

1

2011



Vedecký časopis pre potravinárstvo

Scientific Journal for Food Industry

číslo

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

ročník 5  
číslo 1  
február 2011

potravinárstvo 1 (5)  
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  
doc. Ing. Roman Labuda, PhD.,  
Tuln, Rakúsko  
Ing. Zuzana Bírošová, CSc.,  
Ministerstvo pôdohospodárstva SR

## Potravinárstvo

### Scientific Journal for Food Industry

**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:** 5, č. 1/2011 • Vedecký časopis pre potravinárstvo • Scientific Journal for Food Industry • **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](http://www.potravinarstvo.com) • **Adresa redakcie:** Slivková 12, 951 01 Nitrianske Hrnčiarovce • **E-mail:** [info@potravinarstvo.com](mailto: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 indexovaný v databázach: UIUC OAI registry, OAIster, AGRIS FAO, Google Scholar a CrossRef • **Názov a skratka pomocou ktorých je časopis indexovaný v medzinárodných databázach:** *Potravinarstvo, Potr.*

Všetky práva vyhradené, © 2011 Potravinárstvo®  
Evidenčné číslo Ministerstva kultúry SR: 3771/09  
ISSN 1338-0230 (tlačaná verzia)



Katedra hygieny a bezpečnosti  
potravín



## PROCESS OF OBTAINING OF SUGAR FROM SUGAR BEET AND INFLUENCE ON ITS QUALITY

*Tatiana Bojňanská, Marek Bennár, Helena Frančáková, Marián Tokár*

### ABSTRACT

Cooking of massecuites has been study in the connection with different particle size distribution of white sugar. During the crystallization is possible to operate with parameters which have influence on particle size of white sugar. Dry matter of juice in crystallizer, volume of the standard syrup in crystallizer and heating curve of crystallization process are constant parameters in this process. Quantity of slurry (seed magma crystallizate) and volume of slurry massecuite are parameters which can be changed for control the particle size distribution of white sugar. Five variants of viable parameters have been trying for obtain ideal particle size distribution of white sugar. As a best has been evaluated variant with 1100 cm<sup>3</sup> of slurry and 20 % of volume of slurry massecuite in crystallizer. This variant has had the crystals proportions captured by the sieves between 1.00 and 0.40 mm with minimal differences in weight. More results have been related to reduction of losses of sugar in molasses with the right setting for the line of cooling crystallization process. The losses of sugar can be reduced by adding two coolers in the end of cooling crystallization process what will decrease a temperature to 40°C. This temperature will lead to more efficient crystallization in the cooling crystallization process.

**Keywords:** crystallization process, crystal size, slurry, slurry massecuite, cooling temperature.

### ÚVOD

V súčasnej dobe sa v našich podmienkach pestuje cukrová repa len za účelom získavania sacharózy, pričom jej pestovanie prispieva vedľajšími produktmi vznikajúcimi pri jej spracovaní (skrojky, vysladené rezky, melasa) aj k určitým úhradám v krmivárskych bilanciách.

Na Slovensku sú v súčasnosti v prevádzke dva cukrovary, a to v Trenčianskej Teplej a v Sereďi. Cukrovarníctvo patrí medzi problémové odbory, pretože s výnimkou rokov 1995 a 1996 bolo stratové (Janíček, 2010). Aj keď sa v cukrovarníctve postupne profilujú silné podniky s predpokladmi prosperity, väčšina ekonomických a finančných ukazovateľov zaznamenala priemernú negatívnu tendenciu. Problémy sú spôsobené vysokou cenou suroviny a nízkou možnosťou odbytu cukru. V súčasnosti je vo väčšine subjektov rozhodujúci podiel zahraničného kapitálu (Suhr, Schulze, 2003). Prínos technológií umožňuje pracovať ekonomickejšie, čím sa v kombinácii s cenovými výhodami potenciálne zvyšujú konkurenčné výhody (Wunsch, 2005).

V podmienkach strednej Európy je cukrová repa jedinou plodinou, ktorá je spracovávaná za účelom získavania sacharózy. Bola vyšľachtená tak, aby pri pomerne dlhej vegetačnej dobe a v podmienkach úrodných pôd mierneho zemepisného pásma poskytovala maximálne výnosy cukru (Tichá, 1990; Ober et al., 2005).

Získavanie cukru je nepretržitý proces, cieľom ktorého je zvyšovať kvocient čistoty cukrovarníckych štiav a medziproduktov. Princípom je extrakcia sacharózy z repných rezkov a jej následná kryštalizácia z presýtených roztokov. Pre cukorné roztoky je typické, že tvoria presýtené roztoky a takéto roztoky obsahujú viac rozpusteného cukru ako zodpovedá nasýtenému roztoku. Tento prebytočný cukor vykryštalizuje buď spontánne, ak je presýtenie v labilnej oblasti, alebo po zaočkovaní, ak je presýtenie v metastabilnej oblasti. Hranice metastabilnej oblasti sú ovplyvnené predovšetkým teplotou, čistotou a prítomnosťou tuhej

fázy. Spodná hranica zodpovedá nasýtenému roztoku (Gebler, Bubeník, 1993; Poel et al., 1998).

Pri kryštalizácii v cukrovaroch sa pracuje s presýtenými roztokmi, ktoré sa získavajú odparovaním vody v zrnči alebo ochladzovaním cukrovín v kryštalizátore (Hartel, 2001).

Podľa Rohani et al. (1999a) je kryštalizačný proces zložený z dvoch fáz. Prvou je nukleácia (vznik zárodokov), na ktorú nadväzuje druhá fáza, čiže vlastný rast kryštálov. Pri teoretickom vysvetľovaní kryštalizačného procesu dochádza postupne k transportu molekúl sacharózy z roztoku k difúznej vrstve v okolí kryštálov, k difúzii molekúl sacharózy difúznou vrstvou, k povrchovej difúzii molekúl na povrchu kryštálov a k zaradeniu do kryštalovej mriežky (Rohani et al., 1999b).

Z hľadiska kvality finálneho produktu, čiže rafinovaného cukru, je etapa kryštalizácie jedna z najdôležitejších, pretože riadenie kryštalizácie spolu s dozrievaním zadinovej cukroviny ovplyvňuje hmotnostný podiel požadovaných veľkostných frakcií cukru (Velazquez-Camilo et al., 2009). Cieľom práce prezentovanej v príspevku bolo analyzovanie a vyhodnotenie viacerých spôsobov kryštalizácie so snahou odporučiť optimálny postup očkovania a náťahu očkovacej cukroviny a optimálne množstvo vody a melasy pridávaných do zadinovej cukroviny pre čo najlepšie vycukrenie melasy počas ich dozrievania.

### MATERIÁL A METODIKA

Pri stanovovaní rozdelenia veľkosti častíc bieleho cukru oševom boli analyzované vzorky bieleho cukru, ktorý bol odoberaný z dopravníkového pásu vždy po usušení po každom vare A produktu (biely cukor).

Kryštalizácia vo varostrojii bola realizovaná s dvoma úrovňami pridaného mikroočka a štyrmi variantmi náťahu očkovacej cukroviny (tabuľka 1). Spracované boli výsledky z desiatich varov pri každom variante a vo výsledkoch sú uvedené priemerné hodnoty týchto meraní.

Pre stanovenie rozdelenia veľkosti častíc bieleho cukru oševom bola použitá metóda GS2/9-37 (ICUMSA Method, 2007) založená na rozdelení častíc pomocou sústavy

vhodných sít (spolu 7, s veľkosťami ôk 2,00 mm; 1,00 mm; 0,80 mm; 0,63 mm; 0,40 mm; 0,32 mm). Použitý bol granulometer typu AS 200, Retsch, ktorý pracuje s amplitúdou 1,5 mm.g<sup>-1</sup> počas 10 minút.

**Tabuľka 1** Varianty mikroočka a náťahu očkovacej cukroviny

	Varianta A	Varianta B	Varianta C	Varianta D	Varianta E
množstvo mikroočka, cm <sup>3</sup>	1 000	1 000	1 100	1 100	1 100
náťah očkovacej cukroviny, %	15	19	19	20	22

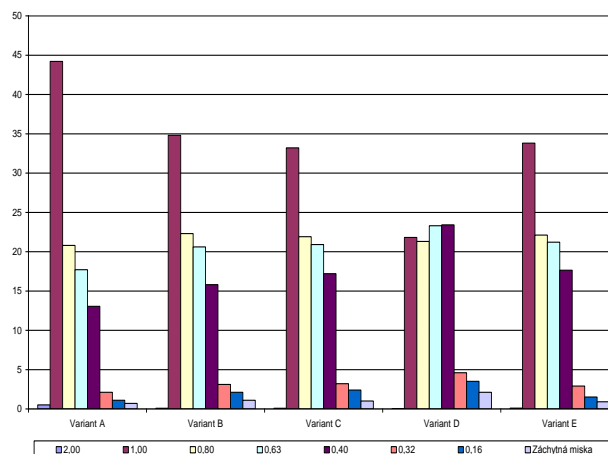
Zadinová cukrovina bola odoberaná z varostrojov na varni každých 8 až 12 hodín a vzorky boli priradené ku konkrétnemu variantu, ktorý bol aplikovaný pri dozrievaní zadinovej cukroviny. Osem rôznych variantov zahŕňalo prídavok melasy v množstve 500 dm<sup>3</sup>. h<sup>-1</sup>, 1000 dm<sup>3</sup>. h<sup>-1</sup> alebo 1500 dm<sup>3</sup>. h<sup>-1</sup> do refrizerantu 1 alebo refrizerantov 1, 3, 5, resp. dávkovanie vody v množstve 500 dm<sup>3</sup>. h<sup>-1</sup> alebo 1000 dm<sup>3</sup>. h<sup>-1</sup> do refrizerantov 1, 3, 5. Na všetkých variantoch boli sledované hodnoty teploty, sacharizácie, polarizácie a kvocientu čistoty.

**VÝSLEDKY A DISKUSIA**

Problematika varenia cukrovín bola riešená v súvislosti s podielom kryštálov rôznej veľkosti vznikajúcich v priebehu kryštalizácie. Proces varenia cukrovín je možné ovplyvniť viacerými spôsobmi, avšak medzi stále veličiny, ktorých hodnoty sa v priebehu varenia nemenia, patrí: sušina šťavy, pri ktorej sa mikroočko pridáva do očkovacieho varostroja a A varostroja, hladina šťavy vo varostroji pri základnom náťahu, a varná krivka. Medzi veličiny, ktoré je možné v priebehu varenia meniť, a tým vplývať na rozdelenie veľkosti častíc produktu, patrí množstvo mikroočka a množstvo očkovacej cukroviny pridávanej do A varostrojov (Velazquez-Camilo et al., 2010).

V rámci prezentovaného výskumu bolo realizovaných päť variantov odlišujúcich sa množstvom mikroočka a náťahu očkovacej cukroviny (tabuľka 1) a výsledky, tj. percentuálne podiely zachytené na sítach s otvormi s predpísanými otvormi sú graficky spracované na obrázku 1.

Z hľadiska granulometrickej analýzy bol najmenej vyrovnaný variant A, na ktorom bol extrémne vysoký podiel veľkých kryštálov sacharózy, ktoré zostali zachytené na site s veľkosťou otvorov 1,00 mm (až 44,2 ± 4,5 %). Na tomto variante bol použitý najnižší náťah očkovacej cukroviny, čo v konečnom dôsledku spôsobilo nízky počet jedincov (kryštálov), ktoré v priebehu varenia narastali do pomerne veľkých rozmerov. Drobnjšie kryštály zachytené na sítach 0,63 mm a 0,40 mm boli zastúpené hmotnostne menej významne.



**Obrázok 1** Podiely zachytené na sítach s rôznymi otvormi, %

Na variantoch B, C a E bolo granulometrické vyhodnotenie podobné ako na variante A, len podiel najväčších kryštálov bol o niečo menší (pod 35 %).

Získané hodnoty boli štatisticky vyhodnotené pri hladine významnosti  $\alpha = 0,95$  a za podmienky, že P – hodnota je menšia ako 0,05 (tabuľka 2).

Bolo potvrdené, že na variante A bol preukazne najvyšší podiel veľkých kryštálov sacharózy (s rozmermi 1,00 – 1,99 mm) a preukazne najnižší podiel kryštálov s veľkosťou 0,63 – 0,79 mm, 0,40 – 0,62 mm, 0,32 – 0,39 mm a 0,16 – 0,31 mm.

**Tabuľka 2** Štatistické vyhodnotenie rozdelenia veľkostí častíc bieleho cukru

Varianty	Veľkosť ôk na sítach (mm)							zachytná miska
	2,00	1,00	0,80	0,63	0,40	0,32	0,16	
A – B	*	*	*	*	*	*	*	
A – C	*	*		*	*	*	*	
A – D	*	*		*	*	*	*	*
A – E	*	*	*	*	*			
B – C								
B – D		*		*	*	*	*	*
B – E								
C – D		*		*	*	*	*	*
C – E							*	*
D – E		*		*	*	*	*	*
P-value	0,000	0,000	0,104	0,000	0,000	0,001	0,000	0,0381

\* potvrdzuje štatistický rozdiel medzi variantmi a podielmi na jednotlivých sítach

Najvyrovnanejšie boli veľkostné podiely kryštálov na variante D. Kryštály s veľkosťou zachytenou na sítach s veľkosťou otvorov 1,00 mm, 0,80 mm, 0,63 mm a 0,40 mm, čiže kryštály väčšie ako 0,40 mm, tvorili podiel 89,83 % z celkového množstva kryštálov. Navyše, podiely jednotlivých frakcií sa pohybovali od 21,3 ± 1,2 % do 23,4 ± 1,9 %, čiže touto vyrovnanosťou bola potvrdená rovnomerná práca varne. Granulometrické zloženie bieleho cukru získaného na variante D bolo optimálne. Pri náťahu očkovacej cukroviny vo výške 20 % a prídavku mikroočka vo výške 1 100 cm<sup>3</sup> nedochádza k vysokému energetickému zaťaženiu cukrovaru a z hľadiska hodnotenia kryštálov sú kryštály pri takejto kombinácii najkvalitnejšie a najrovnomernejšie (Poel et al., 1998). Čím je väčší náťah



očkovacej cukroviny do varostroja, tým väčšie množstvo kryštálov vznikne pri varení. Avšak výška náťahu očkovacej cukroviny je limitovaná, pretože pri príliš vysokom náťahu by sa vytvorilo veľké množstvo kryštálov, ktoré by do konca varu nemohli narásť na požadovanú veľkosť (Christofides et al., 2006). Parametre zvolené na variante D sú najvhodnejšie aj pre ideálny chod odstredieviek pri odstred'ovaní cukru od materského sirupu.

Veľkosť kryštálov je voliteľný parameter, ktorý súvisí s ďalšou manipuláciou s cukrom a s ekonomickou náročnosťou jeho výroby. V minulosti boli spotrebiteľia zvyknutí na cukor s väčšími kryštálmi, ktorý je stabilnejší (napr. pri dlhej preprave) a menej hygroskopický. Ekonomicky výhodnejšie je však vyrábať drobnoznný kryštál.

Z hľadiska požiadaviek na kvalitu cukru je očakávaný podiel kryštálov s veľkosťou viac ako 0,40 mm nad

70 %. Tento kvalitatívny parameter bol vyhovujúci na všetkých variantoch, čiže všetky finálne produkty je možné považovať z hľadiska tohto ukazovateľa za kvalitné (Sutradhar, 2004).

Z hľadiska riadenia nárastu kryštálov na požadovaný rozmer má veľký význam dozrievanie zadinovej cukroviny. Cukrovina vypustená zo zrníčov je v kryštalizátoroch homogenizovaná s miešacím sirupom a za stáleho miešania ďalej kryštalizuje pri postupnom ochladzovaní. Doba ošetrenia cukroviny v kryštalizátoroch závisí od čistoty a trvá 2 až 70 hodín. Kryštalizácia zadinových cukrovín prebieha najpomalšie (24 – 70 hodín) v dôsledku vysokej koncentrácie necukrov a je realizovaná v kontinuálnych vyzrievacích linkách skladajúcich sa z kaskády chladených horizontálnych alebo vertikálnych kryštalizátorov (Vaccari et al., 2002, Vaccari et al., 2005).

Varenie zadinovej cukroviny sa uskutočňovalo v dvoch varostrojoch, z ktorých sa cukrovina spúšťala do dvoch refrižerantov (teplota od 80°C do 85°C). Z nich sa prečerpávala do prvého refrižerantu dozrievacej linky. Postupným dozrievaním sa zadinová cukrovina schladila z 85°C na 50°C v poslednom (ôsmom) refrižerante a počas tohto procesu bola do nej pridávaná melasa a voda. Z posledného refrižerantu bola cukrovina vypustená do miešadla pred odstredivkami, v ktorých došlo k oddeleniu cukru od melasy. Nebol potvrdený významný vplyv režimu pridávania melasy alebo vody k dozrievacej zadinovej cukrovine na výsledok, pretože na všetkých variantoch dochádzalo k poklesu sacharizácie, polarizácie a kvocientu čistoty. Melasa získaná na všetkých použitých variantoch mala hodnoty kvocientu čistoty v rozpätí od 64,73 % do 68,52 %, čo hovorí o jej nedostatočnom vycukrení (Kadlec, Bubník, 1997; Kadlec, 2008).

Na základe týchto výsledkov je zrejmé, že straty cukru v melase je možné znížiť správnym nastavením dozrievacej linky pre zadinový cukor. Použitie zadržanie zadinového cukru v dĺžke trvania 42 – 48 hodín nie je dostatočné na to, aby došlo k dôkladnému vycukreniu melasy na požadovaný kvocient čistoty 60 – 64 % (Kadlec, 2008). Pokiaľ by bola zadinová cukrovina zadržaná v dozrievacej linke dlhšie, došlo by k poklesu jej teploty až na 40°C, čím by došlo k jej efektívnejšiemu

vycukreniu. Tento stav je možné dosiahnuť pridaním ďalších dvoch refrižerantov do dozrievacej linky. Ďalším možným opatrením na zníženie produkcie melasy by bolo jej opätovné použitie pre varenie zadinovej cukroviny, čiže ku koncu varu by bola namiesto zeleného sirupu natiahnutá melasa a tým by bolo možné opätovne získať cukor, inak nezískateľný.

### ZÁVER

Produkcija bieleho cukru ako finálneho produktu spracovania cukrovej repy je ovplyvnená mnohými technologickými faktormi. Výskumnou prácou realizovanou v spracovateľskom podniku, výsledky ktorej sú prezentované v príspevku, boli zistené dôležité skutočnosti týkajúce sa procesu kryštalizácie a dozrievania cukroviny a boli vypracované odporúčania následne aplikovateľné v spracovateľskej technológii. Pri hodnotení kryštalizácie bol ako najlepší vyhodnotený variant s prídavkom 1 100 cm<sup>3</sup> a náťahom očkovacej cukroviny v množstve 20 %. Na tomto variante boli najvyrovnannejšie veľkostné podiely kryštálov všetkých frakcií stanovené granulometricky. Najmenej vyhovujúcim bol variant s množstvom mikroočka 1 000 cm<sup>3</sup> a náťahom očkovacej cukroviny 15 %, na ktorom boli najvyššie odchýlky od požadovaných hodnôt, z čoho jednoznačne vyplýva jeho nevhodnosť z hľadiska rovnomernosti na ďalšie používanie počas kampane. Malý objem náťahu očkovacej cukroviny bol príčinou menšieho počtu materských kryštálov, čo sa prejavilo vysokým podielom veľkých kryštálov s veľkosťou nad 1,0 mm. Straty cukru počas kryštalizácie spôsobené nevycukrením v dôsledku nedostatočne dlhého času zadržania cukroviny v refrižerantoch je možné znížiť pridaním ďalších refrižerantov, v ktorých by došlo k zníženiu teploty na 40°C a v dôsledku toho k dôkladnému vycukreniu melasy na požadovaný kvocient čistoty.

### LITERATÚRA

- BRETSCHNEIDER, R. 1980. *Technologie cukru*. Surovárna a rafinerie. Praha: STN/Alfa. 1980, 423 p.
- CHRISTOFIDES, P. D., SHI, D., EL-FARRA, N. H., LI, M., MHASKAR, P. 2006. Predictive control of particle size distribution in particulate processes. In *Chemical Engineering Science*, vol. 61, 2006, p. 266-280.
- GBLER, J., BUBNÍK, Z. 1993. Kontinuální navážení cukrovín IV. Výsledky měření. In *Listy Cukrovarnické a Řepářské*, vol. 109, 1993, no. 1, p. 15–23, ISSN 0024-4449.
- HARTEL, R. 2001. *Crystallization in Foods*. Aspen Publishers: Gaithersburg. 2001, ISBN 0834216345.
- ICUMSA Method GS 2/9-37. 2007. The Determination of the Particle Size Distribution of White Sugar and Plantation White Sugar by Sieving. Bartens. 2007.
- JANÍČEK, D. 2010. Výsledky cukrovarnické kampane 2009/2010 na Slovensku. In *Listy Cukrovarnické a Řepářské*, vol. 126, 2010, no. 4, p. 128–130, ISSN 0024-4449.
- KADLEC, P., BUBNÍK, Z. 1997. Vztahy pro výpočet zůstatku cukru v melase. In *Listy Cukrovarnické a Řepářské*, vol. 113, 1997, no. 11, p. 294–298, ISSN 1210-3306.
- KADLEC, P. 2008. Technologie cukru. In *Elektronické Studijní Opory* [online]. [cit. 2008-01-09]. 28 p. Retrieved

from the web:<[http://www.vscht.cz/sch/www321/N321403\\_sylabus.pdf](http://www.vscht.cz/sch/www321/N321403_sylabus.pdf)>.

OBER, E. S., LE BLOA, M., CLARK, CH., ROYAL, A., JAGGARD, K. W., PIDGEON, J. D. 2005. Evaluation of physiological traits as indirect selection criteria for drought tolerance in sugar beet. In *Field Crops Research*, vol. 91, 2005, no. 2–3, p. 231–49, ISSN 0378-4290.

POEL, P. W., SCHIWECK, H., SCHWARTZ, T. 1998. Sugar Technology. Beet and Cane Sugar Manufacture. Verlag Dr. Albert Bartens KG, Berlin, 1998.

ROHANI, S., HAERI, M., WOOD, H. C. 1999a. Modeling and control of a continuous crystallization process. Part 1: linear and non-linear modeling. In *Computers & Chemical Engineering*, vol. 23, 1999, no. 3, p. 263–277, ISSN 0098-1354.

ROHANI, S., HAERI, M., WOOD, H. C. 1999b. Modeling and control of a continuous crystallization process. Part 2: model predictive control. In *Computers & Chemical Engineering*, vol. 23, 1999, no. 3, p. 279–286, ISSN 0098-1354.

SUHR, M. R., SCHULZE, B. C. 2003. Technology in use in the modern beet sugar factory. In *International Sugar Journal*, vol. 105, 2003, no.2, p.52, ISSN: 0020-8841.

SUTRAHDAR, B. C. 2004. Coping with Crystallization Problems. In *Chemical Engineering*, vol. 97, 2004, no.1, p. 46-52.

VACCARI, G., WAWRO, P., TAMBURINI, E., SGUALDINO, G., BERNARDI, T. 2002. Cooling crystallization of microfiltered raw juice and of traditional thick juice: a comparison. In *Zuckerindustrie*, vol. 127, 2002, no. 1, p. 22–28, ISSN 0344-8657.

VACCARI, G., SGUALDINO, G., TAMBURINI, E., PEZZI, G., CITTERIO, P., VERARDI, R., URBANIEC, K. 2005. New eco-friendly proposal for the crystallization of beet raw juice. In *Journal of Cleaner Production*, vol. 13, 2005, no. 15, p. 1447–1460, ISSN 0959-6526.

TICHÁ, B. 1990. Vliv kvalitativních ukazovatelů a jakosti cukrovky na práci cukrovaru. In *Listy Cukrovarnické a Repářské*, vol. 106, 1990, no. 2, p. 6–7.

VELAZQUEZ-CAMILO, O., ALVAREZ-RAMIREZ, J., BOLANOS-REYNOSO, E. 2009. Comparative Analysis of the Crystallizer Dynamics Type Continuous Stirred Tank: Isotermic and Cooling Case. In *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, vol. 8, 2009, no. 1, p. 127-133.

VELAZQUEZ-CAMILO, O., ALVAREZ-RAMIREZ, J., BOLANOS-REYNOSO, E., LOPEZ-ZAMORA, L. 2010. Experimental Evaluation of the Concentration Zone Widths in Cane Sugar Crystallization using Data and Image Acquisition. Proceedings of the World Congress on Engineering 2010, vol. 1, WCE 2010, June 30 – July 2, 2010, London, U.K., ISBN 978-988-17012-9-9, ISSN 2078-0966.

WUNSCH, H. 2005. Technological leadership of German sugar industry. In *Zuckerindustrie*, vol. 130, 2005, no.5, p. 405–409, ISSN 0344-8657.

### Acknowledgments:

This work was supported by grant VEGA 1/0282/10.

### Contact address:

doc. Ing. Tatiana Bojňanská, CSc., Department of Storing and Processing Plant Products, Faculty of Biotechnology and Food Science, Slovak University of Agriculture, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra Slovakia, E-mail: tatiana.bojnanska@uniag.sk

Ing. Marek Bennár, PhD., Department of Food Technology Universidad Politecnica de Valencia, Camino de Vera, 46022 Valencia, Spain, E-mail: marek\_bennar@hotmail.com

doc. Ing. Helena Frančáková, CSc. Department of Storing and Processing Plant Products, Faculty of Biotechnology and Food Science, Slovak University of Agriculture, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra Slovakia, E-mail: helena.francakova@uniag.sk

Ing. Marián Tokár, Department of Storing and Processing Plant Products, Faculty of Biotechnology and Food Science, Slovak University of Agriculture, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra Slovakia, E-mail: marian.tokar@uniag.sk

## ANALYSE OF TRAITS OF MILK PRODUCTION IN DAIRY COWS

Jozef Bujko, Roman Kocman, Július Žitný, Anna Trakovická, Cyril Hrnčár

### ABSTRACT

When evaluating milk performance indicators, we mainly focused on dairy cows of the Holstein breed and its cross-breeds. Within the Holstein breed and its cross-breeds we evaluated 68 dairy cows, which produced on average 6447.63 kg of milk, 272.42 kg of fat, 210.73 kg of proteins and 307.79 kg of lactose. By means of a device LACTOSCAN 90 we defined basic milk components in our samples in laboratory conditions on the basis of set working procedures. Average fat content in our samples stood at 3.87 g/100 g. Average proteins content in our samples stood at 3.36 g/100 g. Average lactose content stood at 4.96 g/100 g. When assessing milk technological qualities we determined the average milk acidity value in our samples, which was 5.85 oSH. The average thermostability value of the tested samples was 2.75. In the milk cheeseability test the shortest time needed for sample precipitation was detected in samples No. 4 (42 s.), No. 13 (185 s.) and No.11 (190 s.).

