup>a,b,c</sup> – výsledky s rozdielnym označením v riadku sú štatisticky rozdielne ( $P < 0,05$ )

<sup>1,2,3,4</sup> – výsledky s rozdielnym označením v stĺpci sú štatisticky rozdielne ( $P < 0,05$ )

<sup>d</sup> – absorbancia farby meraná pred skladovaním bola pri všetkých pH považovaná za 100%

**Tab. 2:** Stabilita farby extraktov (%) skladovaných v tme pri 22 °C, čas a pH prostredia<sup>d</sup>

Vzorka	1. deň	2. deň	3. deň	6. deň
Fermenta N*	100,0 <sup>a1</sup>	99,0 ± 0,8 <sup>a1</sup>	97,8 ± 0,3 <sup>a1</sup>	94,2 ± 0,2 <sup>b1</sup>
Fermenta Z*	99,7 ± 0,3 <sup>a1</sup>	97,9 ± 0,2 <sup>a2</sup>	96,0 ± 0,3 <sup>b2</sup>	93,2 ± 0,3 <sup>c1</sup>
Fermenta K*	97,7 ± 0,2 <sup>a2</sup>	97,6 ± 0,3 <sup>a2</sup>	95,1 ± 0,2 <sup>a2</sup>	89,7 ± 0,6 <sup>b2</sup>
Košenila N	98,0 ± 0,2 <sup>a2</sup>	97,2 ± 0,3 <sup>a2</sup>	95,4 ± 0,4 <sup>a2</sup>	93,0 ± 0,3 <sup>b1</sup>
Košenila Z	97,5 ± 0,2 <sup>a2</sup>	95,5 ± 0,3 <sup>a3</sup>	89,0 ± 0,8 <sup>b3</sup>	85,0 ± 0,8 <sup>b4</sup>
Košenila K	- <sup>□</sup>	-	-	-

- poznámky - vid' tabuľka 1

**Tab. 3:** Stabilita farby (%) extraktov tepelne opracovaných pri 90 °C, čas a pH prostredia<sup>d</sup>

Vzorka	30 min.	60 min.	120 min.	180 min.
Fermenta N*	92,0 ± 0,4 <sup>a2</sup>	89,3 ± 0,3 <sup>a2</sup>	79,0 ± 0,8 <sup>b2</sup>	76,0 ± 1,0 <sup>b2</sup>
Fermenta Z*	79,6 ± 0,8 <sup>a3</sup>	73,7 ± 0,9 <sup>b4</sup>	63,7 ± 0,7 <sup>c3</sup>	61,0 ± 0,9 <sup>c3</sup>
Fermenta K*	83,6 ± 0,5 <sup>a3</sup>	76,4 ± 1,4 <sup>b3</sup>	59,0 ± 1,4 <sup>c3</sup>	57,5 ± 1,4 <sup>c3</sup>
Košenila N	98,0 ± 0,6 <sup>a1</sup>	97,3 ± 1,0 <sup>a1</sup>	97,0 ± 0,8 <sup>a1</sup>	96,0 ± 1,2 <sup>a1</sup>
Košenila Z	94,0 ± 0,3 <sup>a2</sup>	95,3 ± 0,9 <sup>a1</sup>	94,0 ± 0,7 <sup>a1</sup>	94,0 ± 1,6 <sup>a1</sup>
Košenila K	- <sup>□</sup>	-	-	-

\*N – pH 7,2; Z – pH 11,0; K – pH 2,5; <sup>□</sup> - výsledky neboli merané pre vyzrážanie extraktov košenily v kyslom prostredí

<sup>a,b,c</sup> – výsledky s rozdielnym označením v riadku sú štatisticky rozdielne (P < 0,05)

<sup>1,2,3,4</sup> – výsledky s rozdielnym označením v stĺpci sú štatisticky rozdielne (P < 0,05)

<sup>d</sup> – absorbanca farby meraná pred skladovaním bola pri všetkých pH považovaná za 100%

**Tab. 4:** Stabilita farby (%) extraktov tepelne opracovaných pri 70 °C, čas a pH prostredia<sup>d</sup>

Vzorka	30 min.	60 min.	120 min.	180 min.
Fermenta N*	97,5 ± 0,4 <sup>a1</sup>	94,2 ± 1,6 <sup>b2</sup>	90,1 ± 0,8 <sup>c2</sup>	86,0 ± 1,7 <sup>c3</sup>
Fermenta Z*	87,2 ± 0,6 <sup>a3</sup>	79,0 ± 1,2 <sup>b4</sup>	73,3 ± 1,4 <sup>c4</sup>	67,0 ± 0,8 <sup>c4</sup>
Fermenta K*	93,5 ± 0,8 <sup>a2</sup>	88,0 ± 1,6 <sup>b3</sup>	79,9 ± 0,9 <sup>c3</sup>	72,2 ± 0,8 <sup>c4</sup>
Košenila N	99,0 ± 0,3 <sup>a1</sup>	98,6 ± 0,3 <sup>a1</sup>	97,6 ± 0,4 <sup>a1</sup>	98,0 ± 0,2 <sup>a1</sup>
Košenila Z	94,4 ± 0,5 <sup>a2</sup>	94,0 ± 0,4 <sup>a2</sup>	91,2 ± 0,3 <sup>b2</sup>	92,0 ± 0,8 <sup>b2</sup>
Košenila K	- <sup>□</sup>	-	-	-

\* poznámky - vid' tabuľka 3

**Tab. 5:** Stabilita farby (%) extraktov tepelne opracovaných pri 40 °C, čas a pH prostredia<sup>d</sup>

Vzorka	30 min.	60 min.	120 min.	180 min.
Fermenta N*	99,5 ± 0,4 <sup>a1</sup>	99,5 ± 0,2 <sup>a1</sup>	99,4 ± 0,2 <sup>a1</sup>	99,1 ± 0,2 <sup>a1</sup>
Fermenta Z*	97,6 ± 0,4 <sup>a2</sup>	96,0 ± 0,5 <sup>a2</sup>	94,2 ± 0,5 <sup>a2</sup>	91,6 ± 0,6 <sup>b3</sup>
Fermenta K*	98,3 ± 0,5 <sup>a1</sup>	97,7 ± 0,3 <sup>a2</sup>	97,1 ± 0,5 <sup>a2</sup>	96,5 ± 0,5 <sup>b2</sup>
Košenila N	99,5 ± 0,2 <sup>a1</sup>	98,8 ± 0,1 <sup>a2</sup>	99,2 ± 0,3 <sup>a1</sup>	98,8 ± 0,3 <sup>a1</sup>
Košenila Z	99,5 ± 0,2 <sup>a1</sup>	99,2 ± 0,3 <sup>a1</sup>	98,0 ± 0,2 <sup>a1</sup>	98,0 ± 0,3 <sup>a2</sup>
Košenila K	92,8 ± 0,3 <sup>a3</sup>	90,6 ± 0,5 <sup>b3</sup>	87,8 ± 0,8 <sup>b3</sup>	- <sup>□</sup>

\*N – pH 7,2; Z – pH 11,0; K – pH 2,5; <sup>□</sup> - výsledky neboli merané pre vyzrážanie extraktov košenily v kyslom prostredí

<sup>a,b,c</sup> – výsledky s rozdielnym označením v riadku sú štatisticky rozdielne (P < 0,05)

<sup>1,2,3,4</sup> – výsledky s rozdielnym označením v stĺpci sú štatisticky rozdielne (P < 0,05)

<sup>d</sup> – absorbanca farby meraná pred skladovaním bola pri všetkých pH považovaná za 100%



## DISKUSIA

Testovanie vplyvu tepla a pH ukázali, že pigmenty fermentovanej ryže sú nestabilné pri nízkom pH a vysokej teplote, ale môžu byť úspešne používané v prostredí okolo neutrálneho pH a vo výrobkoch, ktoré nie sú tepelne opracované (Carvalho et al., 2003, Bakošová et al., 2001).

Carvalho et al. (2005) testovali stabilitu farby červenej fermentovanej ryže podobným spôsobom. Vodné a alkoholové extrakty boli uzavreté v sklenených skúmavkách s rovnakým objemom a absorbancia extraktov bola stanovená meraním na spektrofotometri. Extrakty boli vystavené pôsobeniu rôznych teplôt niekoľko hodín. Intenzita farby bola meraná pri absorbancii 500 nm priamo v každej skúmavke. Všetky vodné extrakty pigmentov z fermentovanej ryže vykazovali s postupom času nižšiu absorbanciu pri všetkých sledovaných podmienkach. Autori tiež konštatujú, že pri vzorkách s odlišnou hodnotou pH (od 4 do 8), inkubovaných pri rovnakej teplote bola zmena farby výraznejšia pri nižšej hodnote pH. Podľa ich záverov tento účinok môže spôsobiť problém pri aplikácii fermentovanej ryže do kyslých potravín, napr. do kyslomliečnych produktov (Carvalho et al., 2003). Naše výsledky potvrdzujú zistenia predchádzajúcich autorov. Avšak vplyv kyslého prostredia pri nižších teplotách nebol až taký výrazný. Práve naopak pri nižších teplotách opracovania (40 a 70 °C) a v zásaditom prostredí (pH 11,0) boli extrakty fermentovanej ryže menej stabilné ako v kyslom prostredí. Pri teplote opracovania 90 °C naše výsledky stability farby korešponujú s výsledkami Carvalho et al. (2005) a Lee et al. (2008). Ou et al. (2009) konštatujú, že najvýraznejšie straty monakolinu K sú pri 85 °C po dobu 30, 60 a 90 minút pri pH extraktov 9.

Pri sledovaní stability farby extraktov fermentovanej ryže pri rôznom pH a spôsoboch skladovania môžeme konštatovať, že najvýraznejší vplyv na stabilitu farby malo skladovanie vzoriek pri 22 °C a stálom svetle. Na šiesty deň skladovania v týchto podmienkach došlo u všetkých extraktov k poklesu farby (pH 7,2 – 93,1 %; pH 11,0 – 91,4%; pH 2,5 – 87,3%). K podobnému významnému poklesu farby za týchto podmienok skladovania došlo aj u vzoriek košenily (pH 7,2 – 91,5 %, pH 11,0 – 88,1 %). V kyslom prostredí boli vzorky košenily nemerateľné z dôvodu vyzrážania a sedimentácii farbiva. Podľa Fabre et al. (1993), klobásky ofarbené červenou fermentovanou ryžou vykazujú stabilnú farbu na 92 – 98 % aj po troch mesiacoch pri 4 °C, s dobrými sensorickými vlastnosťami. Avšak konštatujú, že tieto pigmenty sú nestabilné na svetle (iba 20 % zvyšnej farby po 50 dňoch skladovania) a pri pôsobení tepla (iba 45 % zvyšnej farby po 2 hodinách pôsobenia 100 °C). Tieto pigmenty sú stabilnejšie pri neutrálnom pH (Fabre et al., 1993, Kim et al. 2008).

## ZÁVER

Z výsledkov vyplýva, že červená fermentovaná ryža je stabilné farbivo vhodné na používanie v potravinárstve. Vzhľadom na dobrú stabilitu farby pri teplote opracovania 70 °C po dobu 30 minút je možné ho využiť aj pri výrobe tepelne opracovaných výrobkov, kde teplota opracovania

70 °C neprekročí čas 30 minút a výrobky by tak mali byť stabilné.

**Kontaktná adresa:** MVDr. Dana Marcincáková, Katedra farmácie, farmakológie a toxikológie, Univerzita veterinárskeho lekárstva, Komenského 73, 041 81 Košice, email: marcincakova@uvm.sk

## LITERATÚRA

- BAKOŠOVÁ, A., MÁTÉ, D., LACIAKOVÁ, A., PÍPOVÁ, M. 2001. Utilization of *Monascus purpureus* in the production of foods of animal origin. In *Bull. Vet. Inst. Pulawy*, roč. 45, 2001, s. 111-116.
- BARANOVÁ, M., MAĽA, P., DITTRICHOVA, H., BURDOVÁ, O. 2001. Možnosti využitia prírodného farbiva *Monascus purpureus* pri výrobe výrobkov zo sóje. In *Výživa a potraviny pre tretie tisícročie*, Nitra, 2001, s. 107-109.
- BARANOVÁ, M., MAĽA, P., MARCINČÁKOVÁ, D., BURDOVÁ, O., KREMEŇ, J. 2008. Effect of wheat protein – seitan, colored by microbial natural pigment of *Monascus purpureus* on the organoleptic characters of poultry meat products. In *Folia Veterinaria*, roč. 52, č. 2, 2008, s. 109-112.
- CARVALHO, J. C., PANDEY, A., BABITHA, S., SOCCOL, C. R. 2003. Production of *Monascus biopigments*: An overview. In *AgroFood Ind. Hi-tech*, 2003, s. 37-42.
- CARVALHO, J. C., OISHI, B. O., PANDEY, A., SOCCOL, C. R. 2005. Biopigments from *Monascus*: strains selection, citrinin production and color stability. In *Braz. arch. Biol. technol.*, 2005, roč. 48, č. 6, s. 885-894.
- CICERO, A. F., BRANCALEONI, M., LAGHI, L., DONATI, F., MINO, M. 2005. Antihyperlipidemic effect of a *Monascus purpureus* brand dietary supplement on a large sample of subjects at low risk for cardiovascular disease. A pilot study. In *Complement. Ther. Med.*, roč. 13, č. 4, 2005, s. 273-278.
- FABRE, C. E., SANTERRE, A. L., LORET, M. O., BABERIAN, R., PARAILLEUX, A., GOMA, G., BLANC, P. J. 1993. Production and food application of the red pigments of *Monascus ruber*. In *J. Food Sci.*, roč. 58, 1993, s. 1099-1103.
- FINK - GREMMELS, J., DRESEL, J., LEISTNER, L. 1991. Use of *Monascus* extracts as an alternative to nitrite in meat products. In *Fleischwirtschaft*, roč. 71, 1991, s. 1184-1186.
- CHAIROTE, E., CHAIROTE, G., WONGPORNCHAI, S., LUMYONG, S. 2007. Preparation of red yeast rice using various thai glutinous rice and *Monascus purpureus* CMU001 isolated from commercial chinese red yeast rice sample. In *KMITL Sci. Tech. J.*, roč. 7, 2007, s. 28-37.
- KIM, S. Y., KIM, Y. S., KIM, J. M., SUH, H. J. 2008. The application of Monascal rice in beverage preparation. In *LWT*, roč. 41, 2008, s. 1204-1209.
- LEE, Y. L., YANG, J. H., MAU, J. H. 2008. Antioxidant properties of water extracts from *Monascus* fermented soybeans. In *Food Chem.*, roč. 106, 2008, s. 1128-1137.
- MARCINČÁKOVÁ, D., MAĽA, P., BARANOVÁ, M., MARCINČÁK, S. 2004. The wheat protein, Seitan, coloured by red fermented rice in the innovation of poultry meat products. In *Folia Veterinaria*, roč. 48, č. 1, 2004, s. 46-48.
- Potravinový kódex Slovenskej republiky. 2008. Výnos Ministerstva pôdohospodárstva a Ministerstva zdravotníctva Slovenskej republiky z 11. februára 2008 č. 04650/2008-OL,

ktorým sa vydáva hlava Potravinového kódexu Slovenskej republiky upravujúca prídavné látky v potravinách. In Vestník Ministerstva pôdohospodárstva SR. 25. Február 2008, roč. XXXX, č. 4, 2008, s. 1-532.

SABATER, VILAR, M., MAAS, F. M., FINK, GREMMELS, J. 1999. Mutagenicity of commercial

*Monascus* fermentation products and the role of citrinin contamination. In *Mutation Res.*, roč. 44, 1999, s. 7-16.

OU, H. P., WANG, C. R., LAI, L. S. 2009. Thermal degradation kinetics analysis of monacolin K in *Monascus* – fermented products. In *LWT – Food Sci. Technol.*, roč. 42, 2009, s. 292-296.

## VPLYV GENOTYPOV B-LAKTOGLOBULÍNU NA ZLOŽENIE BIELKOVINOVÉHO KOMPLEXU A TECHNOLOGICKÉ VLASTNOSTI MLIEKA OVIEC ZOŠLACHTENÁ VALAŠKA

### INFLUENCE OF B-LACTOGLOBULIN GENOTYPES ON THE NITROGEN DISTRIBUTION IN THE TOTAL PROTEIN AND TECHNOLOGICAL PROPERTIES OF MILK FROM THE IMPROVED VALACHIAN SHEEP

*Anna Michalcová, Zuzana Krupová*

#### ABSTRACT

The aim of the work was to search genetic polymorphism of  $\beta$ -Lg and its effect on the total milk protein, nitrogen distribution in the total protein and technological properties of milk collected from Slovak Improved Valachian breed sheep. Totally, 166 milk samples were analyzed for whole milk protein, nitrogen distribution in milk, technological properties of milk (pH, calcium content, rennetability, heat stability). The genotypic frequencies at the  $\beta$ -Lg locus, estimated by RLFP-PCR, detected for the Improved Valachian sheep were 0.29 (AA); 0.45 (AB); 0.26 (BB). No statistically significant effect of the genetic variant of  $\beta$ -Lg for the nitrogen distribution in the proteins was found. However, statistically significant differences in the average calcium content ( $P < 0.05$ ) between the genotypes AB and BB and in rennetability ( $P < 0.05$ ) between the genotypes AA and BB were found. Using a two-way ANOVA analysis, we have determined the effect of the lactation period on the crude protein nitrogen, true protein nitrogen, casein and casein number ( $P < 0.01$ ) and on the heat stability and rennetability ( $P < 0.05$ ).

**Keywords:** ovine milk,  $\beta$ -lactoglobulin, nitrogen distribution in milk, technological properties of milk

#### INTRODUCTION

According to **Bencini (2001)**, the most of the sheep milk produced all over the world is transformed into cheeses. For this reason he relates the quality of sheep milk to its capability to be transformed into high quality dairy products and to produce high yields of these products from each liter of milk. Any factor that influence milk composition at the same time affect the yield and quality of final dairy products obtained from ewe's milk, their chemical composition, texture and flavour.

The chemical composition of the milk is a quality factor of relevance for both the consumer and the dairy industry. Although the knowledge of genetic polymorphism of proteins in milk is increasing, there is insufficient knowledge about the effect of genetic variants of milk proteins on the properties of the milk and dairy products and the further research is necessary. Various genetic variants of milk proteins influence the quality of the milk when used, for instance, in cheese making (**Abrahamsen et al., 2007**).

The degree of polymorphism of milk proteins is closely conjoined with the quantitative and qualitative parameters of milk (**Czerneková et al., 2004**), it means with production yield and composition.

In the recent years there was observed a growing interest for the characterization of whey protein polymorphism, especially  $\beta$ -Lg, because of the obtained further important information about their processing properties as well as their future innovation and utilization in the food industry (**Pintado et Malcata, 1999**).

Although the  $\beta$ -lactoglobulin polymorphism and its effect on milk production and cheese characteristics have been extensively studied, the results are often contradictory indicating the predominance of the  $\beta$ -Lg genotype or the absence of any effect (**Amigo et al., 2000**).

**Dario et al. (2005)** indicates no significant differences in the composition of milk Italian Altamura sheep breed by an impact of individual genetic variants  $\beta$ -lactoglobulin.

**However**, they found, proved loci affect BB genotype for protein content. **Martinez- Hense et al. (1993)** show the differences between the values of total protein and casein content in milk with different variants of  $\beta$ -Lg. They found that the homozygous BB is associated with lower levels of protein and casein.

Some research studies reported an important effect of the several  $\beta$ -Lg genotypes on cheese production. **Garzon and Martinez (1992)** analyzed ewe milk of Italian Manchega breed and determined better technological and

cheesemaking properties of milk for A  $\beta$ -Lg. Several researchers found  $\beta$ -Lg AA genotype to be more suitable for cheese production from the point of better rennetability, clotting capability and cheese yield. Milk with  $\beta$ -Lg A allele showed a positive effect on curd formation and curd firming. Curd from milk of  $\beta$ -Lg BB genotype was evaluated as significantly softer (Rampilli et al., 1997). While  $\beta$ -Lg BB genotype is associated with higher milk yield,  $\beta$ -Lg AA and AB genotypes produce milk with higher protein and casein content as well as cheese yield (Garzon a Martinez, 1992).

On contrary, Pilla et al. (1995) indicate a positive effect on the B variant  $\beta$ -Lg of clotting time. The highest yield of curd saw Anton et al. (2005) with BB genotype in sheep breeds Awassi and Lacaune. Korman et al. (2002) argue that the productions of whey cheeses were obtained better results with the AB genotypes than in milk from sheep with homozygous genotypes.

The goal of the work was study the quality of sheep milk as raw material for the dairy industry, characterize the genetic polymorphism of milk proteins Slovak domestic Improved Valachian sheep breed and to determine an effect of  $\beta$ -lactoglobulin genetic variants on the total milk protein, nitrogen distribution in the total protein and technological properties of milk.

## MATERIAL AND METHODS

Individual milk and blood samples were collected from Improved Valachian sheep (75). The sampling was performed once a month during pasture milking season from May to September. Finally, the effects of lactation stage were evaluated.

Individual milk samples were collected at the morning milking and were divided into two parts. The first one (30ml), used for the study of milk composition performed by Milko Scan apparatus was collected into tubes containing preservative agents Acidol and the second one was only cooled and held at a maximum temperature of 10°C during the transport and was analyzed immediately after arrival to the laboratory with the aim to determine physico-chemical and technological properties of milk.

The protein content was stated by infrared technique using a Milko Scan FT 120 (FOSS Electric, Milcom servis, Czech Republic) according to the Slovak technical norm STN 57 05 36 „Determination of milk composition by infrared absorbance analyzer“.

True protein nitrogen (TPN) and whey protein nitrogen (WPN) were determined by the method of Cvak et al. (1992). For determination of TPN, 10 grams of whole milk were precipitated with 18% NaCl and 20-25% Almen's Solution (4g of tannin solubilised in 190 ml of 50% ethanol et 8 ml of 25% acetic acid) and filtered through a nitrogen free KA5 filter (Reachem, Bratislava); three times washed with distilled water and the precipitate retained on the filter was dried at room temperature. The dried precipitate retained on the filter was used for the mineralization stage of the Kjeldal method. For determination of WPN, 20 grams of whole milk were

diluted with distilled water (40 °C) in the proportion of 1:3.3 (v:v), and precipitated with 10% acetic acid and sodium acetate. A precipitant consisting of the whey proteins passed through a filtrate paper. About 50 ml of the filtrate containing whey proteins was evaporated using a mineralization digestion unit Bloc-Digest 12 (J.P. Selecta, Spain) to obtain a final volume of 15 ml used for nitrogen analyses. The nitrogen content was measured using the Kjeldal method following the EN ISO 8968-1:2001 (2002).

The casein content [g.100g<sup>-1</sup>] was calculated as follows: Casein (CN) = true proteins (TP) [g.100g<sup>-1</sup>] – whey proteins (WP) [g.100g<sup>-1</sup>]. The casein number (CNU) was stated according to the following equation: Casein number (CNU) [%] = CN [g.100g<sup>-1</sup>] / TP [g.100g<sup>-1</sup>] x 100. The non-protein nitrogen (NPN) [g.100g<sup>-1</sup>] was expressed as the difference between crude protein nitrogen (CPN) and true protein nitrogen (TPN).

Total calcium was stated by the complexometric method of Cvak et al. (1992). One ml of milk was diluted in the distilled water in the proportion of 1:70; 5 ml of 5 M KOH was added in the presence of the fluorexon indicator. The titration was made with 0.01 M Normanal Chelaton III (Reachem, Bratislava). The total calcium content was calculated by the equation present in the method.

The pH of milk samples was checked at 20 °C with the pH meter MS 22 (Laboratory equipments, Praha).

Heat stability (alcohol number) was determined by the titration with 96% ethanol according to Gajdůšek (1998). Alcohol number expresses an ethanol consumption of given concentration for fixed bulk of milk (2 cm<sup>3</sup>) till protein coagulation under the terms of the method.

Rennetability was determined by the method of Kažimír a Gemer (1993). 20 cm<sup>3</sup> of sample was equilibrated at 35 °C when 1 ml of rennet (power of 1:400) (Chr. Hansen's hannilase powder, MG 2080, Denmark) was added. The milk was stirred. The time till the creation of first curd flakes was measured in seconds.

Genotyping of  $\beta$ -lactoglobulin by Restriction Fragment Length Polymorphism- Polymerase Chain Reaction (RFLP-PCR)

Genetic polymorphism of  $\beta$ -lactoglobulin gene (alleles A and B) was analyzed by the RLFP-PCR method by Anton et al. (1999) in the laboratory of Department of Botany and Genetics, Constantine the Philosopher University in Nitra.

The following primers were used for the amplification of DNA:

LGB1 forward primer: (5'- CTTCCCACCCCCAGAG TGCAAC-3')

LGB2 reverse primer: (5'- TGGGGAGTGGGGGTTT CATGTT-3').

PCR reaction was performed in a 20- $\mu$ l reaction mixture containing 1x PCR reaction buffer, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM dNTP mix, 0.5  $\mu$ M primers, 0.5 U Taq DNA polymerase (Invitrogen) and 1  $\mu$ l of DNA sample ( $\pm$  100 ng) in thermocycler Primus. The PCR conditions were applied as follows: 94°C 4 min., 31x (94°C 30 s, 65°C 30 s, 72°C 30 s) and 72°C 10 min. The length of the PCR product was verified on the 1% agarose gel. Finally, a 217 bp DNA fragment was amplified.

The PCR products were digested with restriction endonuclease Rsa I (Segetic) in the total volume of 20 µl at 37 °C overnight according to the manufacturer's instructions. The products of restriction analysis were separated electrophoretically on 4 % agarose gel (Merck) and were documented by DigiDoc System (BioRad).

In the case of presence of allele A, we have made a detection of allele C as a subtype of allele A. There was used the method of RFLP-PCR with the same composition of reaction mixture as in the case of detection of alleles A and B, with primers exchange (figure 1). The primers used for detection of allele C were:

forward primer: (5'- TCAGGACCCCGGAGGTGGAC AAC-3')

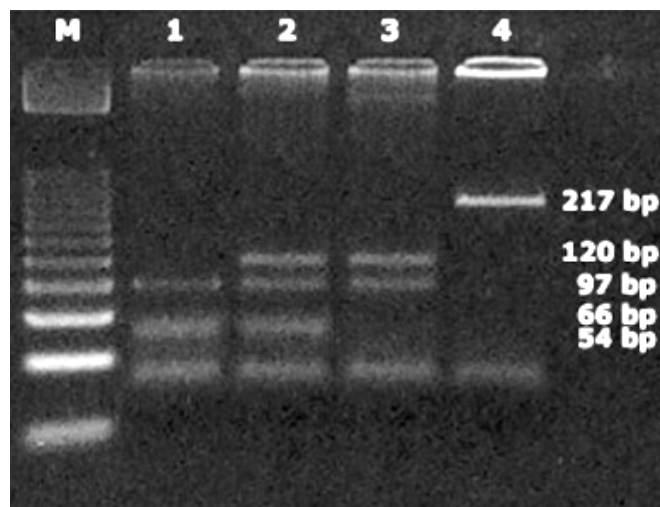
reverse primer: ( 5'- CCTCCAGCTGGGTCGGGTTG AAG-3')

The temperature profile of the PCR analysis was stated the same, besides the temperature of annealing that was maintained at 63 °C. PCR fragments were digested by restriction endonuclease Msp I in the total volume of 20 µl at 37 °C overnight according to the manufacturer's instructions and separated in 4 % agarose gel.

From the obtained results, the frequencies of the genotype and allelic presence were calculated. Frequency homogeneity in the individually examined populations was evaluated with  $\chi^2$  test according to **Falconer et Mackay (1996)**.

Statistical analysis were carried out in program STATISTICA 6.0 (StatSoft, Inc. PL, 2001) used algorithms, which are available on request. The data on milk protein composition were analysed statistically with the least squares method GLM (General Linear Model),

taking into account the effects of genotypes of  $\beta$ -LG and sampling. The differences were tested by using Scheffe multiple range test, LSD test and Student test for all traits studied.



M – 25 bp marker, 1 – AA genotype, 2 – AB genotype, 3 – BB genotype, 4 – PCR product.

**Figure 1:** The representative results of the RFLP-PCR analysis.

## RESULTS AND DISCUSSION

We estimated the distribution of  $\beta$ -Lg genotypes in the population of the Slovak sheep breed Improved Valachian. The alleles A and B were present in examined breed, on the contrary, allele C was not found. The allelic and genotypic frequencies in the exon 2 of  $\beta$ -Lg gene are shown in table 1.

**Table 1:** Distribution of  $\beta$ -Lg genotypes and gene frequencies in Improved Valachian, Czigaia and East-Friesian sheep breeds.

breed	n	Genotypic frequencies			$\chi^2$ test	Allele frequency		
		AA	AB	BB		A	B	
Improved Valachian sheep	75	obs.	22	34	19	0.633	0.52	0.48
		exp.	20.28	37.44	17.28			

n=number of samples,  $\chi^2$  test=chi-squared value, obs.=observed frequencies, exp.=expected frequencies calculated on the basis of Hardy-Weinberg law

The genotypic frequencies at the  $\beta$ -Lg locus estimated by RFLP-PCR, detected for the Improved Valachian sheep were 0.29 (AA); 0.45 (AB); 0.26 (BB). In our study, the variant A of  $\beta$ -Lg was more frequent in the examined population of sheep breed than variant B. It corresponded with the findings of several authors testing the different ovine breeds as Altamura (**Dario et al., 2005**), Massese (**Rampolli et al., 1997**), Lithuanian Native Coarsewooled and Lithuanian Blackface sheep (**Kučinskiene et al., 2005**), Hungarian merino et British milk sheep (**Anton et al., 1997**), Manchega breed (**Lopez-Galvez et al., 1994**) and the majority of studied ovine breeds.

In the tested breed, there was found out the insignificant difference in  $\chi^2$  test calculated between expected and observed genotype frequencies. According to an ideal distribution of the genotypes in the population, we can confirm that the population was in Hardy-Weinberg equilibrium.

The Improved Valachian sheep showed no statistically significant effect of the genetic variant for the nitrogen distribution in the proteins (table 2). We have found the only statistical difference ( $P < 0.05$ ) in the value of the casein number between the AA and AB genotypes (74.68 vs 75.84, respectively). Searching for the dependency using two-factorial ANOVA analysis we have observed

the effect of the lactation period on the crude protein nitrogen, true protein nitrogen, casein and casein number (figure2) ( $P<0.01$ ). **Martinez-Hens et al. (1993)** observed differences between the values of total protein and casein

content in milks with a different  $\beta$ -Lg genetic variant. They found that the BB homozygous form presented the lowest casein content values.

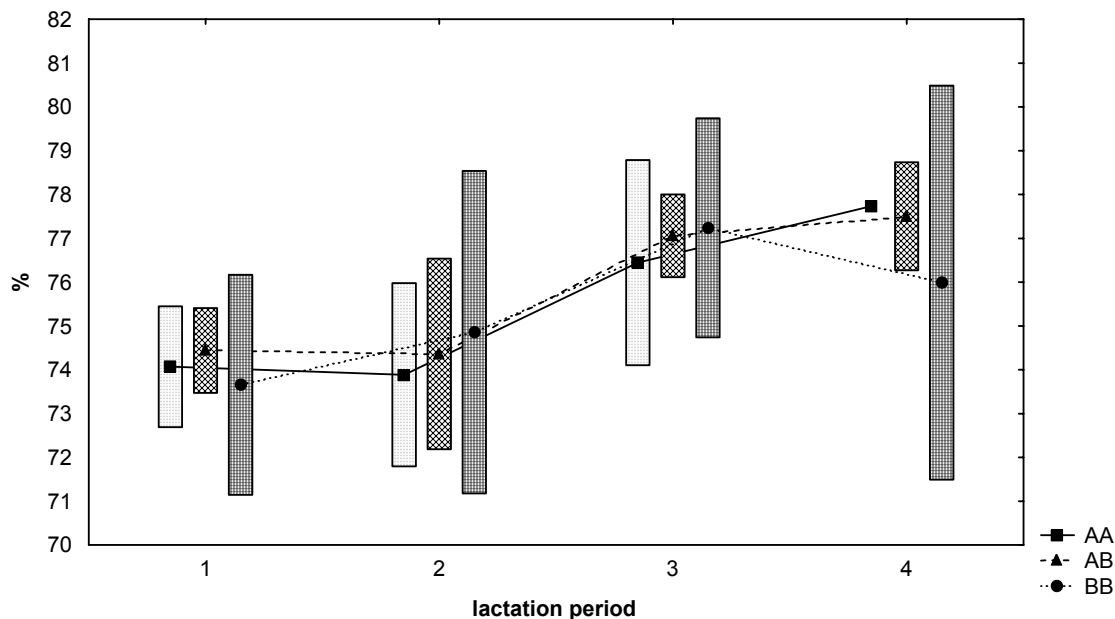
**Table 2:** Nitrogen distribution in milk depending on  $\beta$ -Lg genotype in Improved Valachian sheep.

parameter (n=168)	$\beta$ -Lg genetic variant						F value		
	AA (47)		AB (88)		BB (33)		GV	LP	GV-LP
	mean	sd	mean	sd	mean	sd			
crude protein nitrogen (g.100g <sup>-1</sup> )	6,60	0,16	6,44	0,09	6,50	0,14	0,30	10,19++	1,02
true protein nitrogen (g.100g <sup>-1</sup> )	5,77	0,14	5,74	0,08	5,90	0,12	0,67	14,04++	0,31
non-protein nitrogen (g.100g <sup>-1</sup> )	0,83	0,09	0,70	0,04	0,60	0,07	1,32	1,00	2,18
casein (g.100g <sup>-1</sup> )	4,32	0,12	4,36	0,06	4,42	0,09	0,38	18,86++	0,17
casein number (%)	74,68+	0,46	75,84+	0,32	74,93	0,74	0,19	7,81++	0,26
whey protein nitrogen (g.100g <sup>-1</sup> )	1,45	0,04	1,38	0,02	1,48	0,06	1,05	0,93++	0,63

sd=standard deviation, GV=genetic variant, LP=lactation period, + = statistically significant difference ( $P<0.05$ ), ++ = statistically highly significant difference ( $P<0.01$ )

The highest average true protein as well as casein and whey protein contents were stated in the BB genotype of  $\beta$ -Lg. The casein number reached the highest values in the heterozygous AB genotype. Also **Rampilli et al. (1997)** noted that BB  $\beta$ -Lg variant in Massese sheep may be associated with higher milk output, lower casein

percentage and higher percentage of whey proteins. **Grosclaude (1995)** summarized that in cattle, the polymorphism of  $\beta$ -Lg has a major effect on the  $\beta$ -Lg content ( $\beta$ -Lg A > B) and an opposite effect on casein number.



**Figure 2:** The average values of casein number of Improved Valachian sheep depending on genotype and lactation period

Taking into an account the technological properties of milks of different genotypes for Improved Valachian sheep, several difference were determined. The genotype AA differed significantly from genotype AB in heat stability and pH ( $P<0.05$ ) and a high statistical difference was ascertained in the calcium content ( $P<0.01$ ) (table 3). The statistical differences were found also in average calcium content ( $P<0.05$ ) between the genotypes AB and BB (215.17 mg.100g<sup>-1</sup> vs 224.44 mg.100g<sup>-1</sup>) and rennetability ( $P<0.05$ ) between the genotypes AA and BB (83.63s vs 126.96s, respectively).

The two-factorial ANOVA analysis demonstrated the effect of the lactation period on the heat stability (figure 3) and rennetability ( $P<0.05$ ). Using one-factorial analysis we have determined a statistically highly significant effect ( $P<0.01$ ) of the genetic variant on the calcium content in milk.

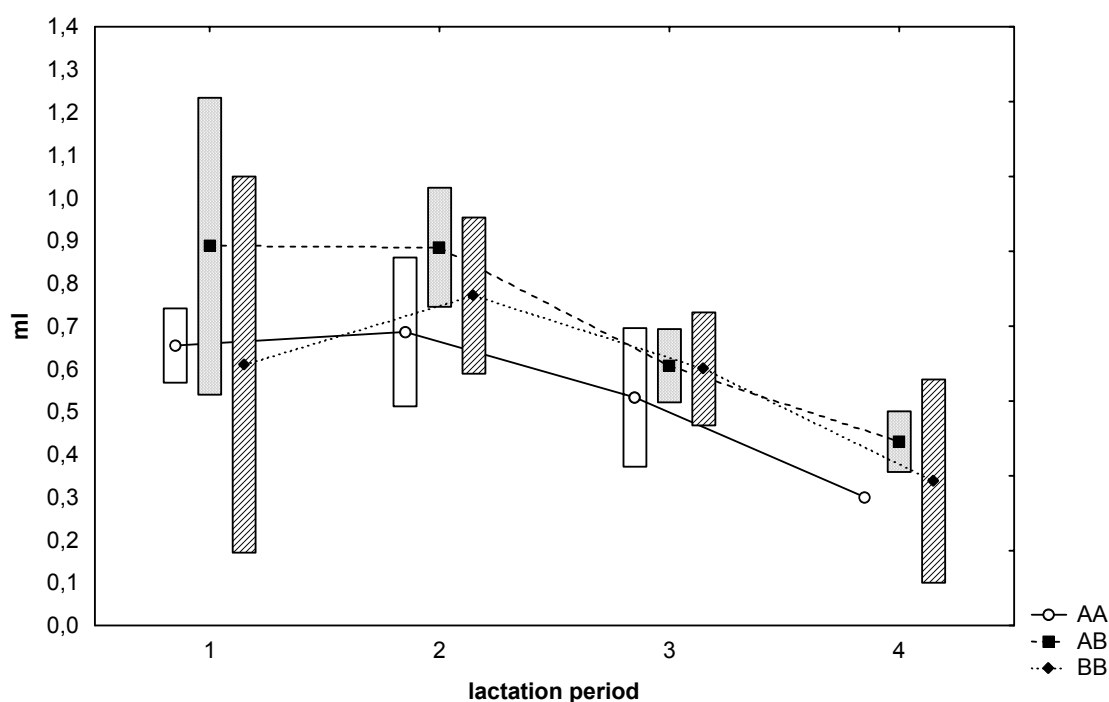
**Table 3:** Technological properties of Improved Valachian sheep milk depending on  $\beta$ -Lg genotype.

parameter (n=168)	$\beta$ -Lg genetic variant						F value		
	AA (47)		AB (88)		BB (33)		F value		
	mean	sd	mean	sd	mean	sd	GV	LP	GV-LP
rennetability (sec)	83,63+	8,17	102,77	10,06	126,95+	20,61	0,71	3,34+	1,13
calcium (mg.100g <sup>-1</sup> )	229,15++	3,78	215,17++	1,96	224,44++	3,39	2,62++	1,13	1,96
heat stability (ml)	0,58+	0,03	0,73+	0,05	0,62	0,05	1,42	3,37+	0,28
pH	6,52	0,02	6,58	0,02	6,57	0,02	0,05	1,04	0,41

sd=standard deviation, GV=genetic variant, LP=lactation period, + = statistically significant difference (P<0.05), ++ = statistically highly significant difference (P<0.01)

Our results correspond with the results of **Pellegrini et al. (1997)**, who found no significant effect of  $\beta$ -Lg genotype for the most physico-chemical characteristics and rennet coagulation properties. They noted only a small difference

in the diffusible Ca content between the AA and BB genotypes that we have observed in the Improved Valachian sheep, and in the diffusible P content between AB and the other variants.