**Keywords:** Holstein breed, dairy cows, traits of milk production, qualitative and technological traits, correlation

### ÚVOD

Význam chovu hovädzieho dobytku spočíva vo využívaní jeho úžitkových vlastností pre výrobu základných potravín ľudí - mlieka a mäsa. Svojím biochemickým a fyziologickým mechanizmom je schopný v procese látkovej premeny uchovávať a pretvárať živiny z hrubých objemových krmív na tieto dve biologicky a energeticky koncentrované plnohodnotné bielkoviny.

Na množstvo, zloženie a vlastnosti mlieka vplyva mnoho činiteľov, ako sú napríklad plemenná príslušnosť, laktačné štádium, vek, zdravie, individualita, výživa atď. Výživa významne ovplyvňuje kvalitu mlieka (ŠIMKO et al., 2010).

Z pohľadu biologickej hodnoty sú najcennejšou zložkou mlieka bielkoviny. Najväčšiu časť až 82 % bielkovín tvorí kazeín, ktorý je zároveň aj výhradnou bielkovinou mlieka, s ktorou sa inde v prírode nestretávame. Kazeín obsahuje všetky nepostrádateľné aminokyseliny a v mlieku sa vyskytuje ako komplexná zložka obsahujúca vápnik, fosfor a malé množstvo horčíka (MICHALCOVA, KRUPOVA, 2007). Má vysokú výživnú hodnotu a vo viacerých výskumoch sa používa ako referenčná bielkovina. Zvyšnú časť bielkovín tvoria srvátkové bielkoviny. S technologickými vlastnosťami mlieka sú najviac spojené vápnik, bielkoviny, pH a laktóza (SEMJAN, 1990).

Cieľom práce bola analýza kvalitatívnych ukazovateľov, technologických vlastností mlieka, kvantitatívnych ukazovateľov a stanovenie podielu jednotlivých vplyvov pôsobiacich na ukazovatele mliekovej úžitkovosti v hodnotenom súbore kráv holštajnskeho plemena a ich kríženciek.

### MATERIÁL A METÓDY

Podkladové materiály mliekovej úžitkovosti sme získali z plemenárskej evidencie (celoživotná úžitkovosť kravy, karty plemenníc) a z materiálov na farme Nemčiňany.

Z hodnotených plemenníc vybrali dojnice s dedičným podielom holštajnskeho plemena (n=68). Zo základných ukazovateľov mliekovej úžitkovosti sme sledovali produkciu mlieka v kg, tuku v kg, bielkovín v kg, % tuku a % bielkovín. Následne sme vypočítali korelačné

závislosti medzi ukazovateľmi mliekovej úžitkovosti navzájom. Na výpočet sme použili štatistický program SAS 9.3.1.

Následne sme na farme 11. februára 2010 odobrali 13 vzoriek mlieka od dojníc na základe plemennej príslušnosti k holštajnskému plemenu a jeho kríženciek (RED Holštajn) a pri zachovaní správneho postupu odoberania vzoriek mlieka podľa kritérií Plemenárskych služieb SR, š.p. a STN 57 0529. Zoznam vybraných dojníc je uvedený v tabuľke 1. Súbežne sme odobrali dve bazénové vzorky pre účely kontroly a zhodnotenia kvality mlieka v súbore celého stáda. Vzorky sme odobrali do 10 ml sklenených skúmaviek, ponechali sme ich do nasledujúceho rána v chlade pri teplote max. 8 °C, následne prevezené v prenosnej chladničke do laboratória a analyzované.

Analýzy boli vykonávané na Katedre hodnotenia a spracovania živočíšnych produktov SPU v Nitre. Sledovali sme základné ukazovatele kvality mlieka: tuk v %, bielkoviny v %, obsah laktózy v %, množstvo BTS v %, minerálne látky v % prostredníctvom prístroja LACTOSCAN. Zo špeciálnych resp. technologických ukazovateľov sme sledovali kyslosť mlieka titračnou metódou, termostabilitu mlieka titračne, syriteľnosť mlieka a obsah Ca<sup>2+</sup> komplexometrickou titráciou. Rozbory a analýzy sme vykonávali podľa stanovených pravidiel a kritérií s čo najväčšou presnosťou za použitia potrebných prístrojov, materiálov a metód používaných v laboratórnych priestoroch KHaSZP a STN 57 0529.

### VÝSLEDKY A DISKUSIA

Pri hodnotení ukazovateľov mliekovej úžitkovosti sme sa hlavne zamerali na dojnice plemena holštajnske a jeho kríženciek. Hodnoty ukazovateľov mliekovej úžitkovosti podľa hodnoteného plemena uvádzame v nasledujúcej tabuľke 2.

V rámci holštajnskeho plemena a jeho kríženciek sme hodnotili 68 dojníc, ktoré vyprodukovali v priemere 6 447,63 kg mlieka pri variabilite 1 768 kg až 9 234 kg mlieka, pri 272,42 ± 74,6 kg tuku a 210,73 ± 54,4 kg bielkovín. Pri porovnaní s výsledkami v rámci kontroly mliekovej úžitkovosti RYBA, DIANOVÁ (2009) uvádzajú priemernú úžitkovosť kráv holsteinského plemena v KÚ 2009 nasledovne: 7 546 kg mlieka, 4,08 % tuku (308,0 kg) a 3,22 % bielkovín (243,0 kg). V nami sledovanom stáde bola priemerná produkcia mlieka o 1099

kg nižšia. Rovnako nižšia bola aj produkcia tuku o 36 kg a produkcia bielkovín o 33 kg.

Na základe toho môžeme konštatovať, že v priemere sledované ukazovatele boli porovnateľné s chovným cieľom daného plemena. **MOTYČKA, VONDRÁŠEK (2005)** uvádzajú, že k parametrom chovného cieľa holštajnskeho plemena patrí dojnnosť u prvôstok 7 500 kg až 7 800 kg mlieka za laktáciu a u dospelých kráv 8 500 kg až 8 700 kg mlieka za laktáciu. Z hľadiska priemernej produkcie v nami sledovanom chove táto hranica prekročená nebola, ale z hľadiska maximálnej laktácie bola prekročená o 534 kg mlieka.

Priemerná produkcia mlieka v kg na 1. laktáciách (n= 32) bola 5 941,63 ± 1 687,81 kg mlieka a na 2. a ďalších laktáciách (n= 36) 6 897,42 kg mlieka pri variabilite v=21,83 %. Podobná tendencia bola aj pri priemernej produkcii tuku a bielkovín v kg čo dokumentuje vysoká kladná korelačná závislosť medzi kg mlieka a kg tuku (r=0,92173), medzi kg mlieka a kg bielkovín (r=0,97321) ako je uvedené v tabuľke 4. Nízke kladné korelačné závislosti sú medzi kg mlieka a % tuku (r= 0,11129), medzi kg mlieka a % bielkovín (r=0,01984) ako je uvedené v tabuľke 2. K podobným záverom dospeli aj **FREEMAN (2003), BUJKO (2009)**.

Pri odhade vplyvu pevných efektov na celkové hodnotenie boli zohľadnené nasledujúce pevné efekty rok otelenia, mesiac otelenia, poradie laktácie, vplyv otca, plemenný typ.

Vplyv hodnotených pevných efektov na priemernú produkciu mlieka v kg v lineárnom modeli predstavoval premenlivosť R<sup>2</sup> = 74,03 %, kde priemerná produkcia predstavovala 6447,63 kg mlieka. Vplyv na produkciu tuku v lineárnom modeli predstavoval premenlivosť R<sup>2</sup> =

75,93 %, kde priemerná produkcia tuku predstavovala 272,42 kg. Vplyv na produkciu bielkovín predstavoval premenlivosť

R<sup>2</sup> = 75,76 %, pri priemernej produkcii bielkovín 210,73 kg (tabuľka 4).

Ako uvádzajú **PŠENICA (1991), KADLEČÍK et al., (1992), UHLÁR et al., (1995), KADLEČÍK et al., (2000), PEREZ et al., (2007)** vplyv rôznych faktorov chovateľského prostredia (stádo, rok, obdobie) a výživy vo vzťahu k užítkovosti zvierat otelených v rôznych mesiacoch sa líši.

Pri analýze jednotlivých efektov bol najvyšší vplyv efektu rok otelenia, ktorý pre produkciu mlieka v lineárnom modeli predstavoval premenlivosť R<sup>2</sup> = 54,72, pre produkciu tuku R<sup>2</sup> = 58,81 % a pre produkciu bielkovín tento vplyv predstavoval premenlivosť R<sup>2</sup> = 59,33 %. Druhý najvyšší vplyv efektu bol mesiac otelenia ktorý vplýval na priemernú produkciu mlieka a jeho premenlivosť bola R<sup>2</sup> = 28,80 %, pre produkciu tuku s premenlivosťou R<sup>2</sup> = 24,73 % a lineárny model premenlivosti pôsobiaci na produkciu bielkovín R<sup>2</sup> = 31,03 % (tabuľka 5). **BUJKO, RYBANSKÁ (2004), BUJKO (2009)** uvádzajú, že pri hodnotení produkčných ukazovateľov v populácii kráv slovenského strakatého plemena má významný vplyv stádo, otec, rok a mesiac otelenia, čo potvrdzuje podobnú tendenciu aj v našom hodnotenom stáde.

Z uvedených výsledkov (tabuľka 5) vyplýva, že štatisticky preukazný vplyv na mliekovú užítkovosť mal mesiac otelenia (P≤0,05). Ostatné faktory mali štatisticky nepreukazný vplyv u všetkých sledovaných ukazovateľov mliekovej užítkovosti (P>0,05).

Tabuľka 2 Hodnotenie ukazovateľov mliekovej užítkovosti holštajnsko - frízskeho plemena.

Ukazovatele	n	$\bar{x}$	s	v	min.	max.
mlieko v kg	68	6 447,63	1 653,53	25,64	1 768	9 234
tuk v kg		272,42	74,60	27,38	67,98	414,61
tuk v %		4,20	0,47	11,24	3,00	5,10
bielkoviny v kg		210,73	54,40	25,81	55,05	298,74
bielkoviny v %		3,26	0,18	5,53	2,80	3,70

Tabuľka 3 Korelácie medzi ukazovateľmi mliekovej užítkovosti.

ukazovatele	mlieko v kg	tuk v kg	tuk v %	bielkoviny v kg	bielkoviny v %
mlieko v kg	1,00000				
tuk v kg	0,92173 +++	1,00000			
tuk v %	0,11129 -	0,47485 +++	1,00000		
bielkoviny v kg	0,97321 +++	0,94516 +++	0,22487 -	1,00000	
bielkoviny v %	0,01984 +	0,22146 -	0,50681 +++	0,24159 +	1,00000

**Tabuľka 4 Vplyvy sledovaných faktorov na hodnotené ukazovatele mliekovej úžitkovosti.**

Ukazovatele	R <sup>2</sup>	variačný koeficient	stredná chyba	$\bar{X}$
Mlieko v kg	0,740329	18,34	1 182,82	6 447,63
Tuk v kg	0,759380	18,85	51,37	272,42
Bielkoviny v kg	0,757619	17,84	37,59	210,73

**Tabuľka 5 Analýza vplyvu jednotlivých zdrojov premenlivosti na produkčné ukazovatele.**

Zdroje premenlivosti	n	Priemer štvorcov	F- hodnota	Pr > F	R <sup>2</sup> = koef. determinácie		
					mlieko (kg)	tuk (kg)	bielkoviny (kg)
Rok otelenia	7	955355	0,68	0,6855	54,72	58,81	59,33
Mesiac otelenia	11	4797580	2,06	0,0391	28,80	24,73	31,03
Vplyv otca	13	3156005	1,20	0,3056	22,39	21,86	22,42
Poradie laktácie	5	3482255	1,30	0,2746	9,50	7,92	8,84
Plemenný typ	5	3485961	1,30	0,2740	9,51	10,61	7,30

**Tabuľka 6 Stanovenie základných zložiek mlieka – LACTOSCAN 90.**

Číslo vzorky	tuk g/100g	bielkoviny g/100g	laktóza g/100g	BTS g/100g	minerálne látky v %
2.	4,70	3,76	5,25	9,69	0,81
3.	3,63	3,54	4,92	9,08	0,76
4.	4,96	3,61	5,02	9,28	0,78
5.	3,29	3,57	4,96	9,17	0,77
8.	3,43	3,66	5,10	9,42	0,79
9.	4,84	3,39	4,69	8,68	0,73
10.	5,04	3,55	4,98	9,13	0,78
11.	2,92	3,52	4,89	9,04	0,76
12.	4,03	3,59	5,00	9,24	0,78
13.	5,30	3,73	5,21	9,62	0,81
14.	1,86	3,66	5,10	9,42	0,70
15.	4,22	3,43	4,75	8,79	0,74
16.	3,63	3,77	5,27	9,72	0,81
B1	3,59	3,56	4,95	9,15	0,77
B2	3,55	3,56	4,95	9,14	0,77

Prostredníctvom prístroja LACTOSCAN 90 sme v laboratórnych podmienkach na základe stanovených pracovných postupov stanovili základné zložky mlieka.

Ako z tabuľky 6 vyplýva najvyšší obsah tuku sme zaznamenali pri vzorke č. 10, 5,30 g/100 g. Najnižší obsah tuku sme zaznamenali pri vzorke č. 11, 1,86 g/100 g. Pri skúške bazénových vzoriek (vzorky B1 a B2) bola priemerná hodnota množstva tuku v mlieku na úrovni 3,57 g/100 g.

Priemerný obsah bielkovín v našich vzorkách predstavoval 3,36 g/100 g. Priemerný obsah bielkovín v bazénových vzorkách bol 3,56 g/100 g. Najvyšší obsah bielkovín sme zaznamenali pri vzorke č. 13, 3,77 g/100 g. Najnižší obsah bielkovín bol zistený pri vzorke č. 6, 3,39 g/100 g. Obsah laktózy v našich vzorkách sa pohyboval od 4,69 g/100 g do 5,27 g/100 g. Priemerný obsah laktózy predstavoval 4,96 g/100 g. Priemerný

obsah BTS v sledovaných vzorkách bol 9,16 g/100 g. Priemerný obsah minerálnych látok v našich vzorkách predstavoval 0,76 %. Najvyšší obsah minerálnych látok mali vzorky č. 1, č. 10 a č. 13, s hodnotou 0,81 %.

Z hľadiska požiadaviek **STN 57 0529** pre surové kravské mlieko bola priemerná hodnota obsahu tuku v našich vzorkách vyhovujúca, nakoľko v spomínanej STN sa uvádza, že surové kravské mlieko by malo obsahovať minimálne 3,3 g/100 g tuku. Priemerný obsah bielkovín v našich vzorkách predstavoval 3,36 g/100 g, čo v porovnaní s požiadavkami **STN 57 0529** vyhovuje, nakoľko norma uvádza že množstvo bielkovín v surovom kravskom mlieku minimálne 2,8 g/100g.

Obsah laktózy v našich vzorkách sa pohyboval od 4,69 g/100 g do 5,27 g/100 g, pričom priemerný obsah laktózy predstavoval 4,96 g/100 g. **STN 57 0529** nedefinuje požiadavku na obsah laktózy. Obsah BTS (beztuková

sušina) v sledovaných vzorkách neklesol pod úroveň 8,50 g/100 g (**STN 57 0529**) a priemerný obsah BTS vo všetkých vzorkách bol 9,16 g/100 g. Priemerný obsah BTS v bazénových vzorkách predstavoval 9,145 g/100 g.

V tabuľke 7 uvádzame kyslosť mlieka stanovenú metódou Soxhlet-Henkela. Priemerná hodnota v našich vzorkách predstavovala 6,22°SH. Najnižšia kyslosť mlieka bola zaznamenaná u vzoriek č.6 (5,36°SH). Priemerná kyslosť bazénových vzoriek sa pohybovala v rozmedzí 6,60–6,64°SH. Najvyššiu kyslosť sme zaznamenali u vzorky č. 3. s hodnotou 7,96°SH, nízku hodnotu kyslosti sme zaznamenali aj pri vzorkách č. 9 a 12. Pri porovnaní našich hodnôt s **STN 57 0529** ktorá uvádza, že surové kravské mlieko by malo mať kyslosť stanovenú metódou Soxhlet-Henkela od 6,2 do 7,8°SH môžeme konštatovať, že priemerná hodnota spĺňa normu.

Ako vyplýva z danej tabuľky, najnižšiu hodnotu termostability, teda najnižšiu spotrebu 96 % alkoholu, mali vzorka č. 10 (1,80). Najvyššiu hodnotu termostability mala vzorka č. 6 (3,20), čo znamená že táto vzorka bola termostabilnejšia na rozdiel od ostatných skúšaných vzoriek. Priemerná hodnota termostability skúšaných vzoriek bola 2,72. **STN 57 0529** neuvádza hodnotu termostability pre surové kravské mlieko. Platí zásada, že čím je vzorka skúšaného mlieka termostabilnejšia, tým mlieko menej podlieha nežiaducim zmenám pri tepelnom ošetrovaní a spracovaní mlieka.

Priemerný obsah Ca<sup>2+</sup> v našich vzorkách bol 134,46 mg/100 g mlieka. Najnižšie množstvo Ca<sup>2+</sup> mali vzorky č. 7 a 9, 126,25 mg/100 g. Najvyššie množstvo Ca<sup>2+</sup> mala vzorka č. 8 s hodnotou 158,31 mg/100 g. **STN**

**57 0529** nedefinuje požiadavku na presný obsah Ca<sup>2+</sup> v surovom kravskom mlieku, pričom priemerná hodnota obsahu Ca<sup>2+</sup> v surovom kravskom mlieku sa pohybuje v rozmedzí 120–140 mg/100 g.

Skúšku syriteľnosti mlieka využívajú najmä výrobcovia syrov, jedná sa o jednu zo základných a dôležitých technologických vlastností mlieka. Syriteľnosť mlieka môžeme hodnotiť ako dobrú, kedy je doba zrážania 110 - 140 sekúnd, ako menej dobrú, kedy je doba zrážania 140 - 200 sekúnd a ako nevhodnú, kedy je doba zrážania viac ako 200 sekúnd. Najkratší čas zrážania vzorky mlieka sme zaznamenali pri vzorkách č. 3 (42 s.), č. 10 (185 s.) a č. 8 s časom 190 s.

Hodnotili sme kvalitu mlieka v súbore prostredníctvom bazénových vzoriek (označenie B1 a B2). Pri hodnotení bazénových vzoriek sme stanovili priemerný obsah tuku na 3,57 g/100g, priemerný obsah bielkovín 3,56 g/100g, priemerný obsah laktózy 4,95 g/100g, priemerný obsah BTS 9,14 g/100 g a priemerný obsah min. látok na 0,77 %. Z hľadiska technologických vlastností sme hodnotili termostabilitu bazénových vzoriek, kde nám vyšla priemerná hodnota spotreby 96 % alkoholu 2,80 ml. V porovnaní s ostatnými individuálnymi vzorkami sa jednalo o strednú hodnotu. Priemerná kyslosť bazénových vzoriek bola stanovená na 6,62 °SH. Priemerný obsah Ca<sup>2+</sup> bazénových vzoriek sme stanovili na 131,16 mg/100 g. Pri hodnotení syriteľnosti bola doba zrážania mlieka z bazénových vzoriek stanovená na 240 s.

### ZÁVER

Záverom môžeme konštatovať, že priemerná produkcia mlieka a jeho zložiek mala stúpajúcu tendenciu, čo dokumentujú kladné korelačné koeficienty medzi ukazovateľmi produkcie mlieka v kg. Na mliekovú

**Tabuľka 7 Kyslosť mlieka skúšaného mlieka, termostabilita skúšaného mlieka, obsah Ca<sup>2+</sup> v skúšanom mlieku, syriteľnosť skúšaného mlieka.**

Číslo vzorky	spotreba 0,25 mol NaOH /ml	kyslosť °SH	spotreba alkoholu (96%) pri titrácii	spotreba Chelatónu III / ml	množstvo Ca <sup>2+</sup> mg/100g	čas potrebný k vyzrážaniu vzorky / sek.
2.	1,64	6,56	2,00	3,60	144,28	232
3.	1,60	6,40	2,89	3,50	140,28	210
4.	1,99	7,96	2,20	3,24	129,85	42
5.	1,56	6,24	3,00	3,55	142,28	398
8.	1,41	5,64	2,80	3,32	133,06	308
9.	1,34	5,36	3,20	3,20	128,25	270
10.	1,51	6,04	2,90	3,15	126,25	264
11.	1,67	6,68	3,00	3,95	158,31	190
12.	1,40	5,60	3,10	3,15	126,25	252
13.	1,56	6,24	1,80	3,80	152,30	185
14.	1,64	6,56	3,10	3,65	146,29	224
15.	1,38	5,52	2,70	3,45	138,27	330
16.	1,51	6,04	2,70	3,41	136,67	280
B1	1,65	6,60	2,80	3,18	127,45	240
B2	1,66	6,64	2,80	3,20	128,25	240



úžitkovosť mal z vybraných faktorov najvýznamnejší vplyv mesiac otelenia. Z hľadiska kvalitatívnych a technologických vlastností v hodnotených vzorkách mlieka bolo zistené, že ich priemerné hodnoty zodpovedajú norme STN 57 5029.

## LITERATÚRA

ADEDIRAN, S.A., NISH, P., DONAGHY, D.J., et al. 2010. Genetic and environmental factors influencing milk, protein and fat yields of pasture-based dairy cows in Tasmania. In *Animal Production Science*, vol. 50, 2010, no. 4, p. 265-275. ISSN 1836-5787.

BUJKO, J., RYBANSKÁ, M. 2004. Factors effecting the milk production in population of Slovak spotted breed. In: *Abstract of XXI. Genetic days 2004 (CD – ROM)*, Wroclaw, Poland, 1. - 3. September 2004, ISBN 83-89189-39-9.

BUJKO, J. 2009. Genetický pokrok produkčných vlastností v populáciách slovenského strakatého plemena : Dizertačná práca. Nitra : SPU, 2009, 162 p.

FREEMAN, A. E. 2003. Milk lipid composition and its alteration by animal breeding. In: *Oportunities a challenges for the animal industry in the 21<sup>st</sup> century (International conference)*, Gyöngyös, 15. - 17. October, 2003, p.133-138.

KADLEČÍK, O., PŠENICA, J., BRZUSKI, P., CANDRÁK, J. 1992. Obsah a produkcia bielkovín mlieka kráv rôznych plemien. In *Živočišna výroba*, vol. 37, 1992, no. 4 , p. 341-349.

KADLEČÍK, O., BULLA, J., CANDRÁK, J., KASARDA, R., KÚBEK, A., RYBANSKÁ, M., STRAPÁKOVÁ, E., TRAKOVICKÁ, A. 2000. *Zefektívnenie geneticko-šľachtiteľských postupov pri zlepšovaní vlastností hovädzieho dobytku na Slovensku*. SPU v Nitre, 2000, 72 p., ISBN 80-7137-842-9.

KOMPRDA, T., SUSTOVA, K., DVORAK, R., TIEFFOVA, P., POUL, J. 2001. Changes in fatty acid pattern, composition and technological parameters of milk in dairy cows fed heat-treated rapeseed cakes in the first stage of lactation. In *Czech J. Anim. Sci.*, vol. 46, 2001, no. 5, p. 231-239 ISSN 1212-1819.

LIUTKEVICIUS, A., SEKMOKIENE, D., STIMBIRYS, A., et al. 2009. Milk composition and its density in dairy cows in lithuania and coefficient of countment of milk volume to it's mass. In *Veterinarija ir zootechnika*, vol. 47, 2009, no. 69 , p. 50-55, ISSN 1392-2130.

MICHALCOVA, A., KRUPOVA, Z. 2007. Influence of composite kappa-casein and beta-lactoglobulin genotypes on composition, rennetability and heat stability of milk of cows of Slovak Pied breed. In: *Czech J. Anim. Sci.*, vol. 52, 2007, no. 9, p. 292-298, ISSN 1212-1819.

MOTYČKA, J. VONDRÁŠEK, L. 2005. Úžitkovosť holštýnskych krav v českej republike opäť vyšší. In *Náš chov*, vol. 65, 2005, no. 2, p. 20–23. ISSN 0027 – 8068.

NEMCOVA, E., STIPKOVA, M., ZAVADILOVA, L., BOUŠKA, J., VACEK, M. 2007. The relationship between somatic cell count, milk production and six linearly scored type traits in Holstein cows. In *Czech J. Anim. Sci.*, vol. 52, 2007, no. 12, p. 437-446, ISSN: 1212-1819.

PEREZ, L. P., ANRIQUE, R. G., GONZALEZ, H. V. 2007. Non genetic factors affecting milk production and composition in a dairy herd with two calving seasons in Los Lagos Region,

Chile. In *Agricultura tecnica*, vol. 67, 2007, no. 1, p. 39-48, ISSN 0365-2807.

PŠENICA, J. 1991. Vplyv ročného obdobia otelenia na mliekovú úžitkovosť prvôstok v chovoch s rôznou úrovňou úžitkovosti. In *Polnohospodárstvo*, 1991, no. 7, p. 664–677.

RYBA, Š., DIANOVÁ, M. 2009. Aktuálne výsledky kontroly mliekovej úžitkovosti za plemenársky rok 2008/2009. In *Slovenský chov*, 2009, no. 12, p. 26 - 27.

SAS. USER'S GUIDE 2005.Version 9.1(TS1M3). 2005. SAS Institute Inc., Carry, NC, USA.

SEMJAN, Š. 1990. Kvalita mlieka. In *Intenzifikácia výroby mlieka* [cit. PAJTÁŠ, M. a i. 1990]. Bratislava : Príroda, 1990, p. 185 - 218.

STN 57 0529 (1999) *Surové kravské mlieko na mliekarenské ošetrovanie a spracovanie*. Bratislava : Slovenský ústav technickej normalizácie, 1991.

ŠIMKO, M., ČEREŠŇÁKOVÁ, Z., BÍRO, D., CHRENKOVÁ, M., JURÁČEK, M., GÁLIK, B. 2010. *Sacharidy vo výžive prežúvavcov*. 1. vyd. Nitra: SPU, 2010, 143 p., ISBN 978-80-552-0337-9.

UHLÁR, J., GAVALIER, M., ŠALINGOVÁ, M. 1995. Mlieková úžitkovosť kráv otelených v rôznych mesiacoch roka na hospodárstve v podhorskej oblasti. In *Acta zootechnica L*, 1995, p. 13 - 19.

## Acknowledgments:

This work was supported by grants VEGA 1/0061/10 and VEGA 1/0769/09.

## Contact address:

Ing. Jozef Bujko, PhD., Department of Genetic and Breeding Biology, Faculty of Agrobiology and Food Resources, Slovak Agricultural University in Nitra, A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovak Republic, Phone: +421 37 641 4294, E-mail: jozef.bujko@uniag.sk

Ing. Július Žitný, CSc., Department of Genetic and Breeding Biology, Faculty of Agrobiology and Food Resources, Slovak Agricultural University in Nitra, A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovak Republic, Phone: +421376414815, E-mail: julius.zitny@uniag.sk

doc. Ing. Anna Trakovická, CSc Department of Genetic and Breeding Biology, Faculty of Agrobiology and Food Resources, Slovak Agricultural University in Nitra, A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovak Republic, Phone: +421376414285, E-mail: anna.trakovicka@uniag.sk

Ing. Cyril Hrnčár, PhD., Department of Poultry Science and Small Animal Husbandry, Faculty of Agrobiology and Food Resources, Slovak Agricultural University in Nitra, A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovak Republic, Phone: +421376414744, E-mail: cyril.hrnear@uniag.sk

Ing. Roman Kocman, Department of Genetic and Breeding Biology, Faculty of Agrobiology and Food Resources, Slovak Agricultural University in Nitra, A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovak Republic, Phone: +421376414294, E-mail: romino08@gmail.com

## CHANGES IN MILK COMPOSITION AS A RESULT OF METABOLIC DISORDERS OF DAIRY COWS.

*Terézia Filipejová, Jaroslav Kováčik, Katarína Kirchnerová, Vladimír Foltýs*

### ABSTRACT

The aim of our study was the determination of blood parameters and changes in milk composition of dairy cows in relation to metabolic disorders and their evaluation. Thirty dairy cows from selected agricultural farm were divided into three groups as follow: group BL: 3-4 weeks after calving (the beginning of lactation), group ML: 3-4 months after calving (the middle of lactation), group DP: 2-3 weeks before calving (the dry period). Concentrations of selected parameters of energy profile (glucose, cholesterol, triglycerides); nitrogenous profile (urea, total proteins); hepatic profile (aspartate aminotransferase, bilirubin) in blood serum were measured. Content of fat, proteins and lactose, Non Fat Solids, urea, freezing point, Somatic Cell Count, Fat/Protein ratio in milk were evaluated. Cholesterol concentration was significantly higher in ML ( $5.33 \pm 1.17$  mmol.l<sup>-1</sup>;  $p < 0.001$ ) in comparison to BL ( $3.46 \pm 0.92$  mmol.l<sup>-1</sup>;  $p < 0.001$ ) and DP ( $2.70 \pm 0.71$  mmol.l<sup>-1</sup>;  $p < 0.001$ ). Concentration of triglycerides was significantly lower in ML ( $0.03 \pm 0.01$  mmol.l<sup>-1</sup>;  $p < 0.001$ ) in comparison to BL ( $0.07 \pm 0.02$  mmol.l<sup>-1</sup>;  $p < 0.001$ ) and DP ( $0.09 \pm 0.04$  mmol.l<sup>-1</sup>;  $p < 0.001$ ). Albumin concentration in DP ( $36.90 \pm 2.99$  g.l<sup>-1</sup>;  $p < 0.05$ ) was significantly higher in comparison to BL ( $32.80 \pm 4.07$  g.l<sup>-1</sup>;  $p < 0.05$ ). AST concentration was significantly higher in ML ( $1.61 \pm 0.47$  μmol.l<sup>-1</sup>;  $p < 0.001$ ) in comparison with DP ( $1.01 \pm 0.18$  μmol.l<sup>-1</sup>;  $p < 0.001$ ) and BL ( $1.39 \pm 0.25$  μmol.l<sup>-1</sup>;  $p < 0.05$ ). Acquired results of milk composition were without significant confirmation ( $p > 0.05$ ). Fat/Protein ratio was lower than 1.1, in BL and ML, which cause rumen acidosis. The present observation confirmed that specific changes of milk composition lead to metabolic disorders.

**Keywords:** milk composition, metabolic disorder, fat/protein ratio, biochemical parameter

### INTRODUCTION

Production cattle diseases are a set of metabolic disorders and organ diseases, which are closely related with high production of animals. Metabolic disorders are caused by the action of negative environmental factors and mainly due to an imbalance between intake and expense of nutrients and metabolites required for the optimal production and reproduction. They are characterized by a disruption in homeostasis of the organism, reduced production, poorer quality of products – milk, meat, fertility disorders and premature decommissioning of farming. Incidence of production diseases is in individual breeding varied and depending on the genetic affiliation, production level, level of nutrition, housing technology, the level of veterinary treatment and prevention. The critical period is dry period, calving and beginning of lactation. Only healthy dairy cows are able to achieve maximum conversation of nutrient from diet, high production and good fertility (Ilek, 2006).

Milk production, reproduction, and health are the principal factors affecting the profitability of a dairy herd. In recent years, the dairy industry agenda in many countries has been dominated by health-related problems. One prerequisite for effective health management is the accurate knowledge of factors that affect the health status of a cow, such as parity, season or health history, and of the relationship between health problems and other economically important traits, such as milk production, reproduction, and length of productive life (Emanuelson and Oltenacu, 1998).

The milk quality is influenced by many factors acting together and influences each other. The basic requirement for quality of milk is that milk as a raw material meets the basic hygiene and health levels, poses any risk to the consumer, fulfil nourishment parameters

and has unaltered technological property which allow its processing as high quality finish products (Vasil, 2006).

A variety of milk components can be used as indicators of metabolic status of cow. The most relevant milk variables describe the supply of energy, protein, mineral and acid base balance, their normal concentration and their trend to change in relation to different types of metabolic disorders. Combined results of variation in milk composition may be useful for early identification of health problems. The earlier these health problems can be identified, the higher the chance for successful health management. In addition, aspects of practicability and economics are considered as well as such of the influence of the level of milk sampling (Hamann and Krömker, 1997).

The aim of our study was to focus on the determination of blood parameters and changes in milk composition of dairy cows in relation to metabolic disorders and their evaluation.

### MATERIAL AND METHODOLOGY

#### Animal Management

Dairy cows were free housing and drinking through drinkers *ad libitum*. Dairy cows were feeding two times per a day, particularly, total mixed ration (TMR).

TMR consisted of:

BL: silage 20 kg. d<sup>-1</sup>, Lucerne hay 11.5 kg. d<sup>-1</sup>, Meadow hay 2 kg. d<sup>-1</sup>, DOVP 7.2 kg. d<sup>-1</sup>, brewer's grain 5 kg. d<sup>-1</sup>.

ML: corn silage 20 kg. d<sup>-1</sup>, Lucerne hay 11.5 kg. d<sup>-1</sup>, Meadow hay 2 kg. d<sup>-1</sup>, DOVP 9.7 kg. d<sup>-1</sup>, brewer's grain 5 kg. d<sup>-1</sup>.

DP: corn silage 12 kg. d<sup>-1</sup>, hay 6 kg. d<sup>-1</sup>, barley straw 3 kg. d<sup>-1</sup>, Meadow hay 3 kg. d<sup>-1</sup>, G3B 0.15 kg. d<sup>-1</sup>.

#### Biological material

Thirty dairy cows of Holstein breed from selected agricultural farm from western part of Slovakia in winter were examined. Dairy cows were divided into three examined groups: BL (the beginning of lactation) 3-4 weeks

after calving, ML (the middle of lactation) 3-4 months after calving and DP (the dry period) 2-3 weeks before calving. Blood samples for biochemical analysis were taken from *vena jugularis* by vacutainer tubes (8 ml) 2 hours after morning feeding and conserved cooled in ice box during transportation to the laboratory. The blood serum was separated from whole blood by the centrifugation at 3000 rpm for 30 minutes and samples were stored at -18 °C until further analysis.

**Biochemistry assay**

In this experiment, energy profile: glucose (GLU), cholesterol (CHOL) and TG (triglycerides); nitrogenous profile: urea, total proteins (TP); hepatic profile: aspartate aminotransferase (AST) and bilirubin (BIL) were analysed in blood serum, using semi-automated clinical chemistry analyzer Microlab 300 (Vilat Scientific, Dieren, The Netherlands) by commercial kits DiaSys (Filipejová and Kováčik, 2009a).

**Milk assay**

Milk samples were taken individually. Samples of milk were cooled down until 6 °C was reached. Samples were kept at the same temperature during the determination of milk quality parameters: fat content, proteins and lactose (by infrared analyzer MilkoScan FT 120; ISO 9622:1999 Whole milk – Determination of milk fat, protein and lactose content), Non-Fat-Solids (by the MilkoScan apparatus; STN EN ISO 13366-1:2008), urea (photocolorimetric device with Ehrlich's reagent, 530 nm wavelength), freezing point (ISO 5764:2002 Milk – Determination of freezing point), Somatic Cell Count (by Somatocount 150 fi Bently Instuments on principle of flow cytometry STN EN ISO 13366 1:2008). Consequently Fat/Protein ratio was evaluated. Samples were analysed in the Institute of Nutrition in the Animal Production Research Centre in Lužianky near Nitra.

**Statistical analysis**

Significant differences among groups of dairy cows were evaluated by Sigma Plot 11.0 (Jandel, Corte Madera, USA) statistical programme. Statistical analysis was done using one-way analysis of variance (ANOVA) by Holm- Sidak method. Differences among the groups at p<0.05 and p<0.001 were considered as significant.

**RESULTS AND DISCUSSION**

Investigation into nutritional problems in herd of dairy cows requires consideration of several aspects; particularly feeding, breeding and rearing management and production level. These examinations should be supported by laboratory examinations like metabolic profile tests. As with order examinations, time of observation and discussion play a dominant role in making diagnosis. Another advantage of blood sampling is that this procedure is giving an opportunity to visit the farm and to discuss feeding of animal thoroughly (Kováč a Mudroň, 2002). Lactation has a great impact on the intensity of metabolism and on metabolic parameters in the blood (Milinković-Tur et al., 2005).

**Energy profile**

Energy metabolism of dairy cows is characterized by carbohydrate and lipid metabolism. Among the most important indicators of energy metabolism of cattle belong glucose and cholesterol and triglycerides (Pechová and Pavlata, 2005).

In order to evaluate the energy metabolism, we detected the concentration of glucose, cholesterol and triglycerides. Changes of glucose concentrations (Table 1) reflect the load energy metabolism in the early phase of lactation. This relates to the disproportion between nutrient intake, particularly energy and an increasing need for nutrients for milk production (Reist, 2002). Average blood glucose concentrations did not drop below the physiological values (3.0-3.9 mmol.l<sup>-1</sup>) noticed by Vrzuľa et al. (1990). The results indicated no significant (p>0.05) differences among the groups.

Consequently, significant differences of cholesterol concentration was significantly higher in ML (5.33±1.17 mmol.l<sup>-1</sup>; p<0.001) in comparison to BL (3.46±0.92 mmol.l<sup>-1</sup>; p<0.001) and DP (2.70±0.71 mmol.l<sup>-1</sup>; p<0.001) (Table 1). Similar results were obtained in our previous study (Filipejová and Kováčik, 2009b).

Concentration of cholesterol showed slightly increased activity above physiological value of 5.2 mmol.l<sup>-1</sup> only in ML (Vrzuľa et al., 1990; Pechová et al., 2003; Kováč et al., 2001).

**Table 1 Energy profile of dairy cows**

	BL (n=10)	ML (n=10)	DP (n=10)
<b>Glucose</b> (mmol.l <sup>-1</sup> )			
x	3.58	3.83	3.85
minimum	2.87	3.60	3.43
maximum	4.32	4.12	4.47
S.D.	0.45	0.21	0.37
CV (%)	0.46	0.21	0.38
<b>Cholesterol</b> (mmol.l <sup>-1</sup> )			
x	3.46 <sup>A</sup>	5.33 <sup>B</sup>	2.70 <sup>C</sup>
minimum	1.30	3.50	1.60
maximum	4.60	7.00	3.90
S.D.	0.92	1.17	0.71
CV (%)	0.94	1.21	0.73
<b>Triglycerides</b> (mmol.l <sup>-1</sup> )			
x	0.07 <sup>A</sup>	0.03 <sup>B</sup>	0.09 <sup>C</sup>
minimum	0.03	0.01	0.02
maximum	0.11	0.05	0.19
S.D.	0.02	0.01	0.04
CV (%)	0.02	0.01	0.04

BL-beginning of lactation, ML-middle of lactation, DP-dry period, x-mean, S.D.-standard deviation, CV-coefficient of variation, A,B,C different letters within the row mean significant differences among the groups at level p<0.001.

Triglycerides as a main component of lipoproteins play an important role in metabolism of dairy cows as a source of dietary energy and fat transporter. They get into the blood by absorption from the gut and mainly synthesized in the liver. Triglycerides determine the degree of hyperlipoproteinemia (Balabánová et al. 2009). Concentration of triglycerides was significantly lower in ML (0.03±0.01mmol.l<sup>-1</sup>; p<0.001) in comparison to BL (0.07±0.02 mmol.l<sup>-1</sup>; p<0.001) and DP (0.09±0.04 mmol.l<sup>-1</sup>; p<0.001) (Table 1). Obtained results of

triglycerides are lower than those presented by **Slanina et al. (1992)** and used reference range (0.17- 0.51 mmol.l<sup>-1</sup>). Low blood levels of lipoproteins indicate impaired lipomobilisation, fat production and release of lipoproteins as transport forms of fat in the liver. This situation occurs when liver function is impaired or during steatosis as well as prolonged lack of energy ration in feed (**Balabánová et al. 2009**).

**Nitrogenous profile**

Nitrogenous metabolism is affected in severe liver disease, where more than one third of parenchyma is dysfunctional. Reduced metabolic liver function was reflected in reduced synthesis of proteins, mainly albumins and further reduced urea synthesis, is accompanied by increased of concentration of ammonia (**Pechová et al., 2003**).

Concerning the nitrogenous profile, average total proteins concentration (Table 2) are similar to changes of total proteins concentrations noticed by **Doornenbal et al. (1988)** and **Šlosárková et al. (2010)**. However, albumin concentration (Table 2) in DP (36.90±2.99 g.l<sup>-1</sup>; p<0.05) was significantly higher in comparison to BL (32.80±4.07 g.l<sup>-1</sup>; p<0.05) and ML (36.30±3.62 g.l<sup>-1</sup>) was without significant difference (p>0.05), in spite of that, in reference range (30-42 g.l<sup>-1</sup>) reported by **Pechová et al. (2003)**.

**Table 2 Nitrogenous profile of dairy cows**

	BL (n=10)	ML (n=10)	DP (n=10)
<b>Total proteins</b>	(g.l <sup>-1</sup> )		
x	78.90	81.20	77.10
minimum	70.00	73.00	56.00
maximum	88.00	90.00	85.00
S.D.	5.86	6.61	9.11
CV (%)	6.02	6.79	9.36
<b>Albumins</b>	(g.l <sup>-1</sup> )		
x	32.80 <sup>a</sup>	36.30	36.90 <sup>b</sup>
minimum	25.00	28.00	33.00
maximum	38.00	41.00	42.00
S.D.	4.07	3.62	2.99
CV(%)	4.19	3.72	3.08
<b>Urea</b>	(mmol.l <sup>-1</sup> )		
x	3.91	4.97	4.08
minimum	2.18	2.87	1.92
maximum	6.31	5.77	5.18
S.D.	1.21	0.94	1.12
CV(%)	1.24	0.97	1.15

BL-beginning of lactation, ML-middle of lactation, DP-dry period, x-mean, S.D.-standard deviation, CV-coefficient of variation, different letters within the row mean significant differences among the groups at level (p<0.05) (a,b).

Urea as a final product of degradation of the protein that is synthesized in the urea cycle in the liver is income indicators in nitrogen metabolism and also is an indicator of liver and renal function (**Balabánová et al., 2009**). Likewise, average urea concentrations of our study were correspondent with results reported by **Vrzgul'a et al. (1990)** and **Slanina et al. (1992)**. The results indicated no significant (p>0.05) differences among the groups.

**Hepatic profile**

Enzymatic diagnosis is used in the diagnosis of liver disease. The principle is based on the determination of enzyme activity in the blood plasma or tissues. The most common analyse enzymes activity in the blood plasma or serum. Diagnostic values of determination of enzymes are limited specificity of enzymes and their half-life (**Pechová and Pavlata, 2005**). The total bilirubin value is a sensitive indicator of liver damage (**Lubojacká et al., 2005**). Activity of AST enzyme and bilirubin is shown in Table 3.

**Table 3 Hepatic profile**

	BL (n=10)	ML (n=10)	DP (n=10)
<b>AST</b>	(μkat.l <sup>-1</sup> )		
x	1.39 <sup>a</sup>	1.61 <sup>A</sup>	1.01 <sup>b, B</sup>
minimum	1.04	1.04	0.77
maximum	1.90	2.57	1.30
S.D.	0.25	0.47	0.18
CV (%)	0.26	0.48	0.18
<b>Bilirubin</b>	(μmol.l <sup>-1</sup> )		
x	4.88	4.58	2.19
minimum	2.10	2.50	0.70
maximum	13.30	13.60	5.30
S.D.	4.43	4.33	1.75
CV (%)	4.55	3.21	1.80

BL-beginning of lactation, ML-middle of lactation, DP-dry period, AST-aspartate aminotransferase, x-mean, S.D.-standard deviation, CV-coefficient of variation, different letters within the row mean significant differences among the groups at level p<0.05 (a,b); and level p<0.001 (A, B).

AST is an ubiquitous enzyme found in liver, heart, skeletal muscle and intestinal mucosa. It is a cellular enzyme present in mitochondria (**Pechová and Pavlata, 2005**). Increased AST activity in the serum is a sensitive marker of liver damage (**Meyer and Harvey 1998**). There are two main isoenzymes: mitochondrial and cytosolic, which prevails in the total concentration in the blood plasma because it has a longer half-life (**Kramer and Hoffman, 1997**).

In our observation we detected significant differences in AST concentration was significantly higher in ML (1.61±0.47μmol.l<sup>-1</sup>; p<0.001) in comparison with DP (1.01±0.18μmol.l<sup>-1</sup>; p<0.001) and BL (1.39±0.25 μmol.l<sup>-1</sup>; p<0.05). AST activity in blood serum in BL and ML was not in accordance with reference range (0.22-0.50 μmol.l<sup>-1</sup>) reported by **Slanina et al. (1992)** and **Vrzgul'a et al. (1990)**. According to **Pechová et al. (2003)** reference range of AST is 0.72-1.41 μkat.l<sup>-1</sup>. AST activity increased in blood plasma with fatty liver (**Pechová et al., 2003**). Increased AST activity in the serum is a sensitive marker of liver damage, even if the damage is of a subclinical nature (**Meyer and Harvey, 1998**).

Bilirubin is a bile pigment that has an important role as an antioxidant. Bilirubin as low molecular antioxidant examined **Capcarová and Kolesárová (2010)**. Furthermore, concentration of bilirubin in blood is an indicator of hepatic metabolism. A slight increase occurs in the liver dystrophy, characterized by significant increase in liver failure and multiple is usually detected significantly increase in haemolytic jaundice (**Pechová and Pavlata, 2005**).

Consequently, without significant differences among the groups the content of bilirubin ranged (0.17-5.13

$\mu\text{mol.l}^{-1}$ ). Decreased bilirubin after calving indicates load and possibly damage of liver tissue, however increased in starvation, it means in negative energy balance (Kraft and Dürr, 2001).

#### Milk components as indicator of the health status of dairy cows

At the beginning, dairy cows have to cope with the energy and protein demands for milk synthesis at the time when nutrient intake is low. Mobilising energy and protein from body tissue stores and reparation of nutrients away from extra mammary tissues are the primary alternatives to supply sufficient nutrients for milk production during the first weeks of lactation. Excessive body reserves, especially fat, can cause a series of metabolic disorders and consequent production losses (Fourichon, et al., 1999).

Changes in some milk variables are specifically related to the metabolic status of cow, some others are associated with udder health status and some milk variables indicate both the systemic and mammary gland condition. Factors predisposing to general or mammary gland diseases should be evaluated in combination with the major milk components (fat and protein) by measuring urea in milk as indicators of a balanced diet (Haman and Krömker, 1997).

The effect of production diseases on milk composition confirmed that there is a close relationship between blood values and milk constituents, reduction in milk proteins during metabolic alkalosis (Ilek et al. 1994), reduction in milk fat during rumen acidosis and reduction in lactose in all metabolic disorders (Bergamini 1987).

In this study some parameters of milk composition were analysed. Results of milk composition are presented in Table 4 and Table 5.

Milk fat content is one of the most variable components, which can be influenced by feeding. Milk fat composition can be modified readily by changing the feeding regimen. The most significant changes in milk fat quality relate to rheological properties, which are influenced by numerous aspects of character and quality of manufactured dairy products (Palmquist and Beaulieu, 1993). As it shown in the Table 4, milk fat content was without significant ( $p>0.05$ ) confirmation. According to STN (570529) fat concentration should be minimum  $3.3 \text{ g.}100\text{g}^{-1}$  which implies, that milk fat content was decreased in both analyzed groups as necessary to monetize that the value indicate  $3.6 \text{ g.}100 \text{ g}^{-1}$ . Lower milk fat content is frequently used in farms as a indicator of sub-acute ruminal acidosis and to predict the effectiveness of diet structure for chewing (Merterns, 1997; De Brabander and De Boever, 1998). Low milk fat content is caused by a lack of major precursor-acetic acid in rumen that is produced in insufficient quantity (Ilek, 2008). The protein content in milk is genetically determined and significantly affected by the level of nutrition and rumen fermentation. Apart from, fat content is easy influenced by nutrition, but in case the protein content of milk is more complex and the range of change is smaller (Ilek, 2003).

Results of milk proteins (Table 4) content showed no significant differences ( $p>0.05$ ).

Table 4 Milk composition

	BL (n=10)	ML (n=10)
<b>Fats (g.100g<sup>-1</sup>)</b>		
x	2.98	2.72
minimum	0.57	0.66
maximum	7.20	6.17
S.D.	2.33	1.72
CV (%)	2.39	1.76
<b>Proteins (g.100g<sup>-1</sup>)</b>		
x	3.15	3.21
minimum	2.80	2.43
maximum	3.58	3.95
S.D.	0.24	0.53
CV (%)	0.24	0.55
<b>Lactose (g.100g<sup>-1</sup>)</b>		
x	4.74	4.35
minimum	3.48	1.65
maximum	5.10	4.99
S.D.	0.47	1.00
CV (%)	0.47	1.03
<b>Non Fat Solids (g.100g<sup>-1</sup>)</b>		
x	8.56	8.29
minimum	7.67	4.83
maximum	9.17	9.16
S.D.	0.44	1.27
CV (%)	0.45	1.31
<b>Urea (mmol.l<sup>-1</sup>)</b>		
x	5.59	5.83
minimum	3.14	3.35
maximum	8.17	8.36
S.D.	1.65	1.70
CV (%)	1.69	1.75
<b>Freezing Point (-m.°C)</b>		
x	523	520
minimum	511	482
maximum	537	532
S.D.	7.10	14.65
CV (%)	7.30	15.05
<b>Somatic Cell Count (10<sup>3</sup>.ml<sup>-1</sup>)</b>		
x	217.00	410.10
minimum	4.00	13.00
maximum	1250.00	1364.00
S.D.	414.40	393.20
CV	425.30	552.40

BL-beginning of lactation, ML-middle of lactation, x-mean, S.D.-standard deviation, CV- coefficient of variation

According to STN (570529) milk protein content should be minimum  $2.80 \text{ g.}100\text{g}^{-1}$ , but basic protein content of milk is to monetize  $3.2 \text{ g.}100\text{g}^{-1}$  (Foltýs and Kirchnerová, 2009). Generally, if milk protein content increased and milk fat content decreased it leads to sub-clinical acidosis. On the other hand, if milk protein decreased and milk fat content increased it leads to another metabolic disorder-ketosis most often in the beginning of lactation (Pavlata et al., 2008).

Lactose content in milk is closely dependent on the health status of each cow and decreases with increasing lactation

period. Composition of feeding ration and nutrition has less influence on the lactose content (Damodaran et al., 2007).

Concerning the lactose content (Table 4), differences were not significant ( $p>0.05$ ). According to STN (570529) lactose content should be  $4.60 \text{ g} \cdot 100\text{g}^{-1}$ . Decrease lactose content, which is accompanied by increased with content of somatic cell count (Kováč et al., 2001) and what was confirmed in our study, is associated mainly with the inflammatory processes of the mammary gland or unsatisfactory long-term nutrition of dairy cows due to disruption of metabolism (Gajdůšek, 1993). Lactose content considerably increased in metabolic disorder-ketosis (Pavlata et al., 2008).