**Figure 3:** The average values of heat stability of Improved Valachian sheep depending on genotype and lactation period

Our findings agree with several studies in which the influence of the  $\beta$ -Lg genotype on coagulation characteristics was confirmed, mainly on renneting time. Milks with allele A clotted significantly faster than milks containing allele B (**Rampilli et al., 1997**). **Amigo et al. (2000)** explained that the positive effect of allele A on rennetability of milk could be due to a greater casein content and specifically to higher relative amounts of  $\kappa$ - and  $\beta$ -CN for phenotype  $\beta$ -Lg AA.

Paying an attention to the effect of the genotypes at  $\beta$ -Lg locus on the rennetability, a better technological suitability of milk for rennet cheesemaking was shown from sheep with the AA and BB  $\beta$ -Lg than AB genotypes. For the production of whey cheeses, better results were obtained when processing milk from sheep with AB genotypes than from sheep with homozygous genotypes (**Korman et al., 2002**). On the contrary to these results are the data of

**Dario et al. (2005)** who observed a significant effect of BB genotype at  $\beta$ -Lg locus on whey protein content.

Regarding this dependence, pH is one of the main factors affecting the renneting properties of ovine milk. Searching for the relationship between pH and protein polymorphism, no statistical differences were found in pH values with the  $\beta$ -Lg genotypes in the Improved Valachian sheep (table 3) as it was similarly determined by **Recio et al. (1997)**. **Pellegrini et al. (1997)** observed a high dependence of rennet clotting time and gel firming rate on milk pH in the milk of Lacaune breed. Nevertheless, gel firmness was not affected by this parameter. According to these results, **Recio et al. (1997)** maintained the importance of further research and discussion for the probable dependence of the renneting properties of milk on the concomitant changes in milk composition and pH.

## CONCLUSION

We have confirmed the insignificant effect of the  $\beta$ -Lg genetic variant on the nitrogen distribution in the milk protein and processing properties of milk. It must be also noted that the pleiotropic effect of the milk protein encoding genes on milk composition is probably relatively small and in many cases, due to fairly large genetic variation, it is difficult to prove. This is because milk traits are quantitative traits and in addition to genetic factors they are also affected by many environmental factors, which are often more responsible for variation than genetic makeup. By **Mroczkowski et al. (2004)** wide differences in the studies on the relationship between milk protein polymorphism and milk performance of sheep result from many factors, such as lack of genetic homogeneity of sheep representing different breeds, the related unequal frequency of genes that condition milk production, differences in the size of the analysed population, and different methods of milk yield determination.

## REFERENCE

- ABRAHAMSEN, R. K., BORGE, G. I., HARSTAD, O. M., HAUG, A., WETLESEN, A. 2007. Milk quality – a future approach from a researcher's point of view. In: *Journal of Animal and Feed Sciences*, vol.16, Suppl. 1, 2007, p. 209-226.
- AMIGO, L., RECIO, I., RAMOS, M. 2000. Genetic polymorphism of ovine milk proteins: its influence on technological properties of milk – a review. In: *International Dairy Journal*, vol. 10, 2000, p. 135-149.
- ANTON, I., ZSOLNAI, A., KUKOVICS, S. ET AL. 1997. Genetic polymorphism of milk proteins in Hungarian dairy sheep breeds and crosses. In: *Sheep and Goat production in central and eastern European countries. Proceedings of the workshop held in Budapest, Hungary, 1997*, p. 224-226.
- ANTON, I., ZSOLNAI, A., FÉSÜS, L. ET AL. 1999. Survey of  $\beta$ -lactoglobulin and  $\alpha_{S1}$ -casein polymorphism in Hungarian dairy sheep breeds and crosses on DNA level (short communication). In: *Arch. Tierz., Dummerstorf*, vol. 41, 1999, no. 4, p. 387-392.
- ANTON, I., ZSOLNAI, A., FÉSÜS, L. 2005.  $\beta$ -lactoglobulin and  $\alpha_{S1}$ -casein polymorphism in Hungarian sheep breeds and crosses on DNA level. In: *Ekologické a ekonomické aspekty využitia poľnohospodársky znevýhodnených plôch chovom malých prežúvavcov. Vrátna dolina*, 2005, p. 63-67, ISBN 80-969312-1-0.
- BENCINI, R. 2001. Factors affecting the quality of ewe's milk. In: *Proceeding of the 7<sup>th</sup> Great Lakes Sheep Symposium. November 1-3. Wisconsin: EAU claire*, 2001, s. 52-83.
- CVAK, P., PETERKOVÁ, L., ČERNÁ, E. 1992. *Chemické a fyzikálněchemické metody v kontrole jakosti mléka mlékarenských výrobu*. 1. vyd. Praha: VÚPP, Středisko potravinářských informací. 1992, 221 s., ISBN 80-85120-36-4.
- CZERNEKOVÁ, V., KOTT, T., DUDKOVÁ, G. ET AL. 2004. Studium genetického polymorfizmu mléčných bílkovin skotu. In: *Celostátní prehlídka syru 2004. Výsledky prehlídek a sborník přednášek semináře Mléko a sýry 2004*, p. 216, ISBN 978-80-86238-42-5.
- DARIO, C., CARNICELLA, D., BUFANO, G. 2005. Effect of  $\beta$ -lactoglobulin genotypes on ovine milk composition in Altamura breed. In: *Arch. Zootec.*, vol. 54, 2005, p. 105-108.
- FALCONER, D. S., MACKAY T. F. 1996. *Introduction to Quantitative Genetics*, 4th edition, Longmans Green, Harlow, Essex, UK, 1996.
- GAJDŮŠEK, S. 1998. *Mlékařství II*. Brno: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, 1998. p. 125-127. ISBN 80-7157-342-6
- GARZON, A. I., MARTINEZ, J. 1992.  $\beta$ -Lg in Manchega sheep breed. Relationship with milk technological indexes in handcraft manufacture of Manchego cheese, XXIII. Int. Conf. *Anim. Genet.*, vol. 23, 1992, supl. 1, p.106.
- GROSCLAUDE, F. 1995. Genetic polymorphism of milk proteins. In: *Bull. Int. Dairy Fed.*, vol. 304, 1995, p. 2-3.
- KAŽIMÍR, L.- GEMERI, L. 1993. *Návody na cvičenia z Mliekárstva a hodnotenia živočíšnych produktov*. I. Mliekárstvo. 3. vyd. Nitra: VŠP, 1993, p. 178.
- KORMAN, K., PAKULSKI, T., MROCZKOWSKI, S. et al. 2002. Vstępne badania nad okrešleniem wplywu genotype laktoglobuliny na przydatnošć mleka do wyrobu sérow podpuszczkowych serwatkowych. In: *Prace I materiały zootechniczne, Zeszyt Specjalny*, vol. 14, 2002, p. 85-92.
- KUČINSKIENE, J., VAGONIS, G., MALEVIČIŪTĖ, J. ET AL. 2005. Genetic polymorphism of  $\beta$ -lactoglobulin in Lithuanian Blackface and Lithuanian Native Coarsewooled sheep. In: *Veterinarija ir zootechnika*, vol. 51, 2005, no. 29, p. 90-92, ISSN 1392-2130.
- LÓPEZ-GALVEZ, G., AMIGO, L., RAMOS, M. 1994. Genetic polymorphism of whey proteins in two ovine breeds. In: *Milchwissenschaft*, vol. 49, 1994, p. 123-125.
- MARTINEZ-HENS, J., GARZÓN, A., MÉNDEZ, D. ET AL. 1993. Influencia de las variantes genéticas de la  $\beta$ -lactoglobulina sobre el pH, caseína total y rendimiento de la cuajada en ovejas de raza Manchega. In: *Arch. Zootec*, vol. 42, 1993, p. 245-252.
- MROCZKOWSKI, S., KORMAN, K., ERHARDT, G. ET AL. 2004. Sheep milk protein polymorphism and its effect on milk performance of Polish Merino. In: *Arch. Tierz.*, vol. 47, 2004, Special Issue, p. 114-121.
- PELLEGRINI, O., REMEUF, F., RIVEMALE, M. ET AL. 1997. Renneting properties of milk from individual ewes: influence of genetic and non-genetic variables, and relationship with physicochemical characteristics. In: *Journal of Dairy Research*, vol. 64, 1997, p. 355-366.
- PILLA, F., DELL'AQUILLA, S., TAIBI, L. ET AL. 1995. Effect of  $\beta$ -lactoglobuline polymorphism on the properties of sheep milk. In: *Proc. XI. Congress Associazione Scientifica Produzione Animale*. 1995, p. 207-208.
- PINTADO, M. E., MALCATA, F. X. 1999. Studies on genetic variants of  $\alpha$ -lactalbumin and  $\beta$ -lactoglobulin from milk of native Portuguese ovine and caprine breeds. In: *International Journal of Food Science and Technology*, vol. 34, 1999, p. 245-252.
- RAMPILLI, M., CECCHI, F., GIULIOTTI, L. ET AL. 1997. The influence of  $\beta$ -lactoglobulin genetic polymorphism on protein distribution and coagulation properties in milk of Masseuse breed ewes. In: *Milk protein polymorphism*. Brussels, Belgium: IDF, 1997, p. 311-315
- RECIO, I., FERNANDEZ-FOURNIER, A., MARTÍN-ÁLVAREZ, P. J. ET AL. 1997.  $\beta$ -Lactoglobulin polymorphism in ovine breeds: influence on cheesemaking properties and milk composition. In: *Lait*, vol. 77, 1997b, p. 259-265.



Statistica (Data Analysis Software system), version 6. StatSoft. Inc. (2001). www.statsoft.com

STN 57 0536: 1994, Stanovenie zloženia mlieka infračerveným absorbným analyzátorom. Bratislava: S-ÚTN, 1994.

STN EN ISO 8968-1. 2002, Mlieko. Stanovenie obsahu dusíka, časť 1: Kjeldahlová metóda. Bratislava: S-ÚTN, 2002.

### Contact address:

doc. Ing. Anna Michalcová, PhD. - UTP Bydgoszcz, W. Rolniczy, Katedra Przechowalnictwa i Przetwórstwa Produktów Roślinnych, ul. Ks. A. Kordeckiego 20, bud.A, 85-225 Bydgoszcz, POLSKA, tel:+48/52-374-9366, mail: michalcova@utp.edu.pl

Ing. Zuzana Krupová, PhD. - INRA, Unité de Genomique et Physiologie de la Lactation, Jouy en Josas, France, mail: zkrupova@yahoo.fr

## STANOVENÍ STRAVITELNOSTI PRODUKTŮ ZE SLADKOVODNÍCH A MOŘSKÝCH ŘAS

## EVALUATION OF THE DIGESTIBILITY OF PRODUCTS FROM FRESHWATER ALGAE AND SEAWEEDS

*Ladislava Mišurcová, Stanislav Kráčmar*

### ABSTRACT

This article deals with the study of digestibility of the products from freshwater algae and seaweed which are available in market of the Czech Republic. Seaweed and freshwater algae are known for their content of nutritional and biological active substances as amino acids, proteins, vitamins, minerals, fatty acids, enzymes, pigments and dietary fibre. The value of digestibility determines the utilization of nutrients in humans. To obtain new data and extend knowledge digestibility *in vitro* was the main topics.

Digestibility was examined by gravimetric method using enzymes pepsin and pancreatin. The new procedure of this method was suggested, using Daisy incubator. The lowest values of DMD and OMD were determined while using pepsin; values ranged from 51.9 to 89.6% and 66.8 to 92.3%, respectively. The highest content of DMD and OMD was determined with pancreatin; values ranged from 57.1 to 97.5% and 79.0 to 98.1%, respectively. All values of digestibility were related to 100% digestibility of casein.

**Keywords:** freshwater algae, seaweed, digestibility *in vitro*

---

### ÚVOD

Pod pojem řasy (Algae) je zahrnováno více než 30 tisíc různých druhů od mikroskopických až po velké mořské i sladkovodní organizmy, které mají řadu podobných vlastností jako biotická skupina, ačkoliv jsou v současné době systematicky zařazeny do čtyř říší (**Kalina a Váňa, 2005**). Obecně jsou rozděleny do tří skupin, které jsou charakterizovány zejména jejich barvou na zelené (Chlorophyta), hnědé (Fucophyceae, Phaeophyceae) a červené (Rhodophyta). Pod pojem řasy bývá zařazována i *Spirulina* (Cyanobacteria) jako modrozelená řasa (Cyanophyceae).

V zemích Dálného východu – v Japonsku, Číně a Koreji – sahá tradice využití řas pro přímou spotřebu do čtvrtého až šestého století. Jedlé mořské i sladkovodní řasy jsou konzumovány jako čerstvá nebo sušená zelenina, případně se z nich vyrábí koření. V evropských přímořských státech, jako je Francie, Severní Irsko, Norsko, Španělsko a Portugalsko, řasy sloužily především jako krmivo pro zvířata. V současné době jsou mořské řasy využívány i na výrobu koření, delikatesních pokrmů; sladkovodní řasy jsou konzumovány převážně ve formě doplňků stravy. Zájem o řasy dokládá i stoupající trend jejich spotřeby. Její objem vysoce převyšuje zásoby dostupné z přírodních zdrojů. Proto se v současné době více než 90 %

požadovaného množství získává průmyslovou kultivací. Podle statistiky **FAO (2008)** se jejich produkce zvýšila z původních 2,8 mil. tun v roce 1980 na 15,1 mil. tun mokré hmoty v roce 2006. Z Dálného východu se kultivace řas rozšířila i do západních zemí a v současné době se úspěšně pěstují asi v 35 zemích. Většina této produkce však pochází z Asie, pouze malá část ze zemí jiných kontinentů – Afriky, Ameriky, Evropy a Oceánie.

Důvodem pro velký zájem o využití mořských a sladkovodních řas je jejich chemické složení. Je však variabilní a mění se v závislosti na jejich druhu, době sběru, geografické lokalitě a vnějších podmínkách jako je teplota vody, intenzita světla a v neposlední řadě i na koncentraci živin (**Marshall et al., 2007**).

Vysoká nutriční hodnota mořských a sladkovodních řas je dána významným obsahem dusíkatých látek, zejména proteinů a aminokyselin. Obsahují i malé množství neproteinového dusíku, jehož zdrojem jsou volné aminokyseliny, chlorofyl, dusičnanový a dusitanový dusík, amonné ionty a nukleové kyseliny (**Lourenço et al., 2002**). Vysoký obsah proteinů, který tvoří až 70 % sušiny, mají sladkovodní mikrořasy *Chlorella* a *Spirulina* (**Campanella et al., 1999**). Obsah proteinů v hnědých řasách je většinou malý, průměrně je udávána hodnota 5 -

15 % sušiny (**Dawczynski et al., 2007**), ale poměrně vysoký obsah je v červených a zelených řasách, kde průměrně dosahuje 10 - 30 % sušiny (**Ramos et al., 2000**). V některých červených řasách, jako např. *Palmaria palmata* a *Porphyra tenera*, které jsou známy pod komerčními názvy Dulse a Nori, tvoří proteiny 35 - 47 % což jsou hodnoty srovnatelné se sójou (**Burtin, 2003; Galland-Irmouli et al., 1999**). Řasové proteiny obsahují všechny esenciální aminokyseliny, některé z nich se však ve srovnání se standardním proteinem vyskytují v limitujícím množství, většinou se jedná o tryptofan, metionin a lizin.

Minerální prvky jsou v řasách zastoupeny makro-, oligo- i mikrobiogenními prvky a jejich obsahy jsou v některých druzích řas velmi dobře zdokumentovány (**Rupérez, 2002**). Obecně platí, že makrobiogenní prvky jsou ve srovnání s jinými zdroji potravin v malé koncentraci, ale hodnoty oligobiogenních prvků, zejména železa a zinku jsou v některých druzích řas velmi vysoké. V produktu Nori vločky z červené řasy *Porphyra tenera* byl zjištěn obsah železa 1833 mg.kg<sup>-1</sup> sušiny (**Mišurcová et al., 2009**). Toto množství by stačilo pokrýt doporučený denní příjem železa 10 - 15 mg pro dospělého člověka při dávce 5 g řasy na den. Hnědé řasy jsou významné svým obsahem jódu, zejména druh *L. japonica*, známý jako Kombu, u něhož byla zjištěna koncentrace jódu 734 mg.kg<sup>-1</sup> čerstvé řasy (**Hou et al., 1997**).

Řasy mají vysokou kapacitu vázat toxické kovy olovo, kadmium, rtuť a arzén. Tato schopnost je vázána na složení jejich buněčných stěn, které jsou bohaté na sulfatované polysacharidy, jejichž hydroxylové, síranové a karboxylové skupiny jsou důležitými vazebnými místy pro kovové kationty (**Vasconcelos et al., 2001**). Podle některých autorů jsou za vazbu těžkých kovů u hnědých řas zodpovědné karboxylové skupiny celulózy, u červených řas je to karagenan. Pro schopnost akumulovat těžké kovy jsou řasy využívány jako bioindikátory znečištění nebo k odstraňování toxických prvků z prostředí (**Aderhold et al., 1996; Hu et al., 1996; Suzuki et al., 2005; Tsui et al., 2006; Ghimire et al., 2007**). Biosorpce těžkých kovů může být ovlivněna jednak druhem řas, ale také některými přírodními faktory jako je geografická poloha a roční období (**Villares et al., 2002**). Řasy rostoucí ve studených vodách jsou obvykle velmi citlivé na sezónní změny, zatímco červené a hnědé řasy, obývající tropické a subtropické oblasti, jsou vhodnými bioindikátory znečištění. Sezónní vlivy se projevují zejména u kadmia, zatímco u olova nejsou tak průkazné (**Hashim et al., 2004**).

Mořské i sladkovodní řasy obsahují velké množství polysacharidů, jejichž typy a množství se mezi jednotlivými druhy řas velmi liší. Hlavním zásobním polysacharidem zelených řas, stejně jako vyšších rostlin, je škrob. Hnědé řasy škrob nikdy netvoří, jejich zásobním polysacharidem je laminaran ( $\beta$ -1,3-glukan) a manitol. Zásobním polysacharidem červených řas je florideový škrob ( $\alpha$ -1,4-glukan), který se od škrobu zelených řas a rostlin liší absencí amylózy. V některých studiích však bylo potvrzeno, že polyglukany některých druhů červených řas obsahují i jednotky amylózy (**Shimonaga et al., 2007**). Další odlišností je neobvyklé uložení zrn

florideového škrobu v cytoplazmě, které je podobné spíše způsobu uložení glykogenu v bakteriích a v živočišných buňkách (**Viola et al., 2001**). Součástí buněčných stěn mořských řas jsou strukturální polysacharidy, které mají funkci vlákniny potravy a jsou zdrojem hydrokoloidů. Z dalších polysacharidů, přítomných v buněčných stěnách, avšak v menším množství, jsou fukoidany hnědých řas, xylany červených a některých zelených řas a ulvany zelených řas. Většinu z těchto polysacharidů (agary, karagenany, ulvany a fukoidany) je přisuzována funkce vlákniny potravy, protože je lidské střevní bakterie nedokáží strávit a mnohé z nich jsou zkoumány pro jejich další biologické funkce, mezi něž patří zejména antioxidační aktivita a protirakovinné účinky (**Ye et al., 2008**). *Chlorella*, jako zástupce sladkovodních zelených řas, obsahuje škrob, hemicelulózy a celulózu, přičemž zastoupení i množství jednotlivých polysacharidů se mezi jednotlivými druhy tohoto rodu velmi liší (**Řezanka and Sigler, 2007**). Přítomnost celulózy v buněčné stěně zelených sladkovodních řas zajišťuje buňkám ochranu, ale na druhé straně způsobuje malou využitelnost nutričně významných složek. Pro jejich využití je nutná dezintegrace pevných buněčných stěn. Významným zdrojem vlákniny jsou hnědé mořské řasy – Arame, Hiziki, Wakame a Kombu – u nichž byly enzymatickou metodou zjištěny hodnoty v rozmezí 39 – 60 % (**Mišurcová, 2008**). Lipidy jsou přítomny v řasách v malém množství, které většinou nepřevyšuje 5 % sušiny, ale převážnou část tvoří polynenasycené  $\omega$ -3 a  $\omega$ -6 mastné kyseliny, které mají preventivní účinek na kardiovaskulární choroby, osteoporózu a diabetes. V zelené řase *Chlorella* je významný obsah  $\alpha$ -linolenové kyseliny ( $\omega$ -3, C 18:3). *Spirulina* má vysoký obsah  $\gamma$ -linolenové kyseliny (GLA,  $\omega$ -6, C 18:3), jejíž podíl činí 20 – 25 % z celkového množství lipidů (**Tokusoglu et al., 2003**). V červených a hnědých řasách se vyskytují převážně mastné kyseliny s dvaceti uhlíkovými atomy – eikosapentaenová (EPA,  $\omega$ -3, C 20:5) a arachidonová (AA,  $\omega$ -6, C 20:4) (**Dawczynski et al., 2007**). Esenciální mastné kyseliny (EFA) jsou prekurzory prostaglandinů, hormonů, které kontrolují mnoho metabolických funkcí. Lipidové extrakty některých jedlých řas vykazují antioxidační aktivitu a synergický účinek s tokoferoly (**Burtin, 2003**).

V současné době je věnována velká pozornost antioxidantům přijímaným potravou. Také mořské a sladkovodní řasy obsahují vedle vitaminů C, E a karotenoidů velké množství přírodních látek, zejména polyfenolických sloučenin, které vykazují značnou antioxidační aktivitu. Antioxidační vlastnosti vykazují také fykobiliproteiny; červený fykoerytrin se vyskytuje v červených mořských řasách a modrý fykokyanin obsahuje *Spirulina*. Bylo zjištěno, že fykobiliproteiny by se svým příznivým účinkem mohly přilákat na prevenci a léčení neuro-degenerativních chorob, způsobených oxidačním stresem, jako je Alzheimerova a Parkinsonova choroba, ale také žaludečních vředů a rakoviny (**Burtin, 2003**).

Pro stanovení nutriční hodnoty každé potravině je nutné kromě jednotlivých nutričních faktorů zjistit také jejich využitelnost lidským organizmem neboli stravitelnost. Stravitelnost je dána množstvím živiny, které bylo

absorbováno zaživacím ústrojím. Vzhledem k široké škále nutričně významných látek není jednoduché stanovit jednotnou metodu pro zjišťování stravitelnosti. U metod *in vivo* probíhá inkubace vzorků přímo v pokusných objektech s využitím jejich enzymového vybavení. Na pokusných objektech je stanoveno množství spotřebovaného dusíku ve vztahu k přijatému a vyloučenému dusíku organizmem (Komprda *et al.*, 1990).

Pro potraviny jsou využívány metody *in vitro*, při nichž dochází k simulování podmínek *in vivo* v laboratorních podmínkách. Stravitelnost pak může být stanovena ze změny obsahu dusíkatých látek před a po působení proteolytických enzymů (Fleurence, 1999; Wong and Cheung, 2001). Záleží však na použitém enzymu, době inkubace a druhu biologického materiálu. V poslední době se pro stanovení stravitelnosti, zejména krmiv, využívá inkubátoru Daisy, pomocí něhož je stravitelnost sušiny a organické hmoty stanovena gravimetricky z úbytků hmotnosti vzorku po enzymové inkubaci a následném vysušení a spálení (Forejtová *et al.*, 2005), proto při použití této metody je nutné vzít v úvahu charakter biologického materiálu pro zvolení vhodných podmínek při simulování trávení v lidském trávicím ústrojí (Mišurcová, 2008). Stravitelnost řas závisí na jejich složení, ale také na typu použitého enzymu štěpící různé složky, které zůstávají po vyprání a různém technologickém zpracování řas. Tato problematika však dosud není dobře zdokumentována. V literatuře jsou

popsány metody, které stanovují stravitelnost proteinů řas po jejich předchozí extrakci elektroforézou na polyakrylamidovém gelu a následném stanovení úbytku dusíku po působení směsi enzymů pepsinu a pankreatinu (Marion *et al.*, 2003).

Cílem práce bylo stanovit stravitelnost vybraných produktů ze sladkovodních a mořských řas pomocí inkubátoru Daisy po hydrolýze enzymy pepsinem a pankreatinem.

## MATERIÁL A METODIKA

Pro studii byly vybrány produkty ze sladkovodních a mořských řas, které jsou běžně dostupné v České republice. Výběr vzorků byl volen tak, aby byly zastoupeny všechny řasové skupiny: sladkovodní zelené řasy – Chlorophyta (*Chlorella pyrenoidosa*) a modrozelené řasy z oddělení Cyanobacteria (*S. pacifica*, *S. platensis*); mořské červené – Rhodophyta (*P. palmata*, *P. tenera*) a mořské hnědé řasy – Fucophyceae, syn. Phaeophyceae (*E. bicyclis*, *H. fusiformis*, *L. japonica*, *U. pinnatifida*). Jejich charakteristiky jsou uvedeny v Tabulce 1. Byly zakoupeny v prodejně se zdravou výživou jako potravní doplňky v podobě tablet, případně sušené řasy v různé úpravě ve formě vloček, plátů a nudliček. Vzorky byly před vlastní analýzou zhomogenizovány mixérem (Vorwerk Thermomix TM 31, Německo) na velikost částic do 1 mm.

Tab. 1: Vyšetřované produkty ze sladkovodních a mořských řas

Produkt	Označení vzorku	Výrobce	Původ suroviny	Řasa
Chlorella Tabs	C	Chlorella centrum, ČR	Taiwan	<i>Chlorella pyrenoidosa</i>
Spirulina Pacifica	S	Nutrex, Inc. USA	Hawai	<i>Spirulina pacifica</i>
Spirulina Bio	SB	Health Link, ČR	Indie	<i>Spirulina platensis</i>
Dulse vločky BIO	D	Lifefood, ČR	USA	<i>Palmaria palmata</i>
Nori vločky	NV	Sunfood, ČR	Japonsko	<i>Porphyra tenera</i>
Arame	A	Country life, ČR	Japonsko	<i>Eisenia bicyclis</i>
Hijiky	H	Country life, ČR	Japonsko	<i>Hizikia fusiformis</i>
Kombu	KB	Country life, ČR	Japonsko	<i>Laminaria japonica</i>
Wakame	W	Country life, ČR	Japonsko	<i>Undaria pinnatifida</i>
Wakame-instant	WI	Country life, ČR	Japonsko	<i>Undaria pinnatifida</i>

Pro stanovení stravitelnosti byla použita metodika „Stanovení stravitelnosti sušiny a organické hmoty pepsin–celulázovou metodou užitím Daisy inkubátoru“ (ANKOM Technology, New York) podle Forejtová *et al.*, 2005. Tato *in vitro* metoda, která je určena pro stanovení stravitelnosti krmiv, byla modifikována (Mišurcová, 2008). Pro stanovení stravitelnosti produktů z mořských a sladkovodních řas bylo využito působení dvou enzymů –

pepsinu (z vepřové žaludeční sliznice, 0,7 FIP–U/g, Merck KGaA, Německo) a pankreatinu (z vepřové slinivky, proteázová aktivita 350 FIP–U/g, lipázová aktivita 6000 FIP–U/g, amylázová aktivita 7500 FIP–U/g Merck KGaA, Německo). Stravitelnost sušiny a organické hmoty byla stanovena působením jednotlivých enzymů na vzorky. Dále byla provedena kombinovaná hydrolýza, nejdříve pepsinem a poté pankreatinem. Pro všechny typy hydrolýz

bylo do filtračních sáčků (F 57, velikost pórů 50 µm, ANKOM Technology, New York) naváženo 0,25 g zhomogenizovaného vzorku s přesností na 0,0001 g. Sáčky se vzorky byly zataveny a spolu s prázdňím zataveným sáčkem, který sloužil pro výpočet korekce, byly umístěny do inkubačních lahví v množství maximálně 25 kusů. Do každé inkubační lahve bylo aplikováno 0,6 g enzymu na 1g vzorku pro všechny typy hydrolyz.

Směs enzymů, která je produkována buňkami slinivky břišní, je označována termínem pankreatin. Je tvořena třemi enzymy – proteázou, lipázou (triglycerolhydroláza) a amylázou ( $\alpha$ -glykozidáza). Pankreatin je aktivní v širokém rozmezí pH 2 – 11. Vzhledem k tomu, že nejvyšší aktivita je vázána na hodnoty pH v intervalu od 7 do 8, byl jako inkubační roztok použit fosfátový pufr o hodnotě pH 7,45. Byl připraven smícháním  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (9,078 g.l<sup>-1</sup>) a  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$  (23,889 g.l<sup>-1</sup>) v poměru 2 : 8. Do každé inkubační lahve, která obsahovala sáčky se vzorky, bylo přidáno 1700 ml inkubačního roztoku, který byl připraven rozpuštěním adekvátního množství pankreatinu ve fosfátovém pufru o hodnotě pH 7,45, který byl předem vytemperován na teplotu 40 °C.

#### **Kombinovaná hydrolyza pepsinem a pankreatinem (P+PK)**

Stravitelnost byla stanovena také po kombinované hydrolyze působením dvou enzymů pepsinu a pankreatinu. Po 24 hodinové inkubaci pepsinem, byly vzorky s minimálním mechanickým zásahem propláchnuty destilovanou vodou a podrobeny další 24 hodinové inkubaci pankreatinem podle výše uvedených postupů.

Následující postup byl stejný pro všechny typy hydrolyz: Po 24 hodinové inkubaci byly sáčky promyty destilovanou vodou, přebytečná voda byla odstraněna filtračním papírem. Sáčky byly vysušeny v laboratorní sušárně při 103 °C po dobu 24 hodin, umístěny do exikátoru a zváženy. Poté byly sáčky zmineralizovány v muflové peci při 550 °C po dobu 5 hodin a po zchladnutí v exikátoru zváženy. U všech vzorků byla stanovena sušina a popel. Hodnoty stravitelnosti jsou vyjádřeny jako stravitelnost sušiny – DMD (Dry matter digestibility) a stravitelnost organické hmoty – OMD (Organic matter digestibility). Všechny výsledky byly vztaženy ke kaseinu, jehož stravitelnost je považována za 100 %-ní. Všechny naměřené hodnoty byly vyhodnoceny analýzou rozptylu ANOVA (Snedecor and Cochran, 1967) za použití statistického balíku Unistat, v. 5.1. a Office Excel@Microsoft.

#### **VÝSLEDKY A DISKUZE**

Metody pro určení stravitelnosti biologických materiálů zahrnují několik způsobů stanovení. Jejich výstupy jsou proto velmi těžko srovnatelné. V odborné literatuře jsou k dispozici pouze obecné údaje o stravitelnosti řas bez uvedených konkrétních hodnot a metody, kterými byla stanovena (Prugar *et al.*, 2008).

#### **Hydrolyza pepsinem (P)**

Do každé inkubační lahve bylo k sáčkům se vzorky přidáno 1700 ml roztoku HCl (0,1 mol.l<sup>-1</sup>) předem vytemperovaného na 40 °C, ve kterém bylo rozpuštěno adekvátní množství pepsinu. Láhve byly umístěny do inkubátoru Daisy a inkubovány po dobu 24 hodin.

#### **Hydrolyza pankreatinem (PK)**

Zjištěné hodnoty stravitelnosti vybraných produktů ze sladkovodních a mořských řas jsou uvedeny v Tabulce 2. Všechny hodnoty DMD i OMD vykazovaly značné rozdíly mezi vzorky z různých řasových skupin, ale i mezi vzorky vyrobenými z jednoho druhu řas.

Při použití pepsinu vykazovaly nejvyšší hodnoty DMD i OMD vzorky Spirulina Bio z modrozelené „řasy“ *S. platensis* – 89,6 a 91,3 % a Dulse z červené mořské řasy *P. palmata* – 87,3 a 92,3 %. Nejnížší stravitelnost DMD vykazovaly vzorky Hijiki – 51,9 % a Wakame instant – 52,8 % z hnědých mořských řas *H. fusiformis* a *U. pinnatifida*. Nejnížší hodnoty OMD byly zjištěny opět v produktu Hijiki – 66,8 % a také v Arame – 67,8 % z hnědé mořské řasy *E. bicyclis*. Velké rozdíly DMD a OMD vykazovaly vzorky Spirulina Bio a Spirulina Pacifica z modrozelených řas *S. platensis* a *S. pacifica*, ale také vzorky Wakame a Wakame instant z hnědé mořské řasy *U. pinnatifida*. Stravitelnost DMD i OMD produktu Chlorella Tabs ze sladkovodní zelené řasy *Chlorella pyrenoidosa* dosahovala nízkých hodnot DMD – 60,9 % a OMD – 69,5 %.

Po enzymové hydrolyze pankreatinem vykazoval nejvyšší hodnoty DMD – 97,5 % i OMD – 98,1 % vzorek Spirulina Bio z modrozelené řasy *S. platensis*. Vysoké hodnoty DMD – 87,4 a 84,9 % i OMD – 93,9 a 89,5 % vykazovaly i produkty Wakame z hnědé mořské řasy *U. pinnatifida* a Dulse z červené mořské řasy *P. palmata* v uvedeném pořadí. Nejnížší hodnoty stravitelnosti byly zjištěny v produktech z hnědých mořských řas: DMD – 57,1 % v produktu Wakame instant (*U. pinnatifida*) a OMD – 79,0 % v produktu Hijiki (*H. fusiformis*).

Při kombinované hydrolyze pepsinem a pankreatinem vykazovaly produkty ze sladkovodních a mořských červených řas vyšší hodnoty DMD než produkty z hnědých mořských řas. Nejvyšší hodnoty DMD – 94,3 a 87,3 % byly zjištěny v produktech Spirulina Bio z modrozelené řasy *S. platensis* a Dulse z červené mořské řasy *P. palmata* v uvedeném pořadí. Hodnoty stravitelnosti organické hmoty OMD byly vyšší než hodnoty stravitelnosti sušiny DMD a vykazovaly rozdíly jak mezi jednotlivými řasovými skupinami, tak i v rámci jedné skupiny. Nejvyšší hodnoty OMD – 95,4; 91,6 a 88,5 % byly zjištěny opět v produktech Spirulina Bio, Dulse a Spirulina Pacifica. Produkty Kombu a Wakame z hnědých mořských řas *L. japonica* a *U. pinnatifida* vykazovaly také poměrně vysokou stravitelnost organické hmoty OMD – 82,9 a 82,4 % v uvedeném pořadí.

**Tab. 2:** Hodnoty stravitelnosti (%) DMA a OMD při použití různé hydrolyzy produktů ze sladkovodních a mořských řas

	Pepsin				Pankreatin				Pepsin + Pankreatin			
	DMD		OMD		DMD		OMD		DMD		OMD	
	x	S.D.	x	S.D.	x	S.D.	x	S.D.	x	S.D.	x	S.D.
C	60,9 ±	3,23	69,5 ±	2,32	79,1 ±	0,99	83,8 ±	0,60	75,3 ±	1,13	80,6 ±	0,79
S	74,1 ±	6,86	78,6 ±	5,57	82,9 ±	1,53	87,3 ±	0,95	85,6 ±	1,49	88,5 ±	1,19
SB	89,6 ±	6,06	91,3 ±	5,16	97,5 ±	0,88	98,1 ±	0,87	94,3 ±	8,29	95,4 ±	6,99
D	87,4 ±	0,73	92,3 ±	0,68	84,9 ±	0,34	89,5 ±	0,09	87,3 ±	0,16	91,6 ±	0,15
NV	73,2 ±	3,84	84,2 ±	2,43	65,9 ±	0,31	81,6 ±	0,24	70,2 ±	0,38	81,4 ±	0,43
A	57,6 ±	1,39	67,8 ±	1,07	73,2 ±	1,37	81,7 ±	0,68	57,1 ±	1,00	67,0 ±	0,73
H	51,9 ±	0,83	66,8 ±	0,68	65,8 ±	2,31	79,0 ±	1,13	51,8 ±	0,84	66,0 ±	0,68
K	70,2 ±	3,93	82,6 ±	2,56	76,1 ±	1,16	89,5 ±	0,36	72,1 ±	0,75	82,9 ±	0,36
W	69,1 ±	0,42	83,8 ±	0,20	87,5 ±	2,02	93,9 ±	0,52	68,6 ±	0,42	82,4 ±	0,20
WI	52,8 ±	0,62	71,8 ±	0,47	57,1 ±	1,40	79,9 ±	0,75	52,7 ±	0,63	70,8 ±	0,47

Pro všechny typy hydrolyz byly vypočteny hodnoty opakovatelnosti stanovení, které jsou uvedeny v Tabulce 3 a určují rozdíl v % mezi dvěma paralelními stanoveními DMD a OMD prováděnými na stejném vzorku.

Hodnoty opakovatelnosti se pohybovaly v rozmezí 0,2 až 8,5 %. Nejlepší opakovatelnost u všech typů hydrolyz byla zjištěna u hodnot stravitelnosti v produktu Dulse a kaseinu, kde nepřesáhla 1 %. Naopak nejhorší opakovatelnost, přesahující 8 % byla u hodnot stravitelnosti produktů Spirulina Pacifica a Spirulina Bio. Při výpočtu

opakovatelnosti stanovení stravitelnosti na přístroji Daisy s použitím tří možností hydrolyzy nebyla zjištěna závislost opakovatelnosti stanovení na hodnotě stravitelnosti. Nejlépe reprodukovatelné hodnoty byly u produktu Dulse a v produktech z hnědých mořských řas. Nejnižší průměrné hodnoty opakovatelnosti pro DMD i OMD byly získány při použití kombinované hydrolyzy 2,0 a 1,4 %, pro pankreatin činila opakovatelnost pro DMD 2,2 % a OMD 3,0 %.

**Tab. 3:** Opakovatelnost stanovení DMD a OMD (%) v produktech ze sladkovodních a mořských řas při různém způsobu hydrolyzy

	DMD			OMD		
	P	PK	P+PK	P	PK	P+PK
C	5,0	1,1	2,1	3,2	3,2	1,6
S	8,5	2,3	2,6	6,7	6,7	1,3
SB	5,9	1,5	7,6	8,5	8,5	6,4
D	0,9	0,4	0,2	0,7	0,7	0,2
NV	8,5	0,7	0,8	4,8	4,8	0,5
A	3,5	2,3	2,1	2,5	2,5	1,6
H	2,7	5,3	2,8	1,7	1,7	1,8
K	5,9	2,3	0,9	3,2	3,2	0,4
W	1,0	3,7	1,0	0,2	0,2	0,3
WI	1,9	4,1	1,9	1,0	1,0	1,0
Kasein	0,8	0,6	0,3	0,7	0,7	0,3

P (Pepsin), PK (Pankreatin), P+PK (Pepsin + Pankreatin)

### ZÁVĚR

Pro posouzení kvality hodnocených potravin je nutné znát i míru jejich využitelnosti. Ve vědeckých publikacích jsou

dostupné informace o složení mořských i sladkovodních řas. Doposud velmi málo je řešena otázka jejich stravitelnosti. Stanovení stravitelnosti potravin metodami *in vivo* je velmi těžko proveditelné. Lze je nahradit

metodami *in vitro*, kdy je možné simulováním podmínek lidského trávení stanovit jejich stravitelnost. Modifikace metody stanovení stravitelnosti krmiv s použitím inkubátoru Daisy pro stanovení stravitelnosti rostlinných surovin určených pro lidskou výživu se jeví jako vhodná metoda pro určení využitelnosti řasových produktů lidským organizmem.

Stanovením DMD a OMD v produktech ze sladkovodních a mořských řas při různých způsobech hydrolyzy s použitím enzymů pepsinu, pankreatinu a kombinované hydrolyzy dvou enzymů pepsinu a pankreatinu byly zjištěny nejnižší hodnoty DMD i OMD při použití pepsinu. Nejvyšší hodnoty DMD i OMD byly u většiny vzorků zjištěny při použití pankreatinu. Kombinovanou hydrolyzou pepsinem a pankreatinem došlo ke zvýšení stravitelnosti pouze u produktů *Spirulina pacifica* a Dulse; v produktu Nori vločky při tomto způsobu hydrolyzy došlo ke zvýšení pouze stravitelnosti sušiny DMD. Nejvyšší stravitelnost vykazovaly vzorky *Spirulina Bio* a Dulse, oba především z důvodu absence celulózy. *Spirulina* obsahuje ve své buněčné stěně rozpustné mukopolysacharidy a červené mořské řasy částečně rozpustné sulfátované galaktany agary a karagenany. *Chlorella* a hnědé mořské řasy obsahují celulózu, která jejich stravitelnost snižuje. Pro zvýšení stravitelnosti se v komerčních produktech z řasy *Chlorella* provádí dezintegrace její buněčné stěny, což zaručuje výrobce produktu *Chlorella Tabs*, přesto byla její stravitelnost v některých případech nižší než v hnědých mořských řasách. Produkt Wakame vykazoval vysokou stravitelnost při všech způsobech stanovení. Nejméně stravitelné při všech způsobech stanovení byly produkty Arame, Hijiki a Wakame instant z hnědých mořských řas.

## LITERATURA

- ADERHOLD, D., WILLIAMS, C. J., EDYVEAN, R. G. J. 1996. The removal of heavy-metal ions by seaweeds and their derivatives. *Bioresource Technol.*, 58, 1996, p. 1–6.
- BURTIN, P. 2003. Nutritional value of seaweeds. *EJEAFChe.*, 2, 2003, p. 498–503.
- CAMPANELLA, L., CRESCENTINI, G., AVINO, P. 1999. Chemical composition and nutritional evaluation of some natural and commercial food products based on *Spirulina*. *Analisis*. 27, 1999, p. 533–540.
- DAWCZYNSKI, CH., SCHUBERT, R., JAHREIS, G. 2007. Amino acids, fatty acids, and dietary fibre in edible seaweed products. *Food Chem.*, 103, 2007, p. 891–899.
- FAO Fisheries and Aquaculture Circular 2008. Rome, 2008, No. 1034, ISBN 978-92-5-106106-0.
- FLEURENCE, J. 1999. Seaweed proteins: Biochemical, nutritional aspects and potential uses. *Trends in Food Science & Technology*. 10, 1999, p. 25–28.
- FOREJTOVÁ, J., LÁD, F., TŘINÁCTÝ, J., RICHTER, M., GRUBER, L., DOLEŽAL, P., HOMOLKA, P., PAVELEK, L. 2005. Comparison of organic matter digestibility determined by *in vivo* and *in vitro* methods. *Czech J. Anim. Sci.*, 50, 2005, 47–53.
- GALLAND-IRMOULI, A.V., FLEURENCE, J., LAMGHARI, R., LUCON, C. R., BARBAROUX, O., BRONOWICKI, J. P., VILLAUME, CH., GUÉANT, J. L. 1999. Nutritional value of proteins from edible seaweed *Palmaria palmata* (Dulse). *J. Nutr. Biochem.*, 10, 1999, p. 353–359.
- GHIMIRE, K.N., INOUE, K., OHTO, K., HAYASHIDA, T. 2007. Adsorption study of metal ions onto crosslinked seaweed *Laminaria japonica*. *Biores. Technol.* 2007, In press.
- HASHIM, M. A., CHU, K. H. 2004. Biosorption of cadmium by brown, green, and red seaweeds. *Chem. Eng. J.*, 97, 2004, p. 249–255.
- HOU, X., CHAI, CH., QIAN, Q., YAN, X., FAN, X. 1997. Determination of chemical species of iodine in some seaweed (I). *Sci. Total Environ.*, 204, 1997, p. 215–221.
- HU, S., TANG, CH.H., WU, M. 1996. Cadmium accumulation by several seaweeds. *Sci. Total Environ.*, 187, 1996, p. 65–71.
- KALINA, V., VÁŇA, J. 2005. Sinice, řasy, houby, mechorosty a podobné organismy v současné biologii. UK Praha, 2005, 606 s., ISBN 80-246-1036-1.
- KOMPRDA, T., KRÁČMAR, S., NEDBÁLKOVÁ B. 1990. Standardizace predikce stravitelnosti pícnin metodou *in situ*. *Živočišná výroba*. 1990, s. 385–396.
- LOURENQO, S. O., BARBARINO, E., DE-PAULA, J. C., OTÁVIO da PEREIRA, L. S., MARQUEZ, U. M. L. 2002. Amino acid composition, protein content and calculation of nitrogen-to-protein conversion factors for 19 tropical seaweeds. *Phycol. Res.*, 50, 2002, p. 233–241.
- MABEAU, S., FLEURENCE, J. 1993. Seaweed in food products: biochemical and nutritional aspects. *Trends in Food Science & Technology*, 4, 1993, p. 103–107.
- MARRION, O., SCHWERTZ, A., FLEURENCE, J., GUÉANT, J. L., VILLAUME, CH. 2003. Improvement of the digestibility of the proteins of the red alga *Palmaria palmata* by physical processes and fermentation. *Nahrung/Food.*, 47, 2003, p. 339–344.
- MIŠURCOVÁ, L. 2008. Nové nutriční aspekty a využití mořských a sladkovodních řas ve výživě člověka. Dizertační práce. UTB Zlín, 2008, 120 s.
- MIŠURCOVÁ, L., STRATILOVÁ, I., KRÁČMAR, S., Obsah minerálních látek ve vybraných produktech z mořských a sladkovodních řas. *Chemické listy*, 103, 2009, p. 1027-1033.
- PRUGAR, J. a kolektiv 2008. Kvalita rostlinných produktů na prahu 3. tisíciletí. VÚPS, a.s. Praha, 2008, 327 s., ISBN 978-80-86576-28-2.
- RAMOS, M. V., MONTEIRO, A. C. O., MOREIRA, R. A., CARVALHO, A. F. F. U. 2000. Amino acid composition of some brazilian seaweed species. *J. Food Biochem.*, 24, 2000, p. 33–39.
- RUPÉREZ, P. 2002. Mineral content of edible marine seaweeds. *Food Chem.*, 79, 2002, p. 23–26.
- ŘEZANKA, T., SIGLER, K. 2007. Structural Analysis of a Polysaccharide from *Chlorella kessleri* by Means of Gas Chromatography-Mass Spectrometry of Its Saccharide Alditols. *Folia Microbiol.*, 52, 2007, p. 246–252.
- SHIMONAGA, T., FUJIWARA, S., KANEKO, M., IZUMO, A., NIHEI, S., FRANCISCO, P. B., SATOH, A., FUJITA, N., NAKAMURA, Y. 2007. Variation in Storage  $\alpha$ -Polyglucans of Red Algae: Amylose and Semi-Amylopectin Types in *Porphyridium* and Glycogen Type in *Cyanidium*. *Mar. Biotech.*, 9, 2007, p. 192–202.
- SNEDECOR, G. W., COCHRAN, W.G. 1967. *Statistical Methods*. Iowa: 6th ed. Iowa State University Press, 1967, p. 534.
- SUZUKI, Y., KAMETANI, T., MARUYAMA, T. 2005. Removal of heavy metals from aqueous solution by nonliving *Ulva* seaweed as biosorbent. *Wat. Res.*, 39, 2005, p. 1803–1808.

TOKUSOGLU, O., UNAL, M. K. 2003. Biomass Nutrient Profiles of Three Microalgae: *Spirulina platensis*, *Chlorella vulgaris* and *Isochrysis galbana*. *J. Food Sci.*, 68, 2003, p. 1144–1148.

TSUI, M. T. K., CHEUNG, K. C., TAM, N. F. Y., WONG, M. H. 2006. A comparative study on metal sorption by brown seaweed. *Chemosphere*, 65, 2006, p. 51–56.

VASCONCELOS, M. T. S. D., LEAL, M. F. C. 2001. Seasonal variability in the kinetics of Cu, Pb, Cd and Hg accumulation by macroalgae. *Mar. Chem.*, 74, 2001, p. 65–85.

VILLARES, R., PUENTE, X., CARBALLEIRA, A. 2002. Seasonal variation and background levels of heavy metals in two green seaweeds. *Environ. Pollut.*, 119, 2002, p. 79–90.

VIOLA, R., NYVALL, P., PEDERSEN, M. 2001. The unique features of starch metabolism in red algae. *Proc. R. Soc. Lond. B*, 268, 2001, p. 1417–1422.

WONG, K. H., CHEUNG, P. C. K. 2001. Nutritional evaluation of some subtropical red and green seaweeds. Part II. *In vitro* protein digestibility and amino acid profiles of protein concentrates. *Food Chem.*, 72, 2001, p. 11–17.

YE, H., WANG, K., ZHOU, CH., LIU, J., ZENG, X. 2008. Purification, antitumor and antioxidant activities *in vitro* of polysaccharides from the brown seaweed *A. Food Chemistry*. 111, 2008, p. 428–432.

**Poděkování:**

Práce vznikla za podpory projektu MŠMT: MSM 7088352101

**Kontaktní adresa:**

Ing. Ladislava Mišurcová, Ph.D., Ústav technologie a mikrobiologie potravin, Fakulta technologická, Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, náměstí T. G. Masaryka 275, 762 72 Zlín, Tel: 00420 576 031 201, email: misurcova@ft.utb.cz

## VYUŽITÍ BLÍZKÉ INFRAČERVENÉ SPEKTROSKOPIE PRO STANOVENÍ ZÁKLADNÍCH FYZIKÁLNĚ-CHEMICKÝCH PARAMETRŮ OVČÍHO MLÉKA APPLICATION OF NEAR INFRARED SPECTROSCOPY TO DETERMINE THE BASIC CHEMICAL AND PHYSICAL PARAMETERS OF SHEEP MILK

*Zuzana Procházková, Michaela Dračková, Alena Remešová, Bohumíra Janštová,*

*Hana Přidalová, Lenka Vorlová*

### ABSTRACT

Proteins, lactose, total solids, solids-non-fat and titratable acidity were analyzed from sheep milk without any previous sample treatment. The spectra were measured in the transreflectance mode (0.1 mm path-length) in near infrared region  $10\,000 - 4\,000\text{ cm}^{-1}$ , with an average of 100 scans. A set of 33 samples was used to calibrate the instrument by partial least squares regression method (PLS) and checked later with cross validation on the same set of samples. The following statistical results were obtained: correlation coefficient (R) of 0.966 and standard error of calibration (SEC) 0.328 for proteins, R = 0.999 and SEC = 0.027 for lactose, R = 0.968 and SEC = 0.684 for total solids, R = 0.951 and SEC = 0.237 for solids-non-fat, R = 0.949 and 0.312 for titratable acidity, respectively. All the parameters of calibration set as obtained by FT-NIR spectroscopy were compared with those obtained by the reference methods, linear regression and paired t-test and no significant results were obtained at statistical level  $P < 0.05$ . The results of the study showed that FT-NIR spectroscopy is a suitable method for analysis of basic chemical and physical parameters of sheep milk.

**Keywords:** FT-NIR, spectroscopy, sheep milk, chemical parameters, physical parameters

### ÚVOD

Blízká infračervená spektrometrie (NIR) využívá část elektromagnetického spektra mezi viditelným zářením a infračerveným spektrem (800–2500 nm). Umožňuje získat informace o relativním obsahu a poměru C-H, O-H a N-H vazeb, které tvoří organickou matrix všech potravin. NIR spektrometrie je úspěšně využívána v průmyslu pro chemickou analýzu díky množství výhod jako rychlá a přesná metoda. V mlékařství se spektrometrie v infračervené oblasti používá pro stanovení laktózy, proteinů, obsahu tuku v mléce a dalších parametrů mléka (Díaz-Carrillo et al., 1993; Albanell et al., 1999; Laporte a Paquin, 1999; Čurda et al., 2002; Jankovská a Šustová, 2003;), sýrů (Rodríguez-Otero et al., 1995; Sorensen a Jepsen, 1998a, b; Witttrup a Norgaard, 1998) a ostaních mléčných výrobků (Rodríguez-Otero a

Hermida, 1996; Rodríguez-Otero et al., 1997; Laporte a Paquin, 1998). Využití NIR spektrometrie pro hodnocení ovčího mléka bylo zpracováno pouze v několika vědeckých publikacích (Albanell et al., 1999; Jankovská et al., 2004).

Cílem naší práce bylo vyvinout kalibrační modely pro základní fyzikálně-chemické parametry ovčího mléka a porovnat dosažené výsledky s dostupnými publikacemi.

### MATERIÁL A METODIKA

V této studii bylo provedeno vyšetření 33 vzorků ovčího mléka pocházejícího z ovčí farmy na severní Moravě. Ve vzorcích byly stanoveny tyto parametry: obsah bílkovin, obsah laktózy, celkový obsah sušiny, obsah tukuprosté sušiny, titrační kyselost. Všechny uvedené

parametry byly stanoveny jednak metodami standardními a jednak pomocí FT-NIR spektrometrie.

Bílkoviny, tuk a laktóza byly stanoveny infračerveným absorpčním spektrofotometrem na přístroji Bentley 2500 (Bentley Instruments, Minnesota, USA) (ČSN 57 0536: 1999). Tukuprostá sušina byla stanovena výpočtem z obsahu celkové sušiny a z obsahu tuku. Titrační kyselost byla stanovena metodou dle Soxhlet Henkela (ČSN 57 0530: 2006).

Před odběrem vzorku bylo každé mléko zahřáto na 40 °C a následně zchlazeno na 20 °C, aby bylo zajištěno rovnoměrné rozptýlení tukových kuliček. Před samotným měřením byl každý vzorek důkladně homogenizován promícháním. Měření bylo prováděno při teplotě 20 °C. Vzorky byly proměřeny na spektrometru NIR Nicolet Antaris (Thermo Electron Corporation, Madison, USA) ve spektrálním rozsahu 10 000 – 4 000 cm<sup>-1</sup> se 100 scany. Čas snímání jednoho spektra se pohyboval okolo 1,5 min. Spektra byla měřena na integrační sféře v režimu transflektance s použitím transflektanční kyvety o tloušťce vrstvy 0,1 mm. Příklad spekter ovčího mléka ukazuje Obrázek 1.

Naměřená data byla zpracována pomocí programu TQ Analyst verze 6.2.1.509 metodou nejmenších čtverců (PLS) a ověřena pomocí křížové validace s použitím stejné sady vzorků jako při kalibraci. Při tomto postupu byl vždy vypuštěn jeden ze standardů a ze zbylých kalibračních dat byl vytvořen nový model, který byl použit pro výpočet

vektoru koncentrací vypuštěného standardu. Vypočtené odchylky od deklarovaného obsahu složek vypuštěného standardu byly statisticky vyhodnoceny (Mlček et al., 2006). Pro identifikaci odlehlých spekter a standardů byly použity diagnostiky Spectrum Outlier a Leverage.

Dále byl zvolen optimální počet PLS faktorů pro kalibraci (PRESS). Diagnostika PRESS (Predicted Residual Error Sum of Squares) zobrazuje, jak se hodnota sumy čtverců predikované zbytkové chyby mění s číslem faktorů použitých ke kalibraci každé složky stanovované aktivní metodou.

Pomocí programu Microsoft Excel 2003 byly u všech referenčních ukazatelů vypočteny základní statistické charakteristiky (průměr, směrodatná odchylka, minimum, maximum). Ke statistickému vyhodnocení dat byl použit statistický a grafický software STAT Plus (Matoušková et al., 1992). Pro porovnání hodnot naměřených pomocí FT-NIR s hodnotami zjištěnými referenčními metodami byl použit párový T-test. Pomocí párového T testu nebyly nalezeny statisticky významné rozdíly mezi hodnotami získanými referenčními metodami a hodnotami vypočítanými pomocí FT-NIR.

## VÝSLEDKY A DISKUZE

Rozpětí referenčních hodnot pro všechny parametry byla vyjádřena pomocí směrodatných odchylek průměru (Tabulka 1).

**Tabulka 1:** Hodnoty individuálních parametrů získané referenčními metodami

Parametry	Minimum	Maximum	Průměr	SD
Bílkoviny (g/100g)	5,20	10,13	6,87	1,35
Laktóza (g/100g)	2,97	5,34	4,47	0,63
Sušina (g/100g)	17,40	28,86	20,75	2,82
Tps (g/100g)	11,15	13,88	12,10	0,80
SH (° SH)	8,50	37,20	12,22	6,45

SD – směrodatná odchylka

**Tabulka 2:** Kalibrační a validační výsledky individuálních parametrů stanovené pomocí FT-NIR spektrometrie

Parametry	Kalibrace			Validace		
	R	SEC	CCV (%)	R	SECV	PCV (%)
Bílkoviny	0,966	0,328	4,72	0,932	0,460	6,62
Laktóza	0,999	0,027	0,61	0,998	0,047	1,06
Sušina	0,968	0,684	3,28	0,928	1,040	4,99
Tps	0,951	0,237	1,94	0,927	0,288	2,36
SH	0,949	0,312	3,07	0,824	0,615	6,04

R – korelační koeficient, SEC – standardní chyba kalibrace, CCV – kalibrační variační koeficient, SECV – standardní chyba cross validace, PCV – predikční variační koeficient

Pomocí diagnostických nástrojů Spectrum Outlier a Leverage byly odstraněny odlehlé standardy, u kterých byly nepřesně stanoveny referenční hodnoty nebo se objevila spektrální odchylka. Kalibrační model pro titrační kyselost byl upraven první derivací, kalibrační model pro obsah tukuprosté sušiny byl upraven druhou derivací. Ostatní modely byly vytvořeny bez použití derivace.

Kalibrační modely pro všechny sledované parametry byly vytvořeny pomocí PLS algoritmu. PLS využívá u vyšetřených vzorků spektrální a současně koncentrační informace ke stanovení latentních proměnlivých PLS faktorů v souboru dat (Sørensen a Jepsen, 1998b). Nejvyšší počet faktorů byl zaznamenán pro parametr obsah laktózy (10 faktorů), nejmenší počet faktorů byl



použit u parametrů obsah bílkovin a obsah tukuprosté sušiny (3 faktory). Pro obsah celkové sušiny a titrační kyselost bylo použito 6 PLS faktorů. Spolehlivost kalibračního modelu byla ověřena křížovou validací. Pro vytvoření validačních modelů byla použita stejná sada vzorků jako při kalibraci. Křížová validace představuje pevnou závislost mezi hodnotami referenčními a hodnotami předikovanými. Přesnost validace byla posouzena na základě korelačních koeficientů validace (R) a standardních chyb validace (SECV) (Sørensen a Jepsen, 1998b) (Tabulka 2).

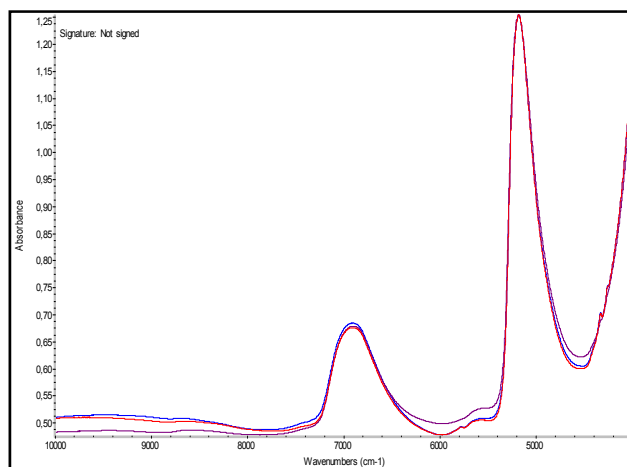
Na Obrázku 2 můžeme posoudit kalibrační a validační výsledky pro stanovení laktózy. Jelikož se regresní přímky plně překrývají, jedná se o pevnou závislost.

Jankovská et al. (2004) ve své práci týkající se ovčího mléka získali tyto hodnoty:  $R = 0,983$  a  $SEC = 0,18$  pro sušinu,  $R = 0,997$  a  $SEC = 0,06$  pro bílkoviny,  $R = 0,980$  a  $SEC = 1,49$  pro laktózu. Námí dosažené výsledky pro laktózu vykazovaly vyšší kalibrační koeficient a zároveň i nižší standardní chybu kalibrace ( $R = 0,999$  a  $SEC = 0,027$ ). Laktóza byla v naší práci parametrem s nejlepšími dosaženými výsledky. Albanell et al. (1999) pro hodnocení spolehlivosti kalibrace používají  $R^2$  a obsahem jejich práce bylo stanovení tří základních chemických parametrů ovčího mléka (bílkovin, tuku a celkové sušiny) s použitím různých materiálů měřících kyvet. Pro porovnání s výsledky jejich práce byly naše korelační koeficienty upraveny:  $R^2 = 0,932$  a  $SEC = 0,328$  pro bílkoviny,  $R^2 = 0,937$  a  $SEC = 0,684$  pro celkovou sušinu. V závislosti na typu použité kyvety dosahovali Albanell et al. (1999) těchto výsledků:  $R^2 = 0,91-0,92$  a  $SEC = 0,190-0,216$  pro bílkoviny,  $R^2 = 0,94-0,98$  a  $SEC = 0,274-0,506$  pro obsah celkové sušiny. Na základě porovnání našich výsledků s výsledky dostupných studií lze konstatovat, že jsme došli k obdobným výsledkům.

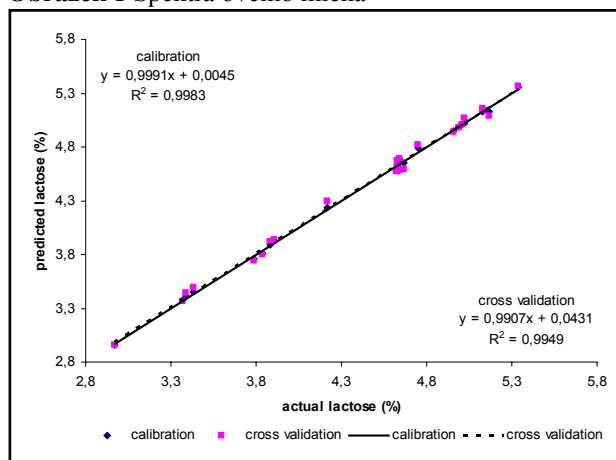
Součástí práce bylo také vytvoření kalibračních modelů pro obsah tuku v ovčím mléce, ale z důvodu příliš velkého rozpětí hodnot a nerovnoměrného zastoupení hodnot získaných referenčními metodami nebylo možné kalibrační modely vytvořit. Po doplnění souboru dat budou výsledky součástí dalších prací.

Spolehlivost kalibrace NIR přístroje pro různé složky byla posouzena na základě výpočtu kalibračního variačního koeficientu (CCV) a predikčního variačního koeficientu (PCV). Zhodnocením CCV a PCV, kdy CCV u žádného ze sledovaných parametrů nepřesáhl hodnotu 5 % a PCV hodnotu 10 % můžeme kalibraci i validaci posoudit jako vysoce spolehlivé, pokud jeden z nich přesahuje danou hodnotu, jedná se o spolehlivý model a pokud oba koeficienty přesahují dané hodnoty, jedná se o nespolehlivý model (Albanell et al., 1999; Esbensen, 2003) (Tabulka 2).

Z výsledku statistického hodnocení lze konstatovat, že mezi referenčními hodnotami a vypočítanými hodnotami pomocí FT-NIR nebyly nalezeny statisticky významné rozdíly ( $p < 0,05$ ).



Obrázek 1 Spektra ovčího mléka



Obrázek 2 Kalibrační a validační model pro obsah laktózy

## ZÁVĚR

Zhodnocení výsledků bylo provedeno na základě korelace mezi referenčními hodnotami a hodnotami vypočtenými pomocí FT-NIR spektrometrie. Korelační koeficienty (R) se přibližují hodnotě 1, což je pro použitelnost modelu nejvhodnější. Spolehlivost celého kalibračního modelu byla posouzena na základě korelačních variačních koeficientů (CCV) a predikčních variačních koeficientů (PCV). Pro všechny námi sledované parametry byly získány velmi spolehlivé kalibrační modely. Z této práce vyplývá, že metoda FT-NIR spektrometrie je vysoce spolehlivou a vhodnou metodou pro stanovení základních parametrů ovčího mléka, což potvrzují i práce ostatních autorů.

## LITERATURA

ALBANELL, E., CÁCERES, P., CAJA, G., MOLINA, E., GARGOURI, I. 1999. Determination of fat, protein and total solids in ovine milk by near-infrared spectroscopy. In *Journal of AOAC International*, vol. 82, 1999, p. 753-758.

ČSN 57 0530 Metody zkoušení mléka a tekutých mléčných výrobků. Český normalizační institut, Praha, 1972, se změnami v r. 1979, 1998, 2006, 100 s.

ČSN 57 0536 Stanovení složení mléka infračerveným absorpčním analyzátozem Český normalizační institut, Praha, 1999, 12 s.

ČURDA, L., KUKAČKOVÁ, O., NOVOTNÁ, M. 2002. NIR spektroskopie a její využití při analýze mléka a mléčných výrobků. In *Chemické Listy*, vol. 96, 2002, p. 305-310.

DÍAZ-CARRILLO, E., MUÑOZ-SERRANO, A., ALONSO-MORAGA, A., SERRADILLA-MANRIQUE, J. M. 1993. Near infrared calibrations for goat's milk components: protein, total casein,  $\alpha_s$ ,  $\beta$ - and  $\kappa$ -caseins, fat and laktose. In *Journal of Near Infrared Spectroscopy*, vol.1, 1993, p. 141-146.

ESBENSEN, K.: Multivariate analysis in practise. [online] Publikováno 22.4. 2003. [citováno 28.9. 2009]. Dostupné z <<http://www.spectroscopynow.com>>.

JANKOVSKÁ, R., ŠUSTOVÁ, K. 2003. Analysis of cow milk by near-infrared spectroscopy. In *Czech Journal of Food Science*, vol. 21, 2003, p. 125-128.

JANKOVSKÁ, R., ŠUSTOVÁ, K., KUČTÍK, J. 2004. Využití FT NIR spektroskopie v analýze ovčího mléka. In *Mléko a sýry 2004*. Praha: VŠCHT, 2004, s. 137-141.

LAPORTE, M. F., PAQUIN, P. 1999. Near infrared analysis of fat, protein and casein in cow's milk. In *J. of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 47, 1999, p. 2600-2605.

LAPORTE, M. F., PAQUIN, P. 1998. Near-infrared technology and dairy food products analysis: A review. In *Seminars in Food Analysis*, vol. 3, 1998, p.173-190.

MATOUŠKOVÁ, J., CHALUPA, J., CÍGLER, M., HRUŠKA, K. 1992. STAT-Plus uživatelská příručka, verze 1.01. Veterinary Research Institute, Brno, 1992, 168 s.

MLČEK, J., ŠUSTOVÁ, K., SIMEONOVÁ, J. 2006. Application of FT NIR spectroscopy in the determination of basic chemical composition of pork and beef. In *Czech Journal of Animal Science*, vol. 6, 2006, p. 361-368.

RODRIGUEZ-OTERO, J.L., HERMIDA, M. 1996. Analysis of Fermented Milk Products by Near Infrared

Reflectance Spectroscopy. *Journal of AOAC International*. 1996, vol. 79, p. 817-821.

RODRIGUEZ-OTERO, J. L., HERMIDA, M., CENTENO, J. 1997. Analysis of dairy products by near infrared spectroscopy: A review. In *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 45, 1997, p. 2815-2820.

RODRIGUEZ-OTERO, J. L., HERMIDA, M., CEPEDA, C. 1995. Determination of fat, protein, and total solids in cheese by near-infrared spectroscopy. In *Journal of AOAC International*, vol. 78, 1995, p. 802-806.

SØRENSEN, L. K., JEPSEN, R. 1998a. Comparison of near infrared spectroscopy techniques for determination of semi-hard cheese constituents. In *Milchwissenschaft*, vol. 53, 1998, p. 263-267.

SØRENSEN, L. K., JEPSEN, R. 1998b. Assesment of sensory properties of cheese by near-infrared spectroscopy. In *International Dairy Journal*, vol. 8, 1998, p. 863-871.

WITTRUP, CH. NORGAARD, L. 1998. Rapid near infrared spectroscopy screening of chemical parameters in semi-hard cheese usány chemometry. In *Journal of Dairy Science*, vol. 81, 1998, p. 1803-1809.

#### Poděkování

Poděkování: Práce vznikla za finanční podpory výzkumného záměru MSM6215712402 „Veterinární aspekty bezpečnosti a kvality potravin“.

#### Kontaktní adresa

MVDr. Zuzana Procházková, Ústav hygieny a technologie mléka, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, Palackého 1/3, 612 42 Brno, Česká Republika, email: [zprochazkova@vfu.cz](mailto:zprochazkova@vfu.cz)

## „STUDENÁ STERILIZÁCIA“ ORECHOVÍN AKO POTENCIÁLNYCH KOMPONENTOV PEKÁRENSKÝCH PRODUKTOV

## „COLD STERILISATION“ OF WALNUTS AS POTENTIAL COMPONENT OF BAKERY PRODUCTS

Jana Sádecká, Emil Kolek, Janka Koreňová, Janka Lopašovská

#### ABSTRACT

Microbiological quality, sensory and chemical changes in volatile and lipid fractions of  $\gamma$ -irradiated walnuts (*Juglans regia* L.) were evaluated using gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS), gas chromatography with flame-ionising detector (GC/FID) and sensory evaluation. Doses of  $\gamma$ -radiation were with in the range 0.5 - 5 kGy, where 10 kGy represented the highest permitted dose for food applications. Microbiological analysis showed that  $\gamma$ -irradiation was an effective sterilisation tool which eliminated prevalent microorganisms including coliform bacteria from initial count of  $6.0 \times 10^2$  CFU/g with 1.5 kGy dose. The dose of only 0.5 kGy was found to be sufficiently effective for killing prevalent moulds. Quoted levels of ionising radiation were adequate for elimination of microbiological load for minimum storage duration of 2 kGy dose. Higher irradiation levels negatively affected organoleptic properties of studied walnuts. Significant changes in relative contents of certain fatty acids, mainly linoleic and linolenic acid, and closely related changes in relative contents of certain volatiles were observed due to the influence of ionising radiation. Unsaturated hydrocarbons as determined by GC/MS method are believed to be suitable markers of  $\gamma$ -irradiation of walnuts even at 0.5 kGy dose of application.

**Keywords:**  $\gamma$ - irradiation, walnut, microbiological analysis, GC/MS, sensory analysis

## ÚVOD

Produkcia kvalitných a bezpečných potravín nezaťažených prítomnosťou mikrobiálnej kontaminácie sa javí v súčasnosti ako jeden z globálnych problémov. V roku 1984 Komisia pre Codex Alimentarius vypracovala medzinárodnú normu pre radiačné ošetrenie potravín a z legislatívneho hľadiska poskytla zásady správneho radiačného ošetrenia potravín do výšky priemernej dávky 10 kGy. Od počiatku 80. rokov rad predovšetkým rozvinutých krajín zaviedol legislatívne predpisy pre radiačné ošetrenie potravín odpovedajúce zásadám kódexovej normy, a tak v 37 štátoch bolo povolených okolo 40 druhov radiačne ošetrených potravín (**Loaharanu, 1994**). Rozdiely medzi národnými zákonmi, týkajúcimi sa ošetrenia potravín ionizujúcim žiarením a podmienkami jeho aplikácie obmedzujú voľný pohyb potravín, môžu vytvoriť nerovnaké konkurenčné podmienky a tým priamo ovplyvňovať fungovanie vnútorného trhu v Európskom spoločenstve. Vzhľadom na uvedené skutočnosti Európsky parlament a Rada EÚ prijali rámcovú smernicu 1999/2/ES:

- o aproximácii zákonov členských štátov týkajúcich sa potravín a potravinových prísad ošetrených ionizujúcim žiarením,
- o ustanovení zásad správneho radiačného ošetrenia potravín do výšky priemernej dávky žiarenia 10 kGy,
- o zásadách kontroly ožarovacieho procesu,
- o prijatí zoznamu potravín v rámci Európskeho spoločenstva, ktoré možno ošetriť ionizujúcim žiarením, a tak zabezpečiť voľný pohyb tovaru na spoločnom trhu,
- vykonávacou smernicou 1999/3/EC Európskeho parlamentu a Rady EÚ bol ustanovený počiatočný zoznam radiačne ošetrených potravín a potravinových prísad (Community positive list of foodstuffs authorised for irradiation), zahŕňajúci sušené aromatické byliny, koreniny a rastlinné prísady ožiarené najvyššou priemernou dávkou žiarenia 10 kGy za účelom dezinfekcie a zníženia, resp. eliminácie patogénnych mikroorganizmov. Tento zoznam je priebežne dopĺňaný o ďalšie potraviny navrhované členskými štátmi EÚ. Od roku 2000 v členských štátoch EÚ je povolené radiačné ošetrovanie sušených aromatických bylín, korenín a rastlinných prísad, ako i odbyt a obchodovanie s nimi na spoločnom trhu. Pri radiačnom ošetrení korenín však môže dochádzať k zmenám v chemickom zložení ich silicových komponentov v závislosti od použitej dávky žiarenia. To sa môže nežiadúco prejaviť na organoleptickej kvalite ošetreného produktu, prípadne i tvorbe zdraviu škodlivých látok. V neposlednom rade je nevyhnutná objektívna kontrola tejto technologickej operácie s cieľom objektívnej informovanosti spotrebiteľa. Výskum chemických zmien a detekčných metód na ožiarené potraviny je vysoko aktuálny a venujú sa mu výskumné tímy jednotlivých krajín (**Stevenson, 1994; Antonelli et al., 1998; Variyar et al., 1997; Onyenekwe et al., 1997; Farag, Abo-Zoid, 1997; Bendini et al., 1998; Polovka et al., 2007, 2008; Raffi et al., 2000; Ukai, Shimoyama, 2003; Smith, Pillai, 2004; Yordanov, Aleksieva, 2004; Suhaj et al., 2006; Sádecká, 2007**). Naviac Rada a Komisia EÚ a tiež členské štáty dali vyhlásenie v smernici 1999/2/ES o podporovaní ďalšieho rozvoja normalizovaných, alebo už schválených analytických metód, zameraných na overovanie a dôkaz radiačne ošetrených potravín.

Identifikácii markerov radiačného ožiarovania rôznych korenín (aníz, bazalka, škoricca, oregano, chilli, čierne korenie, paprika, rozmarín, šalvia)  $\gamma$ -žiarením dávkami 5 a 10 kGy bola venovaná práca autorov **Bendini et al. (1998)**. Zistilo sa, že  $\gamma$ -žiarenie indukuje v koreninách tvorbu nenasýtených uhľovodíkov, a to alkénov C<sub>16:2</sub>, C<sub>16:1</sub>, C<sub>17:2</sub>, C<sub>17:1</sub>, ktorých množstvo rástlo s dávkou žiarenia. Najmä alkén C<sub>17:1</sub> sa ukázal ako dobrý indikátor aplikácie  $\gamma$ -žiarenia, pretože jeho obsah v silici korenín sa menil lineárne s dávkou ožiarovania od 5 do 10 kGy. Tvorba nenasýtených uhľovodíkov ako potenciálnych markerov ošetrenia ionizujúcou energiou sa ukazuje byť zvlášť zaujímavá aj v súvislosti so štúdiom takto ošetrených orechovín, obsahujúcich významný podiel lipidickej frakcie, o to viac, že tieto potravinárske komodity môžu byť aktuálne pre ošetrenie ionizujúcim žiarením hlavne v dôsledku prítomnosti mykotoxínov. Práve zastúpenie mastných kyselín v lipidickej frakcii orechovín ako prekursorov alkénov indikuje ich možnú prítomnosť po expozícii matrice ionizujúcou energiou (**Sánchez-Bel et al., 2005; Crews et al., 2005; Crews et al., 2005**).

V súvislosti s momentálnym trendom prípravy pekárenských výrobkov v domácich pekárničkách - a to tak u nás, ako i v rámci Európy - javí sa perspektívne príprava kompletných múčnych zmesí určených pre maloobchod, vhodných na domácu výrobu chleba a jemného pečiva, ktoré by spĺňali atribúty potravinovej bezpečnosti a organoleptickej kvality. Okrem receptúr reflektujúcich stravovacie návyky slovenských konzumentov, je snaha rozšíriť sortiment kompletných múčnych zmesí aj o kategóriu napr. špeciálnych druhov chlebových zmesí s prídavkom vlašských orechov, slnečnicových jadier, sezamových semienok.

Vzhľadom k uvedeným skutočnostiam cieľom tejto práce bolo štúdium fyzikálno-chemických zmien v lipidickej zložke a následne prchavej frakcii vlašských orechov ožiarených  $\gamma$ -žiarením so zámerom charakterizovať tieto zmeny spôsobujúce prípadný pokles ich organoleptickej kvality; určiť optimálnu dávku žiarenia jednak pre elimináciu prítomnej mikroflóry, ale súčasne so zachovaním organoleptickej kvality orechov. Napokon snahou bolo aj pokúsiť sa o identifikáciu markerov ožiarovania v predmetnej potravinárskej komodite.

## MATERIÁL A METODIKA

**Experimentálny materiál:** Vlašské orechy (*Juglans regia* L.), odroda: Jupiter/Apollo, lúpané, z úrody r. 2007, 15 kg. *Obsah sušiny:* 96,2% (pri 105 °C, počas 5 hod. do konštantnej hmotnosti, z troch paralelíek). *Dodávateľ:* súkromný producent (Chorvátsky Grob).

*Balenie experiment. vzoriek:* orechové jadrá boli navážené do polyetylénových vreciek so suchým zipsom, v ochrannej atmosfére N<sub>2</sub>. *Hmotnosť jednotlivej experiment. vzorky* bola 50 g. Po ožarovaní boli balíčky experiment. vzoriek obalené alumíniovou fóliou na eliminovanie priepustnosti O<sub>2</sub> a vzdušnej vlhkosti. Tento spôsob balenia má súčasne simulovať jednu z možností používaných obalových materiálov orechovín v maloobchodnej sieti. *Skladovanie experiment. vzoriek:* v mrazničke pri -18 °C.

**Ožarovanie v komerčných podmienkach**

Zdroj žiarenia:  $\gamma$ -žiarenie z  $\text{Co}^{60}$ , ožarovanie: ARTIM, s.r.o. Praha, CZ, hladiny  $\gamma$ -žiarenia: 0 kGy, 0,25 kGy, 0,5 kGy, 1 kGy, 1,5 kGy, 2 kGy, 3 kGy, 4 kGy, 5 kGy pri dávkovej rýchlosti 2 kGy/h.

### Mikrobiologická analýza

V intenciách požiadaviek Potravinového kódexu sa pre neošetrenú (kontrolnú) vzorku vlašských orechov stanovil počet koliformných baktérií, kvasiniek a plesní i celkový počet mikroorganizmov (CPM) podľa platných noriem: STN EN ISO 4833, STN ISO 4832, STN ISO 7954. Všetky analýzy sa zrealizovali zriedovacou kultivačnou metódou podľa STN EN ISO 6887-1. Súčasne sa sledoval vývoj mikrobiologickej situácie počas doby skladovania (3 mesiace, 6 mesiacov) ako kontrolnej, tak i ožiarených vzoriek.

### Senzorická analýza

Hodnotiteľský panel tvorilo 7 posudzovateľov (4 ženy, 3 muži, priemerný vek 40 rokov). Hodnotilo sa v 8 kvalitatívnych parametroch (deskriptoroch): **chut'**- sladká, horkastá orechová, typická orechová, typická tuková, tuková zoxidovaná (rybacia), **celková chuťnosť**, **vôňa**, **doznievanie arómy** v 6-bodovej kvantitatívnej škále (0-5). Pre vyhodnotenie senzorickej analýzy sa využilo štatistické spracovanie dát metódou kanonickej diskriminačnej analýzy programom Unistat® (Unistat Ltd., 4 Shirland Mews, London W9 3DY, England).