Moreover, changes that occur in Non Fat Solids are primarily due to changes in the protein and occasionally the lactose content of milk. Good quality hay tends to increase Non Fat Solids, but poor quality hay may reduce both intake and Non Fat Solids. A decline in Non Fat Solids, protein, and lactose content is associated with sub-clinical and clinical mastitis (Harris and Bachman, 2003). Regarding to Non Fat Solids, results of presented study showed no significant differences ( $p>0.05$ ).

Monitoring of urea in milk (Table 4) is an indicator of metabolic nitrogen balance of cows (Jilek et al., 2006), which characterise their health, reproductive ability and longevity (Hanuš et al., 2000; Hanuš et al., 2008). The main factors influencing the level of urea in the organism and subsequently in milk are intake of energy and crude protein in feed, while a higher protein concentration the urea level increases and higher energy intake of urea concentration in milk decreases (Hering et al., 2008). If the ration is well balanced, the urea level in milk is in the normal range ( $2.5\text{-}5.00 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ ) (Eicher, 2004). Increased urea concentration in milk can indicate worse milk quality (Hanuš et al., 1993a; Hanuš et al. 1993b), accompanied by rumen alkalosis, indigestion, lack of production volatile fatty acids and bacterial protein (Frank and Swenson, 2002). In our experiment, urea content was increased in both groups. Acquired results of milk urea were without significant confirmation ( $p>0.05$ ) can leads mentioned problems.

Freezing point (Table 4) is not only an indicator of possible adding water to milk, but also an indicator of technological relevance, (if no adding water to milk) unsatisfactory results of freezing point of the milk are caused by unbalanced ration in protein and energy, respectively deficiencies in mineral nutrition of dairy cows (Kadlec, 1999). Regarding to freezing point results, no significant differences ( $p>0.05$ ) were found.

Milk Somatic Cell Count (SCC) is a key measure of milk quality, reflecting the health status of the mammary gland and the risk of non-physiological changes to milk composition. It is also the key component of national and international regulation for milk quality, udder health and the prevalence of clinical and sub-clinical mastitis in dairy herds (Van Schaik et al. 2002). In case of, milk Somatic Cell Count (Table 4) no significant difference ( $p>0.05$ ) was detected. Obtained results increase risk of incidence of mastitis, mainly in ML.

Significant correlations among milk parameters were mentioned in a previous study (Filipejová et al. 2010).

Table 5 Fat/Protein ratio

Stage of lactation	Fat	Proteins	F/P ratio
BL	2.98	3.15	0.95
ML	2.72	3.21	0.85

Metabolic disorders can reflect chemical-technological characteristics of milk and thus we focused on the changes of milk fat and protein content in individual milk samples of Holstein cows during lactation. Milk fat can be increased or decreased depending on ration composition. It is not uncommon for two metabolic disorders and/or nutritional problems to act in opposition to one another within the same group of cows. For example early lactation cows have a tendency to mobilize body reserves while ingesting rations are low in effective fibre. Mobilization of body fat tends to increase whereas lack of effective fibre will tend to decrease milk fat levels (Eicher, 2004). In order to evaluate nutrition, conversion of nutrients and metabolism is important to analyse milk fat to milk protein ratio. Richardt (2004) considers the F/P ratio to be a very important indicator of animal health. The optimum Fat/Protein ratio is 1.2 – 1.4 (Haas and Hofirek, 2004). Richardt (2004) confirmed that the F/P ratio higher than 1.5 can indicate sub-clinical ketosis whereas the F/P ratio lower than 1.1 can mean suspected rumen acidosis. In our experiment, the both groups had F/P ratio lower than 1.1, which implies rumen acidosis.

## CONCLUSION

Deficiency in dairy cow's nutrition may influence many biochemical and physiological processes. In this study, blood metabolites and milk composition of Holstein dairy cows were analysed. We detected some significant differences in cholesterol ( $p<0.001$ ) and triglycerides concentration ( $p<0.001$ ). There were significant differences in albumin ( $p<0.05$ ) and AST concentration ( $p<0.001$ ), as well. Based on our results, we can conclude, that decreased triglycerides concentration ( $p<0.001$ ) and increased AST concentration ( $p<0.001$ ), may indicate inflammation of liver. Furthermore, in dairy cows could occur lack of energy in feeding ration, what suggest increased urea concentration in milk, while concentration of proteins in milk was increased.

However, decreased content of milk fat and increased proteins content of milk, can lead to metabolic disorder – acidosis, what was confirmed Fat/Protein ratio was lower than 1.1, which implies rumen acidosis in both groups. No significant differences ( $p>0.05$ ) were detected among parameters of milk composition.

## REFERENCES

- BALABÁMOVÁ, M., URBANOVÁ, P., LOHINSKÝ, A., ZEMAN, L. 2009. Influence of feeding ration on values of blood parameters of cows on first lactation and dairy cows in period after calving. In *Mendelnet*, 2009, p. 164-170.
- BERGAMINI, F. P. 1987. Report of pathology (not mammary) from aspects of quality of bovine milk. In *Atti Soc. Ital. Buiatria*. vol.19, 1987, p. 89-99.
- CAPCAROVÁ, M., KOLESÁROVÁ, A. 2010. *Beneficial substances affecting internal milieu of animals*. SPU: Nitra, p.73. ISBN 978-80-552-0416-1.
- DAMODARAN, S., PARKIN K., FENNEMA, O. R. 2007. *Fennema's Chemistry*. CRC Press, Taylor & Francis



- Group, Boca Raton, London, New York, 1160p. ISBN 978-0-8247-2345-3.
- DEBRABANDER, D. L., DEBOEVER, J. L. 1998. Evaluation of physical structure in dairy cattle nutrition. In *Recent advances in Animal Nutrition*, Ed: Garnsworthy PC and Wiseman J, Nottingham Press, 1998, p. 111-145.
- DOORNENBAL, H., TONG, A. K. W., MURRAY, N. L., 1988. Reference values of blood parameters in beef cattle of different ages and stages of lactation. In *Canadian Journal of Veterinary Research*, vol. 52, 1988, p. 99-105.
- EICHER, R. 2004. Evaluation of the metabolic and nutritional situation in dairy herds: Diagnostic use of milk components. Proceedings of the World Buiatrics Congress, 11-16 July, Québec, Canada, 2004.
- EMANUELSON, U., OLTENACU, P. A. 1998. Incidences and effects of diseases on the performance of Swedish dairy herds stratified by production. In *Journal of Dairy Science*, vol. 81, 1998, p. 2376-2382.
- FILIPEJOVÁ, T., KOVÁČIK, J. 2009a. Evaluation of selected biochemical parameters in blood plasma, urine and milk of dairy cows during the lactation period. In *Slovak Journal of Animal Science*, vol. 42, 2009a, no.1, p. 8-12. ISSN 1337-9984.
- FILIPEJOVÁ, T., KOVÁČIK, J. 2009b. The quality of cow milk and its composition in relationship to metabolic disorders of dairy cows performed by metabolic profile test. In *Potravinárstvo*, vol. 4, 2009b, p. 13-17. ISSN 1338-0230.
- FILIPEJOVÁ, T., KOVÁČIK, J., CAPCAROVÁ, M., KOLESÁROVÁ, A., KIRCHNEROVÁ, K., FOLTÝS, V. 2010. Evaluation of selected biochemical milk parameters of dairy cows and their correlations. In *Potravinárstvo*, vol. 1, 2010, p. 12-15. ISSN 1338-0230.
- FOLTÝS, V., KIRCHNEROVÁ, K. 2009. The quality and composition of raw cow's milk from the perspective of people of good nutrition. Retrieved from the web: <<http://www.agroporadenstvo.sk>>.
- FOURICHON, C., SEEGER, H., BAREILLE, N., BEAUDEAU, F. 1999. Effects of disease on milk production in dairy cow: A review. In *Preventive Veterinary Medicine*, vol. 41, 1999, p.1-35.
- FRANK, B., SWENSON, C. 2002. Relationship between content of crude protein in rations for dairy cows and milk yield, concentration of urea in milk and ammonia emission. In *Journal of Dairy Science*, vol. 7, 2002, p. 1829-1838. ISSN 0022-0302.
- GAJDŮŠEK, S. 1993. Advanced evaluation of the quality of raw milk for purchase. In *Dairy sheets - newsletter*, 1993, vol.20, p.10-12.
- HAAS, D., HOFÍREK, B. 2004. The diagnostic importance of milk components for a human and cows' health. CUA Prague, *Proceedings of contributions: Milk day*, 2004, p. 26-29.
- HAMANN, J., KRÖMKER, V. 1997. Potential of specific milk composition variables for cow health management. In *Livestock Production Science*, vol. 48, 1997, p. 201-208.
- HANUŠ, O., GENČUROVÁ, V., PONÍŽIL, A., HLÁSNÝ, K., GABRIEL, B., MÍČOVÁ, Z. 1993a. The effects of year season, urea, acetone and nitrate additions and native content of microelements on cow's milk fermentation. In *Animal production*, vol. 38, 1993a, no.8, p. 735-762.
- HANUŠ, O., BEBER, K., FICNAR, J., GENČUROVÁ, V., BERANOVÁ, A. 1993b. Relationship between the fermentation of milk sample, its condition and contents of some metabolites. In *Animal production*, vol. 38, 1993b, no. 7, p. 635-644.
- HANUŠ, O., LERAY, O., PYTLOUN, J., MENEGAIN, E., TROSSAT, P., GENČUROVÁ, V., MATOUŠ, E., KOPECKÝ, J., JEDELSKÁ, R., DOLÍNKOVÁ, A., 2000. A retrospective of the international laboratory integration impact on reliability of milk analysis data. In *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis* (Brno), vol. 48, 2000, no. 4, p.121-131.
- HARRIS, B., BACHMAN, K.C.2003. Nutritional and Management Factors Affecting Solids-Not-Fat, Acidity and Freezing Point of Milk 1. In *IFAS Extension*, p. 1-5.
- HERING, P., HANUŠ, O., FRELICH, J., PYTLOUN, J., MACEK, A., JANŮ, L., KOPECKÝ, J. 2008. Relationships between the results of various methods of urea in native and enriched milk. In *Czech Journal of Animal Science*, vol. 53, 2008, no. 2, p. 64-76.
- ILLEK, J., FLEISCHER, P., SUCH, P., PECHOVA, A., ZENDULKA, I. 1994. Effect of metabolic alkalosis on the composition and quality of milk. In: *Abstracts of 7th satellite symposium, ISRP, Stará Lesná, 2-5. October*, p 35-40.
- ILLEK, J. 2003. Actual nutritional aspects directed to quality milk. In *Breeder and technological aspects of breeding dairy cows and milk quality*. Rapotín, Proceeding of abstracts. p. 36-39. ISBN 80-903142-1-x.
- ILLEK, J. 2006. Current trends of diagnostic disorders and production disease of cows. In *Days of nutrition and veterinary dietetics VII*. UVL: Košice, p. 27-30 ISBN 80-8077-038-7.
- ILLEK, J. 2008. Causes of metabolic disorders for dairy cows and their effect on the quantity and quality production. In *Days of nutrition and veterinary dietetics VIII*. UVL: Košice, p. 32-35 ISBN 978-80-8077-079-2.
- JÍLEK, F., ŘEHÁK, D., VOLEK, J., ŠTÍPKOVÁ, M., NĚMCOVÁ, E., FIEDLEROVÁ, M., RAJMON, R., ŠVESTKOVÁ, D. 2006. Effect of herd, parity stage of lactation and milk yield on urea concentration in milk. In *Czech Journal of Animal Science*, 2005, vol. 51, no. 12, p. 510-517.
- KADLEC, I. 1999. Quality of raw milk in 1998, the current possibilities of its serial rapid determination and usable in the primary production of milk. In *Milk quality and its evaluation device Foss A/S*. Proceedings of abstracts. New York: Milcom Services, 1999, p. 1-9.
- KRAMER, J. W., HOFFMAN, W. E. 1997. Clinical Enzymology. In *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*. (Kaneko, J. J., J. W. Harvey, M. L. Bruss, Eds.). Academic Press. San Diego, London, Boston, New York, Sydney, Tokyo, Toronto. p. 303-325.
- KOVÁČ, G., BAJNOVÁ, V., BÍREŠ, J., BUGARSKÝ, A., DANKO, J., DIANOVSKÝ, J., ĎURAN, A., FERENČÍK, M., HADVABNÝ, M., HAJURKA, J., LEDECKÝ, V., LEHOČKÝ, J., LEŠNÍK, F., LETKOVÁ, V., MESÁROŠ, P., MEICHNA, A., MIKULA, I., MUDROŇ, P., NAGY, O., ORSÁG, A., ONDRAŠOVIČ, M., ONDRAŠOVIČIVÁ, O., PAULÍK, Š., PAULÍKOÁ, I., PODMANICKÝ, D., REICHEL, P., SEIDEL, H., SOKOL,

- J., TKÁČIKOVÁ, L., VAJDA, V., VASIL, M. 2001. *Cattle diseases*. M&M: Prešov, 874p. ISBN 80-88950-14-7.
- KOVÁČ, G., MUDROŇ, P. 2002. Diagnosis of nutritional problems in cattle. In *Cattle in new millenium*. SPU: Nitra, 2002, p. 27-31. ISBN 80-8069-066-9.
- KRAFT, W., DÜRR, U. 2001. Clinical laboratory diagnostics in veterinary practice. Bratislava: Hajko & Hajková, 2001, p. 1013-1099.
- LUBOJACKÁ, V., PECHOVÁ, A., DVOŘÁK, R., DRASTICH, P., KRUMMER, V., POUL, J. 2005. Liver steatosis following suplementation with fat in dairy cows diet. In *Acta Veterinaria Brno*, vol. 74, 2005, p. 217-224.
- MERTENS, D. R. 1997. Creating a system for meeting the fiber requirements of dairy cows. In *Journal of Dairy Science*, vol. 80, 1997, p. 1463-1481.
- MEYER, D. J., HARVEY, J. W. 1998. *Veterinary Laboratory Medicine. Interpretation and Diagnosis*. 2nd ed., W. B. Saunders Company. Philadelphia, London, Toronto, Montreal, Sydney, Tokyo. p. 157-187.
- MILINKOVIĆ-TUR, S., PERIĆ, V., STOJEVIĆ, Z., ZDELAR-TUK, M., PIRŠLJIN, J. 2005. Concentrations of total proteins and albumins, and AST, ALT and GGT activities in the blood plasma of mares during pregnancy and early lactation. In *Veterinarski arhiv*, vol. 75, 2005, p. 195-202.
- OSTERGAARD S., SORENSEN J. T. 1998. A review of the feeding-health-production complex in a dairy herd. In *Preventive Veterinary Medicine*, vol. 36, 1998, p. 109-129.
- PALMQUIST, D. L., BEAULIEU. A. D. 1993. Feed and Animal Factors Influencing Milk Fat Composition. ADSA FOUNDATION SYMPOSIUM: MILK FAT SYNTHESIS AND MODIFICATION. 1993. In *Journal of Dairy Science*, vol. 76, 1993, p.1753-1771.
- PAVLATA, L., PECHOVÁ, A., DVOŘÁK, R. 2008. Differential diagnosis of cows lying down syndrome. In *Veterinárství*, vol. 58, 2008, p.43-51.
- PECHOVÁ, A., DVOŘÁK, R., PAVLATA, L. 2003. Diagnosis and incidence of liver disease in dairy cows. Health problems in ruminants. Production and metabolic disease of cattle. Proceeding of the training workshop. Brno. 2003. P. 52-59.
- PECHOVÁ, A., PAVLATA, L. 2005. Use of metabolic profiles of dairy cows in the control diet. In *Nutrition of cattle in terms of production and preventive medicine*. p. 102-111. ISBN 80-86542-08-4.
- REIST, M., ERDIN, D., EUW, D., TSCHUEMPEL, K., LEUENBERGER, H., CHILLIARD, Y., HAMMON, H. M., MOREL, C., PHILIPONA, C., ZBINDEN, Y., KUENZI, N., BLUM, J. W. 2002. Estimation of energy balance at the individual and level using blood and milk traits in high yielding dairy cows. In *Journal of Dairy Science*, vol. 85, 2002, p. 3314-3327.
- RICHARDT, W. 2004. Milk composition as an indicator of nutrition and health. In *The Breeding*, vol. 11, 2004, p. 26 -27.
- SLANINA, L., BESEDA, I., HLINKA, D., ILLEK, J., KOVÁČ, G., KROUPOVÁ, V., LEHOCKÝ, J., MICHNA, A., ROSSOW, N., SOKOL, J., VAJDA, V. 1992. Metabolic profile of cattle in relation to health and production. 1992, ŠVS SR, Bratislava, 115 p. ISBN 80-7148-001-0.
- ŠLOSÁRKOVÁ, S., DULÍČEK, J., FLEISCHER, P. 2010. Concentrations of selected blood biochemistry parameters in Holstein cows during important stage of lactation. In *Animal Physiology 2010*, Proceedings of International Conference, May 27-28<sup>th</sup> 2010 Valtice, Czech Republic: Mendel University in Brno, 2010, p. 415-424. ISBN 978-80-7375-403-7.
- VAN SCHAİK, G., LOTEM, M., SCHUKKEN, Y. H. 2002. Trends in somatic cell counts, bacterial counts, and antibiotic residue violations in New York State during 1999-2000. In *Journal of Dairy Science*, vol. 85, 2002, p. 782-789.
- VASIL, M. 2006. Quality milks - reflector farming conditions in herd dairy cattle. In Days of nutrition and veterinary dietetics VII. UVL: Košice, p. 69. ISBN 80-8077-038-7.
- VRZGULA, L., ALIJEV, A. A., BAREJ, W., BARTKO, P., BOUDA, J., DVOŘÁK, R., GARBAŠANSKI, P., ILLEK, J., JAGOŠ, P., KARSAI, F., KÓŇA, KOVÁČ, G., NEDKOVA, L., SOKOL, J., SOVA, Z., SCHÄFER, M. 1990. Metabolic disorder of livestock and their prevention. *Príroda*: Bratislava, 503s. ISBN 80-07-00256-1.
- STN 57 0529: 1999. Surové kravské mlieko na mliekarenské ošetrovanie a spracovanie.*

**Acknowledgments:**

This study was supported by project KEGA 101-001SPU-4/2010

**Contact address:**

Terézia Filipejová, Department of Animal Physiology, Slovak University of Agriculture, A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, E-mail: filipejova@gmail.com, +421- 37-6414288,

Jaroslav Kováčik, Department of Animal Physiology, Slovak University of Agriculture, A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, E-mail: jaroslav.kovacik@uniag.sk, +421- 37- 6414287

Katarína Kirchnerová, Institute of Nutrition, Animal Production Research Centre, Nitra, + 421-37- 6546289, E-mail: kirchnerova@scpv.sk

Vladimír Foltýs, Institute of Nutrition, Animal Production Research Centre, Nitra, +421-37-6546281, E-mail:foltys@scpv.sk

## SURFACE GROWTH OF *GEOTRICHUM CANDIDUM*: EFFECT OF THE ENVIRONMENTAL FACTORS ON ITS DYNAMICS

Anna Hudecová, Eubomír Valík, Denisa Liptáková

### ABSTRACT

The growth dynamics of *Geotrichum candidum* was studied on the surface of the skim milk agar with respect to the temperature, pH and water activity/NaCl content. At pH ranging from 5.0 to 7.0, the fungus growth rates were similar, whereas the temperature and water activity represented by salt addition in concentration of 3 % influenced the growth significantly. The effect of incubation temperature on the surface growth rate was modelled with G- $T_w$  model. Designed model proved to be good predictor of fungus growth at used environmental conditions. As the filamentous fungus under study is commonly present on the surface of various cheeses, the quantitative data found in this work can provide useful information closely related to real fungus growth, e.g. calculation of time required for *G. candidum* to reach visible 3 mm colony. The predictions showed that, for example at 0 % NaCl content, such colonies were grown for 52.2, 30.7, 18.4, 14.4, 13.9 h at temperatures of 10, 14, 19, 23, 27 °C, respectively.

**Keywords:** *Geotrichum candidum*, temperature, pH, water activity, G-model

### ÚVOD

*Geotrichum candidum* je vláknitá huba v prostredí rozšírená ubikvitne. Izolovať ju možno z rôznych habitatov ako sú voda, pôda, vzduch, rastliny, ovocie, človek a iné cicavce. Často sa vyskytuje v mlieku a jeho výrobkoch, zvlášť čerstvých, na základe čoho sa považuje za typickú mliečnu hubu (Görner, Valík, 2004; Wouters et al., 2002). Jej význam v mliečnom prostredí však možno hodnotiť ako negatívny aj ako pozitívny. Na jednej strane je vláknitá huba bežným kontaminantom syrov (Ledenbach, Marshall, 2009). Znehodnocuje fermentované mlieka, maslo a smotanu (Varnam, Sutherland, 1994). Na druhej strane sa kultúrne kmene *G. candidum* využívajú zámerne pri zrení špecifických druhov syrov (Pottier et al., 2008).

Schopnosť *G. candidum* rásť v mliečnom prostredí je ovplyvnená spôsobom jej rozmnožovania a adaptáciou na niektoré jeho podmienky. Rozmnožuje sa vegetatívne produkciou artrokonídií (Kocková-Kratochvilová, 1990) a je pomerne odolná voči niektorým nepriaznivým podmienkam, ako sú napríklad nízka teplota, pH a nízky obsah kyslíka. Nevyznačuje sa zvýšenou toleranciou ku zníženým hodnotám  $a_w$ . *G. candidum* je schopná rásť pri mikroaerofilných podmienkach. Aj keď je interiér syra v podstate anaeróbnym systémom, *G. candidum* je schopná rásť nielen na jeho povrchu, ale i vo vnútri v stonásobne nižšej koncentrácii (Boutrou, Guéguen, 2005; Haasum, Nielsen, 1998).

Vláknitá huba je bežnou súčasťou mikroflóry syrov vyrábaných zo surového mlieka. Napriek tomu kvantitatívne údaje o jej raste v tejto oblasti sú nedostatočné. Dôležitým faktorom v tomto smere je rýchlosť, akou sa dokáže pomnožiť na povrchu syra, kde po určitom čase vytvára biely povlak. Jej premnožením nedochádza iba k zmene vzhľadu, ale svojím metabolizmom rozkladá mliečny tuk a proteíny (Marcellino et al., 2001). V mliekarenskej praxi je dôležité udržať rast *G. candidum* na želanej úrovni a tým dosiahnuť kontrolou nad priebehom príslušných organoleptických zmien.

Cieľom predloženej práce bolo sledovať dynamiku povrchového rastu vláknitej huby pri meniacich sa podmienkach prostredia ako sú teplota, pH a aktivita vody.

Následne popísať vplyv sledovaných faktorov prostredia na rastovú rýchlosť študovanej vláknitej huby pomocou sekundárneho matematického vyhodnotenia.

### MATERIÁL A METODIKA

#### Mikroorganizmus

Vláknitú hubu *G. candidum* sme izolovali z ovčieho hrudkového syra vyrobeného zo surového mlieka. Jeho identifikáciu na druhej úrovni nám potvrdila Ing. E. Piecková, PhD., MPH. (Slovenská zdravotnícka univerzita, Bratislava, Slovenská republika). Izolát sme uchovávali na šikmom agare s obsahom odstredeného sušeného mlieka (SMA, Merck, Darmstadt, Nemecko) pri  $5 \pm 1$  °C.

#### Médiá a zostavenie experimentov

Dynamiku rastu *G. candidum* sme vyšetrovali na povrchu SMA agaru. Na dosiahnutie rôznej aktivity vody sme do živného média pridávali chlorid sodný v koncentráciách 0, 1, 3 a 5 % (w/v). Aktuálna hodnota aktivity vody sa merala pomocou prístroja  $a_w$  sprint TH 500 (Nowasina, Lachen, Švajčiarsko). Hodnotu pH agaru sme upravovali roztokom kyseliny mliečnej. Po sterilizácii, rozliatí na Petriho misky s vnútorným priemerom 11 cm a po stuhnutí sa povrch agaru inokuloval bunkami *G. candidum*. Na inokuláciu sme použili 48 až 72 h kultúru vyrastenú na definovanom povrchu SMA agaru v skúmavkách. Bunky sme naniesli do stredu každej Petriho misky pomocou mikrobiologického očka. Priemer kolónií sme merali vo vhodne stanovených časových intervaloch pomocou posuvného meradla (150x0,02 mm, Jiangsu S. Ltd) v dvoch na seba kolmých smeroch. Výsledný priemer kolónie *G. candidum* sme vypočítali ako aritmetický priemer. Jednotlivé série experimentov sme uskutočnili v troch paralelných pokusoch pri teplotách pohybujúcich sa v intervale od 8 do 37 °C. Pri 0 % prídavku soli a teplotách od 12 do 25 °C sa pH agaru pohybovalo v rozpätí hodnôt od 5,0 do 7,0 s krokom 0,5. Pri ostatných experimentoch bolo pH média vždy upravené na hodnoty 5,5 a 7,0.