### Izolácia lipidickej frakcie vlašských orechov, GC analýzy profilu mastných kyselín

*Izolácia lipidickej frakcie vlašských orechov podľa Soxhleta*

Metóda je kombináciou bázičky a kyslo katalyzovanej esterifikácie. Vzniknuté metylestery mastných kyselín sa analyzovali pomocou plynovej chromatografie s využitím plameňovo-ionizačného detektora (GC/FID). Z každej vzorky (0 kGy, 0,25 kGy, 1 kGy, 1,5 kGy, 2 kGy, 3 kGy, 4 kGy, 5 kGy) sa realizovali 2 paralelné izolácie lipidickej frakcie, ktoré sa v ďalšom esterifikovali a chromatograficky separovali a analyzovali.

*GC/FID analýzy profilu mastných kyselín*

Predmetné stanovenia boli realizované ako akreditované analýzy podľa štandardného pracovného postupu ŠPP ORG.M.047 GC s medzilaboratórnym porovnaním.

### Identifikácia markerov indukovaných ožiarení v tukovej frakcii vlašských orechov

Postupovalo sa v intenciách normy STN EN 1784: DETEKCIA OŽIARENÝCH POTRAVÍN OBSAHUJÚCICH TUK. Metóda je založená na GC detekcii ožiarení vytvorených uhlíkovodíkov.

*Izolácia tukovej frakcie z vlašských orechov* (podľa predmetnej normy, bod 7.3. Extrakcia tuku zo vzoriek syra a ovocia). Z každej dávky ožiarených orechov sa urobili 2 paralelné izolácie tuku.

### Prečistenie tuku na kolóne s Florisilom

*Príprava Florisilu:* podľa uvedenej normy. *Prídavok štandardného roztoku  $C_{20}$ :* po extrakcii sa zmiešal vždy 1 g získaného tuku s 1 ml roztoku n-eikozánu v hexáne ( $c=3$   $\mu\text{g/ml}$ ).

*Kolónová chromatografia s Florisilom:* frakcia uhlíkovodíkov sa získala adsorpčnou kolónovou chromatografiou na Florisile. Uhlíkovodíky sa izolovali použitím cca 20 g deaktivovaného Florisilu pre každú vzorku. Po naplnení Florisilom sa kolóna zmáčala cca 50 ml n-hexánu. 1 g vyextrahovaného tuku sa kvantitatívne prenieslo do chromatografickej kolóny, pridalo sa 3 ml vnútorného štandardu  $C_{20}$  a uhlíkovodíky sa vymývali 60 ml eluentu s prietokom asi 3 ml/min. Získaný eluát sa zakonzentroval na 1 ml odľúkaním dusíkom a použil sa na analýzu plynovou chromatografiou.

*Separácia a detekcia uhlíkovodíkov pomocou GC/MS*

Kolóna: DB-XLB (30 m x 0.25 mm x 0.5  $\mu\text{m}$ ), nosný plyn hélium, ionizačná energia 70 eV

Spôsob dávkovania: Splitless, 1  $\mu\text{l}$

Teplotný program: 60 °C (1 min), 10 °C/min, 245 °C, 70 °C/min, 320 °C (4.0 min)

Režim MSD: SIM mód

Z každej frakcie uhlíkovodíkov sa realizovali 2 GC/MS analýzy, t.j. 4 analýzy z príslušnej dávky (0 kGy, 0,5 kGy, 1 kGy, 3 kGy, 5 kGy) ožiarených orechov

*Štandardné roztoky uhlíkovodíkov* (pre výpočet obsahu uhlíkovodíkových markerov ožiarenia)

8-heptadecén 8-17:1

6,9-heptadekadién 6,9-17:2

Z každého štandardu uhlíkovodíka bolo pripravených 5 koncentračných úrovní: 1  $\mu\text{g/ml}$   $C_6$ , 2  $\mu\text{g/ml}$   $C_6$ , 3  $\mu\text{g/ml}$   $C_6$ , 4  $\mu\text{g/ml}$   $C_6$ , 5  $\mu\text{g/ml}$   $C_6$ , z každej koncentračnej úrovne sa urobili 3 GC analýzy. Výpočet obsahu uhlíkovodíkov ako markerov radiačného ožiarenia sa vykonal metódou kalibračnej krivky.

### Izolácia prchavých frakcií referenčných a radiačne ošetrených vzoriek vlašských orechov: SPME (Solid Phase Microextraction Extract) v spojení s GC/MS

SPME vlákna: DVB/Carboxen/PDMS 2 cm, „For Odour Compounds“, Supelco, Bellefonte, Pennsylvania, USA

Hrúbka filmu stacionárnej fázy SPME vlákna: 50/30  $\mu\text{m}$

Návažok vzorky: 1 g zomletých zhomogenizovaných vlašských orechov

Teplota termobloku: 50 °C, inkubačný čas 30 min, extrakčný čas 15 min

*GC podmienky*

GC: HP 5890II, Hewlett-Packard, MS: HP 5971A, Hewlett-Packard

GC/MS v režime electron impact, ionizačná energia 70 eV

GC kolóna: ULTRA 1 (50 m x 0.20 mm x 0.33  $\mu\text{m}$ ), dávkovacia technika Splitless

Teplota injektora: 250 °C, teplota detektora: 240 °C

Teplotný program: 35 °C (3 min), 1.7 °C/min, 250 °C

### Štúdium chemického zloženia prchavého podielu kontroly a radiačne ošetrených vlašských orechov

Výsledky profilu individuálnych zlúčenín prchavej frakcie orechov pri využití metódy SPME – GC/MS boli spracované metódou vnútornej normalizácie ako relatívne % jednotlivých komponentov komplexnej zmesi v závislosti na aplikovanej hladine žiarenia. Z každej vzorky ožiarenej danou hladinou ionizujúceho žiarenia sa realizovali 3 paralelné izolácie prchavej frakcie, pričom výsledky relatívneho zastúpenia jednotlivých

komponentov frakcie sú priemernými hodnotami z paralelných GC analýz. Identifikácia zlúčenín bola uskutočňovaná porovnávaním ich nameraných hmotnostných spektier s knižnicami spektier štandardných zlúčenín. Využili sa dostupné databázy MS spektier: Willey 275, NIST/EPA/NIH Mass Spectral Library, INRAMASS. MS identifikácia bola doplnená o ďalšiu nezávislú identifikačnú metódu - výpočet lineárnych retenčných indexov predmetných zlúčenín s porovnaním týchto údajov s údajmi nameranými na referenčných materiáloch.

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

### Štúdium vplyvu dávky ionizujúceho žiarenia na mikrobiologickú kvalitu vlašských orechov

Výsledky mikrobiologickej analýzy (tab.1) poukazujú na

**Tab. 1:** Mikrobiologická analýza radiačne ošetrovaných vlašských orechov okamžite po ožiarení

Vlašský orech dávka ožiarenia	CPM (KTJ.g <sup>-1</sup> )	Koliformné baktérie (KTJ.g <sup>-1</sup> )	Kvasinky a plesne
0 kGy	6,0.10 <sup>2</sup>	<10	pozit.
0,25 kGy	<10	<10	pozit.
0,5 kGy	<10	<10	negat.
1 kGy	1,5.10 <sup>1</sup>	<10	negat.
1,5 kGy	1,0.10 <sup>1</sup>	<10	negat.
2 kGy	<10	<10	negat.
3 kGy	<10	<10	negat.
4 kGy	<10	<10	negat.
5 kGy	<10	<10	negat.

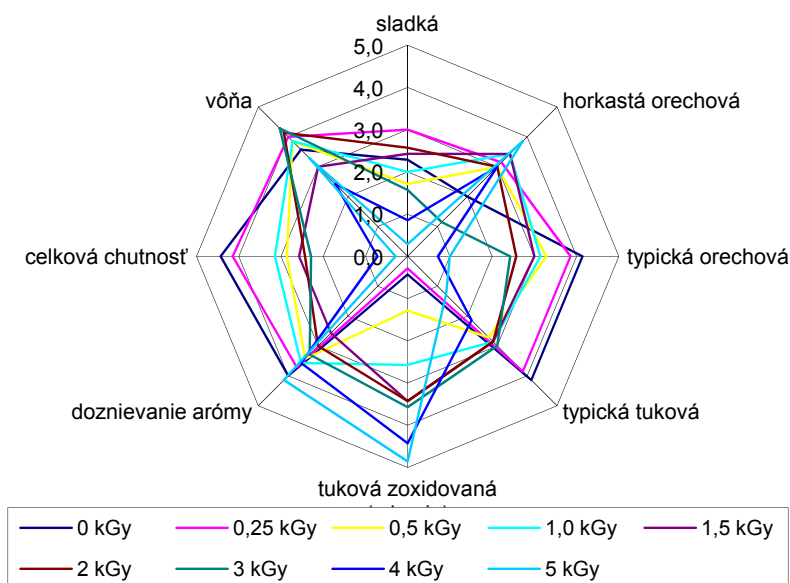
(Pozn.: KTJ – kolóniotvorná jednotka)

### Senzorická analýza vo vzťahu k ožarovaniu

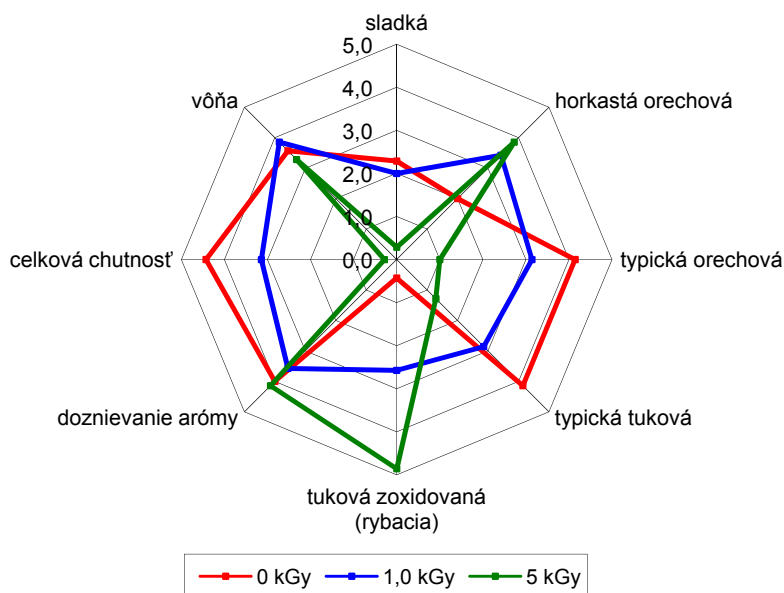
Výsledky senzorickej analýzy realizovanej panelom hodnotiteľov sú vizualizované v hviezdicových diagramoch (obr.1 a 2). Najmä obr. 2 jasne demonštruje vplyv ionizujúceho žiarenia na pokles pozitívnych kvalitatívnych senzorickej deskriptorov (sladká, celková chuť, vôňa, typická orechová, typická tuková) s nárastom hladiny ožiarenia. Naopak, dávka žiarenia výrazne zhoršuje deskriptory typu: tuková zoxidovaná (rybacia), horkastá orechová, ktoré sú dôsledkom oxidácie tukovej frakcie orechov vplyvom ionizujúceho žiarenia. Na základe parametrov kanonickej diskriminačnej analýzy vyplýva, že na diskrimináciu najvýznamnejšie prispievajú prvé tri diskriminačné funkcie (DF), ktoré sa kumulatívne podieľajú 96% na celkovej variabilite dát. Najvýznamnejšia je prvá DF so 77%, druhá s 12% a tretia so 7%. Súčasne, hodnoty vlastného čísla (eigenvalue) sú pre tieto DF významné a sú väčšie ako 1 a hodnoty Wilksovej lambdy pre všetky DF sú blízke hodnote 0. Podľa hodnôt štandardizovaných koeficientov na diskrimináciu v 1. DF najviac prispievajú nasledovné senzorickej deskriptory: zoxidovaná chuť, celková chuť a vôňa, v 2. DF zoxidovaná chuť, vôňa a tuková aróma a

fakt, že experimentálna vzorka neošetrených vlašských orechov bola mikrobiologicky pomerne málo kontaminovaná - celkový počet mikroorganizmov (CPM) bol 6,0.10<sup>2</sup> KTJ.g<sup>-1</sup>. V dôsledku toho, dávka 1,5 kGy až 2 kGy ionizujúceho žiarenia bola postačujúca na eliminovanie prítomnej bakteriálnej mikroflóry v predmetnej vzorke orechov (tab.1). Čo sa týka prítomnosti kvasiniek a plesní, na ich zlikvidovanie bola účinná hladina 0,5 kGy ionizujúceho žiarenia. Ukázalo sa, že uvedené hladiny žiarenia sú účinné pre elimináciu prítomnej mikrobiologickej záťaže minimálne počas 6 mesačnej doby skladovania predmetnej vzorky vlašských orechov.

v 3. DF horkastá chuť, tuková aróma a doznievanie arómy. Podľa matice štruktúr s DF najlepšie korelujú deskriptory charakterizujúce zoxidovanú chuť, tukovú arómu a horkastú chuť. Klasifikačnou procedúrou pri kanonickej diskriminačnej analýze sa dosiahla úspešnosť 76,2% zatriedenia vzoriek podľa jednotlivých dávok ožiarenia (0, 0,25, 0,5, 1, 1,5, 2, 3, 4 a 5 kGy). Kroková diskriminačná analýza selektovala deskriptory senzorickej hodnotenia podľa významnosti vplyvu na diferenciáciu v nasledovnom klesajúcom poradí: zoxidovaná chuť, celková chuť, vôňa a horkastá chuť. Pri senzorickej hodnotení extrahovaných dávok ožiarenia 0, 1, 2, 3, 4 a 5 kGy sa dosiahla veľmi vysoká úspešnosť 95,2% klasifikácie. Získané výsledky v súčinnosti s multivariačným štatistickým spracovaním dát demonštrujú vysokú citlivosť senzorickej hodnotenia ožiarovaných vlašských orechov pri predmetných šetrných a súčasne veľmi blízkych hladinách radiačného ošetrovania na základe dobre zostaveného panelu hodnotiteľov (počet hodnotiteľov, pohlavie, vek), ako aj vhodne vybraných deskriptorov, čo sa týka kvalitatívnych i kvantitatívnych ukazovateľov.



**Obr. 1:** Hviezdicový diagram senzorickeho hodnotenia vlašských orechov pred a po ožiarení ionizujúcim žiarením dávkami od 0,25 kGy do 5 kGy



**Obr. 2:** Hviezdicový diagram senzorickeho hodnotenia ožiarených vlašských orechov vybranými dávkami ionizujúceho žiarenia (0 kGy, 1 kGy a 5 kGy)

Izolácia lipidickej frakcie vlašských orechov, GC analýzy profilu mastných kyselín

Sumarizácia výsledkov je uvedená v tab.2. Relatívne zastúpenie lipidickej frakcie v prípade analyzovaného kultivaru vlašských orechov dosahuje hodnoty v intervale 62,7 – 65,7% v závislosti na použitej dávke žiarenia. Z tab.2 je zrejmé, že lipidická frakcia vlašských orechov je tvorená dominantne tromi nenasýtenými mastnými kyselinami (MK), s najvyšším zastúpením kyseliny linolovej (58%), následne kyseliny olejovej (19,5%) a kyseliny linolénovej (13,2%). Tieto vysoké hladiny

nesaturovaných MK môžu mať jednak dopad na trvanlivosť, resp. dobu skladovania vlašských orechov v porovnaní k iným druhom orechovín, ako aj významný príspevok k charakteristickej aróme vlašských orechov. Čo sa týka štúdia vplyvu dávky  $\gamma$ -žiarenia na obsahy jednotlivých MK, výsledky v tab.2 poukazujú na fakt, že hodnoty relatívneho zastúpenia nasýtených MK (kyselina palmitová, kyselina stearová) oscilujú okolo hodnôt nameraných v neožiarenej vzorke orechov, a teda s rastúcou hladinou žiarenia nie je pozorovaný zrejmy trend v náraste či poklese. To poukazuje na relatívnu stabilitu saturovaných MK.

Tab. 2: GC/FID analýzy profilu mastných kyselín vlašských orechov

Mastná kyselina	Relatívne zastúpenie (%)								
	0 kGy	0,25 kGy	0,5 kGy	1 kGy	1,5 kGy	2 kGy	3 kGy	4 kGy	5 kGy
K. $\alpha$ -linolénová 18:3	13,2	13,0	12,0	12,2	11,9	12,1	12,1	11,9	11,8
K. linolová 18:2	58,0	57,8	57,0	56,3	57,7	56,1	57,2	56,7	56,2
K. olejová 18:1	19,5	20,1	22,2	22,2	21,2	22,6	21,4	21,9	21,7
K. palmitová 16:0	6,8	6,7	6,5	6,6	6,8	6,8	6,8	7,0	6,8
K. stearová 18:0	2,5	2,4	2,4	2,6	2,4	2,5	2,5	2,5	2,5
<b>Tuk</b>	<b>64,6</b>	<b>63,1</b>	<b>65,7</b>	<b>64,8</b>	<b>62,7</b>	<b>65,0</b>	<b>63,4</b>	<b>65,4</b>	<b>65,0</b>

Čo sa týka relatívneho zastúpenia nenasýtenej MK s jednou dvojitou väzbou (kyselina olejová), s aplikovanou dávkou žiarenia narastá jej relatívny obsah rôznou mierou, nie proporčne. Naopak, so zvyšujúcou sa hladinou ožiarovania je jasný pokles obsahu kyseliny linolovej a kyseliny linolénovej, ktoré sú charakteristické vysokou mierou nenasýtenosti (prítomnosť dvoch, resp. troch dvojitých väzieb). Zostaveniu profilu mastných kyselín je dôležité, okrem iného, aj ako základ pre následné štúdium prchavej frakcie orechov.

#### Identifikácia markerov indukovaných ožiarením v tukovej frakcii vlašských orechov

Výsledky identifikácie a kvantifikácie nenasýtených uhlíkov ako markerov radiačného ošetrenia vlašských orechov, získané z GC/MS analýz realizovaných 2 mesiace po ožiarení, sú uvedené v tab.3.

Tab. 3: Kvantifikácia markerov radiačného ošetrenia vlašských orechov (výsledky sú uvedené v  $\mu\text{g/g}$  tuku)

Marker ožiarovania	Dávka žiarenia			
	0,5 kGy	1 kGy	3 kGy	5 kGy
6,9-heptadekadién	0,22	0,90	3,64	7,03
trans-8-heptadecén	1,50	1,18	1,93	3,91
cis-8-heptadecén	0,30	0,22	0,21	0,26

Detekcia ožiarených vlašských orechov sa overovala pre dávky 0,5 kGy a vyššie, čím sa pokrývajú komerčné aplikácie pre túto komoditu. Z výsledkov je zrejme, že kvantita 6,9-heptadekadiénu s narastajúcou hladinou ionizujúceho žiarenia sa evidentne zvyšuje. Čo sa týka predmetných polohových izomérov 8-heptadecénu, tento trend sa nepozoroval. Významné však je, že už hladina 0,5 kGy je z hľadiska detekcie radiačného ošetrenia pomocou tejto metódy preukázateľná.

#### Štúdium chemického zloženia prchavého podielu radiačne neošetrených a radiačne ošetrených vlašských orechov

Sumarizácia získaných výsledkov je uvedená v tab. 4. Zlúčeniny sú identifikované na základe MS spektier, lineárnych retenčných indexov, resp. porovnaním s literatúrou (Elmore et al., 2005) najmä pri zlúčeninách, ktorých identita nemohla byť overená prostredníctvom

štandardných referenčných látok. Z výsledkov uvedených v tab. 4 je zrejme, že prchavá frakcia vlašských orechov je tvorená komplexnou zmesou zlúčenín rôznej chemickej podstaty. Dominantnou zložkou prchavej frakcie tohto kultivaru orechov je hexanal (cca 50 rel. %. Spolu s pentanalom, 1-pentanolom a 1-hexanolom tvorí významnú skupinu lipido-derivovaných "volatiles", generovaných rozkladom kyseliny linolovej. Ďalšie oxidačné produkty kyseliny linolovej, ako napr. 1-oktén-3-ol, trans-2-heptenal signifikantne zvýšili vplyvom dávky žiarenia svoje zastúpenie. Zlúčeniny ako 1-pentén-3-ol, trans,trans-2,4-heptadienal zasa vznikajú dekompozíciou kyseliny linolénovej a opäť s hladinou ožiarovania ich obsah významne rastie. Tieto predpoklady sú v dobrej zhode so zmenou zastúpenia (poklesom) predmetných nenasýtených mastných kyselín vplyvom použitej dávky žiarenia (tab. 3). V tab. 4 je preukazný súbor látok, ktoré boli významne iniciované ožiarovaním 5 kGy (pri 0 kGy boli prítomné len v stopových množstvách, resp. nedetegované). Sú to zlúčeniny: č. 5, 8, 13, 15, 16, 17, 18, 32, 36, 38, 43, 49, 51, 53, 59, 61, 63, 66, 68, 70, 71, 74, 75, 78, 79, 80, 81, 82. Ide o 28 látok, ktoré sumárne predstavujú nárast o 9,5% v celkovom relatívnom zastúpení prchavých zlúčenín ožiarenej vzorky vlašských orechov, čím dochádza k novému prerozdeleniu jednotlivých komponentov komplexnej zmesi prchavej frakcie. Zaujímavým výsledkom je tiež skutočnosť, že vplyvom 5 kGy hladiny  $\gamma$ -žiarenia dochádza ku generovaniu pravdepodobne: **3-cykloheptenónu, 1-etyl-4-metylbenzenu, 1,3-trimetylbenzenu, cykloodekánu, 1,3-bis(1,1-dimetylyl)benzenu**, ktoré by mohli vznikáť ako dôsledok intramolekulárnej dimerizácie lipidov, spôsobenej vyššími dávkami žiarenia, čo by bolo v dobrej zhode s niektorými literárnymi odkazmi (Velíšek, 2002). Zaujímavá je situácia v zmene relatívneho zastúpenia Streckerových aldehydov vo „volatiles“ vlašských orechov po aplikovaní ožiarovania. Vo všeobecnosti Streckerove aldehydy, resp. im príbuzné metylalkoholy, odvodené z reakcií medzi aminokyselinami a sacharidmi, sú považované za významných prispievateľov k arómam. V našej štúdií sme pozorovali, že z troch identifikovaných zlúčenín predmetnej skupiny, sa každý správa po expozícii pozitívnych dávok žiarenia rôzne. Obsah 3-metyl-2-butenalu narastá zo stopového množstva v neožiarenej vzorke na 0,51% vo vzorke ožiarenej 5 kGy. Ožiarovaním predmetnou hladinou mierne narastá relatívne zastúpenie 2-metyl-2-butenalu a 3-metyl-2-hexanolu a mierne klesá obsah 2-metyl-1-butanolu a 2-metyl-2-pentenu. V tejto súvislosti je dobré pripomenúť, že uvedená dávka žiarenia

predstavuje len veľmi miernu hladinu ionizujúceho žiarenia, čo by sa nemalo markantne prejaviť na zmene obsahov jednotlivých komponentov. Na druhej strane, niektoré prítomné aromatické látky (prevažne produkty autooxidácie tukov) už stopovou koncentráciou (podľa jednotlivého prahu vnemu tej-ktorej zlúčeniny) môžu signifikantne ovplyvňovať -spravidla negatívne-senzorické vlastnosti (vôňu a chuť) orechov.

Zhrnúc výsledky diskutovaných analýz prchavej frakcie vlašských orechov a porovnaním s publikovanými údajmi možno skonštatovať, že skupina karbonylových zlúčenín je dôležitá pre arómu vlašských orechov a látky typu hexanal, 2,3-pentadión, pentanal, 2-metyl-2-pentenal ju budú najviac ovplyvňovať (Maarse, 1991).

**Tab. 4:** Profil prchavých aromatických látok vlašských orechov radiačne neošetrených a ožiarených 5 kGy (SPME v spojení s GC/MS, RI<sup>U1</sup>=lineárne retenčné indexy namerané na kolóne Ultra 1)

Č.	RI <sup>U1</sup>	Zlúčenina	Plocha (rel,%)	
			0 kGy	5 kGy
1	660,7	1-pentén-3-ol	0,18	1,03
2	667,9	2,3-pentándion + pentanal	4,78	4,25
3	684,1	1-heptén + cis-3-heptenol	0,50	4,05
4	700	heptán	0,11	1,01
5	704	1-heptyn	nedeteg.	0,61
6	715,5	2-metyl-2-butenal	0,91	1,2
7	720,2	2-metyl-1-butanol	0,50	0,25
8	722,6	3-metyl -2-butenal alebo trans-2-pentenal	stopy	0,51
9	746,9	1-pentanol	9,01	7,72
10	760	3-metyl-2-hexanol	0,35	0,48
11	722,4	hexanal	50,74	43,58
12	800	oktán	0,67	1,59
13		2-oktén (neznámy izomér)	nedeteg.	0,34
14	818	2-metyl-2-pentenal	1,05	0,78
15		2-oktén (neznámy izomér)	nedeteg.	0,98
16		cis-cis-3,5-oktadién	nedeteg.	0,17
17		<b>3-cykloheptenón</b> alebo 1,3-oktadién	<b>nedeteg.</b>	<b>0,55</b>
18	822,8	trans-2-hexenal	stopy	0,01
19	842,3	etylbenzén	0,07	0,05
20	850,8	1-hexanol	10,69	8,86
21	860,5	2-metylbutylacetát	0,16	0,13
22	865,6	2-heptanón	0,56	0,63
23		styrén	0,43	0,24
24	873,4	o-xylén	0,34	0,21
25	876,1	heptanal	1,35	1,61
26		neznáma	0,10	stopy
27		1-nonén	0,19	0,45
28		metoxy-fenyl-oxime <sup>a</sup>	1,38	0,29
29	900	nonán	0,15	0,47
30	907,1	metyl hexanoát	0,28	0,59
31		3-etylcyklopentanón	0,07	0,05
32	923,9	benzaldehyd	stopy	0,08
33	926,6	alfa-pinén	0,77	0,24
34	927,3	trans-2-heptenal	0,67	2,29
35		1-etyl-3(alebo 2)-metylbenzén	0,08	0,06
36		<b>1-etyl-4-metylbenzén</b>	<b>nedeteg.</b>	<b>0,04</b>
37		3,5 alebo 4,5-dimetyldihydro-2(3H)-furanón	0,16	stopy
38		<b>1,3,5-trimetylbenzén</b>	<b>nedeteg.</b>	<b>0,08</b>
39	953,3	1-heptanol	0,36	0,35
40		neznáma	0,91	0,5
41	960,7	2,3-oktándiön	0,29	0,17



## Potravinarstvo

Č.	RI <sup>U1</sup>	Zlúčenina	Plocha (rel,%)	
			0 kGy	5 kGy
42	962,9	1-oktén-3-ol+beta-pinén	0,94	2,71
43		trans,trans-2,4-heptadienal <sup>a</sup>	nedeteg.	0,1
44	967,2	kyselina hexánová	0,15	0,12
45	967,8	2-oktanón	0,29	0,02
46		1,2,3- alebo 1,3,5-trimetylbenzén	0,54	0,14
47	977,5	2-pentylfuran	1,12	0,67
48	979,1	oktanal	1,79	1,18
49		1,4-oktadién	nedeteg.	1,22
50		kyselina heptánová <sup>a</sup>	1,64	stopy
51		1-decén	nedeteg.	0,76
52	995,7	hexyl acetát	0,05	stopy
53	1000	dekán	stopy	0,28
54	1001,3	3-karén	0,82	0,57
55	1018,1	2-metyl-2-heptenal + D-limonén	0,19	0,12
56		vinyl hexanoát	0,29	0,22
57	1030	trans-2-oktenal	0,99	0,99
58		3,5-oktadién-2-ón (neznámy izomér)	0,07	0,12
59		2-oktenol (neznámy izomér)	nedeteg.	0,09
60	1054,3	1-oktanol	0,22	0,21
61		2,3,5,6-tetrametyl pyrazín <sup>a</sup>	nedeteg.	0,02
62		(2cis)-3-metyl-2-pentenol + p-etylstyren <sup>a</sup>	1,15	0,77
63		m-etylstyren	stopy	0,11
64		neznáma	0,17	0,17
65	1081,4	nonanal	0,66	0,74
66		1-undecén	nedeteg.	0,1
67	1100	undekán	0,04	0,26
68		cis,cis-2,4-undekadién	nedeteg.	0,07
69		neznáma	0,23	0,06
70		cis-3-undecén	nedeteg.	0,04
71	1132,7	trans-2-nonenal	stopy	0,06
72	1157,4	kyselina oktánová	0,04	stopy
73	1183,4	dekanal	0,12	0,11
74		<b>cyklododekán</b>	<b>nedeteg.</b>	<b>0,08</b>
75		cis-2-dodecén	nedeteg.	0,06
76	1200	dodekán	0,08	0,22
77		neznáma	0,06	0,05
78		<b>1,3-bis(1,1-dimetylyl)benzén</b>	<b>nedeteg.</b>	<b>0,05</b>
79		neznáma	stopy	0,08
80		neznáma	stopy	0,05
81		neznáma	nedeteg.	0,07
82		trans-3-tridecén	stopy	0,06
83		5-pentyl-2(5H)-furanón <sup>a</sup>	0,09	0,06
84	1300	tridekán	0,08	0,23

<sup>a</sup>-predbežná identifikácia

### ZÁVER

V intenciách metodiky bol študovaný vplyv rôznych hladín ionizujúceho žiarenia v intervale 0 kGy – 5 kGy jednak na redukciu, resp. elimináciu prítomnej mikrobiálnej mikroflóry, ako i na zložky lipidickej a prchavej frakcie lúpaných vlašských orechov s využitím

metód plynovej chromatografie (GC/FID, GC/MS). Z mikrobiologických analýz vyplynulo, že dávka 1,5 kGy až 2 kGy ionizujúceho žiarenia je postačujúca na eliminovanie prítomnej bakteriálnej mikroflóry (CPM =  $6,0 \cdot 10^2$  KTJ.g<sup>-1</sup>) v predmetnej vzorke orechov. Čo sa týka

prítomnosti kvasiniek a plesní, na ich zlikvidovanie bola účinná hladina 0,5 kGy ionizujúceho žiarenia. S aplikovanou dávkou žiarenia boli pozorované významné zmeny v relatívnom zastúpení niektorých mastných kyselín, najmä kyseliny linolovej a kyseliny linolénovej a v nadväznosti na to aj niektoré významné zmeny v zastúpení určitých prchavých aromatických zložiek prchavej frakcie (predovšetkým hexanal, hexanol, 1-pentén-3-ol, 1-pentanol, 2-metyl-1-butanol, trans-2-heptenal, 1-oktén-3-ol). Pozornosť sa venovala aj identifikácii markerov radiačného ošetrovania vlašských orechov (špecifické nenasýtené uhľovodíky) pomocou metód GC. Ukázalo sa, že už hladina 0,5 kGy ionizujúceho žiarenia je z hľadiska detekcie radiačného ošetrovania

preukázateľná. Významná časť práce sa venovala senzorickej analýze so štatistickým vyhodnotením. Pri senzorickej analýze extrahovaných dávok ožiarenia 0, 1, 2, 3, 4 a 5 kGy sa dosiahla veľmi vysoká úspešnosť 95,2% klasifikácie. Získané výsledky v súčinnosti s multivariačným štatistickým spracovaním dát demonštrujú vysokú citlivosť senzorickeho hodnotenia ožiarovaných vlašských orechov pri predmetných šetrných a súčasne veľmi blízkych hladinách radiačného ošetrovania na základe dobre zostaveného panelu hodnotiteľov (počet hodnotiteľov, pohlavie, vek), ako aj vhodne vybraných deskriptorov, čo sa týka kvalitatívnych i kvantitatívnych ukazovateľov.

## LITERATÚRA

- ANTONELLI, A., FABBRI, C., BOSELLI, E. 1998. Modifications of dried basil (*Ocimum basilicum*) leaf oil by gamma and microwave irradiation, In *Food Chemistry*, roč. 64, 1998, č. 4, s. 485 – 489.
- BENDINI, A., GALLINA-TOSHI, T., LERCKER, G. 1998. Influence of gamma irradiation and microwaves on the linear unsaturated hydrocarbon fraction in spices, In *Zeitschrift fuer Lebensmittel Untersuchung und Forschung/Food Research and Technology*, 1998, č. 3, s. 214 – 218.
- CREWS, C. 2005. Study of the main constituents of some authentic hazelnut oils, In *J. Agric. Food Chem.*, 2005, č. 53, s. 4843 – 4852.
- CREWS, C. 2005. Study of the main constituents of some authentic walnut oils, In *J. Agric. Food Chem.*, 2005, č. 53, s. 4853 – 4860.
- ELMORE, J. S., NISYRIOS, J., MOTTRAM, D.S. 2005. Analysis of the headspace aroma compounds of walnuts (*Juglans regia* L.), In *Flavour and Fragrance Journal*, 2005, č. 20, s. 501 – 506.
- FARAG, S. E. A., ABO-ZOID, M. 1997. Degradation of the natural mutagenic compound safrole in spices by cooking and irradiation, In *Nahrung*, roč. 41, 1997, č. 6, s. 359 – 361.
- LOAHARANU, P. 1994. Status and Prospects of Food Irradiation, In *Food Technology*, roč. 48, 1994, č. 5, s. 124 – 131.
- MAARSE, H. 1991. *Volatile Compounds in Foods and Beverages*. ISBN 0-8247-8390-5. Marcel Dekker, Inc., 1991, s. 685.
- ONYENEKWE, P.C., OGBADU, G.H., HASHIMOTO, S. 1997. The effect gamma radiation on the microflora and essential oil of Ashanti pepper (*Piper quineense*) berries, In *Postharvest Biology and Technology*, roč.10, 1997, č. 2, s. 161 – 167.
- POLOVKA, M., BREZOVÁ, V., ŠIMKO, P. 2007. EPR spectroscopy II: A tool to characterize the gamma irradiated foods, In *Journal of Food and Nutrition Research*, roč. 46, 2007, č. 2, s. 75-83.
- POLOVKA, M., SUHAJ, M., SÁDECKÁ, J. 2008. Impact of gamma-irradiation on some spices (EPR/UV-VIS/GC-GC/O and microbiological analysis), In *Books of abstracts*, s. 44-51, Austrian Food Chemistry Days, Eisenstadt, Austria, May 27-30. ISBN 978-3-900554-637.
- RAFFI, J., YORDANOV, N. D., CHABANE, S., DOUFI, L., GANCHEVA, V., IVANOVA, S. 2000. Identification of irradiation treatment of aromatic herbs, spices and fruits by electron paramagnetic resonance and thermoluminescence, In *Spectrochimica Acta A*, 2000, č. 56, s. 409–416.
- SÁDECKÁ, J. 2007. Irradiation of spices – a review, In *Czech J. Food Sci.*, roč. 25, 2007, č. 5, s. 231–242.
- SÁNCHEZ-BEL, P., MARTÍNEZ-MADRID, M. C., EGEA, I., ROMOJARO, F. 2005. Oil quality and sensory evaluation of almond (*Prunus amygdalus*) stored after electron beam processing, In *J. Agric. Food Chem.*, 2005, č. 53, s. 2567 – 2573.
- SUHAJ, M., RÁCOVÁ, J., POLOVKA, M., BREZOVÁ, V. 2006. Effect of gamma-irradiation on antioxidant activity of black pepper (*Piper nigrum* L.), In *Food Chemistry*, 2006, č. 97, s. 696–704.
- SMERNICA 1999/2/ES Európskeho parlamentu a Rady z 22.februára 1999 o aproximácii zákonov členských štátov týkajúcich sa potravín a potravinových prísad upravovaných ionizujúcim žiarením
- SMERNICA 1999/3/EC Európskeho parlamentu a Rady z 22.februára 1999 o zostavení zoznamu potravín a potravinových prísad Spoločenstva, upravovaných ionizujúcim žiarením
- SMITH, J.S., PILLAI, S., 2004. Irradiation and food safety. Scientific Status Summary from Institute of Food Technologists, In *Food Technology*, roč. 58, 2004, č. 11, s. 48–55.
- STEVENSON, M. H. 1994. Identification of irradiated foods, In *Food Technology*, roč. 48, 1994, č. 5, s. 141 – 144.
- UKAI, M., SHIMOYAMA, Y. 2003. Free radicals in irradiated pepper: An electron spin resonance study, In *Applied Magnetic Resonance*, 2003, č. 24, s. 1–11.
- VARIYAR, P.S., GHOLAP, A.S., THOMAS, P. 1997. Effect of gamma irradiation on the volatile oil constituents of fresh ginger (*Zingiber officinale*) rhizome, In *Food Research International*, roč. 30, 1997, č. 1, s. 41 – 43.
- VELÍŠEK, J., 2002. *Chemie potravín 1*, ISBN 80-86659-00-3, OSSIS, Tábor 2002, s.117-154.
- YORDANOV, N. D., ALEKSIEVA, K. 2004. X- and Q-band EPR studies on fine powders of irradiated plants. New approach for detection of their radiation history by using Q-band EPR spectrometry, In *Radiation Physics and Chemistry*, č. 69, 2004, s.59–64.

**PodĎakovanie:** Táto práca bola riešená v rámci projektu VMSP-P 0089-09 podporovaného agentúrou APVV a projektu „Vybudovanie HiTech centra pre výskum vzniku, eliminácie a hodnotenia prítomnosti kontaminantov v potravinách“, na základe podpory operačného programu Výskum a vývoj financovaného z Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

Priemyselná 4, 824 75 Bratislava, Tel.: 02/ 502 37 194, e-mail: kolek@vup.sk

Ing. Janka Koreňová, Výskumný ústav potravinársky, Priemyselná 4, 824 75 Bratislava, Tel.: 02/ 502 37 156, e-mail: korenova@vup.sk

Ing. Janka Lopašovská, Výskumný ústav potravinársky, Priemyselná 4, 824 75 Bratislava, Tel.: 02/ 502 37 161, e-mail: lopasovska@vup.sk

**Kontaktná adresa:**

Ing. Jana Sádecká, Výskumný ústav potravinársky, Priemyselná 4, 824 75 Bratislava, Tel.: 02/ 502 37 197, e-mail: sadecka@vup.sk

Ing. Emil Kolek, PhD., Výskumný ústav potravinársky,

**PRÍPRAVA A ANALÝZA OXIDOVANÝCH METABOLITOV KYSELINY ARACHIDÓNOVEJ**

**OXIDISED METABOLITES OF ARACHIDONIC ACID: PREPARATION AND ANALYSIS**

*Ján Šajbidor*

**ABSTRACT**

Oxidised derivatives of arachidonic acid were prepared and analysed by GC/MS technique. Arachidonic acid was transformed by soya homogenate to trihydroxyeicosatrienoic structures: 11,14,15-trihydroxy-5,8,12-eicosatrienoic; 11,12,15-trihydroxy-5,8,13-eicosatrienoic and 13,14,15-trihydroxy-5,8,11-eicosatrienoic acids as products of enzyme conversion. All these structural derivatives are usable in pharmacy and medicine.