### Matematická analýza

Priemer kolónií rastúcich na povrchu agaru sme v závislosti od času vyhodnotili pomocou primárneho modelu tak, ako to navrhli vo svojej práci **Baranyi et al. (1993)**. Rastovú rýchlosť kolónie *G. candidum* vypočítanú z rastových čiar a vyjadrenú ako nárast kolónie za časovú jednotku (g) sme podrobili sekundárnemu modelovaniu v závislosti od inkubačnej teploty. Na tento účel nám poslušil G-model (**Gibson et al. 1994**), pričom aktivitu vody sme nahradili transformáciou teploty podľa **Medved'ovej et al. (2009)**:

$$T_w = \sqrt{T_{\max} - T} \quad (1)$$

kde  $T_{\max}$  je maximálna teplota pre rast,  $T$  je konkrétna teplota a  $T_w$  je transformácia teploty. Pre popis experimentálnych údajov sa potom použila kvadratická funkcia:

$$\ln g = C_0 + C_1 T_w + C_2 T_w^2 \quad (2)$$

kde  $g$  je rastová rýchlosť kolónie ( $\text{mm}\cdot\text{h}^{-1}$ ) a  $C_0$  až  $C_2$  sú koeficienty rovnice. Optimálna teplota  $T_w$ , pri ktorej rastová rýchlosť dosiahne maximálnu hodnotu sa vypočítala podľa vzorca:

$$T_w(\text{opt}) = -\frac{C_1}{2C_2} \quad (3)$$

### Validácia modelu

Sekundárny model (rov. 2) sme podrobili validácii podľa **Baranyiho et al. (1999)**. Faktor presnosti, faktor spoľahlivosti a percento diskrepancie sme vypočítali použitím nasledovných rovníc:

$$A_f = \exp\left(\sqrt{\frac{\sum_{k=1}^n (\ln f(g^k) - \ln g^k)^2}{n}}\right) \quad (4)$$

$$B_f = \exp\left(\frac{\sum_{k=1}^n (\ln f(g^k) - \ln g^k)}{n}\right) \quad (5)$$

$$D_f = (A_f - 1) \cdot 100\% \quad (6)$$

kde  $g$  je rastová rýchlosť získaná z primárneho modelu,  $f(g^k)$  = rastová rýchlosť vypočítaná z modelu  $f$ , ktorý opisuje experimentálne hodnoty,  $n$  = počet meraní,  $A_f$  = faktor presnosti,  $B_f$  = faktor spoľahlivosti a  $D_f$  = diskrepancia v percentách.

Smerodajnú odchýlku (angl. mean square error – MSE) sme vypočítali nasledovne:

$$MSE = \frac{RSS}{n} = \frac{\sum (g_{\text{experimentálna}} - g_{\text{vypočítaná}})^2}{n} \quad (7)$$

kde  $n$  je počet údajových bodov a RSS (angl. residual sum of squares) je suma štvorcov odchýlok.

### VÝSLEDKY A DISKUSIA

Rast *G. candidum* sme sledovali pri viacerých teplotách v rozpätí od 8 do 37 °C. Tento interval bol zvolený na základe už zistených poznatkov z literatúry tak, aby nám v sekundárnej fáze modelovania pokryl oblasť rastu vláknitej huby. Pri každej kultivačnej teplote sa vykonali dve sady meraní pri dvoch hodnotách pH agaru a to 5,5 a 7,0. Nakoniec sa pri konkrétnej hodnote pH sledoval rast vláknitej huby bez alebo s prídavkom soli v koncentráciách 1, 3 a 5 % (w/v), ktorý znižoval vodnú aktivitu média. Získané rastové čiary vláknitej huby mali typický sigmoidálny tvar s lag-fázou, následnou fázou exponenciálneho rastu, po ktorej nasledovala fáza stacionárna. V mnohých experimentoch však lag-fáza chýbala. Tento jav mohla vyvolať inokulácia veľkého množstva buniek a fragmentov mycélia na povrch živného média identického zloženia. *G. candidum* bola schopná rásť za všetkých zvolených podmienok prostredia, ale rôznou rýchlosťou.

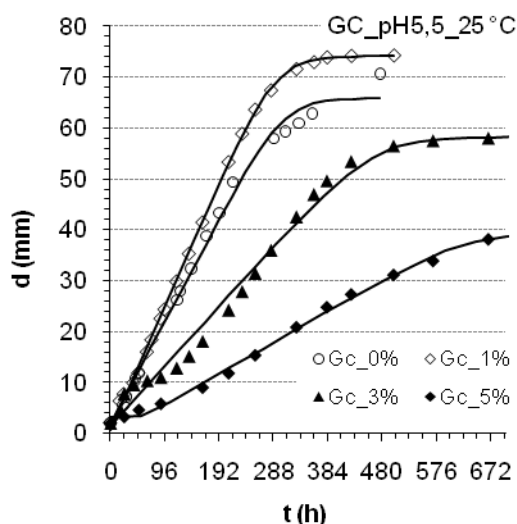
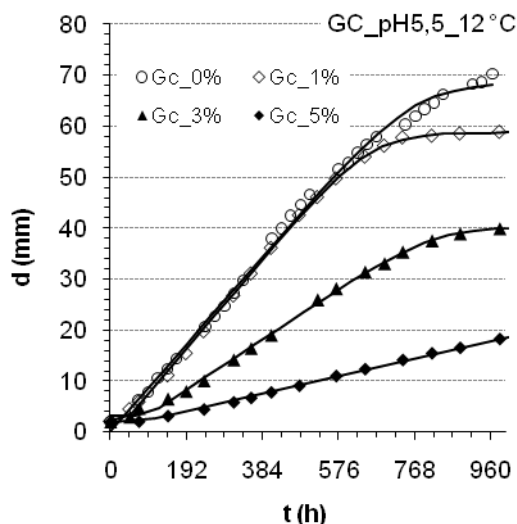
Vplyv obsahu využiteľnej vody v prostredí na rast vláknitej huby je názorne uvedený na obr. 1. Pri konštantnom pH (5,5) a teplote významne ovplyvnil rýchlosť rastu *G. candidum* až prídavok soli v koncentrácii 3 %. Napríklad pri teplote 12 °C rástla vláknitá huba v prostredí bez prídavku soli ( $a_v = 0,993$ ) rýchlosťou 0,089  $\text{mm}\cdot\text{h}^{-1}$ . 1%-tný prídavok soli ( $a_v = 0,985$ ) významne neovplyvnil dynamiku jej rastu ( $g_{1\%} = 0,091 \text{ mm}\cdot\text{h}^{-1}$ ). Tá sa v porovnaní s 0 % obsahom soli zvýšila len o nepatrné 2 %. Iná situácia nastala pri 3 % ( $a_v = 0,975$ ). Vlákňitá huba po 93 h lag-fáze začala rásť rýchlosťou 0,052  $\text{mm}\cdot\text{h}^{-1}$ , čo v prepočte predstavuje 42 % zníženie v porovnaní s 0 % soli. Zvýšenie koncentrácie soli na 5 % ( $a_v = 0,964$ ) spomalilo rastovú rýchlosť *G. candidum* až na hodnotu 0,018  $\text{mm}\cdot\text{h}^{-1}$ . Vlákňitá huba rástla až 5 násobne nižšou rýchlosťou než pri 0 % obsahu soli a takmer trojnásobne pomalšie ako v prípade 3 %. Navýšenie soli na 5 % sa odrazilo nielen v spomalení rastovej rýchlosti *G. candidum*, ale spôsobilo aj zmenu morfológie kolónie (obr.2). Tá nevytvárala súvisle zaoblený okraj, ale jej rast bol nepravidelný s výbežkami mycélia do okolitého agaru. Konečný priemer kolónie bol iba 31 mm a stacionárna fáza nastala až po 2 mesiacoch a 23 dňoch kultivácie. V prípade 1 % prídavku soli exponenciálny rast trval jeden mesiac a kolónia dosiahla priemer takmer 60 mm.

Zvýšením teploty na 25 °C sa rast vláknitej huby významne urýchlil, avšak vzhľadom na obsah soli si zachoval rovnaký trend. Rýchlosť rastu vláknitej huby pri 1 % koncentrácii soli v prostredí dosiahla hodnotu 0,251  $\text{mm}\cdot\text{h}^{-1}$ . Tá bola o 16 % vyššia v porovnaní s rastom bez soli ( $g_{0\%} = 0,210 \text{ mm}\cdot\text{h}^{-1}$ ) ale až 2 násobne vyššia ako pri 3 % ( $a_v = 0,973$ ;  $g_{3\%} = 0,122 \text{ mm}\cdot\text{h}^{-1}$ ). 5 % soli ( $a_v = 0,960$ ) znížilo rýchlosť rastu až 4 násobne ( $g_{1\%} = 0,064 \text{ mm}\cdot\text{h}^{-1}$ ) v porovnaní s 1 %. Kolónia *G. candidum* pri 1 % soli narástla na 72 mm za celé 2 týždne. Pri 5 % dosiahla maximálny priemer 39 mm približne za jeden mesiac. Dynamiku rastu vláknitej huby izolovanej z rozkladajúceho sa citrusového ovocia sledovali aj **Plaza et al. (2004)**. Pri 25 °C dosiahla rýchlosť rastu tohto izolátu hodnotu 0,167  $\text{mm}\cdot\text{h}^{-1}$  ( $a_v = 0,995$ ). Pri znížení aktivity vody na 0,950 rástla vláknitá huba rýchlosťou

nižšou ako  $0,042 \text{ mm}\cdot\text{h}^{-1}$ . V prostredí s vodnou aktivitou upravenou na hodnotu 0,90 sa jej rast nezaznamenal.

### Sekundárna matematická analýza

Pri sekundárnom modelovaní výsledkov sme vplyv teploty na rastovú rýchlosť kolónie *G. candidum* vyjadrili pomocou

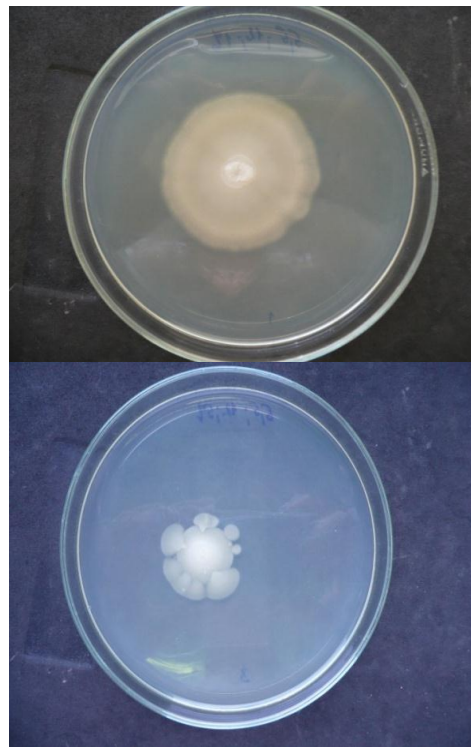


**Obrázok 1: Dynamika rastu *G. candidum* pri pH 5,5 a teplotách 12 °C (hore) a 25 °C (dole) počas jej kultivácie na povrchu agaru s odstredeným sušeným mliekom a s prídavkom soli 0, 1, 3 a 5 %**

G-modelu s transformáciou podľa teploty ( $G-T_w$  model, Medved'ová et al., 2009). Meniaci sa hodnota pH agaru (5,5 a 7,0) neovplyvnila významne dynamiku rastu vláknitej huby. Nevýznamný vplyv pH (od 5,0 do 7,0 s krokom 0,5) na rastovú rýchlosť kolónie *G. candidum* sme zaznamenali už v predošlej práci (Hudecová et al., 2008). *G. candidum* dokáže rásť v širokom intervale pH hodnôt (od 3 do 11). Optimálnym pre jej rast sa uvádza rozpätie od 5,5 do 6,0 ale aj od 6,0 do 7,0. Vzhľadom na uvedené skutočnosti bolo možné v súlade s Boutrouovou a Guéguenovou (2005) ako aj Tempelovou a Nielsenovou (2000) predpokladať, že pH hodnota v intervale od 4,4 do 6,7, ktorá sa uplatňuje pri výrobe

syrov, nemá výrazný vplyv na rast kmeňov *G. candidum* izolovaných z tohto druhu potraviny.

Na základe uvedených skutočností sme pre účely sekundárneho modelovania použili všetky namerané rastové rýchlosti bez ohľadu na hodnotu pH. Podľa experimentálnych údajov sme ako maximálnu pre rast vyšetrovaného izolátu vláknitej huby určili teplotu 38 °C,



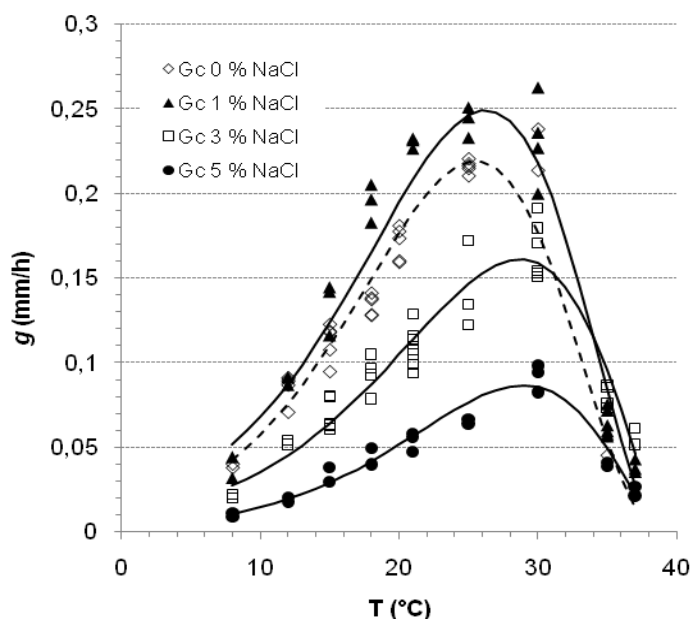
**Obrázok 2: Makroskopický vzhľad kolónie *G. candidum* na agare s odstredeným sušeným mliekom pri pH 5,5, teplote 12 °C a pri koncentrácii soli 1 % (hore) a 5 % (dole)**

ktorú sme použili vo vzťahu (1). Sekundárny model sa použil na vyjadrenie závislosti rastovej rýchlosti kolónie *G. candidum* od teploty pre koncentrácie soli 0, 1, 3 a 5 % (tab. 1) a jeho grafické prevedenie pri týchto podmienkach je zobrazené na obr. 3. Jednou z výhod modelu je možnosť výpočtu optimálnej teploty a optimálnej rýchlosti rastu modelovaného mikroorganizmu. Porovnaním optimálnych teplôt pri rôznom obsahu soli v médiu sme zistili, že so stúpajúcou koncentráciou soli sa optimálna teplota pre rast *G. candidum* zvyšovala, čo prirodzene súviselo s vyššou potrebou energie mikroorganizmu pri osmoregulačných procesoch reagujúcich na zhoršenie podmienok jedného z faktorov prostredia, v tomto prípade zníženia aktivity vody (Marechal et al. 1999). Optimálna teplota pre rast vláknitej huby sa pohybovala v rozpätí od 25 do 30 °C, teda v intervale uvedenom napríklad aj Fröhlich-Wyderovou (2003).

Rýchlosť rastu vláknitej huby bola významne ovplyvnená prídavkom soli do živného média hlavne v oblasti teplôt od 8 do 30 °C. Pri 1 % soli sa dynamika rastu *G. candidum* v porovnaní s rastom bez soli nepatrne zvýšila. Tento nárast bol v priemere 12 %. Navýšenie koncentrácie soli na 3 % už pozorovateľne spomalilo rastovú rýchlosť sledovanej huby. Tá rástla pomalšie v porovnaní s 1 % soli

**Tabuľka 1: Koefficienty  $G - T_w$  modelu, vypočítaná optimálna teplota a rastová rýchlosť *G. candidum* pri jednotlivých koncentráciách soli v prostredí**

<i>G. candidum</i>		G- $T_w$ model			$T_{opt}$ (°C)	$g_{opt}$ (mm.h <sup>-1</sup> )
% NaCl	$a_v$	Koefficienty				
		$C_0$	$C_1$	$C_2$		
0 %	0,993±0,003	-6,9142	3,0561	-0,4326	25,5	0,219
1 %	0,986±0,003	-5,814	2,5805	-0,3762	26,2	0,249
3 %	0,975±0,003	-4,6231	1,8373	-0,3016	28,7	0,161
5 %	0,963±0,002	-5,5468	2,0601	-0,3424	28,9	0,086



**Obrázok 3: Grafické znázornenie rýchlosti rastu kolónie *G. candidum* od teploty a obsahu soli v agare s odstredeným sušeným mliekom. Symboly predstavujú rastové rýchlosti získané z rastových kriviek a funkcia  $g = \exp(C_0 + C_1T + C_2T^2)$  je reprezentovaná kontinuálnymi čiarami.**

a rozdiel v rýchlostiach sa pohyboval od 48 do 27 %. Zníženie rastovej rýchlosti vláknitej huby pri najvyššej koncentrácii soli v prostredí bolo už výrazné. V porovnaní s 3 % sa rýchlosť znížila v priemere o polovicu a oproti 1 % rast poklesol o 79 až 61%. V oblasti za teplotným optimom vláknitá huba rástla podobne či už bol obsah soli 0, 1 alebo 3 %. Až pri 5 % nastalo výraznejšie zníženie rýchlosti rastu. V oblasti za teplotným optimom pri koncentrácii soli 5 % ( $a_v$  0,963±0,002), boli zistené kumulatívne nepriaznivé

účinky zníženej aktivity vody a vysokej teploty. *G. candidum* je na obsah soli v prostredí citlivá, ale táto vlastnosť bola kmeňovo závislá. Rastová odozva kmeňov na soľ sa líšila hlavne v intervale koncentrácií od 1 do 2,5 %. V syre jej rast bol limitovaný pri koncentráciách nad 1 %. Nakoľko sa povrch syra pred zretím soli väčšina kmeňov tolerovala len 1 až 2 % soli (Boutrou, Guéguen, 2005; Lecocq, Gueguen, 1994). Podľa uvedených autorov bola tolerancia kmeňov *G. candidum* na soľ do určitej miery ovplyvnená aj druhom syra. Napríklad všetky kmene *G. candidum* izolované zo španielskeho syra Armada rástli dobre aj pri 5 % soli v prostredí. Tieto kmene vykazovali výnimočné správanie, lebo bežne býva rast vláknitej huby pri 5 až 6 % soli úplne inhibovaný

(Tornadijo et al. 1998). Naproti tomu kmene zo syra s modrou plesňou vo vnútri neboli schopné rásť už pri 4 % soli,  $a_v = 0,970$  (Tempel, Nielsen, 2000).

#### Čas potrebný pre vytvorenie viditeľnej kolónie

Z praktického hľadiska bolo dôležité z našich výsledkov určiť, napríklad, čas potrebný pre vytvorenie viditeľnej kolónie. Za takúto sa považuje kolónia s priemerom 3 mm (Valík, Piecková, 2001). Príslušné výsledky sú uvedené v tab. 2. Ak by sme naše predpovede aplikovali na zretie ovčieho hrudkového syra, ktoré prebieha pri teplotách 14 až 16 °C (STN 571138, 1995), tak pri teplote 15 °C vytvorí *G. candidum* viditeľnú kolóniu po 1 dni. Ak by povrch hrudkového syra nebol ošetrovaný, utieraný slaným roztokom mohol by sa jeho rast vymknúť spod kontroly a spôsobiť nežiaduce organoleptické zmeny nielen v syre, ale aj v bryndzi, pre ktorú je surovinou.



**Tabuľka 2:** Čas (h) potrebný na dosiahnutie 3 mm kolónie *G. candidum* v závislosti od teploty a koncentrácie soli vypočítaný pomocou G-T<sub>w</sub> modelu.

%	Teplota (°C)					
	10	14	19	23	27	31
0	52,2	30,7	18,4	14,4	13,9	19,2
1	44,3	27,1	16,6	13,0	12,1	15,2
3	85,2	52,4	31,3	22,9	19,0	19,5
5	206,8	118,0	64,8	44,8	35,8	36,3

### Validácia sekundárneho modelu

Schopnosť sekundárneho modelu predpovedať rast vláknitej huby za použitých podmienok sme vyhodnotili pomocou výpočtu faktorov validácie (tab. 3) tak, ako to navrhli vo svojej práci **Baranyi et al. (1999)**. Diskrepancie medzi predikovanými a experimentálnymi rastovými rýchlosťami dosiahli hodnoty od 12 % do 25 %. Tieto výsledky sú porovnateľné s inými prácami zaoberajúcimi sa sekundárnym modelovaním povrchového rastu vláknitých húb. Napríklad počas modelovania kombinovaného vplyvu teploty a aktivity vody na rast *Fusarium verticillioides* a *Fusarium proliferatum* boli priemerné nezhody pre dva použité modely 11 a 25,4 % (**Samapundo et al., 2005**). Pri štúdiu vplyvu teploty na rast 5 kmeňov *Penicillium expansum* sa vypočítané hodnoty B<sub>f</sub> pohybovali od 0,91 do 1,10 a A<sub>f</sub> od 1,05 do 1,19 (**Baert et al., 2007**).

**Tabuľka 3:** Faktory validácie G-T<sub>w</sub> modelu pri jednotlivých koncentráciách soli v prostredí

<i>G. candidum</i> % NaCl	Parametre validácie				
	A <sub>f</sub>	B <sub>f</sub>	D <sub>f</sub> (%)	R <sup>2</sup>	MSE
0 %	1,125	0,999	12	0,943	0,014
1 %	1,248	1,001	25	0,902	0,049
3 %	1,163	1,001	16	0,911	0,023
5 %	1,148	1,000	15	0,958	0,019

### ZÁVER

Predložená štúdia poskytla kvantitatívne údaje o povrchovom raste vláknitej huby *G. candidum* a o jeho ovplyvnení faktormi prostredia, ako sú teplota, pH a vodná aktivita. Izolát z ovčieho hrudkového syra nereagoval na zmenu hodnoty pH v rozpätí od 5,0 do 7,0, ale jeho rast bol významne ovplyvnený zmenou teploty a znížením vodnej aktivity prídavkami soli vyššími ako 3 %. Výsledky práce poukázali na opodstatnenosť utierania povrchu hrudkových syrov utierkou prepieranou v soľnom roztoku, čím sa dosiahne kontrola nad intenzívnym rastom vláknitej huby na povrchu syra počas jeho zretia.

### REFERENCES

BAERT, K., VALERO, A., DE MEULENAER, B., SAMAPUNDO, S., AHMED, M. M., BO, L., DEBEVERE, F., DEVLIEGHERE, F., 2007. Modelling the effect of temperature on the growth rate and lag phase of *Penicillium expansum* in apples. In *International Journal of Food Microbiology*, vol. 118, 2007, p. 139-150.

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

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

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

FRÖHLICH-WYDER, M., 2003. Yeasts in dairy products. In BOEKHOUT, T., ROBERT, V. *Yeasts in food*. Hamburg: Woodhead Publishing, 2003, p. 209-237, ISBN 185573706X.

GIBSON, A. M., BARANYI, J., PITT, J. I., EYLES, M. J., ROBERTS, T. A., 1994. Predicting fungal growth: the effect of water activity on *Aspergillus flavus* and related species. In *International Journal of Food Microbiology*, vol. 23, 1994, p. 419-431.

GÖRNER, F., VALÍK, Ľ., 2004. *Aplikovaná mikrobiológia požívatin*. 1. vyd. Bratislava: Malé centrum, 2004. 528 p. ISBN 80-967064-9-7.

HAASUM, I., NIELSEN, P. V., 1998. Ecophysiological characterization of common food-borne fungi in relation to pH and water activity under various atmospheric compositions. In *Journal of Applied Microbiology*, vol. 84, 1998, p. 451-460.

HUDECOVÁ, A., LIPTÁKOVÁ, D., VALÍK, Ľ., MEDVEĐOVÁ, A., 2008. Vplyv teploty a aktívnej kyslosti na rast *Geotrichum candidum* v mlieku a v mliečnom agare. In *Celostátní přehledky sýrů: Mléko a sýry*, 2008, p. 94-99. ISBN 978-80-7080-695-1.

KOCKOVÁ-KRATOCHVÍLOVÁ, A., 1990. *Taxonómia kvasiniek a kvasinkovitých mikroorganizmov*. 1. vyd. Bratislava: Alfa, 1990. 673 p. ISBN 80-05-00644-6.

LECOCQ, J., GUEGUEN, M., 1994. Effects of pH and sodium chloride on the interactions between *Geotrichum candidum* and *Brevibacterium linens*. In *Journal of Dairy Science*, vol. 77, 1994, no. 10, p. 2890-2899.

LEDENBACH, L. H., MARSHALL, R. T., 2009. Microbiological spoilage of dairy products. In SPERBER, W. H., DOYLE, M. P. *Compendium of the microbiological spoilage of foods and beverages*. New York: Springer Science+Business Media, LLC, 2009, p. 41-67, ISBN 978-1-4419-0825-4.

MARCELLINO, N., BEUVIER, E., GRAPPIN, R., GUÉGUEN, M., BENSON, D. R., 2001. Diversity of *Geotrichum candidum* strains isolated from traditional cheesemaking fabrications in France. In *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 67, 2001, no. 10, p. 4752-4759.

MARECHAL, P. A., MARNAÑÓN, I. M., POIRIER, I., GERVAIS, P., 1999. The importance of the kinetics of application of physical stresses on the viability of microorganisms: significance for minimal food processing. In *Trends in Food Science & Technology*, vol. 10, 1999, p. 15-20.

MEDVEĐOVÁ, A., VALÍK, Ľ., SIROTNÁ, Z., LIPTÁKOVÁ, D., 2009. Growth characterisation of *Staphylococcus aureus* in milk: a quantitative approach. In *Czech Journal of Food Sciences*, vol. 27, 2009, p. 443-453.

PLAZA, P., USALL, J., TEIXIDÓ, N., VIÑAS, I., 2004. Effect of water activity and temperature on competing abilities of common postharvest citrus fungi. In *International Journal of Food Microbiology*, vol. 90, 2004, p. 75-82.

POTTIER, I., GENTE, S., VERNOUX, J. P., GUÉGUEN, M., 2008. Safety assessment of dairy microorganisms: *Geotrichum candidum*. In *International Journal of Food Microbiology*, vol. 126, 2008, p. 327-332.

SAMAPUNDO, S., DEVLIEGHIERE, 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. In *International Journal of Food Microbiology*, vol. 105, 2005, p. 35-52.

STN ISO 571138. 1995. Ovčí hrudkový syr. Bratislava: Slovenský ústav technickej normalizácie, 1995, 8 p.

TEMPEL, T. V. D., NIELSEN, M. S., 2000. Effects of atmospheric conditions, NaCl and pH on growth and interactions between moulds and yeasts related to blue cheese production. In *International Journal of Food Microbiology*, vol. 57, 2000, p. 193-199.

TORNADIJO, M. E., FRESNO, J. M., SARMIENTO, R. M., CARBALLO, J., 1998. Study of the yeasts during the ripening process of Armada cheeses from raw goat's milk. In *Le Lait*, vol. 78, 1998, p. 647-659.

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

VARNAM, A. H., SUTHERLAND, J. P., 1994. *Milk and milk products: Technology, chemistry and microbiology*. London: Chapman and Hall, 1994. 451 p. ISBN 041245730X.

WOUTERS, J. T. M., AYAD, E. H. E., HUGENHOLTZ, J., SMIT, G., 2002. Microbes from raw milk for fermented dairy products. In *International Dairy Journal*, vol. 12, 2002, p. 91-109.

### Acknowledgments:

Táto práca bola vypracovaná s podporou grantu MŠ VEGA č. 1/0094/10 a programom na podporu mladých výskumníkov STU č. 6408-PM.

### Contact address:

Anna Hudecová, Department of Nutrition and Food Assessment, Faculty of Chemical and Food Technology, Slovak University of Technology, Radlinského 9, 812 37 Bratislava, Slovak Republic, E-mail: xhudecova@stuba.sk

Lubomír Valík, Department of Nutrition and Food Assessment, Faculty of Chemical and Food Technology, Slovak University of Technology, Radlinského 9, 812 37 Bratislava, Slovak Republic, E-mail: lubomir.valik@stuba.sk

Denisa Liptáková, Department of Nutrition and Food Assessment, Faculty of Chemical and Food Technology, Slovak University of Technology, Radlinského 9, 812 37 Bratislava, Slovak Republic, E-mail: denisa.laukova@stuba.sk

## EFFECT OF NICKEL AND ZINC PERORAL ADMINISTRATION ON MEAT QUALITY OF RABBITS

Anna Kalafová, Jaroslav Kováčik, Peter Massányi, Norbert Lukáč, Rastislav Jurčík, Monika Schneidgenová

### ABSTRACT

The aim of our study was to determine the effect of single nickel administration as well as co-administration with zinc on meat quality parameters. In the experiment 45 [25 female (5 per group) and 20 male (4 per group)] rabbits of broiler line Californian were involved. Animals were divided to five groups: K (n=9) – control; P1 (n=9) – received 17.5 g NiCl<sub>2</sub>·100 kg<sup>-1</sup> feeding dose (FD); P2 (n=9) – received 35 g NiCl<sub>2</sub>·100 kg<sup>-1</sup> FD; P3 (n = 9) – received 17.5 g NiCl<sub>2</sub>·100 kg<sup>-1</sup> FD and 30 g ZnCl<sub>2</sub>·100 kg<sup>-1</sup> FD and finally groups P4 (n = 9) – received 35 g NiCl<sub>2</sub>·100 kg<sup>-1</sup> FD and 30 g ZnCl<sub>2</sub>·100 kg<sup>-1</sup> FD. Animals were fed *ad libitum* using KKV1 feeding mixture with or without nickel and zinc addition for 90 days. Meat quality was analyzed from a sample of *musculus biceps femoris* for the content of water in muscle, content of proteins, fat, energy, electric conductivity, pH, colour and content of bounded water. The value of pH was detected by injection analysis. The content of water, proteins and fat was analyzed using Infratech 1265 Meat Analyzer. Meat colour was detected by spectrophotometer (Specol 11) and the meat ability to bind water by pressure method. In meat quality any significant differences were found among all groups.

**Keywords:** nickel, zinc, rabbit, meat

### ÚVOD

Spotreba králičieho mäsa, ako aj akékoľvek iného mäsa je ovplyvnená historickým, ekonomickým a tiež sociálnym vývojom. Králičie mäso je vysoko cenené pre svoju vysokú nutričnú hodnotu a diätetické vlastnosti: je chudé obsahuje nenasýtené mastné kyseliny (kyselina olejová a linolová; 60 % z celkového množstva mastných kyselín, je bohaté na proteíny (20-21 %) a aminokyseliny s vysokou biologickou hodnotou, má nízke koncentrácie cholesterolu a sodíka je bohaté na draslík, fosfor a horčík (Parigi Bini et al., 1992a; Bielanski et al., 2000; Dalle Zotte, 2002; Hermida et al., 2006). Králičie mäso je lepšie stráviteľné v porovnaní s inými druhmi mäsa (hovädzie, jahňacie alebo bravčové mäso; Enser et al., 1996) a je odporúčané na konzumáciu pre osoby s kardiovaskulárnymi ochoreniami (Hu and Willett, 2002). Z hľadiska kontaminácie potravín a krmív je potrebné venovať zvýšenú pozornosť obsahu rizikových chemických prvkov, ktoré sú významnými enviromentálnymi kontaminantami potravinového reťazca. Významnými anorganickými látkami vstupujúcimi do potravinového reťazca sú kadmium, ortuť, olovo, chróm a nikel. V posledných rokoch sa poznatky o toxicite a karcinogenite niklu výrazne zvýšili. Je to prvok, ktorý môže akumulovať v pôde na toxickú úroveň antropogénnymi aktivitami (Llamas and Sanz, 2008). Zinok, stopový prvok s antioxidantnými účinkami, je súčasťou enzýmu superoxidodismutázy, ktorá sa podieľa na zaistení antioxidantnej ochrany organizmu (Shils et al., 1999; Zadák, 2002).

Cieľom experimentu bolo zistenie účinku experimentálne podávaného samotného niklu a niklu v kombinácii so zinkom na vybrané kvalitatívne parametre mäsa králikov.

### MATERIÁL A METÓDY

V experimente boli použité Králiky domáce brojlerovej línie Kalifornský, o hmotnosti 3,5 – 4,0 kg, vo veku 4 mesiace, ktoré boli umiestnené v priestoroch

Centra výskumu živočíšnej výroby v Lužiankach. Pokusné zvieratá boli po odstave, pohlavne dospelé a klinicky zdravé.

V pokuse sme použili 45 zvierat, samice v počte 25 kusov a samce v počte 20 kusov.

Zvieratá boli rozdelené do 5 skupín:

- pokusná skupina P1 17,5 g NiCl<sub>2</sub>·100 kg<sup>-1</sup> krmnej zmesi (KZ)
- pokusná skupina P2 35 g NiCl<sub>2</sub>·100 kg<sup>-1</sup> KZ
- pokusná skupina P3 17,5 g NiCl<sub>2</sub> + 30g ZnCl<sub>2</sub>·100 kg<sup>-1</sup> KZ
- pokusná skupina P4 35 g NiCl<sub>2</sub> + 30g ZnCl<sub>2</sub>·100 kg<sup>-1</sup> KZ
- kontrolná skupina K

Nikel (NiCl<sub>2</sub>, Reachem, prášková forma) a zinok (ZnCl<sub>2</sub>, Reachem, prášková forma) boli zapracované do krmnej zmesi a podávané vo forme granúl nasledovne:

Tabuľka 1 Schéma pokusu

Skupiny				
K n=9	P1 n=9	P2 n=9	P3 n=9	P4 n=9
KKV1 (KZ)	17,5 g NiCl <sub>2</sub> 100 kg <sup>-1</sup> (KZ)	35 g NiCl <sub>2</sub> 100 kg <sup>-1</sup> (KZ)	17,5 g NiCl <sub>2</sub> + 30 g ZnCl <sub>2</sub> 100 kg <sup>-1</sup> (KZ)	35 g NiCl <sub>2</sub> + 30 g ZnCl <sub>2</sub> 100 kg <sup>-1</sup> (KZ)

Krmivo bolo podávané počas 90 dní pokusu. Zvieratá boli ustajnené v klimatizovaných halách, v jednopodlažných individuálnych kovových klietkach typizovaných rozmerov. Voda bola k dispozícii z automatických napájačiek a zvieratá boli kŕmené kompletnou kŕmnu zmesou KK V1 *ad libitum*.

Kvalita králičieho mäsa sa analyzovala zo vzorky dvojhľavého stehnového svalu *m. biceps femoris* (obsah vody vo svalovine, obsah bielkovín, obsah tuku, energia, elektrická vodivosť, pH, farba, obsah viazanej vody). Vzorka bola odobraná 1 hodinu po porážke, zabalená do alumínovej fólie a uskladnená pri teplote 4°C počas

24 hodín. Po tejto dobe bola zmeraná pH hodnota mäsa vpichovou elektródou (Radelkis OP-109, Radelkis, Hungary). Obsah vody, bielkovín a intramuskulárneho tuku bol stanovený prístrojom Infratec 1265 (Meat analyzer, USA Northcentral, Lab- Equipment) 48 hodín *post mortem*. Farba mäsa bola analyzovaná na prístroji Spekol 11 (Medson, Poľsko) ako podiel remisie pri vlnovej dĺžke 540 µm. Schopnosť mäsa viazať vodu bola zistená tlakovou metódou podľa Grav-Hamma na prístroji modifikovanom Hašekom a Pálanskou (1976).

Získané údaje sme vyhodnotili variačno - štatistickými metódami programom Office Excel 2003 a SAS. Vypočítali sme základné hodnoty (priemer, smerodajná odchýlka, variačný koeficient, minimum a maximum) a analyzovali sme rozptyl (ANOVA).

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

Expozícia zvierat xenobiotikami spôsobila zmeny v zootechnických parametroch (Arpášová et al., 2007; Kalafová et al., 2009a) ako aj zmeny v homeostáze

organizmu (Capcarová et al., 2008; Capcarová et al., 2009; Capcarová et al., 2010; Kalafová et al., 2009; Kolesárová et al., 2008; Kolesárová et al., 2009; Kolesárová et al., 2010a; Kolesárová et al., 2010b; Kolesárová et al., 2011 Koréneková et al., 2009; Martiniaková et al., 2009; Skalická et al., 2009; Medved'ová et al., 2010; Medved'ová et al., 2011). V experimente sme zisťovali vplyv rôznych koncentrácií niklu (NiCl<sub>2</sub>) a niklu v kombinácii so zinkom (ZnCl<sub>2</sub>) na vybrané ukazovatele kvality mäsa králikov. Kvalitu králičieho mäsa sme analyzovali zo vzorky stehna (*m. biceps femoris*). Na základe predchádzajúcich štúdií sme zistili, že prídavok niklu a zinku do kŕmnej zmesi u samíc králikov signifikante zvýšil (P<0,05) obsah vápnika v krvnom sére u sledovaných zvierat v pokusnej skupine P4, zaznamenali sme štatisticky preukazné rozdiely (P<0,05) v hladinách hepatálnych enzýmov (AST a ALT) medzi jednotlivými odbermi (Kalafová et al., 2007; Kalafová et al., 2008; Kalafová 2009b).

V tabuľke 2 sú uvedené hodnoty vybraných kvalitatívnych ukazovateľov mäsa králikov.

**Tabuľka 2** Základné štatistické ukazovatele parametrov mäsa králikov

		K	P1	P2	P3	P4
<b>Obsah celkovej vody g.100g<sup>-1</sup></b>	x	<b>72,05</b>	<b>72,71</b>	<b>73,89</b>	<b>73,38</b>	<b>73,64</b>
	SD	4,31	2,56	1,18	0,67	0,82
	CV	5,98	3,52	1,59	0,91	1,11
	min	61,80	66,40	72,20	72,60	72,70
	max	74,80	75,00	75,60	74,20	75,10
<b>Celkové bielkoviny g.100g<sup>-1</sup></b>	x	<b>22,48</b>	<b>22,83</b>	<b>22,60</b>	<b>22,82</b>	<b>22,63</b>
	SD	0,75	0,96	0,87	0,55	0,53
	CV	3,34	4,20	3,85	2,41	2,34
	min	21,50	21,70	21,70	22,10	22,00
	max	23,50	24,20	24,00	23,50	23,60
<b>Celkový tuk g.100g<sup>-1</sup></b>	x	<b>4,49</b>	<b>3,42</b>	<b>2,48</b>	<b>2,78</b>	<b>2,69</b>
	SD	4,12	2,03	0,87	0,87	0,54
	CV	91,75	59,36	35,08	31,29	20,07
	min	1,80	1,80	1,60	1,90	1,90
	max	14,00	8,40	4,40	4,00	3,50
<b>Energetická hodnota KJ. 100g<sup>-1</sup></b>	x	<b>544,13</b>	<b>511,72</b>	<b>471,81</b>	<b>487,06</b>	<b>480,43</b>
	SD	155,84	84,32	34,01	27,90	23,37
	CV	28,64	16,48	7,21	5,73	4,86
	min	443,02	443,44	427,53	455,17	440,09
	max	909,84	721,86	539,32	520,90	508,76
<b>pH 48</b>	x	<b>5,88</b>	<b>5,88</b>	<b>6,00</b>	<b>5,98</b>	<b>5,71</b>
	SD	0,20	0,31	0,25	0,35	0,20
	CV	3,40	5,27	4,17	5,85	3,50
	min	5,61	5,43	5,75	5,55	5,51
	max	6,28	6,34	6,58	6,54	6,10
<b>Elektrická vodivosť µS</b>	x	<b>3,40</b>	<b>2,30</b>	<b>3,00</b>	<b>2,75</b>	<b>3,98</b>
	SD	1,23	0,79	0,96	1,18	1,36
	CV	36,18	34,35	32,00	42,91	34,17
	min	1,50	1,20	1,70	1,40	1,30
	max	4,70	3,90	4,60	4,40	5,50
<b>Farba L</b>	x	<b>43,97</b>	<b>42,99</b>	<b>42,25</b>	<b>41,20</b>	<b>43,90</b>
	SD	5,85	3,30	5,98	4,92	5,75
	CV	13,30	7,68	14,15	11,94	13,10
	min	32,80	35,89	34,63	31,763	33,04
	max	50,48	48,39	49,60	44,97	52,19
<b>Voľne viazaná voda g.100g<sup>-1</sup></b>	x	<b>32,71</b>	<b>31,36</b>	<b>32,84</b>	<b>30,57</b>	<b>31,52</b>
	SD	2,25	2,47	3,87	2,98	3,78
	CV	6,88	7,88	11,78	9,75	11,99
	min	29,95	27,23	23,54	27,98	24,76
	max	36,57	34,72	35,42	34,78	36,53

x – priemerná hodnota, SD – štandardná odchýlka, CV – variačný koeficient

Priemerné hodnoty obsahu celkovej vody a celkových bielkovín boli v pokusných skupinách vyššie v porovnaní s kontrolnou skupinou. V kontrolnej skupine pri celkovom tuku sme namerali najvyššiu priemernú hodnotu  $4,49 \pm 4,12 \text{ g} \cdot 100\text{g}^{-1}$ . V pokusných skupinách sa priemerné hodnoty pohybovali od  $2,48 \pm 0,87$  do  $3,42 \pm 2,03 \text{ g} \cdot 100\text{g}^{-1}$ . Energetická hodnota bola najvyššia v kontrolnej skupine  $544,13 \pm 155,84 \text{ KJ} \cdot 100\text{g}^{-1}$ . Priemerná hodnota pH 48 bola vyššia v skupine s dvojnásobnou dávkou  $\text{NiCl}_2 - 6,0 \pm 0,25$ . V ostatných skupinách boli hodnoty vyrovnané. Nameraná hodnota elektrickej vodivosti bola najnižšia v skupine P1  $2,30 \pm 0,79 \mu\text{S}$  a najvyššia v skupine P4  $3,98 \pm 1,36 \mu\text{S}$ , medzi týmito pokusnými skupinami nebol zistený štatisticky preukazný rozdiel ( $P > 0,05$ ). Priemerná hodnota farby bola najnižšia v skupine P3  $41,20 \pm 4,92$  v ostatných skupinách boli hodnoty pomerne vyrovnané. Obsah voľne viazanej vody bol vo všetkých skupinách vyrovnaný. Pri vzostupe voľnej vody klesá pH vo svalce a stúpa farba mäsa. Z hodnôt vyplýva, že po 90. dňoch pokusu nebol zistený štatisticky preukazný rozdiel ( $P > 0,05$ ) v sledovaných ukazovateľoch.

Pri analýze kvality mäsa nebol zaznamenaný štatisticky preukazný rozdiel ( $P > 0,05$ ) vplyvom podávania niklu a zinku. Variabilita môže byť zapríčinená rôznymi vplyvmi (plemeno, užitkový typ, kategória, pohlavie, vek, výživa). Hodnoty sledovaných ukazovateľov kvality mäsa možno porovnať aj s údajmi v zootecnickej literatúre (Skřivan et al., 2000; Skřivanová et al., 2001; Ludewig et al., 2003). Vo všeobecnosti sa kvalitatívne parametre mäsa zlepšujú s rastovou intenzitou. Obsah tuku sa zvyšuje na úkor obsahu vody (Pargini – Bini et al., 1992b; Bernardini Battaglini et al., 1994). Zmeny pozorované pri jednotlivých ukazovateľoch kvality mäsa sú pravdepodobne spojené so zmenou histologickej štruktúry a hladiny metabolických procesov.

## ZÁVER

Prítomnosť ťažkých kovov je nutná pre priebeh rôznych biochemických procesov v živej prírode. Ak sa však ich koncentrácia zvyšuje v porovnaní s prirodzeným výskytom, dochádza k ich toxickému účinku. V priebehu pokusu sme sledovali vplyv samotného niklu a niklu v kombinácii so zinkom na vybrané ukazovatele kvality mäsa králikov. Pri hodnotení jednotlivých vybraných ukazovateľov sme nezistili medzi skupinami štatisticky preukazné rozdiely. Dosiahnuté výsledky ukázali, že uvedené koncentrácie niklu a zinku so zinkom nemali negatívny vplyv na vybrané ukazovatele chemickej skladby mäsa.

## LITERATÚRA

ARPÁŠOVÁ, H., CAPCAROVÁ, M., KALAFOVÁ, A., LUKÁČ, N., KOVÁČIK, J., FORMICKI, G., MASSÁNYI, P. 2007. Nickel induced alteration of hen body weight, egg production and egg quality after an experimental peroral administration. In *Journal of environmental science and health, Part B*, vol. 42, 2007, p. 913-918.

BERNARDINI BATTAGLINI, M., CASTELLINI, C. 1994. Rabbit carcass and meat quality: effect of strain,

rabbitry and age. In *Ital. J. Food Sci.*, vol. 2, 1994, p.157-166.

BIELANSKI, P., ZAJAC J., FIJAL, J. 2000. Effect of genetic variation of growth rate and meat quality in rabbits. In *Proceedings of the 7th World Rabbit Congress*, July 4–7, Valencia, Spain, 2000, p. 561–566.

CAPCAROVÁ, M., KOLESÁROVÁ, A., ARPÁŠOVÁ, H., MASSÁNYI, P., LUKÁČ, N., KOVÁČIK, J., KALAFOVÁ, A., SCHNEIDGENOVÁ, M. 2008. Blood biochemical dynamics and correlations in laying hens after experimental nickel administration. In *International Journal of Poultry Science*, vol. 7, 2008, no. 6, p.538-547.

CAPCAROVÁ, M., KOLESÁROVÁ, A., LUKÁČ, N., SIROTKIN, A., BÁRDOS, A., ROYCHOUDHURY, P. 2009. Antioxidant defence in porcine granulosa cells exposed to lead *in vitro*. In *Potravinárstvo*, vol. 3, 2009, no. 2, p. 15-18.

CAPCAROVÁ, M., PETROVOVÁ, E., FLEŠÁROVÁ, P., DANKOVÁ, M., MASSÁNYI, P., DANKO, J. 2010. Bendiocarbamate induced alterations in selected parameters of rabbit homeostasis after experimental peroral administration. In *Pesticide Biochemistry and Physiology*. vol. 98, 2010, no. 2, p. 231-218.

DALLE ZOTTE, A. 2002. Perception of rabbit meat quality and major factors influencing the rabbit carcass and meat quality. In *Livestock Production Science*, vol. 75, 2002, p.11–32.

ENSER, M., HALLET, K., HEWITT, B., FURSEY, G. A. J., WOOD, J. D. 1996. Fatty acid content and composition of English beef, lamb and pork at retail. In *Meat Science*, vol. 4, 1996, p. 443–456.

HÁSEK, O., PALANSKÁ, O. 1976. Determination of water holding capacity in meat by instruments at constant pressure. In *Poultry Industry*, vol. 18, 1996, p. 228–233.

HERMIDA, M., GONZALEZ, M., MIRANDA, M., RODRÍGUEZ-OTERO, J. L. 2006. Mineral analysis in rabbit meat from Galicia (NW Spain). In *Meat Science*, vol. 73, 2006, no. 4, p. 635–639.

HU, F. B., WILLETT, W. C. 2002. Optimal diets for prevention of coronary heart disease. In *Journal of the American Medical Association*, vol. 288, 2002, p. 2569–2578.

KALAFOVÁ, A., KOVÁČIK, J., JURČÍK, R., LUKÁČ, N., MASSÁNYI, P., CAPCAROVÁ, M., SCHNEIDGENOVÁ, M., ČUPKA, P. 2007. Minerálny profil králikov po experimentálnom podaní niklu a zinku. In *Zborník z VII. Celoslovenského seminára z fyziológie živočíchov*, 23. – 24. mája 2007. p. 124-129.

KALAFOVÁ, A., LUKÁČ, N., CAPCAROVÁ, M., SCHNEIDGENOVÁ, M., KOLESÁROVÁ, A., KOVÁČIK, J., ČUPKA, P., CHRENEK, P., MASSÁNYI, P. 2008. Účinok experimentálneho podania niklu a zinku na hladinu hepatálnych enzýmov králikov. In *Bezpečnosť a kvalita surovín a potravín zborník vedeckých prác z III. vedeckej konferencie s medzinárodnou účasťou spojenou s 5. výročím vzniku FBP SPU v Nitre*, Nitra: Slovenská poľnohospodárska univerzita, 2008, p. 273-277, ISBN 978-80-8069-996-3.

KALAFOVÁ, A., KOVÁČIK, J., MASSÁNYI, P., SCHNEIDGENOVÁ, M., FILIPEJOVÁ, T., CAPCAROVÁ, M., CHRASTINOVÁ, E., JURČÍK, R., LUKÁČ, N., CHRENEK, P., ČUPKA, P. 2009a. Účinok experimentálneho podania niklu a zinku na jatočné zloženie králikov. In *Acta fytotechnica et zootechnica* (mimoriadne číslo). Článok zo zborníka: Bezpečnosť a kvalita surovín a potravín, IV. vedecká konferencia s medzinárodnou účasťou, Nitra: SPU, 27. – 28. január 2009a, p. 268-272.

KALAFOVÁ, A., MASSÁNYI, P., CHRENEK, P., KOVÁČIK, J., LUKÁČ, N., CHRASTINOVÁ, E.,

SCHNEIDGENOVÁ, M., ČUPKA, P., JURČÍK, R. 2009b. The effect of single nickel and combined nickel and zinc peroral administration on selected mineral blood parameters in female rabbits, In *Potravinárstvo*, vol. 3, 2009b, no. 4, p. 26-29.

KOLESÁROVÁ, A., CAPCAROVÁ, M., ARPÁŠOVÁ, H., KALAFOVÁ, A., MASSÁNYI, P., LUKÁČ, N., KOVÁČIK, J., SCHNEIDGENOVÁ, M. 2008. Nickel-induced blood biochemistry alterations in hens after an experimental peroral administration. In *Journal of Environmental Science and Health, part B*, vol. 43, 2008, no. 7, p. 625-632.

KOLESÁROVÁ, A., ROYCHOUDHURY, P., SLIVKOVÁ, J., MASSÁNYI, P., SIROTKIN, A., CAPCAROVÁ, M., MEDVEĎOVÁ, M., KOVÁČIK, J. 2009. Olovom indukované zmeny v sekrécii hormonálnych látok ovariálnymi granulóznymi bunkami prasničiek *in vitro*, In *Potravinárstvo*, vol. 3, 2009, no. 2, p. 30-34.

KOLESÁROVÁ, A., CAPCAROVÁ, M., ROYCHOUDHURY, P. 2010a. Metal induced ovarian signaling. Nitra : Slovak Agricultural University, 2010a, 135 p. ISBN 978-80-552-0456-7.

KOLESÁROVÁ, A., ROYCHOUDHURY, P., SLIVKOVÁ, J., SIROTKIN, A., CAPCAROVÁ, M., MASSÁNYI, P. 2010b. In vitro study on the effects of lead and mercury on porcine ovarian granulosa cells. In *Journal of environmental science and health, Part A*, vol. 45, 2010b, no. 3, p. 320-331.

KOLESÁROVÁ, A., CAPCAROVÁ, M., MEDVEĎOVÁ, M., SIROTKIN, A., KOVÁČIK, J. 2011. *In vitro* Assessment of Iron on Porcine Ovarian Granulosa Cells: secretory activity, markers of proliferation and apoptosis. In *Physiological Research*, 2011, in press.

KORÉNEKOVÁ, B., SKALICKÁ, M., KOŽÁROVÁ, I., MAČANGA, J., KORÉNEK, M. 2009. Sledovanie rizikových chemických prvkov u kačic divých (*Anas platyrhynchos*), In *Potravinárstvo*, vol. 3, 2009, no. 2, p. 35-37.

LLAMAS, A., SANZ, A. 2008. Organ – distinctive changes in respiration rates of rise plants under nickel stress. In *Plant Growth Regul.*, vol. 54, 2008, p. 63-69.

LUDEWIG, M., TREEL, VAN N. 2003. Schlachtausbeute und Fleischqualität von Mastkaninchen in Abhängigkeit vom Alter. In *Fleischwirtschaft*, 2003, p.101-103.

MARTINIAKOVÁ, M., OMELKA, R., JANČOVÁ, A., FORMICKI, G., STAWARZ, R. 2009. Koncentrácia vybraných rizikových prvkov v stehnových kostiach hrdziaka hôrneho (*Clethrionomys glareolus*), In *Potravinárstvo*, vol. 3, 2009, no. 2, p. 54-57.

MEDVEĎOVÁ, M., KOLESÁROVÁ, A., CAPCAROVÁ, M., SIROTKIN, A., KOVÁČIK, J. 2010. The release of progesterone by ovarian granulosa cells following cobalt experimental administration. In *Potravinárstvo*, vol. 4, p. 330-336.