**Keywords:** arachidonic acid, eicosanoids, prostaglandins, soya

**ÚVOD**

Polyénové kyseliny sú mastné kyseliny s dvoma a viacerými dvojitými väzbami v reťazci. Sú zložkami veľkej skupiny lipidov, ktorú ako základnú stavebnú a energetickú štruktúru môžeme nájsť prakticky vo všetkých živých organizmoch. Súčasťou biochemických premien polyénových kyselín je ich oxidácia, pri ktorej vznikajú biologicky aktívne látky, ktoré sa môžu ďalej cyklizovať, alebo štiepiť na nenasýtené aldehydy a alkoholy. Najvýznamnejšou skupinou polyénov sú eikozanoidy. Eikozanoidy sú odvodené od kyseliny arachidónovej (AA, 20:4, ω-6), alebo príbuzných polynenasýtených mastných kyselín. Patria medzi ne aj produkty cyklooxygenázovej, lipoxygenázovej a cytochróm P-450 monooxygenázovej metabolickej dráhy, ktoré zaraďujeme medzi prostaglandíny, tromboxány, leukotriény, lipoxíny a rôzne hydroxy-, hydroperoxy- a epoxy- mastné kyseliny (Bustos a et al., 1997). Je to veľmi rôznorodá skupina látok, z ktorých väčšina vzniká z AA. Ich výskyt sa spája s so

zápalovými procesmi, horúčkou, trombózou, alergickou a imunitnou odpoveďou (Schera a Pillinger, 2005). Pôvodne sa predpokladalo, že prostaglandíny a im podobné zlúčeniny sa vyskytujú iba u vyšších živočíchov. Prvou prácou popisujúcou transformáciu polyénov na prostaglandínom podobné látky enzýmami neživočíšneho pôvodu bol patent Beala et al., (1966). V r.2002 Schneider a et al., zistili prítomnosť acetylovaného derivátu PGE2 v korale Plexaura homomalla. Bild et al., (1978) uvádzajú že sójová lipoxygenáza transformuje AA, pričom sa vytvára prostaglandín PGF2α. PGE boli nájdené v cibuli (Claeys a et al., 1986), známe sú tzv. „PG like compounds“ hmyzu (Blomquist et al., 1991), morských organizmov (Miyaoka et al., 2005) i mikroorganizmov (Lamačka a Šajbidor 1998). Výskytu prostaglandínov v nižších organizmoch sa venuje review (Lamačka a Šajbidor, 1995).

**Tab. 1:** Metódy analýzy oxidovaných eikozanoidov rôzneho pôvodu

Organizmus	Oxidovaný eikozanoid	Metódy analýzy	Literatúra
Riasy rodu <i>Gracilaria</i> a <i>Hypnea</i>	prostaglandíny	chromatografia	ICHIRO et al., (1991, 1992)
<i>Lithothamnion corallioides</i> <i>Lithothamnion calcareum</i>	etylestery kyselín: 13-HETE a 13-HEPE, 8-hydroxy-13-oxo-5,9-11,14-eikozatetraénovej	NMR	GUERRIERO et al., (1990)
<i>Rhodophyta</i>	12-HETE, 12-HEPE, 6E-LTB4, hepoxilín B3, 12R 13S-DiHETE a iné	HPLC, MS, NMR	GERWICK (1993)

Tab. 1: (pokračovanie)

Organizmus	Oxidovaný eikozanoid	Metódy analýzy	Literatúra
<i>Acanthamoeba castellanii</i>	prostaglandíny	chromatografia	HADAS (1988)
<i>Tetrahymena species</i>	PGB, E, F	RIA	CSABA a NAGY (1987)
<i>Aloe vera</i>	PGE <sub>2</sub> , TXB <sub>2</sub> , iné prostanoidy	rádiometrická analýza	AFZAL et al., (1991)
Sója	15S-HPETE, PGF <sub>2α</sub> pri špec. podmienkach - LX	RIA, GC-MS	GARDNER (1991)
Hmyz	hlavne PGE <sub>2</sub> , PGF <sub>2α</sub>	hlavne GC-MS	BLOMQUIST et al., (1991)
<i>Tethys fimbria</i>	tri PG-1,15-laktóny PGE <sub>3</sub> a PGE <sub>2</sub>	HPLC, NMR	DIMARZO et al., (1991)
Morské živočíchy a iné vyššie a nižšie stavovce	PG merané ako PGE <sub>2</sub> alebo PGE <sub>3</sub> a iné	bioanalýza (svalstvo žalúdka potkana)	GERWICK (1993)

## MATERIÁL A METÓDY

10 g sójových bôbov sme nechali cez noc namočených vo vode (90 ml) pri laboratórnej teplote. Napučanú sóju sme oddelili dekantáciou a zhomogenizovali v 80 ml 0,05M fosfátového tlmivého roztoku (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 6,80 g/l, NaOH 1,7 g/l, pH=7,7, teplota 5-10°C) 3 min v mixéri. Homogenát sme kvantitatívne preniesli do odmerného valca a tlmivým roztokom, doplnili na objem 100 ml. Do troch 250 ml kultivačných baniek sme odpipetovali po 1ml zriedeného homogenátu, pridali 49 ml tlmivého roztoku a pH upravili na 7,4. pomocou 1M NaOH. V slepom pokuse sme homogenát v banke povarili 2 min. Po ochladení na 0-5°C sme pridali 90 µl etanolu a 3 µl AA. Pri transformačnom experimente sme k homogenátu v banke, ktorý bol ochladený na 0-5°C pridali 90 µl etanolu a 3 µl AA. Všetky banky sme potom umiestnili na 3 h na závesnú rotačnú trepačku (3 Hz) a inkubovali pri 28°C. Po skončení transformácie sme obsah baniek okyslili 5M HCl na pH = 3 a extrahovali dichlórmetánom (2 x 50 ml). Po prefiltrovaní extraktu cez bezvodý síran sodný sme rozpúšťadlo odparili za vákuu a odparok rozpustili v 1 ml chloroformu. 500 µl tohto roztoku sme delili na tenkej vrstve (Silufol, 20 x 20 cm) v sústave n-heptán : dietyléter : kyselina octová = 70:30:1 (v/v). Látky, ktoré ostali na štarte boli zo silikagélu extrahované zmesou metanol : chloroform = 2:1 (v/v), (3 x 6 ml) a rozpúšťadlo sme odľákali v prúde dusíka. Získané metabolity sme po derivatizácii analyzovali systémom GC/MS. Eikozanoidy boli analyzované po prevedení hydroxy-, keto- a karboxylových skupín na trimetylsilyléterové, O-metyloxímové a metylesterové deriváty. Derivatizáciu sme uskutočňovali nasledovným postupom (PACE-ASCIK, 1989):

**Metylestery:** Ku vzorke zbavenej rozpúšťadiel sme pridali 0.5 ml roztoku diazometánu (pripraveného z N-metyl-N-nitrózo-p-toluénsulfónamidu v zmesi éter : metanol (9:1, v/v). Obsah sme dôkladne premiešali a nechali reagovať

30 min pri laboratórnej teplote. Po skončení reakcie boli rozpúšťadlá odľákané dusíkom do sucha.

**O-metyloxímy:** K suchej vzorke sme pridali 50 µl roztoku metoxyamínhydrochloridu v pyridíne (20 mg/ml) a inkubovali 1h pri 60°C (prípadne nechali reagovať cez noc pri laboratórnej teplote). Po skončení reakcie sme rozpúšťadlo odľákali dusíkom, pridali 20 µl vody a metylestery-metyloxímy sme extrahovali 2 x 50 µl etylacetátu. Rozpúšťadlo sme opäť odľákali v prúde dusíka.

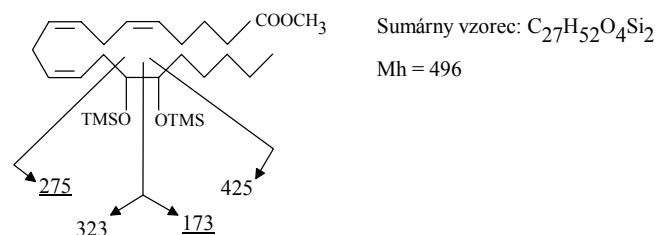
**Trimetylsilylétery:** K suchej vzorke sme pridali 100 µl bis-(trimetylsilyl)-trifluoroacetamidu (BSTFA) a inkubovali 15 min pri 60°C (alebo nechali reagovať cez noc pri laboratórnej teplote). Po skončení reakcie sme BSTFA odľákali prúdom dusíka. Derivatizovanú vzorku sme rozpustili v heptáne a analyzovali metódou GC/MS za týchto podmienok:

Prístroj: GC/MS 25RFA (Kratos Analytical, Manchester)  
 Kolóna: CP Sil 8CB (Supelco, USA), dĺžka - 25 m, vnútorný priemer - 0.32 mm, hrúbka fázy - 0,12 µm  
 Prietok He: 1 ml/min  
 Nástrek: 1 µl heptánového roztoku, splitless (30 s)  
 Teplota injektora: 250°C  
 Teplotný program: 80°C (1 min), 10°C/min - 250°C  
 Spôsob ionizácie: elektrónovým nárazom (EI), energia elektrónov: 70 eV  
 Teplota iónového zdroja: 240°C  
 Rýchlosť scanu (rozvoja spektra): 0,6s/dekáda

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

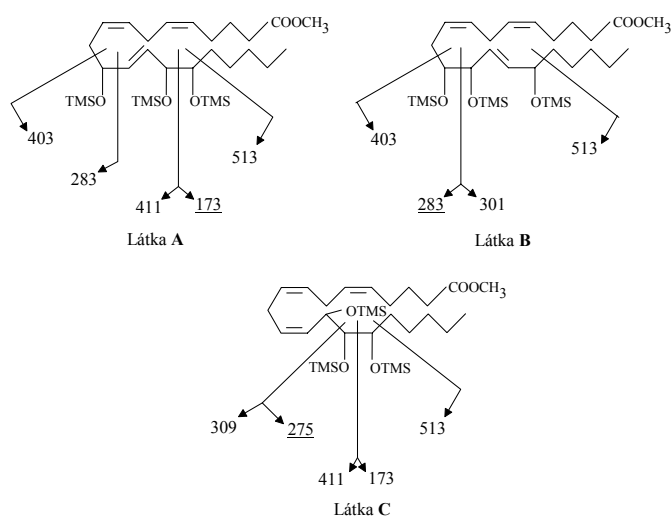
Keďže sójový homogenát intenzívne transformoval exogénnu AA na polárne, PG-podobné látky (po 1 h biotransformácie bol stupeň premeny AA asi 21%), pokúsili sme sa identifikovať jednotlivé sójové AA metabolity. Interpretácia záznamu GC/MS vyhovuje fragmentačným schémam uvedené nižšie.

**Ob. 1:** Fragmentačná schéma pre MeTMS derivát 14,15-dihydroxy-5,8,11-eikozatriénovej kyseliny. Majoritné ióny sú podčiarknuté.



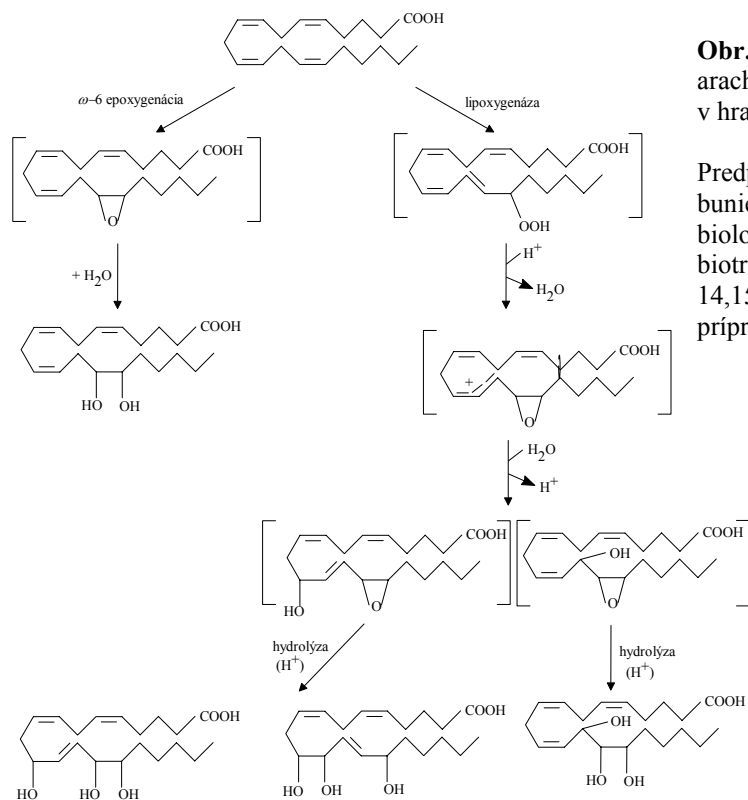
Sumárny vzorec:  $C_{30}H_{60}O_5Si_3$

Mh = 584



**Obr. 2:** Štruktúra a fragmentácia MeTMS derivátov kyselín 11,14,15-trihydroxy-5,8,12-eikozatriénovej (A); 11,12,15-trihydroxy-5,8,13-eikozatriénovej (B) a 13,14,15-trihydroxy-5,8,11-eikozatriénovej (C). Základné ióny sú podčiarknuté.

Pomocou GC/MS analýzy sme zistili syntézu oxidovaných foriem AA. Ako hlavné produkty transformácie sme identifikovali dihydroxy- a trihydroxyeikozatriénové kyseliny. Spomedzi dihydroxy derivátov sme identifikovali diastereoizoméry kyseliny 14,15-dihydroxy-5,8,11-eikozatriénovej (14,15-DiHETrE). Predpokladáme, že biosyntéza tejto látky prebieha cez 14,15-epoxyderivát, ktorého hydrolyzou (pôsobením hydroláz alebo v procese izolácie) vzniká dihydroxykyselina.



**Obr. 3:** Predpokladaný metabolizmus kyseliny arachidónovej sójovým homogenátom. Zlúčeniny uvedené v hranatých zátvorkách neboli identifikované.

Predpokladá sa, že tento eikozanoid ovplyvňuje adhéziu buniek a okrem toho sa u EpETrEs zistil celý rad iných biologických účinkov. Vhodným vedením procesu biotransformácie AA sójou je možné reakciu zastaviť na 14,15-EpETrE a vytvoriť tak alternatívny postup na prípravu tejto farmakologicky zaujímavej kyseliny.

## LITERATÚRA

AFZAL, M., ALI, M., HASSAN, R. A., SWEEDAN, N., DHAMI, M. S. 1991. Identification of Some Prostanoids in Aloe vera Extracts, *Planta Med.*, 57, 38-40

BEAL, P. F., FONKEN, G. S., PIKE, J. E. 1966. Microbiological conversion of unsaturated fatty acids. US Patent 3290226

BILD, G. S., BHAT, S. G., RAMADOSS, C. S., AXELROD, B. 1978. Biosynthesis of a prostaglandin by a plant enzyme. *J. Biol. Chem.* 253, 21-23

BLOMQUIST, G. J., BORGESON, C. E., VUNDLA, M. 1991. Polyunsaturated fatty acids and eicosanoids in insects. *Insect Biochem.* 21, 99-106

BUSTOS, M., COFFMAN, T. M., SAADI, S., PLATT, J. L. 1997. Modulation of eicosanoid metabolism in endothelial cells in a xenograft model. Role of cyclooxygenase-2. *J. Clin Invest.* 1; 100, 1150-1158

CLAEYS, M., ÚSTÜNES, L., LAEKEMAN, G., HERMAN, A. G., VLIETINCK, A. J., ÖZER, A. 1986. Characterization of prostaglandin E-like activity isolated from plant source (*Allium cepa*), *Prog.Lipid Res.*, 25, 53-58

CSABA, G., NAGY, S. U. 1987. Presence (HPL, prostaglandin) and absence (triiodothyronine, thyroxine) of hormones in *Tetrahymena*: experimental facts and open questions, *Acta Physiol. Hung.*, 70, 105-110

DIMARZO, V., CIMINO, G., CRISPINO, A., MINARDI, C., SODANO, G., SPINELLA, A. 1991. A novel

multifunctional metabolic pathway in a marine mollusk leads to unprecedented prostaglandin derivatives (prostaglandin 1,15-lactones), *Biochem. J.* 273, 593-600

GARDNER, H. W. 1991. Recent investigations into the lipoxygenase pathway of plants, *Biochim. Biophys. Acta*, 1084, 221-39

GERWICK, W. H. 1993. Carbocyclic oxylipins of marine origin, *Chem. Rev.*, 93, 1807-1823

GUERRIERO, A. D., AMBROSIO, M., PIETRA, F. 1990. Novel Hydroxyicosatetraenoic and Hydroxyicosapentaenoic Acids and a 13-Oxo Analog. Isolation from a Mixture of the Calcareous Red Algae *Lithothamnion corallioides* and *Lithothamnion calcareum* of Brittany Waters, *Helv. Chim. Acta* 73, 2183-2189

HADAS, E. 1988. Biosynthesis of prostaglandins in pathogenic and nonpathogenic strains of *Acanthamoeba castellanii*, *Acta Protozool.*, 27, 61- 65

ICHIRO, N., KAZUHIKO, S., MASAHISA, T. 1991. Methods for producing prostaglandins and for purifying the same, *European Patent* 0424915

ICHIRO, N., KAZUHIKO, S., MASAHISA, T. 1992. Purification of prostaglandins from the far east seaweed *Gracilaria verrucosa* using nonpolar porous resins, *Japan Patent* 04112866

LAMAČKA, M., ŠAJBIDOR, J. 1995. The occurrence of prostaglandins and related compounds in lower organisms, *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 52, 357-64

LAMAČKA, M., ŠAJBIDOR, J. 1998. The content of prostaglandins and their precursors in *Mortierella* and *Cunninghamella* species, *Lett Appl Microbiol.*, 26, 224-226

MIYAOKA, H., HARA, Y., SHINOHARA, I., KUROKAWA, T., YAMADA, Y. 2005. Synthesis and structural revision of marine eicosanoid agardhilactone, *Tetrahedron Lett.*, 46, 7945-7949

PACE - ASCIAK, C. R. 1989. Mass spectra of prostaglandins and related compounds. *Advances in Prostaglandin, Thromboxane and Leukotriene Research*, Raven Press, New York, p. 565

SCHERA, J. U., PILLINGERA, M. H. 2005. 15d-PGJ<sub>2</sub>. The anti-inflammatory prostaglandin? *Clinical Immunol.*, 114, 100-109

SCHNEIDER C., MANIER, M. L., HACHEY, D. L., BRASH, A. R. 2002. Detection of the 15-acetate of prostaglandin E<sub>2</sub> methyl ester as a prominent component of the prostaglandins in the gorgonian coral *Plexaura homomalla*, *Lipids* 37, 217-21

**Pod'akovanie:** Práca bola podporená grantom APVV 0310-06

**Adresa:** Ján Šajbidor, Fakulta chemickej a potravinárskej technológie STU v Bratislave, Radlinského 9, 812 37 Bratislava, jan.sajbidor@stuba.sk

## CHEMICKÁ A BIOCHEMICKÁ ANALÝZA KVASINIEK *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* KMEŇ KÖLN, 612 A GÖYNG

## CHEMICAL AND BIOCHEMICAL ANALYSIS OF YEAST *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* STRAIN KÖLN, 612 AND GÖYNG

*Silvia Šillerová, Anežka Poláková, Dana Urminská, Eva Szabová*

### ABSTRACT

In this study three strains of *Saccharomyces cerevisiae* Köln, 612 and Gyöng were analysed. The experiment focused on chemical and biochemical analysis of yeasts. The strain Köln contained the highest amount of proteins (49 %) and lipids (5.88 %). It was found that the strain Gyöng contains up to 1.5 % saccharides. Vitamin B<sub>2</sub> is the most widely occurring vitamin in these strains with the highest content noted in strain Köln (0.02 %). Analysis also showed that microelements such as Zn, Fe, Cu and Mn are the most prevalent in the strain Köln, too. As a result, it may be stated that composition of yeasts may be a reason for their use in feed and food industries.

**Keywords:** Chemical composition, yeast, *Saccharomyces cerevisiae*, biomass, analysis

### ÚVOD

Kvasinky sú celosvetovo najpoužívanejšie priemyselné mikroorganizmy, ktoré majú široké uplatnenie v potravinárskych technológiách a vo farmaceutickom priemysle. Mnohé sú využívané ako biologické modelové systémy pre štúdium metabolizmu eukaryotických buniek. Sú ľahko manipulovateľné na molekulovej úrovni, a preto sa využívajú aj pre produkciu rekombinantných proteínov (Wang, Chen, 2006).

Využitie kvasiniek je zaujímavé z nutričného hľadiska, kvôli zloženiu ich bunkovej hmoty. Chemické zloženie

kvasiniek je do značnej miery ovplyvňované zmenami v zložení kultivačného média a podmienkami kultivácie. Podľa viacerých autorov (Swanson, Fahey, 2004; Milič et al., 2007) sú však základné charakteristiky sušiny kvasiniek rovnaké vo vysokom obsahu bielkovín, sacharidov a vitamínov, kým koncentrácia tukov a minerálnych látok je relatívne nízka.

Podiel bielkovín a sacharidov sa dá ovplyvniť obsahom dusíkatých živín v živnom médiu. Albers et al., (2007) pozorovali pri nedostatku dusíka, ale v prítomnosti glukózy v živnom médiu, akumuláciu sacharidov a tukov,

zníženie obsahu voľných aminokyselín v bunkách, podstatnú redukciiu obsahu RNA a tiež zníženie obsahu bielkovín biomasy. V lipidovom zložení došlo pri nedostatku dusíka k zvýšeniu podielu nenasýtených mastných kyselín.

V populovinách kvasiniek je v najväčšom množstve zastúpený oxid fosforečný, menej draslík, horčík, vápnik a sodík, ostatné prvky sa vyskytujú v zlomkoch percenta (Šilhánková, 2009). Bunky kvasiniek obsahujú rôzne hydrofilné vitamíny vrátane tiamínu, riboflavínu, kyseliny nikotínovej, kyseliny folovej a pyridoxínu. Vitamíny plnia funkciu koenzýmov kľúčových enzýmov (Abramov et al., 2003). Špeciálne kmene *Saccharomyces cerevisiae* sa používajú na prípravu provitamínu D. Ergosterol je prítomný vo všetkých bunkových membránach kvasiniek, je nevyhnutný pre správnu fluiditu a funkciu bunkových membrán

(Endo et al., 2009; Šilhánková, 2009).

Chemickou analýzou troch kmeňov *Saccharomyces cerevisiae* sme sa snažili poukázať na možnosti využívania kvasiniek ako suplementov humánnej výživy z hľadiska biochemicky významných látok prítomných v týchto mikroorganizmoch.

## MATERIÁL A METODIKA

### Biologický materiál

V spolupráci so Slovenskými liehovarmi a likérkami, a.s., Leopoldov, boli do výskumu zaradené mikroorganizmy *Saccharomyces cerevisiae*, konkrétne kmene Kolín, Gyöng a 612.

### Podmienky kultivácie mikroorganizmov

Podľa viacerých autorov (Jones, Kompala, 1999; Kompala, 1999; Stanbury et al., 2000) je vhodným kultivačným postupom pre kvasinky **submerzná kultivácia**. Vsádzková kultúra je uzatvorený systém kultúry, ktorý obsahuje začiatkové, limitujúce množstvo živín. Zloženie kultivačného média sa priamo odráža vo fyziologickom fenotype a charakteristikách pestovanej kultúry, ktoré následne vplývajú na výsledky analýz a zároveň na priemyselné využitie mikroorganizmov (Hahn-Hägerdal et al., 2005). Pre základnú kultiváciu kvasiniek bolo použité YPD (Yeast Peptone Dextrose) médium s nasledovným zložením:

- 10 g.dm<sup>-3</sup> kvasničného autolyzátu (ImunnaPharm),
- 20 g.dm<sup>-3</sup> peptónu pre bakteriológiu (ImunnaPharm),
- 20 g.dm<sup>-3</sup> glukózy (ImunnaPharm) (Jinping et al., 2008).

Optimalizácia zloženia kultivačného média sa realizovala pridávaním glukózy v koncentráciách 20 g.dm<sup>-3</sup> až 45 g.dm<sup>-3</sup>. Cieľom optimalizácie zdroja uhlíka v kultivačnom médiu bolo získanie čo najväčšieho výťažku kvasinkovej biomasy. Kultivácia prebiehala za aeróbnych podmienok pri teplote 30 °C na rotačnej závesnej trepačke (280 ot.min<sup>-1</sup>) počas 48, 72 a 96 hodín.

### Použitie metódy

Základnou separačnou metódou bolo **odstredovanie**, ktorým sa v podobe sedimentu oddelili od živného média mikrobiálne bunky. Pre získanie čistej biomasy bolo potrebné opakované premývanie živného média destilovanou vodou a následné odstredovanie. Sediment

buniek bol stabilizovaný **lyofilizáciou**. Podstatou je sublimácia rozpúšťadla zo zmrazenej vzorky, ku ktorej dochádza vo vákuu. Získané preparáty si zachovávajú svoje biologické vlastnosti a môžu sa skladovať bez straty biologickej aktivity (Káš et al., 2006). Získaná sušina kvasinkovej biomasy bola analyzovaná v akreditovanom laboratóriu EL spol. s r.o. v Spišskej Novej Vsi, za účelom získania podrobných údajov o chemickom zložení kvasiniek, s cieľom ich ďalšieho využitia pre prípravu aditív obohatených o esenciálne minerálne prvky, najmä Se a Zn. Pre analýzu bielkovín bola použitá Kjeldahlova metóda, gravimetrickou analýzou bol vyhodnotený obsah tukov, spektrofotometriou UV/VIS boli analyzované monosacharidy a β-karotén, obsah vitamínov skupiny B bol určený vysokoúčinnou kvapalinovou chromatografiou s diodovým poľom (HPLC/DAD), atómovou absorpčnou spektrofotometriou s využitím hydridového generátora (HG-AAS) bol analyzovaný selén, a pre ostatné mikroelementy bola použitá atómová emisná spektrofotometria s indukčne viazanou plazmou (AES-ICP).

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

Kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* kmeň Kolín, Gyöng a 612 boli kultivované v aeróbnych podmienkach v živnom médiu YPD, v ktorom bola použitá počítačová koncentrácia glukózy v médiu 2 %, na základe informácií z viacerých literárnych zdrojov (Kuranda, Robbins, 1991; Zyracka et al., 2005; Jinping et al., 2008). S cieľom optimalizovať zloženie živného média a dobu kultivácie, sme kvasinky kultivovali 48, 72 a 96 hodín v prostredí

so zvyšujúcou sa koncentráciou glukózy do 4,5 %. Najvyššia produkcia biomasy sa dosiahla kultiváciou kmeňa Kolín po 48 hodinách v médiu s 3 % koncentráciou glukózy (Tab. 1). Predĺžením kultivačnej doby množstvo biomasy klesalo. Najvýraznejšie sa to prejavilo práve pri 3 % glukóze, kde počas 96 hodín bol zaznamenaný pokles až o 39 %. Najvyššie množstvo biomasy kvasiniek kmeňa 612 sa získalo kultiváciou v médiu so 4 % a 4,5 % glukózou a kultiváciou kmeňa Gyöng v médiu so 4,5 % glukózou po 72 hodinách kultivácie. Tieto množstvá však predstavovali priemerne iba 73 % z výťažku kmeňa Kolín. Z pohľadu ekonomiky procesu je kmeň Kolín najvhodnejším pre produkciu kvasinkovej hmoty. Zastúpenie základných živín v získanej biomase jednotlivých kmeňov kvasiniek je prezentované na Obr. 1. Kultivované kvasinky obsahujú priemerne 45,7 % bielkovín, čo umožňuje ich využitie pri suplementácii bielkovín. Kvasinky obsahujú päťkrát viac bielkovín ako obilniny, pričom biologická hodnota týchto bielkovín je vysoká vďaka prítomnosti aminokyselín s obsahom síry (Úrgeová, Marecová, 2003). Podľa Šilhánkovej (2009) obsah vody v bunkovej hmote kvasiniek je 65 % až 83 % a hlavný podiel sušiny kvasiniek tvoria bielkoviny, okolo 50 %. Lipidy tvoria asi 5,6 % analyzovanej kvasinkovej biomasy, čo je v súlade so zisteniami Bombu et al., (2000), ktorí uvádzajú, že obsah tuku v kvasinkách kolíše od 0,5 % do 9 %. Najväčším množstvom bielkovín (49 %) a lipidov (5,88 %) v bunkovej hmote sa vyznačoval kmeň

Kolín a naopak najnižšie hodnoty bielkovín a lipidov boli stanovené v kmeni Gyöng. V uvedených podmienkach kultivácie sledovaných kvasiniek bol po analýze,

v porovnaní k ostatným živinám zaznamenaný nízky obsah jednoduchých cukrov – glukózy, max. 1,551 % v kmeni Gyöng a fruktózy, max. 0,017 % v kmeni 612.

**Tabuľka 1:** Produkcia biomasy *Saccharomyces cerevisiae* kmeň Kolín, 612 a Gyöng

koncentrácia glukózy, %	doba kultivácie, hod.	Kolín hmotnosť biomasy, g.100 cm <sup>-3</sup> média	612 hmotnosť biomasy, g.100 cm <sup>-3</sup> média	Gyöng hmotnosť biomasy, g.100 cm <sup>-3</sup> média
2,0	48	1,20	1,27	1,31
2,0	72	1,15	1,22	1,24
2,0	96	1,14	1,23	1,23
2,5	48	1,40	1,49	1,45
2,5	72	1,10	1,41	1,37
2,5	96	1,30	1,39	1,43
3,0	48	2,47	1,59	1,46
3,0	72	2,00	1,53	1,56
3,0	96	1,50	1,49	1,48
3,5	48	2,37	1,58	1,50
3,5	72	2,08	1,61	1,68
3,5	96	1,60	1,60	1,64
4,0	48	1,50	1,65	1,55
4,0	72	1,57	1,78	1,70
4,0	96	1,69	1,67	1,68
4,5	48	1,43	1,63	1,55
4,5	72	1,54	1,78	1,83
4,5	96	1,72	1,64	1,73

Mikroelementy majú dôležitú úlohu v bunkovom metabolizme, primárne sú požadované ako kofaktory enzýmov, sú významné pre všetky živé organizmy, pretože iónové transportéry majú rozhodujúcu úlohu v udržiavaní ich homeostázy. Akumulácia mikroelementov v biomase kvasiniek je rozdielna, závisí od prítomnosti mnohých špecifických faktorov, ktoré sú schopné transportovať dané mikroelementy cez cytoplazmatickú membránu. Zinok, ktorý je súčasťou aktívneho centra alkoholdehydrogenázy, sa po prenose cez plazmatickú membránu ukladá v cytoplazme, odkiaľ je čerpaný do rôznych organel (mitochondria, endoplazmatické retikulum) alebo využívaný na syntézu metaloproteínov

v cytoplazme. Prebytočné množstvo Zn je skladované vo vakuolách kvasiniek (Colin et al., 2000). Z analýzy zastúpenia mikroelementov v biomase kvasiniek vyplýva, že obsah zinku sa pohyboval v intervale od 180,5 mg.kg<sup>-1</sup> do 304,8 mg.kg<sup>-1</sup> biomasy (Obr. 2), pričom množstvo bolo v jednotlivých kmeňoch veľmi rozdielne. Výrazne najvyššia koncentrácia Zn bola zaznamenaná v kmeni Kolín (304,8 mg.kg<sup>-1</sup> biomasy), čo predstavuje v porovnaní s kmeňom Gyöng (180,5 mg.kg<sup>-1</sup>) nárast o takmer 69 %.

Minimálne tri kľúčové enzýmy *Saccharomyces cerevisiae* vyžadujú prítomnosť iónov medi. Je to cytochrómoxidázový komplex, ktorého kofaktorom sú Cu<sup>2+</sup> ióny, nevyhnutný v bunkách kvasiniek kultivovaných v médiách s nesekvasiteľnými uhlíkovými zdrojmi a metaloenzýmy superoxidodismutáza, chrániaca kvasinky pred účinkom superoxidových aniónov a ferroxidáza, rozhodujúca pre príjem Fe<sup>2+</sup> (Gross a kol, 2000). Najvyššie zastúpenie medi bolo stanovené v kmeni

Kolín (16,6 mg.kg<sup>-1</sup>), kým ostatné testované kmene obsahujú iba 3,7 mg Cu.kg<sup>-1</sup> biomasy, čo predstavuje oproti kmeňu Kolín pokles o 78 %.

Selén sa v súčasnosti považuje za významný antioxidant, ktorý je integrálnou súčasťou detoxikačného enzýmu glutatiónperoxidázy. Predpokladá sa, že v ľudskom organizme môže mať ochranné účinky proti reaktívnym formám kyslíka, detoxikuje ťažké kovy, prispieva k správnej funkcii srdca, pomáha predchádzať vzniku novotvarov a pravdepodobne pôsobí proti neurodegeneratívnym zmenám, napr. pri Parkinsonovej chorobe (Chen, Berry, 2003). Z analyzovaných mikroelementov bol selén najmenej zastúpený (Obr. 2). Jeho najvyšší obsah 0,46 mg.kg<sup>-1</sup> kvasinkovej biomasy bol stanovený v kmeni 612.

Pre kvasinky je v stopových množstvách nevyhnutný mangán, ktorý je časťou niektorých enzýmov, napr. pyruvátkarboxylázy (Stehlik-Tomas et al., 2004).

Fe je v kvasinkách skladované vo vakuolách, ale aj v drobných extravakuolárnych štruktúrach. Rovnováhu železa v týchto mikroorganizmoch ovplyvňuje aktivita superoxidodismutázy (Roudeau, 2004).

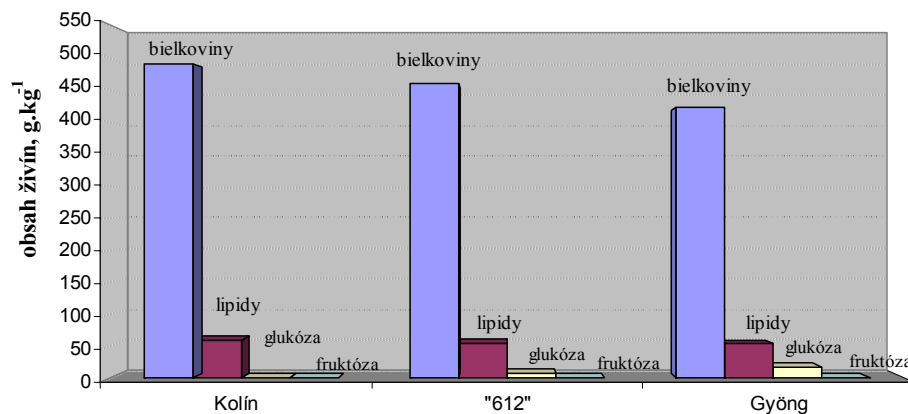
Priemerný obsah Fe v kvasinkách bol 48,1 mg.kg<sup>-1</sup> biomasy, najvyšší v kmeni Kolín (52,5 mg.kg<sup>-1</sup>) a priemerný obsah Mn bol 6,43 mg.kg<sup>-1</sup> bunkovej hmoty a opäť najvyšší v kmeni Kolín (7,3 mg.kg<sup>-1</sup>).

Kvasinky sú vo všeobecnosti známe ako zdroj vitamínov skupiny B, ktoré majú z nutričného hľadiska nezastupiteľný význam. Najvyššie množstvo vo všetkých troch kmeňoch predstavoval vitamín B<sub>2</sub> (Obr. 3), a to

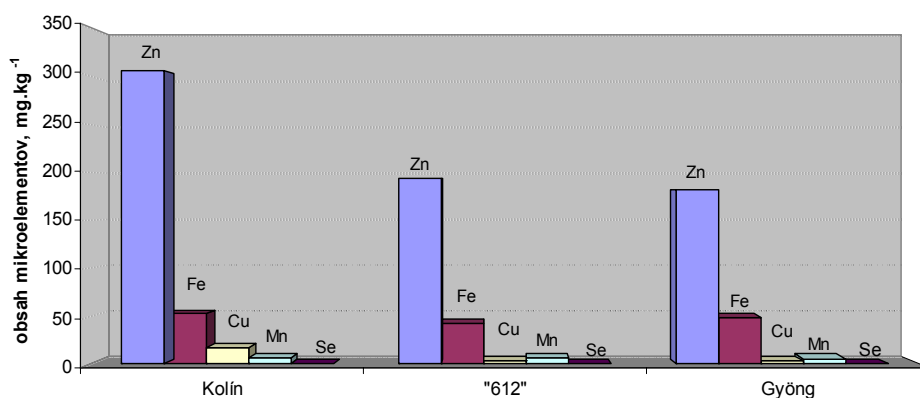


v kmeni Kolín až 20,6 mg.kg<sup>-1</sup> kvasinkovej biomasy a v kmeňoch 612 a Gyöng to bolo v priemere iba 5,35 mg.kg<sup>-1</sup> bunkovej hmoty, čo predstavuje pokles o takmer 75 %. V kmeni Kolín bolo stanovené množstvo tiamínu 1,8 mg.kg<sup>-1</sup> biomasy, kým v ostatných analyzovaných kvasinkách je obsah vitamínu B<sub>1</sub> veľmi nízky. Obsah β-karoténu a pyridoxínu bol v analyzovaných kmeňoch

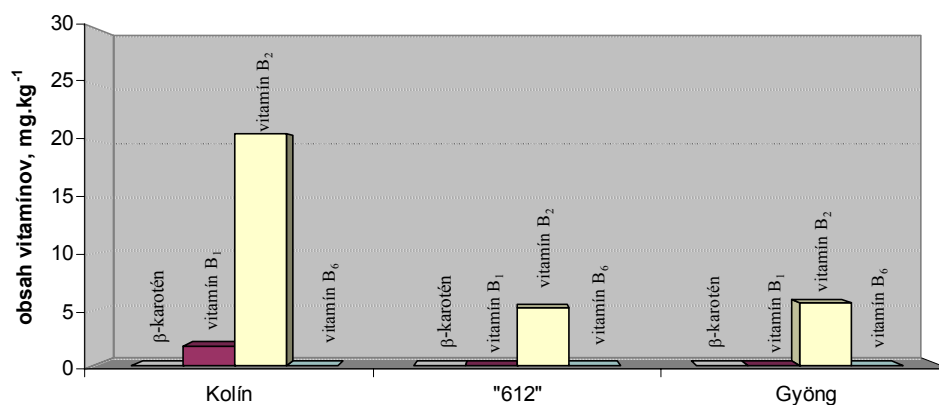
stanovený podobne, menej ako 1 mg.kg<sup>-1</sup> bunkovej hmoty. **Ůrgeová a Marecová (2003)** uvádzajú, že obsah riboflavínu v kvasinkách sa pohybuje v rozmedzí 40 – 80 mg.kg<sup>-1</sup>. Analýza potvrdila zastúpenie hydrofilných vitamínov skupiny B v kvasinkách, čo predurčuje využívať tieto mikroorganizmy vo výžive ľudí.