MEDVEĎOVÁ, M., KOLESÁROVÁ, A., CAPCAROVÁ, M., LABUDA, R., SIROTKIN, A., KOVÁČIK, J., BULLA, J. 2011. The effect of deoxynivalenol on the secretory activity, proliferation and apoptosis of porcine ovarian granulosa cells *in vitro*. In *Journal of Environmental Science and Health Part B*. in press.

PARIGI-BINI, R., XICCATO, G., CINETTO, M., DALLE ZOTTE, A. 1992a. Effetto dell'età e peso di macellazione e del sesso sulla qualità della carcassa e della

carne cunicola. 2. Composizione chimica e qualità della carne, In *Zoot. Nutr. Anim.*, vol.18, 1992b, p. 173-190.

PARIGI-BINI, R., XICCATO, G., CINETTO, M. 1992b. Effect of slaughter age and weight on carcass and meat quality of the commercial rabbit. In *Proc. 5<sup>th</sup> World rabbits congress*, Oregon, 1992, vol.2, p. 819-826.

SKALICKÁ, M., KORÉNEKOVÁ, B., KOŽÁROVÁ, I. 2009. Porovnávanie hladín zinku a medi u strelených a zabitých bažantov, In *Potravinárstvo*, vol. 3, 2009, no. 2, p. 64-66.

SHILS, M. E., OLSON, J. A., SHIKE, M., ROSS, A C. 1999. Modern Nutrition in Health and Disease: King, C.J., Keen, C.L.: Zinc. 9<sup>th</sup> edition, Williams & Wilkins, 1999, p. 223-239.

SKŘIVAN, M., SKŘIVANOVÁ, V., MAROUNEK, M., TŮMOVÁ, E., WOLF, J. 2000. Influence of dietary fat source and copper supplementation on broiler performance, fatty acid profile of meat and depot fat, and on cholesterol content in meat. In *British Poultry Science*, vol. 41, 2000, p. 608-614.

SKŘIVANOVÁ, V., SKŘIVAN, M., MAROUNEK, M., BARAN, M. 2001. Effect of feeding supplemental copper on performance, fatty acid profile and on cholesterol contents and oxidative stability of meat of rabbits. In *Arch. Anim. Nutr. – Arch. Tierernähr.*, vol. 54, 2001, p. 329-339.

ZADÁK, Z. 2002. Výživa v intenzivní péči. In *Grada Publishing a.s.*, 2002, p. 488.

#### Acknowledgments:

This work was supported by grant APVV SK-PL-0007-09.

#### Contact address:

Ing. Anna Kalafová PhD. Department of Animal Physiology, Slovak University of Agriculture, A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovakia, E-mail: anna.kalafova@uniag.sk

prof. Ing. Jaroslav Kováčik PhD Department of Animal Physiology, Slovak University of Agriculture, A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovakia, E-mail: jaroslav.kovacik@uniag.sk

doc. MVDr. Peter Massányi, PhD. Department of Animal Physiology, Slovak University of Agriculture, A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovakia, E-mail: peter.massanyi@uniag.sk

doc. Ing. Norbert Lukáč PhD. Department of Animal Physiology, Slovak University of Agriculture, A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovakia, E-mail: norolukac@gmail.com

MVDr. Rastislav Jurčík PhD. Institute of Nutrition, Animal Production Research Centre, Hlohovecka 2, Nitra, Slovakia, E-mail: jurcik@cvzv.sk

Ing. Monika Schneidgenová. Department of Animal Physiology, Slovak University of Agriculture, A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovakia, E-mail: monika.schneidgenova@uniag.sk



**MICROBIAL QUALITY OF HONEY MIXTURE WITH POLLEN**

*Vladimíra Kňazovická, Miroslava Kačániová, Mária Dovičičová, Martin Melich, Zuzana Barboráková, Miriam Kadási-Horáková, Ján Mareček*

**ABSTRACT**

The aim of this study was evaluation of microbial quality in raw materials (honey, pollen) and evaluation of microbial quality in honey mixture with pollen (2.91 % and 3.85 %) and also dynamics of microbial groups in honey mixtures with pollen after 14 days storage at the room temperature (approximately 25 °C) and in cold store (8 °C). We used dilution plating method for testing of samples. Detections of total plate microbial count (aerobic and anaerobic microorganisms), sporulating bacteria, coliform bacteria, *Bifidobacterium* sp., *Lactobacillus* sp. and microscopic fungi were performed. In general, counts of microorganisms decreased in honey mixture with pollen compared to raw pollen and these counts increased compared to natural honey. Total plate count was 5.37 log KTJ.g<sup>-1</sup> in pollen; 1.36 log KTJ.g<sup>-1</sup> in honey; 2.97 log KTJ.g<sup>-1</sup> in honey mixture with 2.91 % pollen and 2.04 log KTJ.g<sup>-1</sup> in honey mixture with 3.85 % pollen. Coliform bacteria were detected in pollen (1.77 log KTJ.g<sup>-1</sup>). Then, we found coliform bacteria in one sample of honey mixtures with pollen (2.91 %) – 1.00 log KTJ.g<sup>-1</sup>. *Bifidobacterium* species were detected only in raw pollen. We did not find *Lactobacillus* sp. in any of the samples. Microscopic fungi were detected on two cultivating media. Yeasts were present in pollen sample (average 5.39 log KTJ.g<sup>-1</sup>), honey mixture with 2.91 % pollen (average 2.51 log KTJ.g<sup>-1</sup>) and honey mixture with 3.85 % pollen (average 1.58 log KTJ.g<sup>-1</sup>). Filamentous microscopic fungi were detectable in pollen (average 3.38 log KTJ.g<sup>-1</sup>), in honey (only on one medium: 1.00 log KTJ.g<sup>-1</sup>), in honey mixture with 2.91 % pollen (average 1.15 log KTJ.g<sup>-1</sup>) and in honey mixture with 3.85 % pollen (1.71 %). Raw pollen contained microscopic fungi as *Absidia* sp., *Mucor* sp., *Alternaria* sp. and *Emericella nidulans*. Honey mixture with 2.91 % pollen after storage (14 days) contained lower microbial counts when compared with the sample analyzed at the beginning, beside sporulating bacteria and filamentous microscopic fungi in sample stored at 8 °C. We recorded growth of anaerobic microorganisms in honey mixture with 3.85 % pollen after storage (8 °C, 25 °C / 14 days).

**Keywords:** bee product, filamentous microscopic fungi, bacteria

**ÚVOD**

Peľ je potravinový doplnok zatiaľ známy najmä medzi včelármi a nadšencami včelích produktov. Včely potrebujú kvalitnú výživu najmä v období skorej jari. Využívajú peľové zásoby. Sú pre ne nevyhnutné ako zdroj bielkovín – peľ využívajú na prípravu kŕmnej kašičky pre plod a matku; na regeneráciu tkanív a opotrebovaných buniek všetkých včiel vo včelstve (Demeter a Haščík, 2008). Každé peľové zrno si v sebe nesie genetickú výbavu a zásobu všetkých potrebných energetických a výživných látok (Titěra, 2006). Užívanie peľu sa odporúča aj u ľudí. Podľa Bogdanova (2004), peľ má rôzne zdravie prospešné účinky a je tiež využívaný v apiterapii.

Peľ je tvorený sacharidmi (najmä polysacharidmi), sú hlavnou zložkou peľu, vrátane škrobu, fruktózy, glukózy a sacharózy; tiež obsahuje bielkoviny (najmä enzýmy) a aminokyseliny; tuková zložka v peľi pozostáva z rôznych lipidov, mastných kyselín a sterolov (Bogdanov, 2004). V bielkovinách peľu sa nachádzajú všetky esenciálne aminokyseliny pre včely i človeka a tiež vitamíny (najmä A, B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>3</sub>, B<sub>5</sub>, B<sub>6</sub>, B<sub>7</sub>, B<sub>9</sub>; v stopových množstvách B<sub>12</sub>, C, D, E, K) a minerálne látky, konkrétne draslík, fosfor, síra, horčík, meď, sodík, vápnik, zinok, železo a v stopových množstvách jód (Titěra, 2006).

Včely lietavky zbierajú peľ na kvetoch, spracujú ho pomocou sekréty čelustných žliaz a ukladajú do tzv. peľových košíčkov. Tieto peľové obnôžky nosia do úľa, kde ich včely mladušky navlhčia nektárom, uložia do buniek plástov, utlačia hlavou a zalejú medom. V uloženom peľi prebieha mliečne kvasenie, vzniká

kyselina mliečna, ktorá peľ konzervuje (Demeter a Haščík, 2008).

Podľa spôsobu získavania rozoznávame obnôžkový a plástový peľ; podľa spôsobu spracovania mrazený, sušený, lyofilizovaný a fermentovaný peľ. Jedným zo spôsobov spracovania čerstvého obnôžkového peľu je jeho pridanie priamo do medu.

Typickými fyzikálno-chemickými vlastnosťami medu sú vysoký obsah sacharidov (následkom je vysoký osmotický tlak), obsah kyselín a následne kyslosť prostredia (nízke pH), nízky obsah vody, nízka vodná aktivita a obsah rôznych komponentov, pôvodom z rastlín a včiel (Cooper, 2005). Kombinácia týchto parametrov je významným aspektom, dôsledkom čoho si med vo všeobecnosti udržuje výbornú mikrobiologickú kvalitu. Prostredie je bariérou pre mikroorganizmy. Avšak odchýlka od prípustnej hodnoty jedného alebo viacerých fyzikálno-chemických vlastností sa môže negatívne prejaviť v mikrobiologickej kvalite produktu. Aj z tohto dôvodu, je dôležité opatrne zaobchádzať s medom. Pri vmiešaní peľu je nutné zhodnotiť čistotu a množstvo peľu, ktorý pridávame.

Všetky mikroorganizmy potrebujú k svojmu životu zdroje uhlíka, dusíka, minerálnych látok a vodu, pričom obmedzenie zdroja nevyhnutnej živiny vedie k zmene mikrobiálneho metabolizmu (Cooper, 2005). Z toho vyplýva, že v mede sa nachádzajú mikroorganizmy, ktorým med poskytuje dostatok živín k prežitiu, resp. tie, ktoré svoj metabolizmus dokážu prispôsobiť daným podmienkam. Pre med je charakteristický nízky počet a limitovaná rôznorodosť mikroorganizmov (Iurlina a Fritz, 2005). Podľa Snowdon a Cliver (1996) častou súčasťou medu sú spóry *Bacillus* sp., *Clostridium* sp. a mikroskopické huby

(kvasinky a vláknité mikroskopické huby), pri ktorých bol zistený rast v mede; rast baktérií je nepravdepodobný.

V súčasnosti, zvýšený dôraz je kladený na stanovenie mikrobiologických húb, pretože niektoré sú potenciálnymi producentmi mykotoxínov, ktoré môžu kontaminovať potraviny a poškodiť zdravie konzumenta (Kačániová et al., 2009). Mykologický rozbor peľu je pravdepodobne potrebný ešte vo väčšej miere ako v prípade medu. V peľu sa nesmú nachádzať žiadne cudzorodé častice, nesmie byť zlepený a napadnutý vláknitými mikroskopickými hubami, kvôli riziku prítomnosti aflatoxínov (Titěra, 2006), čo sa dá potvrdiť alebo vyvrátiť mykologickým rozborom, resp. detekciou produkovaných metabolitov.

Podľa Bogdanova (2004) deštrukcia mikroorganizmov peľu žiarením, ozónovým spracovaním alebo chemickými prostriedkami (fumigáciou) nie je potrebná a vedie k hromadeniu toxických rezíduí.

Cieľom práce bolo hodnotenie mikrobiologickej kvality základných surovín určených na zmiešanie (medu, peľu), hodnotenie mikrobiologickej kvality vzoriek medu s prídavkom peľu v dvoch koncentráciách a hodnotenie dynamiky mikrobiálnych spoločenstiev po 14-dňovom skladovaní pri izbovej a chladničkej teplote.

## MATERIÁL A METÓDY

Pre účely tejto práce sme analyzovali:

- základné suroviny pre zmes:
  - peľ (čerstvý),
  - med (repkový, pastovaný);
- med s prídavkom peľu – v dvoch koncentráciách:
  - 1,5 kg peľu na 50 kg medu, teda 2,91 %,
  - 2 kg peľu na 50 kg medu, teda 3,85 %;
- med s prídavkom peľu po 14 dňoch skladovania pri izbovej teplote (cca 25 °C) a v chladničke (cca 8 °C).

Tabuľka 1 Charakteristiky metódy použitej na stanovenie uvedených mikrobiálnych skupín

Skupina mikroorganizmov	Podmienky očkovania			Podmienky kultivácie		
	riedenia	platňa	spôsob	O <sub>2</sub>	teplota	čas
CP mikroorganizmov	10 <sup>-1</sup> - 10 <sup>-4</sup>	GTK	zaliatie	aeróbne	30 °C	48-72 h
CP anaeróbných mikroorganizmov		MPA / W	zaliatie	anaeróbne	25 °C	48-72 h
CP sporulujúcich baktérií		AnA	zaliatie	aeróbne	37 °C	48-72 h
Koliformné baktérie		VČŽL	na povrch	aeróbne	37 °C	24 h
<i>Bifidobacterium</i> sp.		mod W+SP	zaliatie	anaeróbne	37 °C	48-72 h
<i>Lactobacillus</i> sp.		Rog	zaliatie	aeróbne	37 °C	48-72 h
Mikroskopické huby		CD	zaliatie	aeróbne	25 °C	5-7 dní
		SA				

CP – celkový počet; GTK – Agar s glukózou, tryptónom a kvasničným extraktom, VČŽL – Agar s violetou kryštálovou, červeňou neutrálnou, žltými soľami a laktózou (IMUNA, Šarišské Michaľany); MPA – Nutrient agar no. 2 (mäso-peptónový agar), W – Wilkins Chalgren anaerobic agar, mod W+SP – Wilkins Chalgren anaerobic agar so sójovým peptónom modifikovaný podľa Rada a kol. (1999), AnA – Anaerobic agar, Rog – Rogosa SL agar, CD – Czapek Dox agar modifik. SA – Malt agar (Sladinový agar) (Biomark laboratories, Pune)

Všetky analyzované vzorky pochádzajú z včelej farmy na západnom Slovensku, z roku 2010. Analýza každej vzorky pozostávala z určenia celkového počtu mikroorganizmov (aeróbných aj anaeróbných), celkového počtu sporulujúcich baktérií, koliformných baktérií, baktérií rodov *Bifidobacterium* a *Lactobacillus* a mikroskopických húb. Postupovali sme podľa platných

Slovenských technických noriem (STN): STN EN ISO 4833 (1997) – celkový počet mikroorganizmov; STN ISO 4832 (1997) – koliformné baktérie; STN ISO 7954 (1997) – mikroskopické huby.

Na mikrobiologickú analýzu vzoriek sme použili platňovú zriedňovaciu metódu. Základné riedenie (10<sup>-1</sup>) sme získali 30-minútovou homegenizáciou 5 g vzorky a 45 ml fyziologického roztoku (0,85 % NaCl). Ďalšie riedenia sme pripravili podľa zásad desiatkového systému riedenia. Očkovali sme riedenia 10<sup>-1</sup> až 10<sup>-4</sup> pre všetky analyzované mikrobiálne skupiny, vždy 1 ml, v dvojnásobnom opakovaní. Potom sme mikroorganizmy kultivovali za presne stanovených podmienok. Charakteristika jednotlivých častí metódy je uvedená v tabuľke 1.

Pred analýzou na počet sporulujúcich baktérií sme medu podrobili teplotnému šoku pri teplote 80 °C počas 10 min. Anaeróbne prostredie sme vytvorili kultiváciou v anaerokultoch (Merck, Darmstadt).

Po kultivácii sme spočítali kolónie na platniach. Pre výpočet KTJ.g<sup>-1</sup> sme použili vzorec (pre počty na miskách z dvoch za sebou idúcich riedení):

$$N = \sum C / [(n_1 + 0,1n_2) \cdot d], \text{ kde:}$$

$\sum C$  – súčet charakteristických kolónií na platniach

$n_1$  – počet misiek z prvého riedenia použitého na výpočet

$n_2$  – počet misiek z druhého riedenia použitého na výpočet

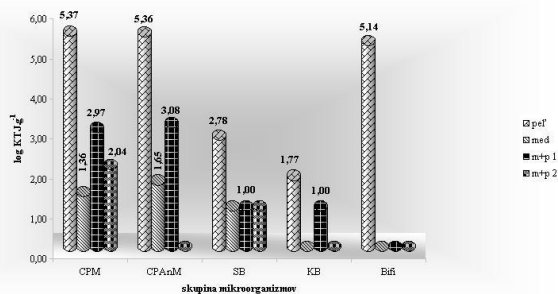
$d$  – riediaci faktor zhodný s prvým použitým riedením

Ak boli kolónie prítomné len na miskách prvého použitého riedenia (10<sup>-1</sup>), hodnotu KTJ.g<sup>-1</sup> sme určili podielom súčtu kolónií a počtu misiek (na ktorých boli kultivované) a následným vynásobením prevrátenou hodnotou zriedenia (teda 10). Všetky hodnoty sme zlogaritovali a výsledky uviedli v log KTJ.g<sup>-1</sup>.

Na zachytenie širšieho spektra mikroskopických húb sme použili 2 živné média – Czapek Dox agar a Sladinový agar. Počty sme vyjadrili osobitne pre kvasinky a osobitne pre vláknité mikroskopické huby, ktoré sme zatriedili do rodov, resp. druhov podľa De Hoog et al. (2000). Ako doplnkový test pri vzorke peľu sme použili kultiváciu na AFPA [selektívne médium pre *Aspergillus flavus/A. parasiticus*; STN 56 0087 ISO 7954 (2010)], na ktorom aspergily, schopné produkovať aflatoxín, majú spodinu kolónie sfarbenú do oranžova.

Detekčný limit uvedenej metódy je 10 KTJ.g<sup>-1</sup>, teda 1,00 log KTJ.g<sup>-1</sup>.

## VÝSLEDKY A DISKUSIA



Obrázok 1 Mikrobiologická kvalita medu, peľu a ich zmesí

m+p 1 – med s prídavkom peľu (2,91 %), m+p 2 – med s prídavkom peľu (3,85 %); CPM – celkový počet mikroorganizmov, CPAnM – celkový počet anaeróbných mikroorganizmov, SB – sporulujúce baktérie, KB – koliformné baktérie, Bifi – *Bifidobacterium* sp. a príbuzné baktérie; KTJ – kolóniu tvoriaca jednotka;

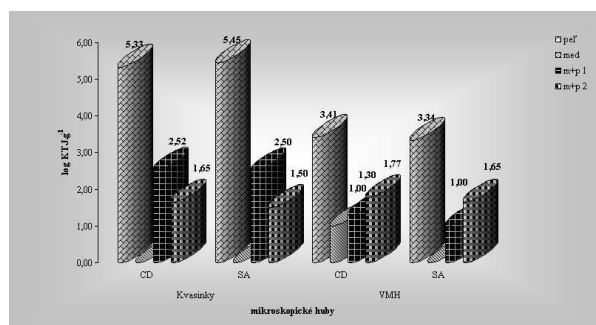
Na obrázku 1 sú graficky znázornené hodnoty celkového počtu mikroorganizmov (CPM), celkového počtu anaeróbných mikroorganizmov (CPAnM), počtu sporulujúcich baktérií, koliformných baktérií, bifidobaktérií (*Bifidobacterium* sp.) a príbuzných organizmov vo vzorke peľu medu a ich zmesí v dvoch koncentráciách. V nasledovnom texte sú uvedené hodnoty v log KTJ.g<sup>-1</sup> vzorky. Prepočty rozdielov v počte mikroorganizmov pôvodných surovín a ich zmesí sú uvedené aj pre KTJ.g<sup>-1</sup>.

Vo vzorke medu s prídavkom 2,91 % peľu (v porovnaní s peľom ako surovinou) sa počet mikroorganizmov znížil približne 221 krát, čo sa potvrdilo poklesom o 2,40 log KTJ.g<sup>-1</sup> (t. j. 251 krát) pri CPM a poklesom o 2,28 log KTJ.g<sup>-1</sup> (191 x) pri CPAnM. Z toho vyplýva, že pridaním peľu do medu došlo k prečisteniu peľu z hľadiska výskytu mikroorganizmov. Počet mikroorganizmov medu sa v porovnaní s pôvodným stavom zvýšil približne 34 krát – CPM sa zvýšil o 1,61 log KTJ.g<sup>-1</sup> (41 x) a CPAnM sa zvýšil o 1,43 log KTJ.g<sup>-1</sup> (27 x). Počet sporulujúcich baktérií v zmesi klesol o 1,78 log KTJ.g<sup>-1</sup> (60 x) v porovnaní s pôvodnou vzorkou peľu, pričom nedošlo k zvýšeniu sporulujúcich baktérií v mede. V peľi sa nachádzali koliformné baktérie, ktorých počet sa pridaním do medu znížil o 1,78 log KTJ.g<sup>-1</sup> (60 x). V pôvodnej vzorke medu sme nezistili prítomnosť koliformných baktérií. Po pridaní peľu boli zistiteľné použitou metódou. Baktérie rodu *Bifidobacterium* a príbuzné organizmy sa v peľi nachádzali, ale prenos do medu ich zničil. Prítomnosť baktérií rodu *Lactobacillus* sme nezaznamenali v žiadnej zo sledovaných vzoriek. Podľa **Olofsson a Vásquez (2008)** *Bifidobacterium* sp. a *Lactobacillus* sp., baktérie produkujúce kyselinu mliečnu, zistené v niekoľkých vzorkách čerstvo vytočeného medu, pochádzajú z medového včaku včely medonosnej a nie z rastlín, ako sa predpokladalo.

Vo vzorke medu s prídavkom 3,85 % peľu sme zistili pokles CPM o 3,33 log KTJ.g<sup>-1</sup> (2137 x) v porovnaní so vzorkou peľu, pričom v porovnaní s pôvodnou vzorkou medu sa CPM zvýšil o 0,68 log KTJ.g<sup>-1</sup> (5 x). Počet sporulujúcich baktérií klesol o 1,78 log KTJ.g<sup>-1</sup> (60 x) v porovnaní s pôvodnou vzorkou peľu, pričom nedošlo k zvýšeniu sporulujúcich baktérií v mede, rovnako ako v predchádzajúcom prípade. CPAnM, počet koliformných baktérií a bifidobaktérií bol vo vzorke pod zistiteľný limit.

**Kačániová et al. (2008)** analyzovali 20 vzoriek peľu priamo od včelárov. Zistili priemerne 2,40 log KTJ.g<sup>-1</sup> mezofilných aeróbných sporulujúcich mikroorganizmov; 1,70 log KTJ.g<sup>-1</sup> mezofilných anaeróbných mikroorganizmov; 1,60 log KTJ.g<sup>-1</sup> koliformných baktérií a 2,40 log KTJ.g<sup>-1</sup> mikroskopických húb. Medzi najviac zastúpené vlákňité mikroskopické huby patrili *Alternaria alternata* (34,6 %), *Cladosporium cladosporioides* (25 %) a *Penicillium* sp. (6,4 %). Menej frekvencovanými boli *Aspergillus* sp., *Fusarium* sp., *Mucor racemosus*, *Mycelia sterilia*, *Rhizopus stolonifer* a *Trichoderma* sp.. Zistili sme podobné hodnoty počtu mikroorganizmov v peľi, okrem počtu anaeróbných mikroorganizmov, ktorého hodnota bola výrazne vyššia.

Obrázok 2 predstavuje grafické znázornenie kvantitatívneho hodnotenia mikroskopických húb všetkých štyroch vzoriek, na dvoch živných médiách (Czapek Dox agar a Sladinový agar), použitých na zachytenie rozsiahlejšieho spektra mikroskopických húb. Keďže podobnosť hodnôt pri oboch médiách je zreteľná, v ďalšom texte uvádzame priemerné hodnoty. V peľi sa nachádzalo približne 5,39 log KTJ.g<sup>-1</sup> kvasiniek, v mede sme ich prítomnosť nezistili. Vo vzorke medu s 2,91 % peľu nastal pokles počtu kvasiniek o 2,88 log KTJ.g<sup>-1</sup> (759 x), vo vzorke medu s 3,85 % peľu bol zaznamenaný dokonca pokles o 3,81 log KTJ.g<sup>-1</sup> (6457 x). Vlákňité mikroskopické huby boli súčasťou peľu v počte 3,38 log KTJ.g<sup>-1</sup>, v mede sa potvrdili len na jednom z použitých médií v počte 1,00 log KTJ.g<sup>-1</sup>.



**Obrázok 2** Kvantitatívne zastúpenie mikroskopických húb v mede, peľi a ich zmesiach

m+p 1 – med s prídavkom peľu (2,91 %), m+p 2 – med s prídavkom peľu (3,85 %); CD – Czapek Dox agar, SA – Sladinový agar, VMH – vlákňité mikroskopické huby; KTJ – kolóniu tvoriaca jednotka;

**Martins et al. (2003)** sledovali 80 vzoriek portugalského kvetového medu. Prítomnosť mikroskopických húb zaznamenali v 88,8 % vzoriek (71 z 80), pričom 25 z týchto vzoriek obsahovalo len kvasinky a 46 obsahovalo kvasinky aj vlákňité mikroskopické huby, konkrétne *Aspergillus candidus*, *A. flavus*, *A. fumigatus*, *A. niger*, *Mucor* sp. a *Penicillium* sp. Úroveň kontaminácie vlákňitými mikroskopickými hubami bola 10<sup>1</sup> až 10<sup>2</sup> KTJ.g<sup>-1</sup>. Úroveň kontaminácie kvasinkami (*Candida humicola* a *Saccharomyces* sp.) bola vyššia – 10<sup>4</sup> až 10<sup>5</sup> KTJ.g<sup>-1</sup>.