**Obrázok 1:** Porovnanie obsahu bielkovín, lipidov a sacharidov v kmeňoch Kolín, 612 a Gyöng



**Obrázok 2:** Porovnanie obsahu mikroelementov v kmeňoch Kolín, 612 a Gyöng



**Obrázok 3:** Porovnanie obsahu vybraných vitamínov v kmeňoch Kolín, 612 a Gyöng

## ZÁVER

Analýza získanej biomasy kvasiniek *Saccharomyces cerevisiae*, kmene Kolín, 612 a Gyöng, ukázala približne vyrovnaný a vysoký obsah bielkovín vo všetkých testovaných kmeňoch (45,7 %), vysoký obsah zinku, kmeň Kolín obsahuje tento stopový prvok v množstve 304,8 mg.kg<sup>-1</sup> biomasy, a tiež nezanedbateľný podiel ďalších mikroelementov, najmä Fe (52,5 mg.kg<sup>-1</sup>). Okrem toho sú skúmané kvasinky zdrojom hydrofilných vitamínov skupiny B, najmä riboflavínu, ktorého najvyšší obsah (20 mg.kg<sup>-1</sup>) bol stanovený v kmeni Kolín. Z hľadiska zastúpenia mikroelementov sa ako najlepší potenciálny zdroj Zn, Fe, Cu a Mn javí kmeň Kolín, ktorý má zo všetkých analyzovaných kmeňov zároveň najvyšší obsah vitamínov B<sub>1</sub> a B<sub>2</sub>. Zistené výsledky analýz troch vybraných kmeňov kvasiniek *S. cerevisiae* poukazujú na vhodnosť ich využitia pri získavaní aditív bohatých na bielkoviny, mikroelementy, najmä zinok, a tiež vitamíny B<sub>1</sub> a B<sub>2</sub>. Ako najlepší potenciálny zdroj bielkovín a esenciálnych minerálnych látok a vitamínov, bol vyhodnotený kmeň Kolín.

## LITERATÚRA

ABRAMOV, S. A., KOTENKO, S. T., RAMAZANOV, A. S., ISLAMOVA, F. I. 2003. Dependence of vitamin content in *Saccharomyces* yeasts on the composition of nutrient media. In: *Appl. Biochem. Microbiol.* 39, 2003, s. 385 – 387

ALBERS, E., LARSSON, C., ANDLID, T., WALSH, M. C., GUSTAFSSON, L. 2007. Effect of nutrient starvation on the cellular composition and metabolic capacity of *Saccharomyces cerevisiae*. In: *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 2007, s. 4839 – 4848

BOMBA, A., NEMCOVÁ, R., GANCARČÍKOVÁ, S., HERICH, R., GUBA, P. 2000. Optimalizácia probiotického efektu mikroorganizmov. In: *Slovenský veterinárny časopis* 5, 2000, s. 297 – 301

CHEN, J., BERRY, M. J. 2003. Selenium and selenoproteins in the brain and brain diseases. In: *J. Neurochem.* 86, 2003, s. 1 – 12

COLIN, W., MACDIARMID, L., GAITHER, A., EIDE, D. 2000. Zinc transporters that regulate vacuolar zinc storage in *Saccharomyces cerevisiae*. In: *EMBO J.* 19, 2000, s. 2845 – 2855

ENDO, A., NAKAMURA, T., SHIMA, J. 2009. Involvement of ergosterol in tolerance to vanillin, a potential inhibitor of bioethanol fermentation, in *Saccharomyces cerevisiae*. In: *FEMS Microbil. Lett.* 299, 2009, s. 95 – 99

GROSS, C., KELLEHER, M., IYER, V. R., BROWN, P. O., WINGE, D. R. 2000. Identification of the copper regulon in *Saccharomyces cerevisiae* by DNA Microarrays. In: *J. Biol. Chem.* 275, 2000, s. 32310 – 32316

HAHN-HÄGERDAL, B., KARHUMAA, K., LARSSON, U. C., GORWA-GRAUSLUND, M., GÖRGENS, J., VAN ZYL, W. H. 2005. Role of cultivation media in the development of yeast strains for large scale industrial use. In: *Microb. Cell Fact.* 4, 2005

JINPING, L., QINGHAI, L., ERZHENG, S., DONGZHI, W., SHENGLI, Y. 2008. Application of comparative proteome analysis to reveal influence of cultivation conditions on asymmetric bioreduction of  $\beta$ -keto ester by *Saccharomyces cerevisiae*. In: *Appl Microbiol. Biotechnol.* 80, 2008, s. 831 – 839

JONES, K. D., KOMPALA, D. S. 1999. Cybernetic model of the growth dynamics of *Saccharomyces cerevisiae* in batch and continuous cultures. In: *J. Biotechnol.* 71, 1999, s. 105 – 131

KÁŠ, J., KODÍČEK, M., VALENTOVÁ, O. 2006. Laboratorní techniky biochemie. 1. vyd. Praha : VŠCHT, 2004, 258 s. ISBN 80-7080-586-2

KOMPALA, D. S. 1999. Cybernetic modeling of spontaneous oscillations in continuous cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. In: *J. Biotechnol.* 71, 1999, s. 267 – 274

KURANDA, M. J., ROBBINS, P. W. 1991. Chitinase is required for cell separation during growth of *Saccharomyces cerevisiae*. In: *J. Biol. Chem.* 29, 1991, s. 19758 – 19767

MILIĆ, T. V., RAKIN, M., ŠILER-MARINKOVIĆ, S. 2007. Utilization of baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) for the production of yeast extract: effects of different enzymatic treatments on solid, protein and carbohydrate recovery. In: *J. Serb. Chem. Soc.* 72, 2007, s. 451 – 457

ROUDEAU, S. 2004. Metals and amyotrophic lateral sclerosis. Determination of Cu/Zn ratios in SOD mutants and chemical element imaging of cells. PhD thesis, 2004, University of Bordeaux

STANBURY, P. F., WHITAKER, A., HALL, S. J. 2000. Principles of Fermentation Technology. Oxford : Butterworth-Heinemann, 2000, 376 s. ISBN 9780750645010

STEHLIK-TOMAS, V., ZETIĆ, V. G., STANZER, D., GRBA, S., VAHČIĆ, N. 2004. Zinc, copper and manganese enrichment in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. In: *Food Technol. Biotechnol.* 42, 2004, s. 115 – 120

SWANSON, K. S., FAHEY, G. C., Jr. 2004. The role of yeasts companion animal nutrition. In *Nutritional biotechnology in the feed and food industries*. UK : Alltech, 2004, s. 475 – 484

ŠILHÁNKOVÁ, L. 2009. Mikrobiologie pro potravináře a biotechnologu. 4. vyd. Praha : Academia, 2009, 364 s. ISBN 9788020017031

ÜRGEOVÁ, E., MARECOVÁ, M. 2003. Probiotické kmene mikroorganizmov a ich účinok na hostiteľský organizmus. In: *Nova Biotechnologica*. Trnava : UCM, vol. 3, 2003, s. 145 – 157

WANG, J., CHEN, C. 2006. Biosorption of heavy metals by *Saccharomyces cerevisiae*: A review. In: *Biology Adv.* 24, 2006, s. 427 – 451

ZYRACKA, E., ZADRAĞ, R., KOZIOŁ, S., KRZEPIŁKO, A., BARTOSZ, G., BILINSKI, T. 2005. Yeast as a biosensor for antioxidants: simple growth tests employing a *Saccharomyces cerevisiae* mutant defective in superoxide dismutase. In: *Acta Biochim. Pol.* 52, 2005, s. 679 – 684.

## Kontaktná adresa:

Ing. Silvia Šillerová, Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre, Fakulta biotechnológie a potravinárstva, Katedra biochémie a biotechnológie, Trieda Andreja Hlinku 2, Tel.: 037 641 4699, E-mail: silvia.sillerova@gmail.com

Ing. Anežka Poláková, Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre, Fakulta biotechnológie a potravinárstva, Katedra biochémie a biotechnológie, Trieda Andreja Hlinku 2, Tel.: 037 641 4278, E-mail: anezka.polakova@uniag.sk

doc. RNDr. Dana Urminská, CSc., Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre, Fakulta biotechnológie a potravinárstva, Katedra biochémie a biotechnológie, Trieda Andreja Hlinku 2, Tel.: 037 641 4695, E-mail: dana.urminska@uniag.sk

Ing. Eva Szabová, PhD., Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre, Fakulta biotechnológie a potravinárstva, Katedra biochémie a biotechnológie, Trieda Andreja Hlinku 2, Tel.: 037 641 4276, E-mail: eva.szabova@uniag.sk

## STANOVENIE VYBRANÝCH $\beta$ -AGONISTOV V MLIEKU METÓDOU LC/MS/MS DETERMINATION SELECTED $\beta$ -AGONISTS IN MILK BY LC/MS/MS METHOD

*Bronislava Škarbová, Jozef Golian*

### ABSTRAKT

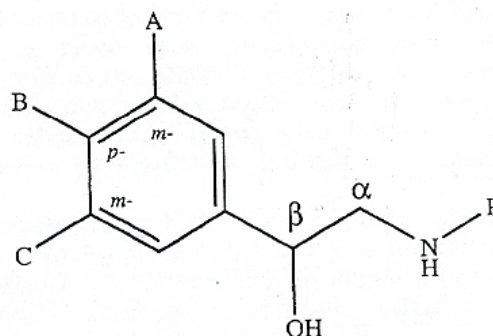
Introduced LC/MS/MS method has replaced not enough sensitive confirmation GC/MS methods for monitoring of residues of clenbuterol and salbutamol by markedly more sensitive technique in compliance with EU requirements, as well as it has extended spectrum of confirmation methods for determination of  $\beta$ -agonists by another analyt of above mentioned group, as well as by another matrix – milk and has enabled screening and confirmation of problem  $\beta$ -agonists, such as ractopamin, zilpaterol, terbutalin, cimaterol and salbutamol. Complete validation of developed method is at level of European Community standards and in compliance with Commission Decision 2002/657/EC. Accreditation of laboratory according to ISO/IEC 17025:2005, as well as careful performance of elaborated system of quality, ensures accuracy and trueness of laboratory results what is extremely important from the view of laboratory diagnostics and by that also from the point of view food safety.

**Keywords:**  $\beta$ -agonist, LC/MS/MS, clenbuterol, ractopamine, zilpaterol, milk

### ÚVOD A PREHĽAD LITERATÚRY

V súčasnosti sa veterinárne liečivá používajú v chove hospodárskych zvierat v širokom rozsahu a podávajú sa zvieratám prídavkom do napájacej vody alebo formou aditív v krmive. Vzhľadom na vysokú účinnosť liečiv sa dávky podávané zvieratám pohybujú v koncentráciách v rozsahu  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ , dôsledkom čoho je obsah ich reziduí v živočíšnych tkanivách na extrémne nízkych koncentračných úrovniach. Aj napriek skutočnosti, že v oblasti detekcie reziduí určitých kontaminantov a veterinárnych liečiv nastal v posledných rokoch obrovský progres, stále sa objavujú neobvyklé alebo doteraz neznáme látky, metabolity a zmesi, ktoré sú výzvou na vývoj nových techník na zabezpečenie bezpečnosti potravín. Popri vysoko efektívnych, spoľahlivých a cenovo prístupnejších skriningových metódach je zároveň potrebné využívať chemické inštrumentálne metódy ako z dôvodu konfirmácie pozitívnych výsledkov skriningových testov, tak aj z dôvodu sledovania látok, ktoré sa dostupnými skriningovými metódami stanoviť nedajú, alebo sú ich detekčné limity na neakceptovateľne vysokých hodnotách. Tento aspekt je najzávažnejší pri kontrole ilegálneho použitia veterinárnych liečiv, ktoré sú v rámci štátov EÚ zakázané. Medzi látky, ktoré sa nesmú podávať zvieratám určeným na produkciu potravín, patria aj  $\beta$ -agonistické liečivá. Rýchle zmeny vo vývoji nových  $\beta$ -agonistov vyvíjajú tlak na dostupnosť analytických metód, či už skriningových alebo konfirmačných, ktoré by zachytili celú škálu uvedenej skupiny látok. Niektoré známe  $\beta$ -agonistické látky a ich syntetické analógy vykazujú len malé rozdiely v chemickej štruktúre a počet ďalších možných zástupcov tejto skupiny liečiv je veľmi rozsiahly.

$\beta$ -agonisti sú fenyletanolamíny s  $\beta$ -hydroxylamino-skupinou na bočnom reťazci. Jednotlivé látky tejto skupiny liečiv sa odlišujú podľa substituentov na aromatickom kruhu a na terminálnej amino skupine.



Aromatický kruh môže byť substituovaný s hydroxylovou -OH skupinou, halogénmi -Cl, -Br, -F, aminmi -NH<sub>2</sub>, hydroxymetyl skupinou -CH<sub>2</sub>OH, kyano skupinou -CN, alebo ich rôznymi kombináciami (**Baker and Kiernan, 1983; Krüger et al., 1984; Anderson et al., 1987**).

$\beta$ -agonistické látky sa stali populárnymi v 60. rokoch minulého storočia, kedy sa ich používaním výrazne zlepšila účinnosť liečby astmatických pacientov. Zároveň sa môžu aplikovať zvieratám ako rastové promotory za účelom prírastku svalovej hmoty a s tým spojenou vysokou efektívnosťou živočíšnej produkcie (**Baker and Kiernan, 1983; Anderson et al, 1987; Dalidowitz et al., 1992**).

V Európskej únii platí striktný zákaz podávania  $\beta$ -agonistických liečiv hospodárskym zvieratám, určeným na

produkcii potravín živočíšneho pôvodu. Zákaz používania rastových promótorov (hormónov a  $\beta$ -agonistov) je ustanovený v smernici Rady 96/22/EC o zákaze používania určitých látok s hormonálnym alebo tyreostatickým účinkom a beta-agonistov pri chove dobytka. Smernica bola doplnená a pozmenená smernicou Európskeho parlamentu a Rady č. 2003/74/ES z 22. septembra 2003. Smernica Európskeho parlamentu a Rady 2008/97/ES mení a dopĺňa uvedenú smernicu obmedzením jej pôsobnosti iba na zvieratá určené na výrobu potravín, zrušením zákazu vo vzťahu k spoločenským zvieratám a upravením vymedzenia pojmu terapeutické ošetrovanie. Smernicou Rady 96/23/EC je uvedený návod na kontroly rezíduí veterinárnych liečiv u zvierat a v ich produktoch s detailne rozpracovaným postupom pre jednotlivé členské štáty pri tvorbe Národných plánov kontroly.

V analýze rezíduí veterinárnych liečiv je možné pozorovať dva základné trendy. Prvým je výber vhodnej matrice na zistenie ilegálneho podávania liečiva, druhým je výber spoľahlivých a dostatočne citlivých analytických metód. V minulosti sa na detekciu ilegálneho použitia  $\beta$ -agonistov v chovoch hospodárskych zvierat sa používali hlavne konvenčné matrice – moč, pečeň a krvná plazma (Boyd et al., 1996; Benjamin et al., 1997), neskôr boli publikované práce s detekciou  $\beta$ -agonistov v srsti a v retine (Popot et al., 2001; Stachel et al., 2003). Po posledných škandáloch spojených s mäsom a mäsovými produktmi sa do popredia dostáva konzumácia alternatívnych potravín (vajcia, ryby, mlieko, med), čo zvyšuje nároky na kontrolu rezíduí aj v týchto komoditách. Publikácie venované stanoveniu  $\beta$ -agonistov v mlieku sú pomerne zriedkavé (Jones et al., 1999) a uvádzané detekčné limity pre jednotlivé analyty sú vysoko nad stanovenými hodnotami MRPL.

V rámci EÚ nie je povinné používať na kontrolu rezíduí u zvierat produkujúcich potraviny, v potravinových produktoch živočíšneho pôvodu a v krmivách štandardizované analytické metódy a na ich výber sa uplatňuje pomerne vysoký stupeň flexibility. Na výber reziduálnych metód sú však technické kritériá a požiadavky na ich pracovné charakteristiky ako úroveň detekcie, selektivita, špecifita, ako aj kritériá pre konfirmačné metódy sú striktné ustanovené v Rozhodnutí Komisie 2002/657/EC (Stolker et al., 2007).

Kontrola látok skupiny A, do ktorej patria aj  $\beta$ -agonisti, je najviac kritická, nakoľko ide o zakázané látky a tým vzrastá potreba uplatnenia najcitlivejších a zároveň dostatočne spoľahlivých metód za účelom dosiahnutia čo najnižších detekčných limitov. Pozitívne výsledky dosiahnuté skriningovými metódami musia byť potvrdené vhodnými konfirmačnými metódami.

Niektoré analyty nie je možné stanoviť dostupnými skriningovými testami (ELISA, RIA, biosenzory) buďto vôbec alebo sú ich detekčné limity na neakceptovateľne vysokých koncentračných úrovniach. V týchto prípadoch je potrebné použiť vhodné inštrumentálne analytické techniky ako GC/MS/MS alebo LC/MS/MS ako na konfirmačné, tak aj na skriningové účely (Van Hoof et al., 2005, Stachel et al., 2003).

V súčasnosti je v oblasti kontroly rezíduí veterinárnych liečiv trend vývoja skriningových a konfirmačných metód na princípe LC/MS/MS (Stolker and Brinkman, 2005;

De Brabander et al., 2007) Jednostupňové LC/MS analýzy sa používajú na skriningové účely, kým QqQ-MS techniky (techniky na princípe trojitého kvadrupólu) sú mimoriadne vhodné na konfirmáciu látok hlavne v komplexných maticiach.

LC/MS/MS metódy využívajúce ionizačné techniky ako elektrospray (Debrauwer et al., 1992; Poletti et al., 1995; Stachel et al., 2003, Thevis et al., 2005) alebo chemickú ionizáciu za atmosferického tlaku (Doerge et al., 1993; Doerge et al., 1995; Doerge et al., 1996; Van Hoof et al., 2005;) boli mnohými autormi publikované a používajú sa v systéme kontroly rezíduí veterinárnych liečiv v širokom meradle.

Nakoľko analytické techniky LC/MS/MS sú finančne veľmi náročné, výrazným trendom je vývoj multireziduálnych metód (Churchwell et al., 2005; Nielsen et al., 2008). Pri vysokom počte analytov a iónových prechodov je potrebné rozdeliť monitoring špecifických prechodov do niekoľkých špecifických okien, daných retenčným časom. V každom okne sú monitorované špecifické prechody a ich celkový počet v danom okne nie je väčší ako 10. Týmto spôsobom je možná selektívna a citlivá analýza veľkého počtu látok (100-120) jednou multireziduálnou LC/QqQ-MS metódou.

V rámci štruktúry Smernice Rady 96/23/EC, Rozhodnutia Komisie 2002/657/EC a ISO/IEC 17025:2005 je dané, že v úradnej kontrole rezíduí v potravinách a krmivách sa môžu používať výlučne validované metódy. Validáciu analytických metód sa má dokázať, že použité analytické postupy sú v zhode s kritériami príslušných pracovných charakteristík.

Podľa Prílohy č. 8 Nariadenia vlády SR č. 320/2003 Z. z. z 9. júla 2003 o monitorovaní určitých látok a ich rezíduí v živých zvieratách a v produktoch živočíšneho pôvodu sú na účely výberu a validácie analytických metód na kontrolu rezíduí definované pojmy a limity pracovných charakteristík:

Podľa Rozhodnutia Komisie 2002/657/EC sa na konfirmáciu látok používa systém identifikačných bodov. Na konfirmáciu jednotlivých sledovaných analytov je potrebný špecifický počet identifikačných bodov (IPs). Pri konfirmácii nepovolených, ilegálnych alebo zakázaných látok (látky skupiny A) je požadovaný počet minimálne IPs, čo pre hmotnostné spektrometrické detekcie znamená stanovenie jedného prekurzorového iónu (1 IP) a dvoch dcérskych iónov (2x1,5 IP). Ako doplňujúce kritérium sa pri konfirmačných analýzach využíva pomer plôch dvoch dcérskych iónov (primárneho a sekundárneho). Tento pomer musí byť v rozpätí  $\pm 20\%$  v porovnaní s priemernou hodnotou pomerov vypočítaných z maticovej kalibrácie.

Ako pomocné kritérium sa využíva relatívny retenčný čas, pomer retenčného času sledovaného analytu a retenčného času príslušného vnútorného štandardu. Rozdiel medzi relatívnym retenčným časom analytu vo fortifikovanej matici a v analyzovanej vzorke môže kolísť do  $\pm 2,5\%$ .

#### METODIKA PRÁCE

LC/MS/MS metódu sme využili v úradnej kontrole prítomnosti rezíduí 10  $\beta$ -agonistov (cimaterol, cimbuterol, zilpaterol, terbutalín, salbutamol, ractopamin, clenbuterol,

brombuterol, mabuterol a mapenterol) vo vzorkách surového kravského mlieka v rámci systému NPKR.

Vzorky boli odoberané veterinárskymi inšpektormi bez predchádzajúceho oznámenia kontrolovanému subjektu, prepravované a skladované podľa predpísaného postupu. V súlade s metodickým pokynom k NPKR sme vzorky analyzovali do 10 pracovných dní od dátumu ich doručenia do laboratória.

Vzorky sme spracovávali a analyzovali podľa zavedenej interne validovanej LC/MS/MS metódy. Metóda je kompletne validovaná v súlade s Rozhodnutím Komisie 2002/657/EC a dosiahnuté validačné parametre vyhovujú stanoveným požiadavkám.

Po extrakcii sme vzorky surového kravského mlieka prečist'ovali na SPE kolónkach a po zakoncentrovaní sme ich analyzovali technikou LC/MS/MS. Na stanovenie  $\beta$ -agonistov sme využili MS detektor na princípe trojitého kvadrupólu Quattro Premier XE firmy Micromass Technologies, Manchester, UK. Na ionizáciu sme zvolili API – ionizáciu pri atmosferickom tlaku v móde  $ESI^+$ , ktorá je všeobecne vhodná na analýzu liečiv, ich metabolitov a konjugátov. Na kvantifikáciu jednotlivých analytov sme použili 6 bodovú matricovú kalibráciu s metódou vnútorného štandardu. Konfirmáciu sledovaných látok sme zabezpečili stanovením prekursorového iónu a minimálne 2 parentálnych fragmentov pre každý analyt. Pri každom testovaní vzoriek sme robili analýzu blanku a piatich interných referenčných

matricových materiálov o daných koncentráciách za účelom zostrojenia matricovej kalibračnej krivky a analýzu kontrolného interného referenčného materiálu o koncentracii najnižšieho bodu kalibračnej krivky. Namerané koncentrácie kontrolného interného referenčného materiálu sme zapisovali do regulačných diagramov.

#### VÝSLEDKY A DISKUSIA

V roku 2008 sme analyzovali 45 úradných vzoriek surového kravského mlieka (SKM) z jednotlivých okresov Slovenska.

Z uvedeného počtu analyzovaných vzoriek sme v troch prípadoch pri vyhodnocovaní výsledkov aplikovali doplnujúce konfirmačné kritérium na potvrdenie identity cimaterolu, ractopamínu a terbutalínu, nakoľko v príslušných retenčných časoch sme zreteľne detegovali látky s prítomným parentálnym iónom a dvomi dcérskymi iónmi (tabuľka 1). V týchto vzorkách sme porovnali číselné hodnoty pomerov primárnych a sekundárnych iónov ( $Pi/Si$ ) detegovaných látok vo vzorkách (tabuľka 3) s priemernými hodnotami  $Pi/Si$  pre cimaterol, ractopamín a terbutalín, zistenými z 5 meraní interného matricového referenčného materiálu, pričom sme pri posudzovaní zohľadnili interval tolerancie  $\pm 20\%$  okolo priemernej hodnoty ( $0,8 * Pi/Si - 1,2 * Pi/Si$ ), ako je uvedené v tabuľke 2.

Tab. 1: Suspektné vzorky SKM – stanovená koncentrácia

Suspektná vzorka č.	Detegovaný analyt ( $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ )		
	cimaterol	ractopamín	terbutalín
1	0,0907	0,0318	-
2	-	-	0,0631
3	0,0348	-	-

Tab. 2: Pomery primárnych a sekundárnych iónov – interný matricový referenčný materiál

Analyt	$0,8 * Pi/Si$	$Pi/Si$	$1,2 * Pi/Si$
cimaterol	0,858	1,072	1,286
terbutalín	4,098	5,123	6,148
ractopamín	1,213	1,516	1,819

Tab. 3: Pomery primárnych a sekundárnych iónov - suspektné vzorky SKM

Suspektná vzorka č.	$Pi/Si$		
	cimaterol	ractopamín	terbutalín
1	2,308	0,392	-
2	-	-	0,787
3	0,423	-	-

Vypočítané hodnoty iónových pomerov stanovených látok vo vzorkách SKM neboli v rozsahu akceptovaného intervalu ( $0,8 \cdot \text{Pi/Si} - 1,2 \cdot \text{Pi/Si}$ ) pre iónové pomery cimaterolu, ractopaminu a terbutalínu a preto sme vylúčili možnosť identity stanovených látok s uvedenými  $\beta$ -agonistami. Nakoľko už týmto doplnujúcim konfirmačným kritériom sa nám podarilo vylúčiť pozitivitu testovaných vzoriek na prítomnosť reziduí  $\beta$ -agonistov, nebolo potrebné použiť pomocné konfirmačné kritérium porovnania hodnôt relatívnych retenčných časov s ohľadom na interval tolerancie  $\pm 2,5\%$  okolo priemernej hodnoty, ako je uvedené v tabuľke 4

**Tab. 4:** Relatívne retenčné časy – interný matricový referenčný materiál

Analyt	0,975* rR <sub>t</sub>	rR <sub>t</sub>	1,025 * rR <sub>t</sub>
Cimaterol	0,9927	1,0182	1,0437
Terbutalín	1,0025	1,0282	1,0539
Ractopamin	0,9757	1,0007	1,0257

Na základe uvedených výsledkov môžeme skonštatovať, že v roku 2008 neboli v SR vo vzorkách surového kravského mlieka zistené rezidúá  $\beta$ -agonistov - cimaterolu, cimbuterolu, zilpaterolu, terbutalínu, salbutamol, ractopaminu, clenbuterolu, brombuterolu, mabuterolu a mapenterolu.

## ZÁVER

LC/MS/MS metódy sú z pohľadu laboratórnej diagnostiky veľmi perspektívnymi, nakoľko umožňujú súčasne stanovenie veľkého počtu analytov v komplexných matriciach s vynikajúcim rozlíšením aj pri koelúcii niekoľkých látok. Minimalizáciou možných interferencií správnou selekciou detekčných iónov sa dá dosiahnuť vysoká citlivosť stanovenia a spoľahlivosť identifikácie sledovaných reziduí.

Pri analýzach vzoriek surového kravského mlieka v rámci Národného programu kontroly reziduí v r. 2008 validovanou LC/MS/MS metódou boli získané 3 falošne pozitívne výsledky z dôvodu prítomnosti diagnostických iónov, ktoré nepochádzali z terčových analytov ale z interferencií prítomných vo vzorke v pomerne vysokej detegovateľnej koncentrácii. Falošná pozitivita bola dokázaná aplikáciou doplnkových a pomocných konfirmačných kritérií podľa Rozhodnutia Komisie 2002/657/ES.

## LITERATÚRA

ANDERSON, D. B., SCHMIEGEL, K. K., VEENHUIZEN, E. L., 1987. Growth promotion, *U. S. Patent* 4, 1987, p. 690, 951.

BAKER, P. K., KIERNAN, J. A. 1983. Phenylethanolamine derivatives and acid addition salts thereof for enhancing the growth rate of meat-producing animals and improving the efficiency of feed utilization thereby, *U. S. Patent* 4, p. 404, 222.

BENJAMIN, P., LAU, Y., LEWIS, D., LAWRENCE, J. F. 1997. Confirmation Analysis of Clenbuterol in Beef Liver and

Minced Beef by a Combination of Immunoaffinity Chromatography and Liquid Chromatography/Electrospray Mass Spectrometry or Liquid Chromatography/Electrospray Tandem Mass Spectrometry, *J. Mass. Spectrom.*, 1997, 32, p. 655-661.

BOYD, D., O'KEEFE, M., SMYTH, M. R. 1996. Methods for the determination of beta-agonists in biological matrices - A review, *Analyst*, 1996, 121, p. R1-R10.

DALIDOWICZ, J. E., THOMSON, T. D., BABBITT, G. E. 1992. Ractopamine hydrochloride, a phenethanolamine repartitioning agent: Metabolism and residues. In: D. H. Hutson, D. R. Hawkins, G.D. Paulson, and C. B. Struble (Ed.) *Xenobiotics and Food-Producing Animals*, American Chemical Society, Washington, DC., 1992, p. 234-243.

DE BRABANDER, H. F., LE BIZEC, B., PINEL, G., ANTIGNAC, J. P., VERHEYDEN, K., MORTIER, V., COURTHEYN, D., NOPPE H. 2007. Past, present and future of mass spectrometry in the analysis of residues of banned substances in meat-producing animals, *J. Mass Spectrom.*, 2007, 42, p. 983-998.

DEBRAUWER, L., BORIES, G. 1992: Electrospray ionization mass spectrometry of some  $\beta$ -agonists, *Rapid Commun. Mass. Spectrom.*, 1992, 6, p. 382-387.

DOERGE, D. R., BAJIC, S., LOWES, S. 1993. Analysis of clenbuterol in human plasma using liquid chromatography/atmospheric-pressure chemical-ionization mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass. Spectrom.*, 1993, 7, p. 462-464.

DOERGE, D. R., BAJIC, S., BLANKENSHIP, L. R., PREECE, S. W., CHURCHWELL, M. I. 1995. Determination of  $\beta$ -agonists residues in human plasma using liquid chromatography atmospheric pressure chemical ionisation mass spectrometry and tandem mass spectrometry, *J. Mass. Spectrom.*, 1995, 30, p. 911-917.

DOERGE, D. R., CHURCHWELL, M. I., HOLDER, C. L., ROWE, L., BAJIC, S. 1996. Detection and confirmation of beta-agonists in bovine retina using LC/APCI-MS, *Anal. Chem.*, 1996, 68, p. 1918-1923.

CHURCHWELL, M. I., TWADDLE, N. C., MEEKER, L. R., DOERGE, D. R. 2005. Improving LC/MS sensitivity through increases in chromatographic performance: Comparisons of UPLC-ES/MS/MS to HPLC-ES/MS/MS, *J. Chromatogr. B*, 2005, 825, p. 134-143.

ISO/IEC 17025:2005. Všeobecné požiadavky na kompetentnosť skúšobných a kalibračných laboratórií; SÚTN, október 2005.

JONES, D. C., DOST, K., DAVIDSON, G., GEORGE, M. W., 1999. The analysis of  $\beta$ -agonists by packed-column supercritical fluid chromatography with ultra-violet and atmospheric pressure chemical ionisation mass spectrometric detection, *Analyst.*, 1999, 124, p. 827-831.

KRÜGER, G., KECK, J., NOLL, K., PIEPER, H., 1984. Synthesis of further amino-halogen-substituted phenyl-aminoethanols, *Arzneim.-Forsch.*, 1984, 34, p. 1612-1624.

NARIADENIE VLÁDY SR Č. 320/2003 Z. z. z 9. júla 2003 o monitorovaní určitých látok a ich reziduí v živých zvieratách a v produktoch živočíšneho pôvodu, Príloha č. 8: Analytické metódy a interpretácia výsledkov analýz úradných vzoriek

NIELEN, M. W., LASAROMS, J. J. P., ESSERS, M. L., OOSTERINK, J. E., MEIJER, T., SANDERS, M. B., ZUIDEMA, T., STOLKER, A. A. 2008. Multiresidue analysis of beta-agonists in bovine and porcine urine, feed and hair using liquid chromatography electrospray ionisation



tandem mass spectrometry, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2008, 391, p. 199-210.

POLETTINI, A., MONTAGNA, E. A., HOGENDOORN, E., DIJKMAN, E., VAN ZOONEN, P., VAN GINKEL, L. A. 1995. Applicability of Coupled-Column Liquid Chromatography to the Analysis of Beta-Agonists in Urine by Direct Sample Injection. I. Development of a Single-Residue Reversed-Phase Liquid Chromatography-UV Method for Clenbuterol and Selection of Chromatographic Conditions Suitable for Multi-Residue Analysis, *J. Chromatogr. A*, 1995, 695, p. 19-31.

POPOT, M. A., BOYER, S., MACIEJEWSKI, P., GARCI, P., BONNAIRE, Y., BEYET, L., LESAGE, D., TABET, J. C. 2001. Determination of Clenbuterol in Horse Hair by Gas Chromatography – Tandem Mass Spectrometry, *Chromatographia*, 2001, 53, p. 375-379.

ROZHODNUTIE KOMISIE 2002/657/ES zo 14. augusta 2002, ktorým sa vykonáva smernica Rady 96/23/ES týkajúca sa vykonávania analytických metód a interpretácie výsledkov, *Ú. v. ES L 221*, 17. 8. 2002, p. 8–36.

SMERNICA RADY 96/22/ES z 29. apríla 1996 o zákaze používania určitých látok s hormonálnym alebo tyrostatickým účinkom a beta-agonistov pri chove dobytka, ktorou sa zrušujú smernice 81/602/EHS, 88/146/EHS a 88/299/EHS, *Ú. v. ES L 125*, 23. 5. 1996, p. 3–9.

SMERNICA RADY 96/23/ES z 29. apríla 1996 o opatreniach na monitorovanie určitých látok a ich rezíduí v živých zvieratách a živočíšnych produktoch a o zrušení smerníc 85/358/EHS a 86/469/EHS a rozhodnutí 89/187/EHS a 91/664/EHS, *Ú. v. ES L 125*, 23. 5. 1996, p. 10–32.

SMERNICA EURÓPSKEHO PARLAMENTU A RADY 2003/74/ES z 22. septembra 2003, ktorou sa mení a dopĺňa smernica Rady 96/22/ES o zákaze používania niektorých látok s hormonálnym alebo tyrostatickým účinkom a beta-agonistov pri chove dobytka, *Ú. v. EÚ L 262*, 14. 10. 2003, p. 17–21.

SMERNICA EURÓPSKEHO PARLAMENTU A RADY 2008/97/ES z 19. novembra 2008, ktorou sa mení a dopĺňa smernica Rady 96/22/ES o zákaze používania určitých látok s hormonálnym alebo tyrostatickým účinkom a beta-agonistov pri chove dobytka, *Ú. v. EÚ L 318*, 28.11.2008, p. 9–11.

STACHEL, C. S., RADECK, W., GOWIK P. 2003. Zilpaterol-a new focus of concern in residue analysis, *Anal. Chim. Acta*, 2003, 493, p. 63-66.

STOLKER, A. A. M., ZUIDEMA, T., NIELEN, M. W. F. 2007. Residue analysis of veterinary drugs and growth – promoting agents, *Trends in Anal. Chem.*, 2007, 26 (10), p. 967-979.

STOLKER, A. A. M., BRINKMAN, U. A. T. 2005. Analytical strategies for residue analysis of veterinary drugs and growth-promoting agents in food-producing animals - a review, *J. Chromatogr. A*, 2005, 1067, p. 15-53.

THEVIS, M., SCHEBALKIN, T., THOMAS, A., SCHÄNZER, W. 2005. Quantification of Clenbuterol in Human Plasma and Urine by Liquid Chromatography – Tandem Mass Spectrometry, *Chromatographia*, 2005, 62, No. 7/8, p. 435–439.

VAN HOOFF, N., COURTHEYN, D., ANTIGNAC, J. P., VAN DE WIELE, M., POELMANS, S., NOPPE, H., DE BRABANDER, H. 2005a. Multi-residue liquid chromatography/tandem mass spectrometric analysis of beta-agonists in urine using molecular printed polymers, *Rapid Commun. Mass. Spectrom.*, 2005, 19, p. 1.

**Kontaktná adresa:**

Ing. Bronislava Škarbová, PhD. Ministerstvo pôdohospodárstva SR, Dobrovičova 12, 812 66 Bratislava, tel.: 02 566 402, e-mail: bronislava.skarbova@land.gov.sk

doc. Ing. Jozef Golian, Dr., Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre, FBP, KHBP, Trieda Andreja Hlinku 3, E-mail: jozef.golian.af@uniag.sk

**NIGROSPORA – NOVÝ ENDOFYT NA PŠENICI (*TRITICUM AESTIVUM* L.) SLOVENSKÉHO PÔVODU**

**NIGROSPORA – NEW ENDOPHYTE FROM WHEAT (*TRITICUM AESTIVUM* L.) OF SLOVAK ORIGIN**

*Dana Tančinová, Zuzana Mašková, Soňa Felšöciová, Mária Dovičičová, Zuzana Barboráková, Roman Labuda*

**ABSTRACT**

The aim of this study was to investigate endogenous contamination of wheat (*Triticum aestivum* L.) grains with focus on new endophytic filamentous fungi – *Nigrospora*. A total of 52 wheat samples were analyzed. They were harvested from different regions of Slovakia in seasons 2006 (21 samples), 2007 (30 samples) and 2008 (21 samples). The endogenous contamination was detected by direct plating method on Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol agar (DRBC) after superficial sterilization of grains. Total endogenous contamination by micromycetes was ranging from 26 to 100 %. This study discovered only 1 species - *Nigrospora oryzae*, which was detected in 47.62 % (season 2006), 60.00 % (season 2007) and 28.57 % (season 2008) of wheat samples. This species was presented at 1.54 % (season 2006), 4.97 % (season 2007) and 0.86 % (season 2008) of analyzed wheat grains.

**Keywords:** wheat, endogenous contamination, *Nigrospora*

## ÚVOD

Rod *Nigrospora* Zimmerm. podľa **Ellisa (1971)** zahŕňa 4 druhy. Hlavným identifikačným znakom je veľkosť konidií. Rod *Nigrospora* sa veľmi často vyskytuje v tropických krajinách a zriedkavo býva zaznamenaný z krajín s miernejšou teplotou. Vyskytuje sa na rozmanitých druhoch rastlín, obzvlášť na ryži, vo vzduchu a pôde (**Ellis, 1971; Pitt, Hocking, 1999**). Infikované zrná ryže sú niekedy čierno sfarbené, biela farba je spôsobená narastenou masou mycélia. Kontaminácia sa môže vyskytovať pred zberom, počas zberu i počas spracovania ryže (**Sempere, Santamarina, 2008**). Najviac informácií je o vplyve *N. oryzae* na rastliny ryže. **Sempere a Santamarina (2006)** uvádzajú, že hoci prítomnosť *N. oryzae* nemusí vyvolávať závažné ochorenia rastlín, môže ovplyvniť kvalitu osiva, klíčivosť, rast koreňov a odolnosť rastlín. Na Slovensku bol druh *Nigrospora oryzae* identifikovaný prvýkrát zo vzoriek pšenice z úrody zberanej v roku 2003 (1 izolát), následne z úrody 2004 (2 izoláty) (**Tančinová, Labuda, 2006; Tančinová et al. 2008**). **Franková et al. (2002)** izolovali zástupcu rodu *Nigrospora* – *Nigrospora sphaerica* (Sacc.) z vodárenskej nádrže Nová Bystrica a z drevenej plastiky pochádzajúcej z Afriky.

Cieľom práce bolo sledovanie endogénnej kontaminácie pšeničných zŕn so zameraním na druhy rodu *Nigrospora*, ktorý je pre Slovensko nový.

## MATERIÁL A METÓDY

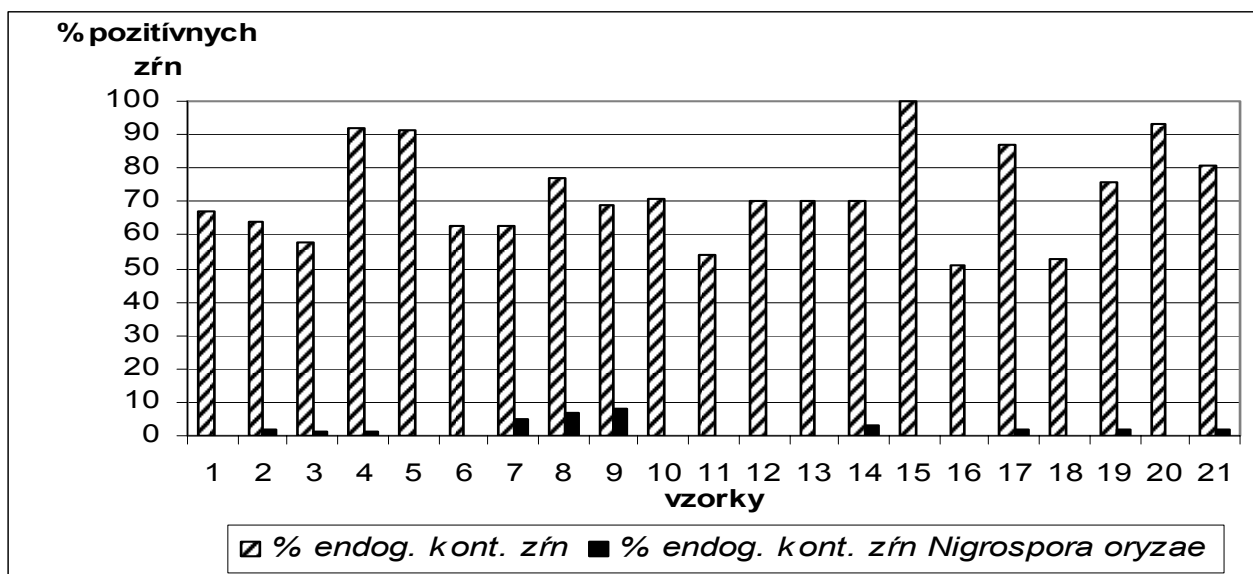
Vzorky pšenice - dvadsaťjeden vzoriek pšenice letnej formy ozimnej (*Triticum aestivum* L.) - pochádzalo z úrody roku 2006, tridsať z úrody 2007 a dvadsaťjeden vzoriek z úrody 2008. Pšenica bola dopestovaná vo viacerých lokalitách Slovenska a odobraná pre mykologické analýzy počas skladovania. Hmotnosť jednej

vzorky bola cca 5 kg. Analyzované vzorky nejavili znaky kontaminácie mikroskopickými hubami. Endogénna kontaminácia bola zisťovaná po priamej kultivácii povrchovo sterilizovaných pšeničných zŕn na DRBC (agar s dichlóranom, chloramfenikolom a bengálskou červenou; Merck, Nemecko; 100 zŕn; 7 až 8 zŕn na jednu petriho misku). Povrchová sterilizácia bola urobená podľa **Samson et al. (2002)**, pôsobením 0,4 % roztoku chloramínu po dobu dvoch minút. Následne boli zrná trikrát prepláchnuté sterilnou destilovanou vodou. Kultivácia prebiehala 5–7 dní v tme pri teplote  $25 \pm 1$  °C. Po kultivácii sme spočítali zrná pozitívne na prítomnosť endogénne vyskytujúcich sa húb. Všetky kolónie boli makroskopicky a mikroskopicky analyzované na prítomnosť rodu *Nigrospora*. Na druhovú identifikáciu zástupcov rodu *Nigrospora* sme použili MEA (agar so sladínovým extraktom, **Samson et al., 2002**). Identifikácia izolátov sa robila podľa **Domsh et al., 1980; Ellis, 1971; de Hoog et al., 2000; Watanabe, 2002**.

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

Ako sme uviedli v metodike analyzované vzorky nejavili známky mykotickej kontaminácie na zrnách. Celkovo sa endogénna kontaminácia pohybovala v úrode zberanej v roku 2006 od 53 do 100 % (priemer 72 %) (graf 1), v roku 2007 od 26 do 100 % (priemer 89 %) (graf 2) a v úrode zberanej v roku 2008 od 75 do 100 % (priemer 96 %) (graf 3). Všetky rozdielne izoláty rodov boli preočkované podľa rodovej príslušnosti na identifikačné médiá. V tejto štúdii sme sa zamerali na výskyt pre pšenicu nového endofyta – rod *Nigrospora*. Percento pozitívnych zŕn a zároveň porovnanie s celkovou endogénnou kontamináciou uvádzame v grafoch 1, 2 a 3.

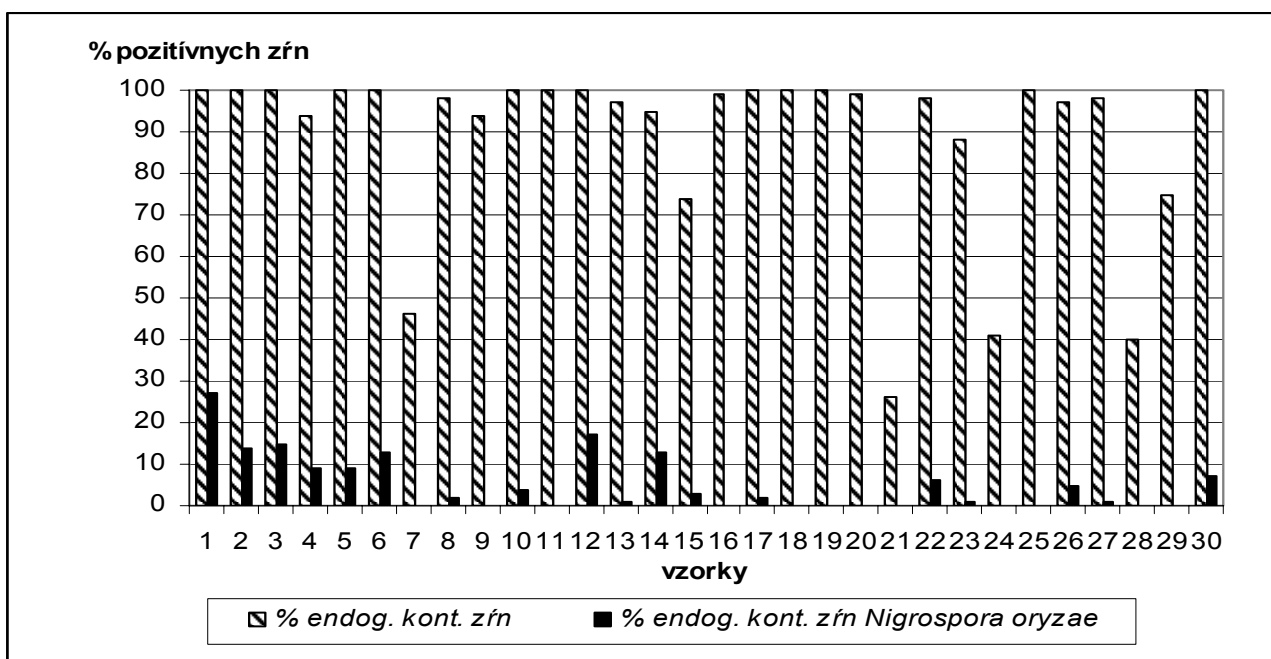
**Graf 1:** Endogénne kontaminácia povrchovo sterilizovaných zŕn pšenice dopestovanej na Slovensku v roku 2006 na DRBC\*



\*agar s dichlóranom, chloramfenikolom a bengálskou červenou

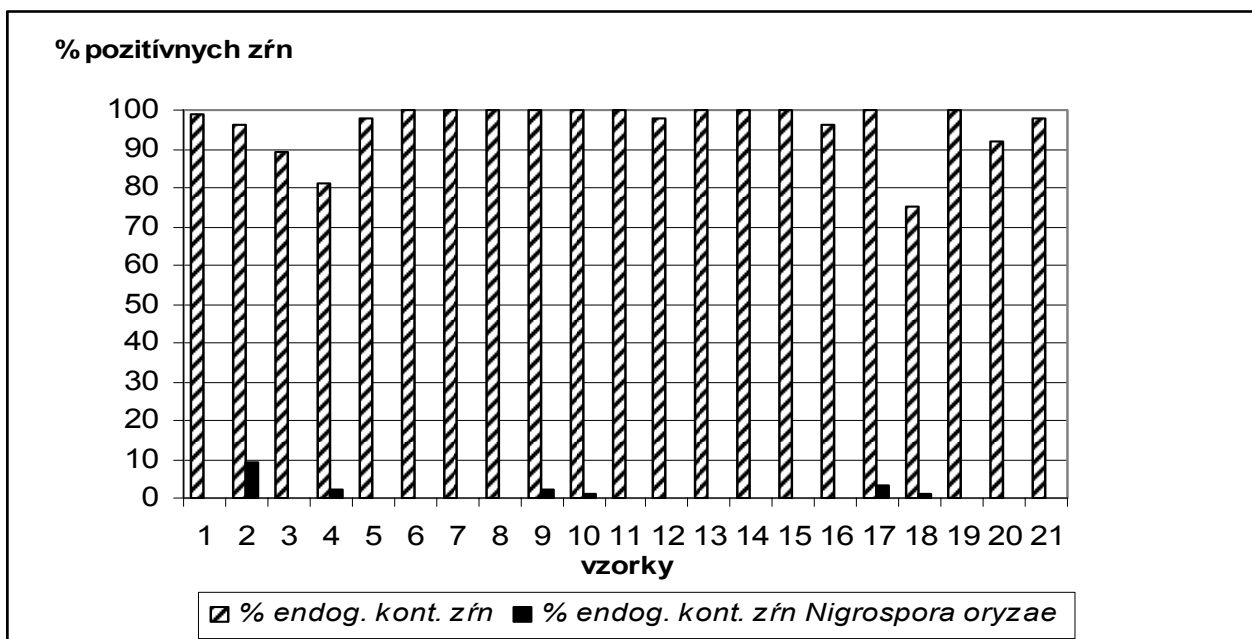


**Graf 2:** Endogénne kontaminácia povrchovo sterilizovaných zŕn pšenice dopestovanej na Slovensku v roku 2007 na DRBC\*



\*agar s dichlóranom, chloramfenikolom a bengálskou červenou

**Graf 3:** Endogénne kontaminácia povrchovo sterilizovaných zŕn pšenice dopestovanej na Slovensku v roku 2008 na DRBC\*



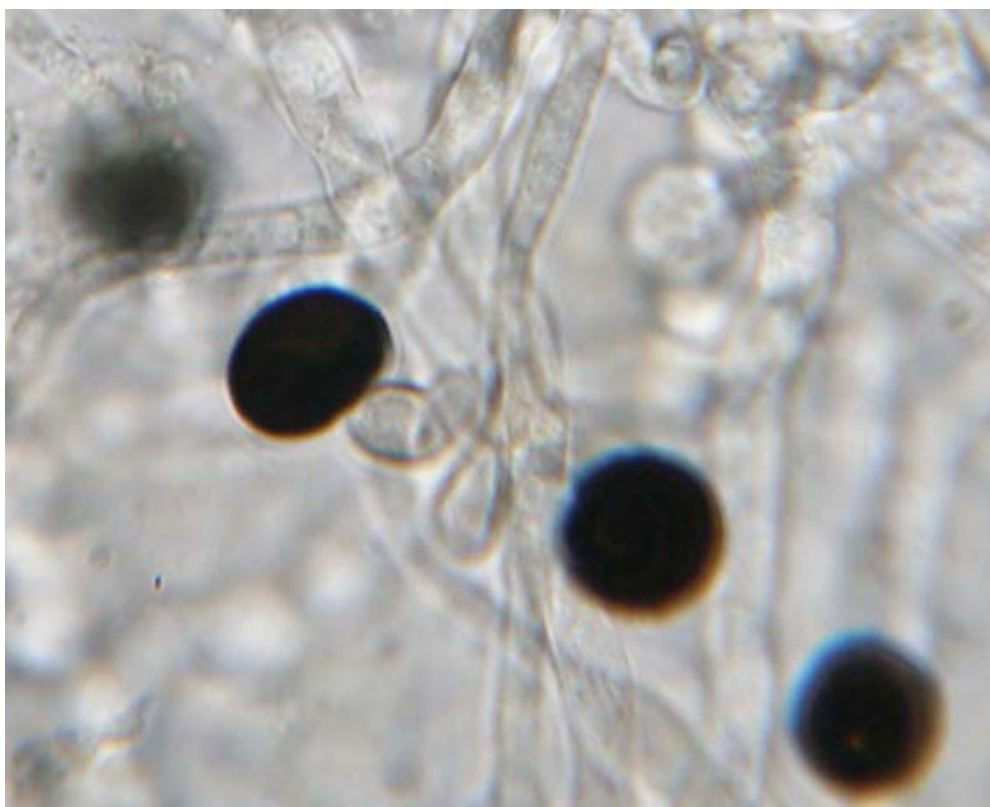
\*agar s dichlóranom, chloramfenikolom a bengálskou červenou

Rod *Nigrospora* Zimmerm. podľa **Ellisa (1971)** zahŕňa 4 druhy. Hlavným identifikačným znakom je veľkosť konídií. Dĺžka spór nami meraných izolátov bola od 12,75  $\mu\text{m}$  do 14,88  $\mu\text{m}$  ( $\text{Ø}$  13,5  $\mu\text{m}$ ), čo zodpovedá druhu *Nigrospora oryzae*. Izoláty boli na základe identifikačných znakov zaradené do druhu *Nigrospora oryzae* (Berk. & Broome) Petch (teleomorfa: *Khushia oryzae* Huds.).

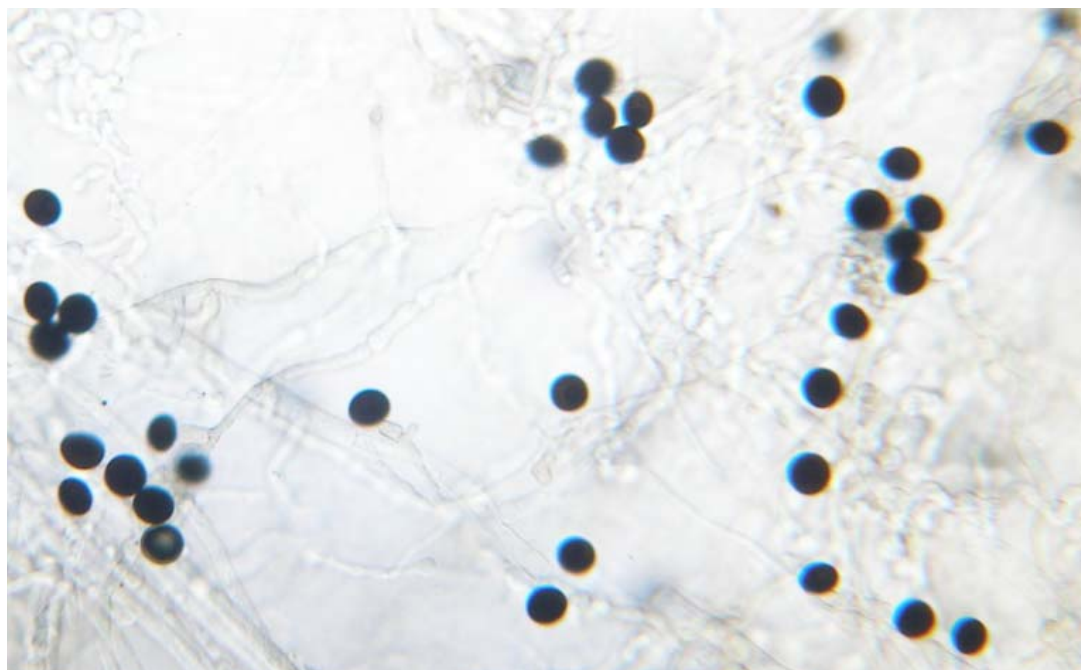
Kolónie na MEA (obrázok 1) sú spočiatku biele vatovité počas sporulácie tmavnú do hnedá až sivočierna a podobajú sa na kolónie rodu *Mucor*. Konidiogénna bunka je zdurená, hyalínna, ampuliformná a tvorí jednu globóznou až subglobóznou čiernu spóru (obrázok 2 a obrázok 3).



**Obrázok 1:** *Nigrospora oryzae* na MEA (agar so sladínovým extraktom), 7. deň, 25±1 °C



**Obrázok 2:** *Nigrospora oryzae* 1000x



Obrázok 3: *Nigrospora oryzae* 400x

Tabuľka 1: Výskyt *Nigrospora oryzae* v endogénnej mykocenóze v povrchovo sterilizovaných zrnách pšenice dopestovanej na Slovensku na DRBC\*

Úroda rok	Počet analyzovaných vzoriek	% pozitívnych vzoriek <i>Nigrospora oryzae</i>	Počet analyzovaných zrn	% zrn kontaminovaných <i>Nigrospora oryzae</i>
2006	21	47,62	2085	1,58
2007	30	60,00	3000	4,97
2008	21	28,57	2098	0,86

\*agar s dichlóranom, chloramfenikolom a bengálskou červenou

Výsledky výskytu *Nigrospora oryzae* v endogénnej mykocenóze vzoriek pšenice uvádzame v tabuľke 1. Z úrody v roku 2006 sa druh *Nigrospora oryzae* vyskytoval v 47,62 % vzoriek a v 1,58 % analyzovaných zrn pšenice. Vo vzorkách pozitívnych na výskyt *Nigrospora oryzae* sa tento druh vyskytoval od 1 do 8 % zrn. Z úrody v roku 2007 sme druh *Nigrospora oryzae* detegovali až v 60,00 % vzoriek a v 4,97 % analyzovaných zrn. Vo vzorkách pozitívnych na výskyt *Nigrospora oryzae* sa tento druh vyskytoval od 1 do 27 % zrn. Z úrody v roku 2008 sme druh *Nigrospora oryzae* detegovali v 28,87 % vzoriek a v 0,86 % analyzovaných zrn. Vo vzorkách pozitívnych na výskyt *Nigrospora oryzae* sa tento druh vyskytoval od 1 do 9 % zrn. **Clear, Patrick (1993)** uvádzajú, že rod *Nigrospora* kontaminuje každoročne viac ako 1 percento zrn pšenice v Ontáriu. Ako bolo uvedené vyššie *Nigrospora oryzae* sa vyskytuje predovšetkým v oblastiach s vyššími teplotami, **Fakhrunnisa et al. (2006)** uvádzajú *Nigrospora oryzae* ako druh izolovaný s vysokou frekvenciou zo zrn obilnín (pšenica, jačmeň, cirok) v Pakistane. **Larran et al. (2007)** uvádzajú frekvenciu výskytu *Nigrospora* sp. (bez druhovej špecifikácie) 0,04 % a to z rôznych častí rastlín pšenice ako zložku endogénnej mykocenózy z oblasti Buenos Aires v Argentíne. **Pitt et al. (1993)** uvádzajú frekvenciu výskytu v povrchovo sterilizovaných zrnách kukurice

v okolí Bankoku 42 % (podľa lokality od 10 do 47 %). **Santamarina et al. (2002)** uvádzajú vysokú frekvenciu *Nigrospora oryzae* v ryži pestovanej v oblasti Valencia (Španielsko).

#### ZÁVER

Celkovo bolo analyzovaných 52 vzoriek pšenice zberanej v rokoch 2006 (21 vzoriek), 2007 (30 vzoriek) a 2008 (21 vzoriek). Endogénna kontaminácia bola detegovaná po povrchovej sterilizácii zrn na agare s dichlóranom bengálskou červenou a chloramfenikolom (DRBC). Celková endogénna kontaminácia mikroskopickými hubami sa pohybovala od 26 do 100 %. V štúdiu sme zistili výskyt len jeden druh rodu *Nigrospora* – *Nigrospora oryzae*. Tento druh sme detegovali v 47,62 % vzoriek z úrody 2006, 60,00 % (úroda z 2007) a 28,57 % vzoriek z úrody 2008. *Nigrospora oryzae* bol vyizolovaný z 1,54 % analyzovaných zrn z úrody 2006, z 4,97 % z úrody 2007 a z 0,86 % zrn z úrody 2008. Tento druh sa v našich podmienkach v starších prácach zaoberajúcich sa mykocenózou pšeničných zrn neuvádza. I keď v nami analyzovaných vzorkách neboli detegované zmeny na povrchu zrn v prípade masívnejšej kontaminácie, resp. za vhodných podmienok sa môže výraznejšie prejavíť a negatívne ovplyvniť kvalitu zrn.

LITERATÚRA

CLEAR, R. M., PATRICK, S. K., 1993. Prevalence of some seed-borne fungi on soft white winter-wheat seed from Ontario, Canada. In *Can. Plant Disease Survey*, vol. 73, 1993, no. 2, p. 143-149.

DE HOOG, G. S., GUARRO, J., GENÉ, J., FIGUERAS, M. J., 2000. *Atlas of clinical fungi*. 2. ed. Utrecht : Centraalbureau voor Schimmelcultures, 2000.1126 p. ISBN 90-70651-43-9.

DOMSH, K. H., GAMS, W., ANDERSON, T. H., 1980. *Compendium of Soil Fungi*. Vol. 1. London : Academic Press, 1980. 859 p. ISBN 0-12-220401-8.

ELLIS, M.B., 1971. *Dematiaceous hyphomycetes*. England: CAB, 1971. 608 p.

FAKHRUNNISA, H. M. H., GHAFFAR, A., 2006. Seed-borne mycoflora of wheat, sorghum and barley. In *Pakistan J Botany*, 38, 2006, 1, p. 185-192.

FRANKOVÁ, E., TÓTHOVÁ, L., ŠIMONOVICHOVÁ, A., GÓDYOVÁ, M., 2002. Zriedkavé pôdne mikromycéty v atypických biotopoch. In *Život v pôde*. Bratislava : Československá spoločnosť mikrobiologická, Ústav krajinej ekológie SAV, 2002, s. 27-29.

LARRAN, S., PERELLÓ, A., SIMÓN, M. R. 2007 The endophytic fungi from wheat (*Triticum aestivum* L.). In *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 23, 2007, 4, p. 565-572.

PITT, J. I., HOCKING, A. D., BHUDHASAMAI, K., MISCAMLE, B. F., KATHRYN, A. W., TANBOON-EK, P. 1993. The normal mycoflora of commodities from Thailand. 1. Nuts and oilseeds. In *Int. J. Food. Microbiol.*, 20, 1993, p. 211-226.

PITT, J. I., HOCKING, A. D., 1999. *Fungi and food spoilage*. New York : Aspen Publishers, 1999, 593 p. ISBN 0-8342-1306-0.

SAMSON, R. A., HOEKSTRA, E. S., FRISVAD, J. C., FILTENBORG, O., 002. *Introduction to food- and airborne fungi*. Utrecht : Centraalbureau voor Schimmelcultures, 2002. 389 p. ISBN 90-70351-42-0.

SANTAMARINA, M. P., SERNA, R., ASENSI, C., ROSELLÓ, J., 2002. Evolución de la micoflora del arroz durante el periodo de almacenamiento. In *Phytoma*, 142, 2002, p. 113-117.

SEMPERE, F., SANTAMARINA, M. P., 2006. Microscopic and macroscopic study of interaction between *Alternaria alternata* (Fr.) Keissler and *Nigrospora oryzae* (Berk. & Broome) Petch. In *Ann. Microbiol.*, 56, 2006, 2, p. 101-107.

SEMPERE, F., SANTAMARINA, M. P., 2008. Suppression of *Nigrospora oryzae* (Berk. & Broome) Petch by an aggressive mycoparasite and competitor, *Penicillium oxalicum* Currie & Thom. In *Int. J. Food Microbiol.*, 122, 2008, p. 35-43.

TANČINOVÁ, D., LABUDA, R. 2006. Mykotická kontaminácia vybraných surovín rastlinného pôvodu. In Kolektív autorov: *Výživná a technologická kvalita rastlinných produktov a ich potravinárske využitie*. Nitra : SPU Nitra, 2006. s. 167-194. ISBN 80-8069-780-9.

TANČINOVÁ, D., DOVIČIČOVÁ, M., LABUDA, R., PIOVARČIOVÁ, Z., FELŠÖCIOVÁ, S. 2008. Zaujímavé nálezy mikromycét na pšenici slovenského pôvodu. In *Sborník príspevků z workshopu MICRONYCO 2008*. České Budějovice : Ústav půdny biologie České Budějovice, 2008, s. 92-97.

WATANABE, T., 2002. *Pictorial atlas of soil and seed fungi: morphologies of cultured fungi and key species*. 2. ed. Boca Raton etc : CRS PRESS, 486 p. ISBN 0-8493-1118-7.

**PodĎakovanie**

Tento príspevok vznikol s podporou projektov VEGA 1/3456/06 a KEGA 3/2080/07

**Kontaktná adresa:**

doc. Ing. Dana Tančinová, PhD. Katedra mikrobiológie, Fakulta biotechnológie a potravinárstva, Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre Tr. A. Hlinku 2 949 76 Nitra, e-mail: Dana.Tancinova@uniag.sk

Dana Tančinová, Zuzana Mašková, Soňa Felšöciová, Mária Dovičičová, Zuzana Barboráková, Roman Labuda: Katedra mikrobiológie, Fakulta biotechnológie a potravinárstva, Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre Tr. A. Hlinku 2 949 76 Nitra.

Roman Labuda Romer Labs Division Holding GmbH Technopark 1, 3430 Tulln, Austria

## ZMENY REOLOGICKÝCH VLASTNOSTÍ PŠENIČNÉHO CESTA VPLYVOM MIESENIA

### CHANGES IN RHEOLOGICAL PROPERTIES OF WHEAT DOUGH CAUSED BY MIXING PROCESS

*Boris Žitný, Ladislav Haris, Zdenka Muchová*

#### ABSTRACT

The importance of dough mixing, knowledge of the requirements of individual type of flour on the mixing and achieving the proper quality with respect to final dough properties still remain actual problems. This study describes the changes in consistency, extensographic energy and temperature progress in connection to mechanical energy flow into the dough during the mixing on Diosna SP12 kneader. The results of mixing tests on the first gear indicate that different energy inputs caused different changes in consistency, development time and temperature increase of mixed dough. By the alteration of mixing energy it is probably possible to utilize this energy in the form of emerging dough with better quality, despite the fact that this was not shown statistically. However, it was observed that energy consumption is more effective for the experimental regimes in comparison to standard regime. Experimental regimes required less energy input, while achieved consistency level was similar and durability in positive consistency changes were higher. Temperature increase was significantly higher when standard regime was used.

**Keywords:** dough rheology, dough mixing, wheat dough

#### ÚVOD

Individuálne požiadavky jednotlivých múk na optimálny vývin cesta s požadovanými technologickými parametrami, náležitý vstup energie a možnosti modifikácie vlastností cesta zmenou operačných podmienok miesenia, sú témy s veľkým aplikačným významom. Počas miesenia sú voda, múka a soľ (prípadne ďalšie receptúrne suroviny) vstupujúcou, prevažne mechanickou energiou, zmiešavané pri čom vzniká cesto. Jeho vlastnosti sú závislé okrem kvalitatívnych parametrov surovín aj na spôsobe, akým je cesto miesené (Zheng et al., 2000; Gras et al., 2000; Wilson et al., 2001). Pre dosiahnutie riadneho vývinu cesta počas miesenia, musia byť splnené dve základné podmienky a to, dodaná energia (práca) počas miesenia musí presiahnuť minimálny kritický energetický limit, ktorý je potrebný na sformovanie gluténu a intenzita (rýchlosť) miesenia musí byť vyššia ako úroveň, pri ktorej je možné cesto vypracovať (Kilborn a Tipples, 1972). Úroveň týchto požiadaviek je rôzna v závislosti od typu miesiča a parametrov múky (Frazier et al., 1975; Oliver a Allen, 1992). Vývin cesta počas miesenia je dynamický proces počas ktorého sa viskoelastické vlastnosti cesta kontinuálne menia. S rýchlosťou miesenia sa zvyšuje maximálna konzistencia cesta a skracuje sa čas vývinu cesta na laboratórnych miesičoch. S narastajúcou intenzitou miesenia sa znižuje stabilita cesta. Takéto výsledky sú referované vo viacerých prácach (Zounis a Quail, 1997). Priebeh jednotlivých zmien v ceste počas miesenia je závislý od pôsobiacich síl v priestore miesiča pri čom každý typ miesiča (špirálové, dvojšpirálové, Z - lopatky, závitnica a iné) pôsobí na cesto inou výslednicou síl čím výrazne ovplyvňuje finálne vlastnosti a konzistenčný priebeh cesta počas miesenia (Hwang a

Gunasekaran, 2001; Haraszi et al., 2008). Ak uvažujeme o možnosti kombinácie rôznych rýchlostí miesenia a pripustíme fakt, že každá múka má špecifickú komponentnú skladbu a tým špecifické požiadavky na vstup energie v každej etape procesu, problém optimalizácie miesenia môže mať viac ako jedno riešenie a je nutné definovať spoločných menovateľov s majoritným vplyvom na správanie sa ciest počas ich miesenia s ohľadom na dosiahnuteľné a želané technologické zmeny. Parametre miesenia tak môžu byť ako externý faktor nastavené s ohľadom na požiadavky vychádzajúce z vnútornej skladby múk, subštruktúr ich komponentov, hlavne so zameraním na proteínovú skladbu (Weegels et al., 1996; Aussenac et al., 2001; Tronsmo et al., 2002; Don et al., 2005). Problémom ostáva definovanie vplyvu geometrie miesiča na prenos energie miesenia z hybných častí miesiaceho aparátu do mieseného materiálu, pretože pri pohybe miesidiel (lopatky, špirála) v miesiacom priestore dochádza k vzniku rôznych, fyzikálne ťažko definovateľných deformačných síl (ťah, tlak, strih, šmyk a iné) s rôznou intenzitou a trvaním. Ich vplyv na formovanie trojrozmernej makromolekulárnej proteínovej štruktúry a tým na vlastnosti pripraveného cesta, je rôzny. Preto, aj pri dodaní rovnakého množstva energie do rovnakej vzorky múky prostredníctvom miesičov s rôznym miesiacim aparátom nedosiahneme výrobu cesta s rovnakými viskoelastickými parametrami (Mani et al., 1992; Haraszi et al., 2008). Tiež prenos výsledkov reologických meraní na laboratórnych prístrojoch, napr. farinografe, mixografe (s odlišným fyzikálnym princípom) na miesiče využívané v priemysle je problematický. Napríklad Wilson et al., (1997) uvádzajú, že stabilita cesta definovaná farinograficky dobre koreluje s požiadavkami na túto

vlastnosť pri priemyselne vyrobenom cestu, pričom **Zounis a Quail (1997)** zdôrazňujú inú pozitívnu koreláciu - dobu vývinu cesta (ale stanovenú mixografom).

Pri aplikácii laboratórnych výsledkov pre potreby priemyselného miesenia je nutné zohľadniť aj fakt, že na proces miesenia vplýva aj množstvo mieseného materiálu a rozmery miesiaceho priestoru (**Hwang a Gunasekaran, 2001**). Rozsah zmien v proteínovej štruktúre ciest počas miesenia, skúmané na molekulárnej úrovni, potvrdil, že spôsob akým je cesto miesené má významný vplyv na skladbu gluténových makromolekúl, ktoré sa pravdepodobne formujú počas miesenia z vysokomolekulárnych subjednotiek glutenínov s príspevkom gliadínov (**Aussenac et al., 2001; Kuktaite et al., 2004**). Frakcia proteínov označovaná ako UPP (neextrahovateľné polymérne proteíny) sa v práci **Harasziho et al., (2008)** ukázala ako dobre korelujúca s reologickým správaním ciest miesených na mixografe aj experimentálnom miesiči so Z – lopatkami. Konzistencia UPP vzrastala od začiatku miesenia až po dosiahnutie maximálnej konzistencie cesta a potom klesala. Konzistencia UPP pozitívne koreluje aj s odporom cesta voči deformácii, kým obsah extrahovateľných polymérnych proteínov s frakciou omega-gliadínov viac korelovali s ťažnosťou ciest (**Weegels et al., 1996; Skerit et al., 1999 a,b**).

Vyjadrenie prenosu energie miesenia na miesený materiál môže byť vyhodnotený aj prostredníctvom otáčok miesidla, prípadne miesiaceho aparátu (**Anderssen et al., 1998; Haraszi et al., 2008; Wilson et al., 2000**). Autori sa zhodli v názore, že závislosť počtu otáčok k dosiahnutiu maxima konzistencie cesta na rýchlosti miesenia je funkciou jednak typu miesiča ako aj kvality použitej múky, pri čom v istých intervaloch rýchlostí miesenia, ktoré sú pre každý z miesičov špecifické, je počet otáčok miesidla pre dosiahnutie bodu maximálnej konzistencie rýchlostne nezávislý (napr. takýto interval je pre MDD 125 miesič pre slabé múky nad 150 rpm (rpm = otáčky za minútu), silné nad 200 rpm).

Vzhľadom na skutočnosť, že z pohľadu priemyselného spracovania môžu byť požiadavky na miesenie ciest definované aj ako nákladovo najefektívnejšia cesta k ich kvalitnej výrobe, sme v našej práci skúmali zmeny vlastností ciest pripravených počas rôznych rýchlostí miesenia na prototyp prístroja Diosna SP 12 v modifikovanej verzii (Diosna Dierks and Söhne, Osnabrück, Germany), z ktorého je možné získať výsledky priamo korelovať s priemyselnými miesičmi tohto výrobcu. Reologické charakteristiky vzoriek boli získané meraniami na reologických prístrojoch Amylograph-E, Farinograph-E a Extensograph-E (Brabender OHG., Duisburg, Germany).

### MATERIÁL A METODIKA

V práci bola použitá múka T512 (MPC Cessi a.s., Spišská Nová Ves, SR) s definovanými vlastnosťami.

Obsah minerálnych látok (popola) bol stanovený podľa ICC štandard 104/1, 1990, obsah dusíkatých látok v zmysle STN ISO 1871, 1997, obsah vlhkosti (ICC štandard 110/1, 1976) obsah mokrého lepku v sušine (ICC štandard No. 106/2, 1984), obsah škrobu (STN EN ISO

10520, 2002,) stanovenie Zeleného indexu (ICC štandard 115/1, 1994). Číslo poklesu bolo stanovené na prístroji Falling number 1500 Perten (ICC štandard 107/1, 1995).

Reologické hodnotenie múky a cesta bolo robené nasledovnými metódami:

Farinograph-E (Brabender OhG, Duisburg, Germany) podľa ICC štandard 115/1, 1997, Extensograph-E (Brabender OhG) - ICC štandard 114/1, 1992, Amylograph-E (Brabender OhG) - ICC štandard 126/1, 1992.

Na prípravu cesta sme použili destilovanú vodu v množstve ktoré zodpovedalo farinografickej väznosti vzorky múky s NaCl tak, aby výsledná koncentrácia bola 2,2325 % NaCl na sušinu múky. Vstupné suroviny sme vymiesili na cesto podľa jednotlivých režimov miesenia na laboratórnom miesiči Diosna SP12. Po vymiesení cesta bola zaznamenaná teplota, počet otáčok miesiacej špirály a spotrebovaná energia vo W. h na vymiesenie cesta. Následne bola odobratá vzorka cesta, ktorú sme reologicky hodnotili (Farinograph-E, Extensograph-E) podľa modifikovaných metódik.

### Laboratórny miesič Diosna SP12 – modifikovaná verzia

Prístroj bol modifikovaný za účelom rozšírenia možností použitia rôznych režimov prípravy cesta aplikovateľných aj na ostatné miesiace zariadenia Diosna vyrábané pre priemysel. Modifikácia sa týkala samostatného pohonu dieže a miesiacej špirály s individuálnym meraním a ovládaním. Miesič priamo meria spotrebu energie vo [W .h], ktorá je spotrebovaná pri miesení cesta, finálnu teplotu cesta prostredníctvom teplotného čidla Pt 100 umiestneného v priestore vertikálnej osi miesiacej nádoby a počet otáčok miesiacej špirály, ktoré sa vykonajú počas miesenia.

### Modifikácie reologických meraní

Modifikácia klasickej metodiky pre farinografické stanovenie spočívala v použití farinografu na reologickú charakterizáciu cesta pripraveného na Diosne SP12. Vypočítané množstvo cesta sme 5 min. po jeho vymiesení vložili do prístroja a z farinogramu merali jeho reologické parametre, po 4 min. a 6 min.

Modifikácia extenzografickej metódy spočívala v zmene časov (doby v min.) v ktorých sme merali vlastnosti cesta a v príprave cesta na meranie. Cesto bolo pripravené na Diosne SP12 a merané ihneď a po 30 minútach po vymiesení. Po 30 minútovom odpočinku sme merali súbežne aj druhú vzorku cesta, ktorá bola oddelená z rovnako vymieseneho cesta a bola meraná bez predchádzajúceho namáhania. Modifikované metodiky dosahovali opakovateľné výsledky s odchýlkou do 4 % medzi hodnotami opakovaných meraní.

### VÝSLEDKY A DISKUSIA

Vyhodnotenie kvalitatívnych parametrov múky a z nej vyrobeného cesta je uvedené v súhrnnej tabuľke 1. Na základe stanovených parametrov môžeme zhodnotiť kvalitu vzorky ako stredne silnú pekársku múku, vhodnú pre výrobu kysnutých ciest požadovanej výťažnosti.



**Tabuľka 1:** Vyhodnotenie základných parametrov múky ( $\sigma$  3 opakovaní) a reologické hodnotenie z nej vyrobeného cesta

Popis znaku	vyhodnotenie
Obsah vlhkosti [%]	12.8
Obsah sušiny [%]	87.2
Obsah popola v sušine [%]	0.55
Obsah mokrého lepku v sušine [%]	24
Ťažnosť lepku [cm]	12
Číslo poklesu [s]	261
N x 5.7 [%]	11.9
Obsah škrobu v sušine [%]	71.5
Zeleného index [cm <sup>3</sup> ]	35
Maximálna konzistencia cesta [FU]	504
Farinografická väznosť múky 500 FU [%]	54.8
Čas vývinu cesta [min]	1.7
Stabilita cesta [min]	9.4
Stupeň zmäknutia cesta (po 5 min) [FU]	32
Stupeň zmäknutia (po 12 min) [FU]	59
Farinograph quality number FQN [s]	97
Začiatok želatinácie škrobu [°C]	62.6
Konzistencia v maxime [AU]	465
Teplota želatinácie v max. [°C]	82

**Zmeny v konzistencií ciest na prvej rýchlosti miesenia**

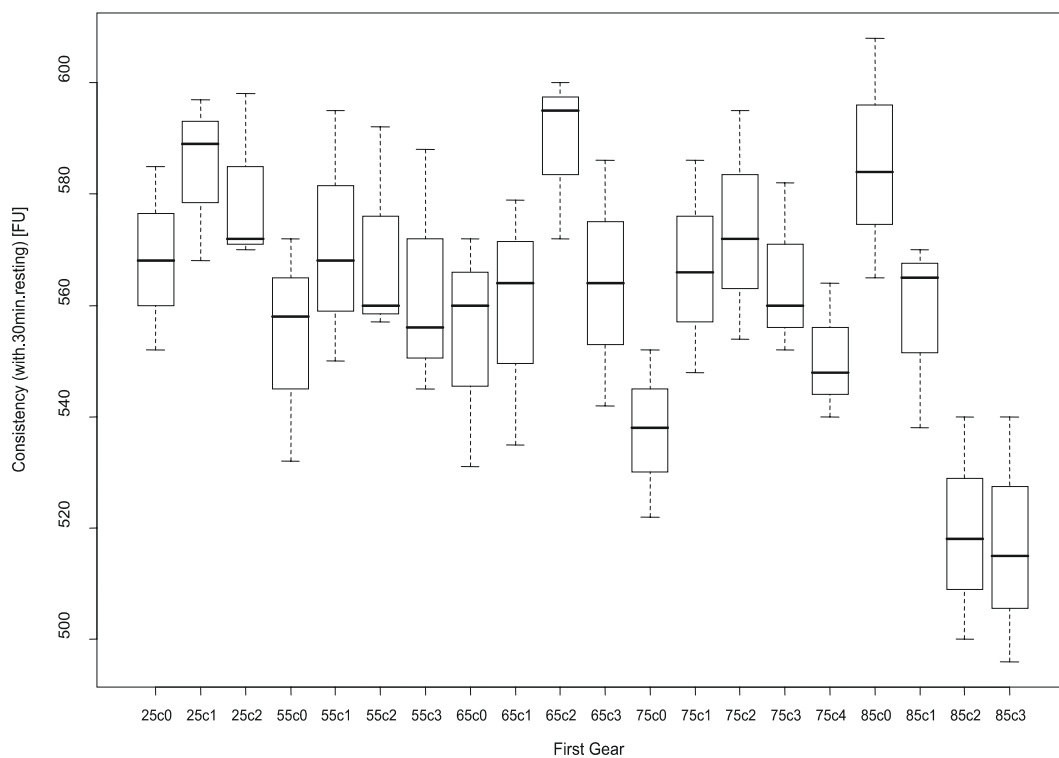
Podľa aktuálnych poznatkov o procesoch a vývine ciest počas miesenia, významné zmeny v štruktúre ciest prebiehajú v prvých fázach miesenia až po dosiahnutie maximálnej konzistencie (Walker, 1996; Graybosch, 1999). Tieto procesy sú závislé od použitej múky, typu miesiča a rýchlosti miesenia. Pri zmene intenzity miesenia na našom type miesiča na prvej rýchlosti sme tiež dosiahli zmeny v konzistencii ciest v súlade s výsledkami citovaných autorov. Vzhľadom na skutočnosť, že títo autori nepoužili Diosna SP12 miesič, neporovnávali sme veľkosť dosiahnutých zmien. Dôležitejšie je, že konzistencia cesta po 30 minútovom odležaní v porovnaní s konzistenciou týchto ciest ihneď po vymiesení na miesiči, preukazne klesla (obrázok 1 A,B, tabuľka 2). V prípadoch, v ktorých nebol pokles konzistencie po relaxácii štatisticky významne preukázaný, bola zistená tendencia k poklesu konzistencie.

Podobné výsledky sú uvádzané aj v prácach iných autorov. Pokles konzistencie po relaxácii cesta je pripisovaný vnútornej kompenzácií napätia medzi reťazcami polymérov v ceste na molekulárnej úrovni, ktoré je vyvolané miesením. Po ukončení pôsobenia síl na vnútorné usporiadanie systému sa ustáli rovnovážny stav, čo je sprevádzané uvoľnením cesta (Singh a MacRitchie, 2001). Najvyšší pokles konzistencie cesta bol zaznamenaný pri najvyššej intenzite miesenia (85 Hz), pričom maximum konzistencie bolo pri tejto intenzite miesenia dosiahnuté najskôr, čo je porovnateľný výsledok s prácami na iných typoch miesičov (Frazier et al., 1975; Zheng et al., 2000). Ukazuje sa tak, že závislosť času vývinu cesta od intenzity miesenia je zrejme principiálne rovnaká pre všetky typy miesičov. Samozrejme, dosiahnuté časy vývinu ciest sú na jednotlivých miesičoch rôzne. Nárast teploty pri prvej rýchlosti miesenia na Diosne SP12 nebol lineárny (obrázok 2, tabuľka 3).

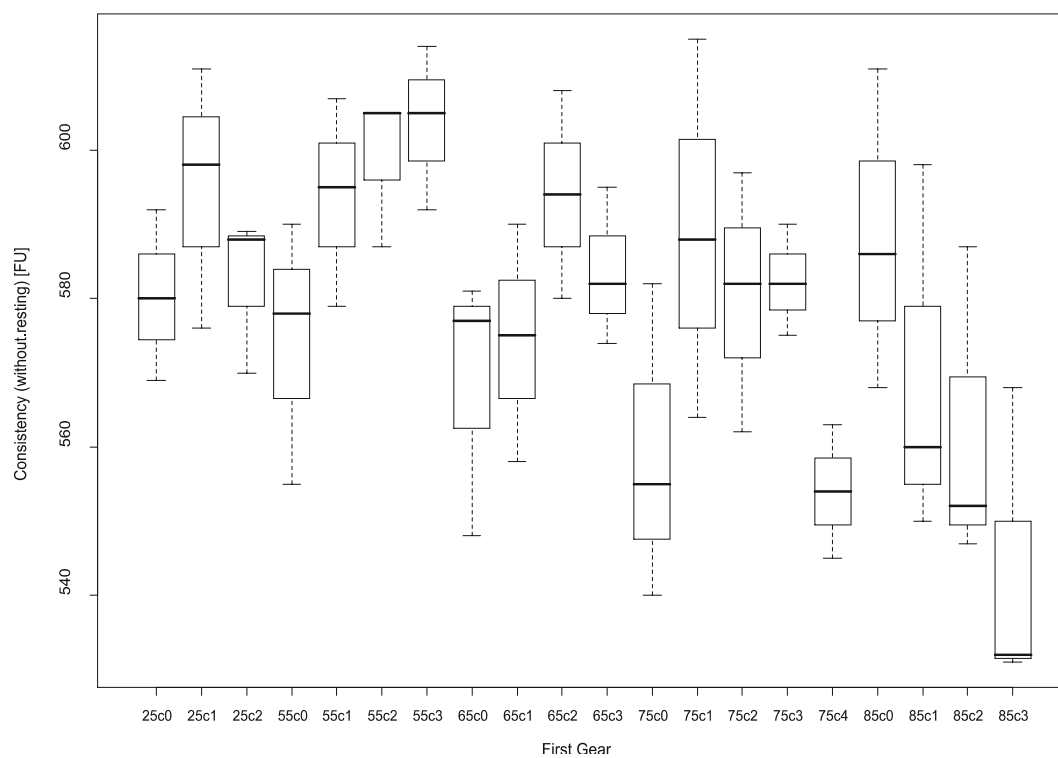
**Tabuľka 2:** Popis a vyjadrenie štatistickej významnosti (p-value) pre pokles konzistencie pred a po relaxácii cesta vymieseneho na Diosne SP12.

PCT	25hz180s	25hz240s	25hz300s	-	-
delta.C	25c0	25c1	25c2	-	-
p-value	0.0266	0.0154	0.3899	-	-
PCT	55hz90s	55hz120s	55hz150s	55hz180s	-
delta.C	55c0	55c1	55c2	55c3	-
p-value	0.0025	0.0258	0.0433	0.0156	-
PCT	65hz90s	65hz120s	65hz180s	65hz240s	-
delta.C	65c0	65c1	65c2	65c3	-
p-value	0.0165	0.0322	0.1188	0.0495	-
PCT	75hz90s	75hz120s	75hz150s	75hz180s	75hz240s
delta.C	75c0	75c1	75c2	75c3	75c4
p-value	0.0797	0.1088	0.3063	0.1255	0.1334
PCT	85hz90s	85hz120s	85hz150s	85hz180s	-
delta.C	85c0	85c1	85c2	85c3	-
p-value	0.0076	0.2725	0.0129	0.0183	-

(PCT – rýchlosť miesenia/čas miesenia v ktorom bolo porovnanie konzistencií uskutočnené, delta.C – označenie daného bodu merania na obrázku 1).



A



B

**Obrázok 1:** Závislosť konzistencie a prvej rýchlosti miesenia pre cesto miesené na Diosne SP12  
 A, (hore) cestá s 30 minútovou relaxáciou  
 B, (dole) cestá bez relaxácie



**Tabuľka 3a:** Nárast teploty v jednotlivých fázach miesenia pri prvej rýchlosti na Diosne SP12 v rozsahu rýchlostí od 25 Hz do 85 Hz.

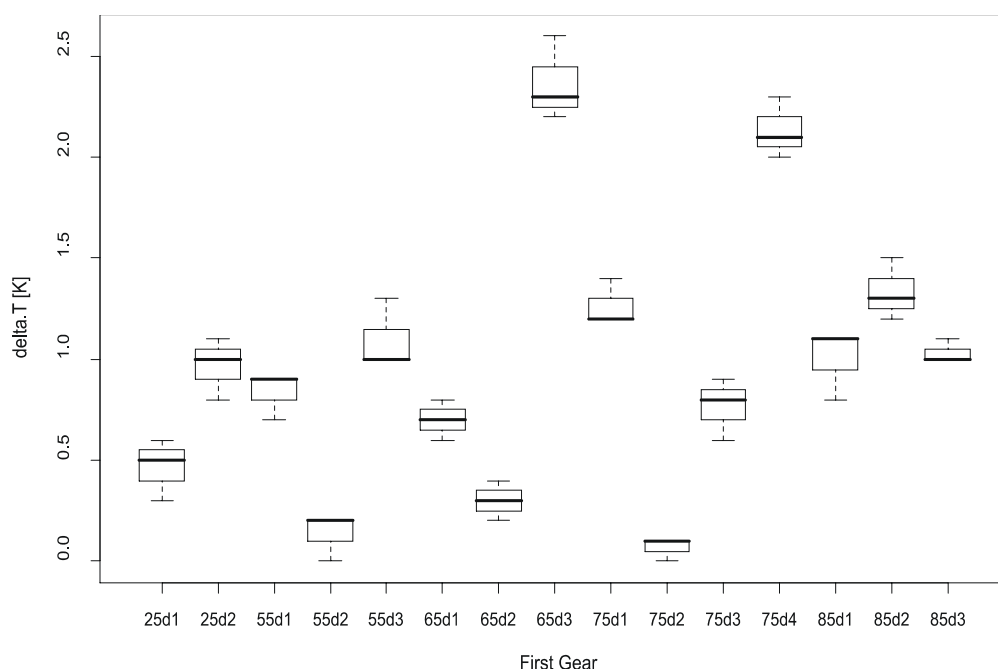
Čas miesenia	90 s	120 s	150 s	180 s	240 s	300 s
Rýchlosť miesenia	delta.T [K]					
85 Hz	0	1.0	1.3	1.2	-	-
75 Hz	0	1.3	0.1	0.8	2.1	-
65 Hz	0	0.7	0.3	2.4	-	-
55 Hz	0	0.8	0.1	1.1	-	-
25 Hz	0	0	0	0	0.5	1.0

**Tabuľka 3b:** popis k obrázku 3 (delta.T – nárast teploty od jedného meraného úseku k druhému meranému úseku vyjadrené v [K]).

Čas miesenia	90 s	120 s	150 s	180 s	240 s	300 s
Rýchlosť miesenia	delta.T [K]					
85 Hz	0	85d1	85d2	85d3	-	-
75 Hz	0	75d1	75d2	75d3	75d4	-
65 Hz	0	65d1	65d2	65d3	-	-
55 Hz	0	55d1	55d2	55d3	-	-
25 Hz	0	0	0	0	25d1	25d2

Od začiatku miesenia sa teplota postupne zvyšovala, pričom v oblasti pred dosiahnutím bodu maximálnej konzistencie sa teplotný nárast spomalil. Po dosiahnutí bodu maxima konzistencie sa teplotný nárast zvyšoval. V oblasti pred dosiahnutím maxima konzistencie sa pravdepodobne dodaná energia využívala skôr na formovanie vnútorných štruktúr a väzieb makromolekúl cesta ako na disipáciu vo forme tepla. Tento predpoklad vychádza okrem iného aj z pozorovaní viacerých autorov,

ktorí sa zamerali na sledovanie distribúcie proteínov v ceste v jednotlivých etapách miesenia na základe ich molekulovej hmotnosti (Skerrit et al., 1999 a,b ; Aussenac et al., 2001; Kuktaite et al., 2004), pričom v oblasti pred a v okolí bodu maximálnej konzistencie zistili najvyšší obsah makropolymérov, ktorých vznik a zánik počas miesenia pozitívne koreloval s odporom a stabilitou cesta.



**Obrázok 2:** Nárast teploty počas miesenia na prvej rýchlosti vo vybraných úsekoch miesenia (vyhodnotené s použitím Kruskal-Wallisovej jednoparametrickej analýzy dát). Popis obrázku je uvedený v tabuľke 3b.

Vnútorné trenie v ceste bude pravdepodobne predstavovať významný faktor zapríčínujúci zahrievanie cesta, čo

úroveň súvisí aj s konštrukciou miesiča. Wilson et al., (2000) uvádzajú, že rýchlosť miesenia, množstvo dodanej

práce a typ múky sú faktory ktoré výrazne ovplyvňujú teplotné pomery ciest počas miesenia. Naše výsledky nie sú v rozpore s týmto tvrdením, skôr ho podporujú.

Výsledky zmien v parametroch ciest miesených uceleným režimom miesenia

Pri priemyselnom spracovaní múky na cesto sa používajú rôzne režimy miesenia, ktoré zväčša pozostávajú z dvoch

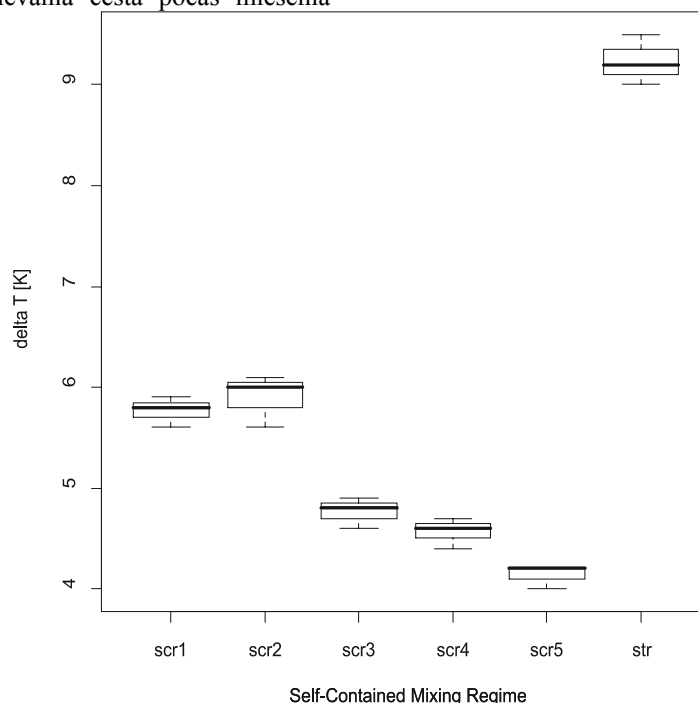
**Tabuľka 4:** Nastavenie ucelených režimov miesenia.

Ucelený režim miesenia	skratka	prvá rýchlosť miesenia [Hz]	Čas miesenia na prvej rýchlosti [s]	druhá rýchlosť miesenia [Hz]	Čas miesenia na druhej rýchlosti [s]
Štandardný režim	str	25	120	50	300
Experimentálny režim 1	scr1	70	120	25	300
Experimentálny režim 2	scr2	60	120	25	300
Experimentálny režim 3	scr3	50	120	25	300
Experimentálny režim 4	scr4	40	120	25	300
Experimentálny režim 5	scr5	30	120	25	300

Z nameraných výsledkov vyplýva, že pri experimentálnych režimoch miesenia je množstvo energie dodané do systému ako aj počet otáčok špirály miesiča v porovnaní so štandardným režimom menšie pri dosiahnutí približne rovnakej konzistencie výsledného cesta. Namerané rozdiely energie a otáčok boli štatisticky preukazné pri čom rozdiel v konzistencii ciest preukazný nebol. Pri porovnaní zahrievania cesta počas miesenia

po sebe kontinuálne nasledujúcich rýchlostí, aplikovaných za daný časový úsek. Pre experimentálnu časť sme zvolili štandardný režim miesenia podľa nastavenia priemyselných zariadení Diosna. Na základe poznatkov a predošlých skúseností sme zostavili experimentálne režimy miesenia, ktorých dopad na parametre cesta sme porovnávali so štandardným režimom. Nastavenia jednotlivých režimov miesenia sú uvedené v tabuľke 4.

podľa experimentálnych režimov bol výrazne signifikantný rozdiel medzi zahriatím cesta medzi jednotlivými experimentálnymi režimami ako aj pri ich celkovom porovnaní so štandardným režimom (obrázok 3), čo pravdepodobne súvisí z efektívnejším využitím vynaloženej energie miesenia v prospech experimentálnych režimov.



**Obrázok 3:** Porovnanie nárastu teplôt medzi jednotlivými ucelenými režimami miesenia ( $\Delta T$  – rozdiel medzi počiatočnou a konečnou teplotou miesenia)

Zmena konzistencie ciest pripravených podľa experimentálnych režimov bola po 30 minútovej relaxácii štatisticky nepreukazná, avšak pokles konzistencie ciest

miesených štandardným režimom bol signifikantný. Na základe výsledkov zmeny konzistencie a zahriatí cesta možno predpokladať, že energia dodávaná pri

štandardnom režime miesenia do cesta nebola primeraná k požiadavkám cesta na optimálne vymiesenie a jej nadbytok spôsobil nadmerné zahrievanie ako aj ruptúru štruktúry cesta. Dodaním väčšieho podielu energie pred dosiahnutím piku maximálnej konzistencie cesta s následným miernym miesením prispelo k udržiavaniu konzistencie cesta aj počas jeho relaxácie. Tento výsledok podporujú aj tvrdenia mnohých autorov, ktorí sledovali vývin proteínových makromolekulárnych štruktúr počas miesenia na rôznych miesičoch a zhodne potvrdzujú, že na vývin cesta a makropolymérov má spôsob a rýchlosť miesenia významný vplyv a to hlavne vo fáze vývinu priestorovej nadmolekulárnej štruktúry (Skerritt et al., 1999a, Weegels et al., 1996; Kuktaite et al., 2004; Larsson et al., 2005; Haraszi et al., 2008). Toto zistenie by mohlo mať po overení v priemyselnom meradle významný dopad na efektívnosť procesu miesenia. Prezentované výsledky sú striktné viazané na kvalitatívne a kvantitatívne parametre použitej suroviny a bude nutné overiť ich na väčšom súbore múk s rozdielnou kvalitou. Vo viacerých predošlých prácach boli namerané hodnoty počas miesenia silne závislé na kvalite použitých múk, pričom výsledky medzi vzorkami navzájom boli často rozporuplné.

Extenzografické hodnotenie ciest miesených podľa experimentálnych a podľa štandardného režimu, podporilo pozitívny vplyv experimentálnych režimov miesenia na technologickú akosť takto vyrobených ciest. Extenzografická energia bola v prípade režimu scr 2 a scr 3 významne väčšia v porovnaní so štandardným režimom. Ostatné experimentálne režimy dosahovali rovnako vyššie hodnoty extenzografickej energie, ktoré však boli na hranici štatistickej preukaznosti. Extenzografická energia je pri tom jeden z ukazovateľov, ktorý veľmi významne koreluje s retenčnou kapacitou ciest a objemom výrobkov v praxi.

## ZÁVER

Vplyvom zvýšenej intenzity miesenia na prvej rýchlosti bez prechodu na druhú rýchlosť miesenia sa zvýšila konzistencia mieseného cesta a naopak, pričom miera tejto zmeny musí byť hodnotená v závislosti od typu použitého miesiaceho zariadenia a kvality použitej múky. Zmeny v konzistencii boli merané sekundárne na prístroji Farinograf-E a neboli v dôsledku značného rozptylu hodnôt štatisticky preukazné ( $p > 0,05$ ), avšak tendencia uvedeného javu bola jasne viditeľná. So zvýšenou intenzitou miesenia sa urýchlil aj vývin cesta, avšak jeho stabilita naopak so zvýšením intenzity klesala. V prípade miesenia cesta z nami použitej múky na Diosne SP12 bola energia miesenia s ohľadom na dosiahnuté technologické zmeny využitá oveľa efektívnejšie pri miesení podľa experimentálnych režimov. Rovnako merania nárastu teploty preukázali nižšie zahriatie ciest miesených experimentálne v porovnaní so štandardným miesením. Porovnaním extenzografickej energie bol v prípade režimu scr 2 a 3 preukazne zistený nárast hodnoty tohto parametra. Celkovo namerané hodnoty pre experimentálne režimy boli tendenčne technologicky lepšie v porovnaní s cestami pripravenými štandardným režimom, i keď boli

na hranici štatistickej preukaznosti. Konzistencia cesta mieseného experimentálne nebola v porovnaní so štandardným miesením významne rozdielna. Všetky výsledky sú striktné viazané na použitý materiál a metodiku.

## LITERATÚRA

- ANDERSEN, R. S., GRAS, P. W., MACRITCHIE, F. 1998. The rate-independence of the mixing of wheat flour dough to peak dough development. *Journal of Cereal Science*, 27, 1998, p. 167-177.
- AUSSENAC, T., CARCELLER J. L., KLEIBER, D. 2001. Changes in SDS solubility of glutenin polymers during dough mixing and resting. *Cereal Chemistry*, 78, 2001, p. 39-45.
- DON, C., LICHTENDONK, W. J., PLIJTER J. J., VAN VLIET T., HAMER R. J. 2005. The effect of mixing on glutenin particle properties: aggregation factors that affect gluten function in dough. *Journal of Cereal Science*, 41, 2005, p. 69-83.
- FRAZIER, P. J., DANIELS, N. W. R., RUSSEL EGGITT, P. W. 1975. Rheology and the continuous bread making process. *Cereal Chemistry*, 52, 1975, p. 106-130.
- GRAYBOSCH, R. A., PETERSON, C. J., HARELAND, G. A., SHELTON, D. R., OLEWNIK, M. C., HE, H., STEARNS, M. M. 1999. Relationships between small-scale wheat quality assays and commercial test bakes. *Cereal Chemistry*, 76, 1999, p. 428-433.
- HARASZI, R., LARROQUE, O. R., BUTOW, B. J., GALE, K. R., BEKES, F. 2008. Differential mixing action effect on functional properties and polymeric protein size distribution of wheat dough. *Journal of Cereal Science*, 47, 2008, p. 41-51.
- HWANG, C. H., GUNASEKARAN, S. 2001. Determining wheat dough mixing characteristics from power consumption profile of a conventional mixer. *Cereal Chemistry*, 78, 2001, p. 88-92.
- ICC STANDARD NO. 107/1, 1995. Determination of the "Falling Number" according to Hagberg-Perten as a Measure of the Degree of Alpha-Amylase Activity in Grain and Flour. Vienna : International association of cereal sciences and technology, 1995, 5 pp.
- ICC STANDARD NO. 115/1, 1994. Determination of Sedimentation Value (ac. to Zeleny) as an Approximate Measure of Baking Quality. Vienna : International association of cereal sciences and technology, 1994, 6 pp.
- ICC STANDARD NO. 116/1, 1992. Method for Using the Brabender Farinograph. Vienna : International association of cereal sciences and technology, 1992, 5 pp.
- ICC STANDARD NO. 114/1, 1992. Method for using the Brabender Extensograph. Vienna : International association of cereal sciences and technology, 1992, 6 pp.
- ICC STANDARD NO. 126/1, 1992. Method for using the Brabender Amylograph. Vienna : International association of cereal sciences and technology, 1992, 5 pp.
- ICC STANDARD NO. 104/1, 1990. Determination of ash in cereals and cereal products. Vienna : International association of cereal sciences and technology, 1990, 5 pp.
- ICC STANDARD NO. 110/1, 1976. Determination of Moisture Content of Cereals and Cereal Products. Vienna : International association of cereal sciences and technology, 1976, 6 pp.

ICC STANDARD NO. 106/2, 1984. Working Method for the Determination of Wet Gluten in Wheat Flour. Vienna : International association of cereal sciences and technology, 1984, 6 pp.

KILBORNE, R. H., TIPPLES, K. H. 1972. Factors affecting mechanical dough development I. effect of mixing intensity and work input. *Cereal chemistry*, 49, 1972, p. 48-53.

KUKTAITE, R., LARSON, H., JOHANSON, E. 2004. Variation in protein composition of wheat flour and its relationship to dough mixing behavior. *Journal of Cereal Science*, 40, 2004, p. 31-39.

LARSSON, H., KUKTAITE, R., MARTTILA, S., JOHANSSON, E. 2005. Effect of mixing time on gluten recovered by ultracentrifugation studied by Microscopy and rheological Measurements. *Cereal Chemistry*, 82, 2005, p. 375-384.

MANI, K., ELIASSON, A. C., LINDHAL, L., TRÄGARDH, C. 1992. Rheological properties and bread making quality of wheat flour doughs made with different dough mixers. *Cereal Chemistry*, 69, 1992, p. 222-225.

OLIVIER, J. R., ALLEN, H. M. 1992. The prediction of breadmaking performance using the farinograph and extensograph. *Journal of Cereal Science*, 15, 1992, p. 79-89.

SINGH, H., MACRITCHIE, F. 2001. Application of polymer science to properties of gluten. *Journal of Cereal Science*, 33, 2001, p. 231-243.

SKERRITT, J. H., HAC, L., BEKES, F. 1999. Depolymerisation of the glutenin macropolymer during dough mixing: I. changes in levels, molecular weight distribution, and overall composition. *Cereal Chemistry*, 76, 1999, p. 395-401.

SKERRITT, J. H., HAC, L., LINDSAY, M. P., BEKES, F. 1999. Depolymerisation of the glutenin macropolymer during mixing: II. differences in retention of specific glutenin subunits. *Cereal Chemistry*, 76, 1999, p. 402-409.

STN ISO 1871, 1997. Common conditions for determination of organic nitrogen according to Kjeldahl method. Bratislava: Slovak Standard Institute, 1997, 12 pp.

STN EN ISO 10520, 2002. Native starch, Determination of starch content - Ewers polarimetric method. Bratislava: Slovak Standard Institute, 2002, 16 pp.

TRONSMO, K. M., FAERGESTAD, E. M., LONGVA, A., SCHFIELD, J. D. 2002. A study of how size distribution of

gluten proteins, surface properties of gluten and dough mixing properties relate to baking properties of wheat flours. *Journal of Cereal Science*, 32, 2002, p. 201-214.

WALKER, C. E., HANZELTON, J. L. 1996. Dough rheological tests. *Cereal Foods World*, 41, 1996, p. 23-28.

WEEGELS, A. M., VAN DE PIJPEKAMP, A. M., GRAVELAND, A., HAMER, R. J., SCHOFIELD, J. D. 1996. Depolymerisation and Re-polymerisation of wheat glutenin during dough processing. I. Relationships between glutenin macropolymer content and quality parameters. *Journal of Cereal Science*, 23, 1996, p. 103-111.

WILSON, A. J., WOODING, A. P., MORGENSTERN, M. P. 1997. Comparison of work input requirement on laboratory-scale and industrial-scale mechanical dough development mixers. *Cereal Chemistry*, 74, 1997, p. 715-721.

WILSON, A. J., MORGENSTERN, M. P., KAVALE, S. 2001. Mixing response of a variable speed 125 g laboratory scale mechanical dough development mixer. *Journal of Cereal Science*, 34, 2001, p. 151-158.

WOODING, A. R., KAVALE, S., MACRITCHIE, F., STODDARD, F. L. 1999. Link between mixing requirements and dough strength. *Cereal Chemistry*, 76, 1999, p. 800-806.

ZHENG, H., MORGENSTERN, M. P., CAMPANELLA, O. H., LARSEN, N. G. 2000. Rheological properties of Dough During mechanical dough development. *Journal of Cereal Science*, 32, 2000, p. 293-306.

ZOUNIS, S., QUAIL, K. J. 1997. Predicting test bakery requirements from laboratory mixing tests. *Journal of Cereal Science*, 25, 1997, p. 185-196.

### Pod'akovanie:

Táto práca vznikla s podporou agentúry VEGA, pri riešení GP 1/0661/09 Reologické modely správania sa pekárskeho polotovaru a ich vzťah ku kvalite finálnych výrobkov.

### Kontaktná adresa:

prof. Ing. Zdenka Muchová, CSc., Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre, FBP, KSSRP, Trieda Andreja Hlinku 2, E-mail: zdenka.muchova@uniag.sk

Ing. Boris Žitný. Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre, FBP, KSSRP, Trieda Andreja Hlinku 2, Email: zitnyb@t-zones.sk

Ing. Ladislav Haris. Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre, FBP, KSSRP, Trieda Andreja Hlinku 2.

**H A C C P**  
**CONSULTING**



**KATEDRA HYGIENY  
A BEZPEČNOSTI POTRAVÍN**

<b>ZUZANA BARBORÁKOVÁ, SOŇA FELŠŤOČIOVÁ, DANA TANČINOVÁ, MÁRIA DOVIČIČOVÁ, ZUZANA MAŠKOVÁ, ROMAN LABUDA</b> VÝSKYT TOXINOGENNÝCH DRUHOV RODU <i>PENICILLIUM</i> V PŠENICI SLOVENSKEHO PŮVODU Z ÚRODY 2008 A ICH MOŽNÝ VPLYV NA ZDRAVIE KONZUMENTA INCIDENCE OF TOXIGENIC <i>PENICILLIUM</i> IN WHEAT GRAINS OF SLOVAK ORIGIN AND THEIR POTENTIAL IMPACT ON THE CONSUMER HEALTH ..... 1	MALT ..... 45
<b>ALENA BEDNÁRIKOVÁ, JANA SÁDECKÁ</b> PROFIL AMINOKYSELÍN V ORECHOVINÁCH AKO POTENCIÁLNYCH KOMPONENTOV PEKÁRENSKÝCH ZMESÍ AMINO ACIDS PROFILE IN SOME NUTS AS POTENTIAL INGREDIENTS OF BAKERY MIXTURES ..... 4	<b>MARIA DYMKOWSKA-MALESA, WERONIKA WOŹNIAK, JANUSZ ZAKRZEWSKI, KRYSZYNA A. SKIBNIEWSKA</b> VYHODNOCOVANIE ENERGETICKEJ HODNOTY MENU PRE DETI V POĽSKÝCH MATERSKÝCH ŠKOLÁCH EVALUATION OF ENERGY VALUE FROM KINDERGARTEN MENU OF POLISH CHILDREN ..... 50
<b>TATIANA BOJŇANSKÁ, HELENA FRANČÁKOVÁ, PETER CHLEBO, RADOVAN GAŽAR</b> MOŽNOSTI VYUŽITIA POHÁNKY PRI VÝROBE CHLEBA A VÝHODY JEHO KONZUMÁCIE POSSIBILITY OF EXPLOITATION OF BUCKWHEAT IN BREAD-MAKING AND ADVANTAGES OF ENRICHED BREAD CONSUMPTION ..... 8	<b>DANA MARCINČÁKOVÁ, PAVEL MAĽA, MÁRIA BARANOVÁ, SLAVOMÍR MARCINČÁK</b> STABILITA FARBY EXTRAKTOV MIKROBIÁLNEHO FARBIVA ČERVENÁ FERMENTOVANÁ RYŽA COLOR STABILITY OF EXTRACTS FROM MICROBIAL COLORANT RED FERMENTED RICE ..... 53
<b>TERÉZIA FILIPEJOVÁ, JAROSLAV KOVÁČIK, MARCELA CAPCAROVÁ, ADRIANA KOLESÁROVÁ, KATARÍNA KIRCHNEROVÁ, VLADIMÍR FOLTÝS</b> ZHODNOTENIE VYBRANÝCH BIOCHEMICKÝCH UKAZOVATEĽOV MLIEKA DOJNÍC A ICH KORELÁCIE EVALUATION OF SELECTED BIOCHEMICAL MILK PARAMETERS OF DAIRY COWS AND THEIR CORRELATIONS ..... 12	<b>ANNA MICHALCOVÁ, ZUZANA KRUPOVÁ</b> VPLYV GENOTYPOV B-LAKTOGLOBULÍNU NA ZLOŽENIE BIELKOVINOVÉHO KOMPLEXU A TECHNOLOGICKÉ VLASTNOSTI MLIEKA OVIEC ZOŠLACHTENÁ VALAŠKA INFLUENCE OF B-LACTOGLOBULIN GENOTYPES ON THE NITROGEN DISTRIBUTION IN THE TOTAL PROTEIN AND TECHNOLOGICAL PROPERTIES OF MILK FROM THE IMPROVED VALACHIAN SHEEP ..... 58
<b>SOŇA GAVURNÍKOVÁ, ĽUBOMÍR MENDEL, MICHAELA HAVRENTOVÁ, KATARÍNA ZIRKELBACHOVÁ, MAGDALÉNA BIELIKOVÁ, KATARÍNA BOJŇANSKÁ</b> PEKÁRSKA KVALITA A REOLOGICKÉ VLASTNOSTI JAČMENNO-PŠENIČNÝCH MÚK BREADMAKING QUALITY AND RHEOLOGICAL PROPERTIES OF BARLEY-WHEAT FLOURS ..... 16	<b>LADISLAVA MIŠURCOVÁ, STANISLAV KRÁČMAR</b> STANOVENÍ SRAVITELNOSTI PRODUKTŮ ZE SLADKOVODNÍCH A MOŘSKÝCH ŘAS EVALUATION OF THE DIGESTIBILITY OF PRODUCTS FROM FRESHWATER ALGAE AND SEAWEEDS ..... 64
<b>MILAN CHŇAPEK, ZDENKA GÁLOVÁ, MARIÁN TOMKA, ĽUBOMÍR RÜCKSCHLOSS</b> NUTRIČNÁ A TECHNOLOGICKÁ KVALITA FAREBNÝCH GENOTYPOV PŠENICE LETNEJ FORMY OZIMNEJ ( <i>TRITICUM AESTIVUM</i> L.) NUTRITIVE AND TECHNOLOGICAL QUALITY OF COLOURED BREAD WHEAT GENOTYPES ( <i>TRITICUM AESTIVUM</i> L.) ..... 20	<b>ZUZANA PROCHÁZKOVÁ, MICHAELA DRAČKOVÁ, ALENA REMEŠOVÁ, BOHUMÍRA JANŠTOVÁ, HANA PŘIDALOVÁ, LENKA VORLOVÁ</b> VYUŽITÍ BLÍZKÉ INFRAČERVENÉ SPEKTROSKOPIE PRO STANOVENÍ ZÁKLADNÍCH FYZIKÁLNĚ-CHEMICKÝCH PARAMETRŮ OVČÍHO MLÉKA APPLICATION OF NEAR INFRARED SPECTROSCOPY TO DETERMINE THE BASIC CHEMICAL AND PHYSICAL PARAMETERS OF SHEEP MILK ..... 70
<b>PETER CHRENK, ALEXANDER MAKAREVICH, JOZEF BULLA</b> KVALITA MĚSA A MLIEKA TRANSGÉNNÝCH KRÁLIKOV TRANSGENIC RABBIT MILK AND MEAT QUALITY ..... 25	<b>JANA SÁDECKÁ, EMIL KOLEK, JANKA KOREŇOVÁ, JANKA LOPAŠOVSKÁ</b> „STUDENÁ STERILIZÁCIA“ ORECHOVÍN AKO POTENCIÁLNYCH KOMPONENTOV PEKÁRENSKÝCH PRODUKTOV „COLD STERILISATION“ OF WALNUTS AS POTENTIAL COMPONENT OF BAKERY PRODUCTS ..... 73
<b>KITA AGNIESZKA, PŁUCIENNIK EWA</b> VPLYV TEPLoty NA FAREBNÚ A OXIDAČNÚ STABILITU OLEJOV BOHATÝCH NA OBSAH POLYUNENASÝTENÝCH MASTNÝCH KYSELÍN THE EFFECT OF TEMPERATURE ON COLOUR OF OILS RICH IN POLYUNSATURATED FATTY ACIDS ..... 29	<b>JÁN ŠAJBIDOR</b> PŘÍPRAVA A ANALÝZA OXIDOVANÝCH METABOLITOV KYSELINY ARACHIDÓNOVÉJ OXIDISED METABOLITES OF ARACHIDONIC ACID: PREPARATION AND ANALYSIS ..... 82
<b>ANNA KREBS-ARTIMOVÁ, MIROSLAV KROČKO, VIERA DUCKOVÁ, MARGITA ČANIGOVÁ</b> TESTOVANIE ÚČINNOSTI SANITAČNÝCH PROSTRIEDKOV NA ENTEROKOKY TESTING OF SANITARY DETERGENTS EFFECTIVENESS TO ENTEROCOCCI ..... 35	<b>SILVIA ŠILLEROVÁ, ANEŽKA POLÁKOVÁ, DANA URMINSKÁ, EVA SZABOVÁ</b> CHEMICKÁ A BIOCHEMICKÁ ANALÝZA KVASINIEK <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i> KMEŇ KOLÍN, 612 A GÖYNG CHEMICAL A BIOCHEMICAL ANALYSIS OF YEAST <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i> STRAIN KÖLN, 612 AND GÖYNG ..... 85
<b>DENISA LIPTÁKOVÁ, ANNA HUDECOVÁ, ĽUBOMÍR VALÍK, ALŽBETA MEDVEĐOVÁ</b> KVANTITATÍVNA ANALÝZA RASTU <i>CANDIDA MALTOZA</i> A <i>GEOTRICHUM CANDIDUM</i> : VPLYV TEPLoty A PRÍTOMNOSTI <i>LACTOBACILLUS RHAMNOSUS</i> GG QUANTITATIVE ANALYSIS OF THE GROWTH OF <i>CANDIDA MALTOZA</i> AND <i>GEOTRICHUM CANDIDUM</i> : THE EFFECT OF TEMPERATURE AND <i>LACTOBACILLUS RHAMNOSUS</i> GG ..... 39	<b>BRONISLAVA ŠKARBOVÁ, JOZEF GOLIAN</b> STANOVENIE VYBRANÝCH B-AGONISTOV V MLIEKU METÓDOU LC/MS/MS DETERMINATION SELECTED B-AGONISTS IN MILK BY LC/MS/MS METHOD 90
<b>MIRIAM LIŠKOVÁ, HELENA FRANČÁKOVÁ, JÁN MAREČEK</b> VPLYV DORMANCIE NA FORMOVANIE TECHNOLOGICKÝCH PARAMETROV SLADU EFFECT OF DORMACY ON FORMATION OF TECHNOLOGICAL PARAMETERS OF	<b>DANA TANČINOVÁ, ZUZANA MAŠKOVÁ, SOŇA FELŠŤOČIOVÁ, MÁRIA DOVIČIČOVÁ, ZUZANA BARBORÁKOVÁ, ROMAN LABUDA</b> <i>NIGROSPORA</i> – NOVÝ ENDOFYT NA PŠENICI ( <i>TRITICUM AESTIVUM</i> L.) SLOVENSKEHO PŮVODU <i>NIGROSPORA</i> – NEW ENDOPHYTE FROM WHEAT ( <i>TRITICUM AESTIVUM</i> L.) OF SLOVAK ORIGIN ..... 94
	<b>BORIS ŽITNÝ, LADISLAV HARIS, ZDENKA MUCHOVÁ</b> ZMENY REOLOGICKÝCH VLASTNOSTÍ PŠENIČNEHO CESTA VPLYVOM MIESENIA CHANGES IN RHEOLOGICAL PROPERTIES OF WHEAT DOUGH CAUSED BY MIXING PROCESS ..... 100



# FAKULTA BIOTECHNOLÓGIE A POTRAVINÁRSTVA

**Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre**

**Fakulta organizuje vzdelávanie v akreditovanom trojstupňovom štúdiu (bakalárske, inžinierske, doktorandské).**

## **BAKALÁRSKE ŠTUDIJNÉ PROGRAMY (3 roky)**

- 1. Agropotravinárstvo**
- 2. Aplikovaná biológia**
- 3. Agrobiotechnológia**
- 4. Bezpečnosť a kontrola potravín**

## **INŽINIERSKE ŠTUDIJNÉ PROGRAMY (2 roky)**

- 1. Technológia potravín**
- 2. Biotechnológia**
- 3. Aplikovaná biológia**
- 4. Bezpečnosť a kontrola potravín**

## **DOKTORANDSKÉ ŠTUDIJNÉ PROGRAMY (4 roky)**

- 1. Technológia potravín**
- 2. Molekulárna biológia**
- 3. Biotechnológia**

**[www.fbp.sk](http://www.fbp.sk)**