Podľa **Finola et al. (2007)** mikroskopické huby môžu spôsobiť kvasenie medu, keď je v ňom vysoký obsah vody (nad 21 %) a existuje priama úmernosť počtu mikroskopických húb v mede a hodnoty vodnej aktivity. Kvasenie je nezvratný jav, ktorý môže v mede prebiehať najmä počas skladovania a spôsobuje významné ekonomické straty (**Carvalho et al., 2005**).

Spektrum vlákňitých mikroskopických húb, ktoré boli súčasťou peľu bolo relatívne široké, ich prehľad je uvedený v tabuľke 2. V mede (bez pridaného peľu) sa nachádzali *Penicillium* sp. a *Aspergillus fumigatus*.

**González et al. (2005)** sledovali mikroskopické huby, prirodzene sa vyskytujúce v peľi – 87 vzoriek pochádzalo zo Španielska a 3 vzorky z Argentíny. Zamerali sa na potenciálnych producentov mykotoxínov. Kvasinky a *Penicillium* sp. boli dominantnými hubami. Z mikroskopických húb potenciálne schopných produkcie mykotoxínov objavili *Penicillium verrucosum*, *Aspergillus niger* komplex, *Aspergillus carbonarius*, *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* a *Alternaria* sp. (veľmi často izolované).

Tabuľka 2 Vlákňité mikroskopické huby prítomné vo vzorke peľu

Vlákňité mikroskopické huby v peľi
<i>Absidia</i> sp.
<i>Alternaria</i> sp.
<i>Arthriniium</i> sp.
<i>Aspergillus</i> sp.
<i>Aspergillus</i> sekcia <i>Circumdati</i>
<i>Aspergillus flavus</i>
<i>Aspergillus fumigatus</i>
<i>Emericella</i> sp.
<i>Emericella nidulans</i>
<i>Eurotium</i> sp.
<i>Eurotium amstelodami</i>
<i>Mucor</i> sp.
<i>Penicillium</i> sp.

Doplňkovým testom vzorky peľu na AFPA (*Aspergillus flavus parasiticus* selektívnom médiu) sme zistili absenciu *Aspergillus* sp., schopných produkovať mykotoxíny - aflatoxíny. Avšak zistené izoláty zo sekcie *Circumdati* môžu byť potenciálnymi producentmi mykotoxínu ochratoxínu A (Frisvad et al., 2004), izoláty *A. flavus* slovenského pôvodu majú často potenciú produkovať mykotoxín kyselinu cyklopiazónovú (Tančinová et al., 2007, Labuda a Tančinová, 2006), druh *A. fumigatus* produkuje tremorgénne mykotoxíny (Samson et al., 2007) a *Emericella nidulans* je konštantným producentom mykotoxínu sterigmatocystínu (Frisvad et al., 2006). Posledné tri uvedené druhy sú tiež potenciálnymi patogénmi človeka v skupine BSL-2 (De Hoog et al., 2000).

Podľa Bogdanova (2004) je z hygienického hľadiska mikrobiologická bezpečnosť hlavným kritériom kvality a je dôležité kontrolovať mikrobiologickú kvalitu peľu, obzvlášť absenciu patogénnych baktérií a mikroskopických húb. Niektoré mikroorganizmy môžu produkovať enzýmy, antibiotiká, mykotoxíny a rastové látky (vitamíny, aminokyseliny), môžu sa zúčastňovať na metabolických premenách a potláčať konkurujúce mikroorganizmy (Goerzen, 1991).

Vo vzorke medu s 2,91 % peľu sa znížil počet vlákňitých mikroskopických húb o 2,23 log KTJ.g<sup>-1</sup> (170 x) a vo vzorke medu s 3,85 % peľu bol pokles o 1,67 log KTJ.g<sup>-1</sup> (47 x) v porovnaní s pôvodnou vzorkou peľu.

Vo všetkých sledovaných mikrobiálnych parametroch zmesi peľu v mede sme zistili pokles počtov v porovnaní s pôvodnou vzorkou peľu. Výraznejší pokles CPM, CPAnM, sporulujúcich baktérií, koliformných baktérií, bifidobaktérií a kvasiniek sa prejavil vo vzorke medu s prídavkom 3,85 % peľu. Pokles vlákňitých mikroskopických húb bol vyšší vo vzorke medu s prídavkom 2,91 % peľu.

Pôvodnou vzorkou na obrázku 3A je med s prídavkom 2,91 % peľu. Analýzou sme zistili absenciu koliformných baktérií, tak ako bifidobaktérií a príbuzných baktérií (avšak tie neprežili ani prenos

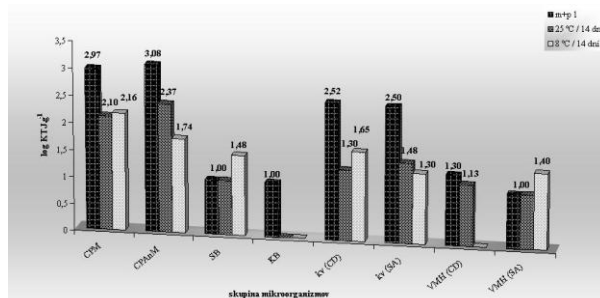
z peľu do medu) po 14 dňoch skladovania oboma spôsobmi. V znížení počtov ostatných mikrobiálnych skupín boli rozdiely.

Skladovaním pri izbovej teplote sa znížili počty všetkých sledovaných mikrobiálnych skupín porovnaním s pôvodnou vzorkou. Zaznamenali sme vyšší pokles CPM (o 0,87 log KTJ.g<sup>-1</sup>, teda 7 x), počtu kvasiniek (o 1,12 log KTJ.g<sup>-1</sup>, teda 13 x) a počtu vlákňitých mikroskopických húb (o 0,08 log KTJ.g<sup>-1</sup>, teda 1 x). CPAnM sa znížil po 14 dňoch o 0,71 log KTJ.g<sup>-1</sup>, 5 x. Počet sporulujúcich baktérií zostal na rovnakej úrovni.

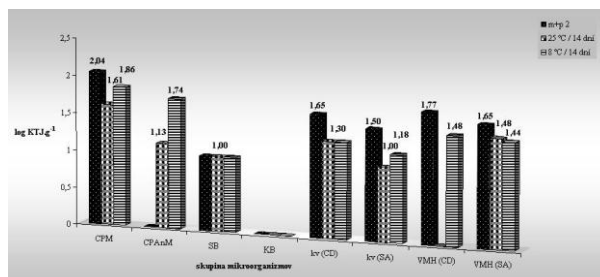
Skladovanie v chladničke viedlo k poklesu počtu mikroorganizmov, okrem vlákňitých mikroskopických húb (zачytených na jednom z dvoch použitých živných médií) a sporulujúcich baktérií. Počet vlákňitých mikroskopických húb sa zvýšil o 0,25 log KTJ.g<sup>-1</sup> - 2-násobne a počet sporulujúcich baktérií o 0,48 log KTJ.g<sup>-1</sup> - 3-násobne v porovnaní s pôvodnou vzorkou. V porovnaní so vzorkou skladovanou pri izbovej teplote sme zaznamenali vyšší pokles CPAnM - o 1,34 log KTJ.g<sup>-1</sup>, teda 22-násobne oproti pôvodnej vzorke. CPM sa znížil po 14 dňoch o 0,81 log KTJ.g<sup>-1</sup> (6x) a počet kvasiniek sa znížil o 1,03 log KTJ.g<sup>-1</sup> (11x).

Súhrnne, vyššie poklesy počtu mikroorganizmov boli zaznamenané v mede s prídavkom peľu (2,91 %) po 14 dňoch skladovania pri izbovej teplote. Skladovanie v chladničke viedlo k malému nárastu vlákňitých mikroskopických húb a sporulujúcich baktérií a tiež k výraznému poklesu CPAnM.

A



B



Obrázok 3 Dynamika mikrobiálnych spoločenstiev vo vzorkách medu s prídavkom peľu po 14 dňoch skladovania pri izbovej teplote a v chladničke

A – med s prídavkom peľu 1,5 kg / 50 kg – 2,91 %

B – med s prídavkom peľu 2 kg / 50 kg – 3,85 %

m+p 1 – med s prídavkom peľu (2,91 %), m+p 2 – med s prídavkom peľu (3,85 %);

CPM – celkový počet mikroorganizmov, CPAnM – celkový počet anaeróbných mikroorganizmov, SB – sporulujúce baktérie, KB – koliformné baktérie, kv (CD) – kvasinky, kultivované na Czapek Dox agare, kv (SA) – kvasinky, kultivované na Sladivom agare, VMH (CD) – vlákňité mikroskopické huby, kultivované na Czapek Dox agare, VMH (SA) – vlákňité mikroskopické huby, kultivované na Sladivom agare;

KTJ – kolónia tvoriaca jednotka;

Pôvodnou vzorkou na obrázku 3B je med s prídavkom 3,85 % peľu. Koliformné baktérie; bifidobaktérie a príbuzné baktérie sa nenachádzali vo vzorkách v zistiteľnom množstve v uvedenej zmesi ani na začiatku ani po 14 dňoch. Počet sporulujúcich baktérií sa udržal pri oboch spôsoboch skladovania rovnaký ako na začiatku ( $1,00 \log \text{KTJ.g}^{-1}$ ). Počet vláknitých mikroskopických húb sa znížil pri oboch spôsoboch skladovania 2-násobne. Skladovaním pri izbovej teplote klesol počet o  $0,23 \log \text{KTJ.g}^{-1}$ , pričom sme ich zachytili len na jednom z použitých živných médií a skladovaním v chladničke klesol ich počet priemerne o  $0,25 \log \text{KTJ.g}^{-1}$ . CPAnM v pôvodnej vzorke bol pod detekčným limitom metódy. Analýzou po 14 dňoch skladovania oboma spôsobmi sme zistili, že anaeróbne mikroorganizmy sa nachádzali vo vzorkách, bol zaznamenaný nárast na hodnotu  $1,13 \log \text{KTJ.g}^{-1}$  vo vzorke skladovanej pri izbovej teplote, čo predstavuje minimálne zdvojnásobený nárast. Vo vzorke, skladovanej v chladničke, bol CPAnM  $1,74 \log \text{KTJ.g}^{-1}$ , čo predstavuje minimálne 6-násobný nárast. CPM, tak ako aj počet kvasiniek klesli po skladovaní pri izbovej teplote o  $0,43 \log \text{KTJ.g}^{-1}$ , teda 3-násobne. Po skladovaní v chladničke klesli tieto počty 2-násobne, CPM klesol o  $0,18 \log \text{KTJ.g}^{-1}$  a kvasinky o  $0,34 \log \text{KTJ.g}^{-1}$ .

Súhrnne, rozdiely mikrobiálnych ukazovateľov vzorky medu s prídavkom 3,85 % peľu po 14 dňoch skladovania boli veľmi malé. Vyšší pokles CPM a kvasiniek a nižší nárast CPAnM sme zaznamenali vo vzorke skladovanej pri izbovej teplote.

## ZÁVER

Biodiverzitu, ako aj kvantitu mikroorganizmov v mede považujeme za premenlivé údaje, ktoré sú špecifické pre konkrétny analyzovaný med. Boli formované celým radom faktorov počas produkcie a spracovania medu. Pokiaľ med nebol vystavený extrémnym podmienkam, dochádza v ňom k rôznym fyzikálno-chemickým procesom a prirodzene sa v ňom nachádzajú niektoré mikroorganizmy.

V peľi sa, vo všeobecnosti, nachádza viac mikroorganizmov v porovnaní s medom. Z výsledkov analýz v našich experimentoch vyplýva, že je ich asi 1000-násobne viac v peľi ako v mede. Mikroorganizmy nachádzajúce sa v peľi sú veľmi rôznorodé. Je to dôsledok variability zdrojov, z ktorých pochádzajú. Taktiež ich fyzikálno-chemické charakteristiky sú iné ako pri mede a prichádzajú do styku s viacerými zdrojmi kontaminácie – pôdou, kvetmi, povrchom organizmu včiel, prachom a úľovým prostredím.

Peľ je veľmi cenným výživovým doplnkom a prirodzený spôsob ako ho uchovať v stave prijateľnom a stráviteľnom pre človeka je pridať ho do medu. Keď peľ pridáme do medu, zvýšime aj počet mikroorganizmov v zmesi medu s peľom v porovnaní s pôvodným medom a táto jedinečná zmes potrebuje určitý čas, aby sa s nimi vysporiadala. Cieľom nie je zničiť všetky mikroorganizmy, ale dosiahnuť rovnovážny stav, ktorý zabezpečí uchovanie produktu z hľadiska zdravotnej bezpečnosti a zároveň výživovej hodnoty. Výsledky analýz poukazujú na vhodne zvolené koncentrácie peľu v mede – 2,91 % (1,5 kg / 50 kg)

a 3,85 % (2 kg / 50 kg). Po primiešaní peľu do medu klesli počty mikroorganizmov v porovnaní s peľom a mierne stúpili v porovnaní s medom. Pričom vo vzorke s koncentráciou peľu 3,85 % bol pokles mikroorganizmov zreteľnejší, okrem vláknitých mikroskopických húb, ktorých počet viac klesol vo vzorke s 2,91 % peľu.

Už po 14-dňovom skladovaní sme zaznamenali poklesy počtu mikroorganizmov v porovnaní s výsledkami na začiatku pokusu. Je zaujímavé, že výraznejšie poklesy boli vo vzorke s koncentráciou peľu 2,91 %. Preto je možné, že existujú mechanizmy, ktoré po určitom čase skladovania vyrovnajú počty mikroorganizmov, nakoľko v sledovaných koncentráciách peľu v mede je rozdiel 0,94 %.

Z hľadiska spôsobu skladovania, výraznejší pokles počtu mikroorganizmov po 14 dňoch bol vo vzorkách, skladovaných pri izbovej teplote. V niektorých vzorkách skladovaných v chladničke sa mierne zvýšil počet anaeróbnych mikroorganizmov, vláknitých mikroskopických húb a sporulujúcich baktérií po 14 dňoch.

Uvedené výsledky sú čiastkové, v analýzach vzoriek skladovaných pri izbovej teplote a v chladničke pokračujeme.

## LITERATÚRA

BOGDANOV, S. 2004. Quality and Standards of Pollen and Beeswax. In *Apiacta*, vol. 38, 2004, no. 11, p. 334-341.

CARVALHO, C. M., ROCHA, A., ESTEVINHO, M. L. F., CHOUPINA, A. 2005. Identification of honey yeasts species based on RFLP analysis of the its region. In *Ciencia y Tecnología Alimentaria*, vol. 5, 2005, no. 1, p. 11-17. ISSN 1135-8122.

COOPER, R. 2005. *Chapter 2 – The antimicrobial activity of honey*. [online]. [cit. 2009-01-16]. Dostupné na internete: <<http://www.medicalhoney.com>>.

DE HOOG, G. S., GUARRO, J., GENÉ, J., FIGUERAS, M. J. 2000. *Atlas of clinical fungi*. 2<sup>nd</sup> edition. Utrecht : Centraalbureau voor Schimmelcultures, 2000. 1126 p. ISBN 90-70351-43-9.

DEMETER, Š., HAŠČÍK, J. 2008. *Včelie produkty*. 3. zväzok v edícii Slovenská včela. Nitra : Polymedia, 2008. 60 p. ISBN 978-80-969977-0-1.

FINOLA, M. S., LASAGNO, M. C., MARIOLI, J. M. 2007. Microbial and chemical characterization of honeys from central Argentina. In *Food Chemistry*, vol. 100, 2007, issue 4, p. 1649-1953.

FRISVAD, J. C., FRANK, J. M., HOUBRAKEN, J. A. M. P., KUIJPERS, A. F. A., SAMSON, R. A. 2004. New ochratoxin A producing species of *Aspergillus* section *Circumdati*. In *Studies in Mycology*, vol. 50, 2004, p. 23-43.

FRISVAD, J. C., THRANE U., SAMSON, R. A., PITT, J. I. 2006. Important mycotoxins and the fungi which produce them. In HOCKING, A. D., PITT, J., SAMSON, R. A., THRANE, U. 2006. *Advances in Food Mycology*. Berlin : Springer, vol. 571, 2006, p. 1-131.

GOERZEN, D. W. 1991. Microflora associated with the alfalfa leafcutting bee, *Megachile rotundata* (Fab) (Hymenoptera: Megachilidae) in Saskatchewan, Canada. In *Apidologie*, vol. 22, 1991, no. 5, p. 553-561.

GONZÁLEZ, G., HINOJO, M. J., MATEO, R., MEDINA, A., JIMÉNEZ, M. 2005. Occurrence of mycotoxin producing fungi in bee pollen. In *International Journal of Food Microbiology*, vol. 105, 2005, no. 1, p. 1-9.

IURLINA, M. O., FRITZ, R. 2005. Characterization of microorganisms in Argentinean honeys from different sources.

In *International Journal of Food Microbiology*, vol. 105, 2005, no. 3, p. 297-304. ISSN 0168-1605.

KAČÁNIOVÁ, M., KŇAZOVICKÁ, V., NÔŽKOVÁ, J., ŠRAMKOVÁ, K. 2008. Microbiology of honeybee collected pollen. In *Dovkillja i zdorovja ljudini*. Užgorod : Vidavnicтво UžNU (Goverla), 2008, p. 357-360.

KAČÁNIOVÁ, M., PAVLIČOVÁ, S., HAŠČÍK, P., KOCIUBINSKI, G., KŇAZOVICKÁ, V., SUDZINA, M., SUDZINOVÁ, J., FIKSELOVÁ, M. 2009. Microbial communities in bees, pollen and honey from Slovakia. In *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*, vol. 56, 2009, no. 3, p. 285-295, ISSN 1217-8950.

LABUDA, R., TANČINOVÁ, D. 2006. Fungi recovered from slovakian poultry feed mixtures and their toxinogenity. In *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, vol. 13, 2006, p. 193-200.

MARTINS, H. A., MARTINS, M. L., BERNARDO, F. M. A. 2003. *Bacilaceae* spores, fungi and aflatoxins determination in honey. In *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*, vol. 98, 2003, p.85-88.

OLOFSSON, T. C., VÁSQUEZ, A. 2008. Detection and Identification of a Novel Lactic Acid Bacterial Flora Within the Honey Stomach of the Honeybee *Apis mellifera*. In *Current Microbiology*, vol. 57, 2008, no. 4, p. 356-363.

RADA, V., SIROTEK, K., PETR, J. 1999. Evaluation of Selective Media for Bifidobacteria in Poultry and Rabbit Caecal Samples. In *Journal of Veterinary Medicine, series B*, vol. 46, 1999, issue 6, p. 369-373, ISSN 0931-1793.

SAMSON, R. A., HONG, S., PETERSON, S. W., FRISVAD, J. C., VARGA, J. 2007. Polyphasic taxonomy of *Aspergillus* section *Fumigati* and its teleomorph *Neosartorya*. In *Studies in Mycology*, vol. 59, 2007, p. 147-203.

SNOWDON, J. A., CLIVER, D. O. 1996. Microorganisms in honey. In *International Journal of Food Microbiology*, vol. 31, 1996, issue 1-3, p. 1-26.

STN ISO 4832 Mikrobiológia – M4: 1997. *Všeobecné pokyny na stanovenie počtu koliformných baktérií. Metóda počítania kolónii v potravinách a krmivách.*

STN EN ISO 4833 Mikrobiológia – M1: 1997. *Všeobecné pokyny na stanovenie celkového počtu mikroorganizmov metódou počítania kolónii v potravinách a krmivách.*

STN ISO 7954 Mikrobiológia – M10: 1997. *Všeobecné pokyny na stanovenie počtu kvasiniek a plesní metódou počítania kolónii v potravinách a krmivách.*

STN 56 0087 (ISO 7954) R – 12: 2010. *Dôkaz potenciálnych toxínogénnych húb rodov Aspergillus a Penicillium.*

TANČINOVÁ, D., DOVIČIČOVÁ, M., LABUDA, R. 2007. *Aspergillus* sekcia *Flavi-* potenciálny producent

mykotoxínov. In *Zborník z medzinárodnej konferencie Rizikové faktory potravinového reťazca*. Nitra : Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre, 2007, p. 219-223.

TITĚRA, D. 2006. *Včelí produkty mýtů zbavené – med, vosk, pyl, mateří kašička, propolis, včelí jed*. 1. vydání. Praha : Nakladatelství Brázda, s. r. o., 2006. 176 p. ISBN 80-209-0347-X.

### Acknowledgments:

This work was supported by grants VEGA 1/0372/09 and KEGA 430-014SPU-4/2010.

### Contact address:

Ing. Vladimíra Kňazovická, Department of Microbiology, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Slovak University of Agriculture in Nitra, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovakia, Phone: +421376415812, E-mail: vladimira.knazovicka@uniag.sk

doc. Ing. Miroslava Kačániová, PhD., Department of Microbiology, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Slovak University of Agriculture in Nitra, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovakia, Phone: +421376414494, E-mail: miroslava.kacaniova@uniag.sk

Ing. Mária Dovičičová, PhD., Department of Microbiology, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Slovak University of Agriculture in Nitra, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovakia, E-mail: mddmfbp@gmail.com

Ing. Martin Melich, Department of Microbiology, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Slovak University of Agriculture in Nitra, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovakia, Phone: +421376415821, E-mail: matko7903@gmail.com

Ing. Miriam Kadási-Horáková, PhD. Department of Microbiology, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Slovak University of Agriculture in Nitra, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovakia, Phone: +421376415813, E-mail: mirka.kadasihorakova@gmail.com

Ing. Zuzana Barboráková, Department of Microbiology, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Slovak University of Agriculture in Nitra, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovakia, Phone: +42137 6415812, E-mail: zuzana.barborakova@gmail.com

Ing. Ján Mareček, PhD., Department of Plant Processing and Storage, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Slovak University of Agriculture in Nitra, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovakia, Phone: +421376414379, E-mail: jan.marecek@uniag.sk



## PERCEPTION OF BIO-FOOD LABELING BY CONSUMERS IN SLOVAKIA

*Dagmar Kozelová, Peter Zajác, Eva Matejková, Lucia Zeleňáková, Eubomír Lopašovský, Ladislav Mura, Jozef Čapla, Vladimír Vietoris*

### ABSTRACT

The paper presents an overview of the present perception of bio-food labeling by consumers in Slovakia. Analyses were realized by the questionnaire survey organized in the period December 2009 to January 2010. In the survey, 388 respondents were interviewed. From the methodological aspect, basic approaches of descriptive statistics have been used, as well as methods of association measurement. The test of robustness tested Chi-Square statistic. The robustness have been judged based on the p-values. Correlations have been tested through the Contingency coefficient and Cramer's V coefficient. The survey showed that dependency knowledge of logos was confirmed in terms of knowledge of bio-food, education, type of employment, study at FBP faculty and in terms of choice of organic foods by manufacturers. Students of FBP knows more bio-food logos than other respondents. The second highest dependency was confirmed within selection of bio-food produced individual manufacturers.

**Keywords:** bio-food, labeling, consumer, Chi-Square test of Independence, Contingency coefficient and Cramer's V coefficient

### ÚVOD

**Biopotraviny** sú potraviny vyrobené len zo surovín pochádzajúcich z ekologickej poľnohospodárskej výroby, ktorou sa rozumie taká výroba rastlín, v ktorej sa používajú osobitné oševné postupy, zelené hnojenie, hnojenie organickými hnojivami, mechanické a biologické metódy na ochranu rastlín, ako aj chov zvierat, pre ktoré sa používajú výlučne krmivá pochádzajúce z ekologickej rastlinnej výroby a ktorým sa súčasne venuje osobitná veterinárna starostlivosť.

Pre zvýšenie konzumácie biopotravín musia byť splnené tri podmienky. Prvou podmienkou je vysoká úroveň povedomia spotrebiteľov o životnom prostredí a benefite konzumácie biopotravín, pričom spotrebiteľ musí mať tieto informácie ešte pred tým, než biopotraviny začne kupovať. Druhou podmienkou je ochota zaplatiť za predávanú biopotravinu vyššiu cenu, než je cena bežných potravín. Treťou podmienkou je, že spotrebiteľ musí mať dostatočné a dôveryhodné informácie o tom, že konzumuje biopotraviny (Carter, 2007; Jordan et al., 2004; Gertz, 2005). Jasné označenie biopotravín špecifickým logom predstavuje účinný spôsob poskytovania ľahko dostupných informácií spotrebiteľom o konzumácii špecifických potravín (Lohr, 1998). Takéto označenie poskytne spotrebiteľovi informácie o tom, že konzumuje potraviny šetrné k životnému prostrediu, slúži na odlišenie biopotravín od ostatných potravín a zabezpečí spotrebiteľom, že výrobok je vyrobený v súlade s legislatívou a predpismi. Označovaniu biopotravín sa venujú mnohé štúdie (Nilsson et al 2004; Boström, 2006; Boström a Klintman, 2008). Pomerne malá pozornosť sa však venuje problematike poznania označovania biopotravín spotrebiteľmi, preto z hľadiska zvýšenia ich informovanosti je potrebné zapojiť viaceré zainteresované organizácie. Štát môže v tomto smere zohrať významnú úlohu (Boström a Klintman, 2006). Úloha mimovládnych organizácií a súkromných organizácií je tiež veľmi dôležitá. V štúdiách publikovaných autormi Gertz (2005) a Ward et al. (2004) boli spotrebiteľia požiadaní o zodpovedanie viacerých otázok, pričom ich hlavným cieľom bolo zistiť, či by certifikáciu a označovanie biopotravín mala

vykonávať štátna alebo súkromná organizácia. Z týchto štúdií vyplynulo, že spotrebiteľia dávajú prednosť environmentálnym alebo mimovládnym organizáciám pred štátnymi. Podľa Jordana et al. (2005) a Boströma a Klintmana (2008) je potrebné pre zvýšenie dôvery spotrebiteľa zabezpečiť certifikáciu biopotravín nezávislou treťou stranou, ktorá by mala vykonávať aj audity, či výrobcovia vyrábajú tieto potraviny v súlade s predpismi a legislatívou.

Táto tretia strana môže byť štátna alebo súkromná organizácia. V mnohých prípadoch štát autorizuje štátnu organizáciu, ktorá sama zabezpečuje výkon certifikácie výrobkov a výrobcov, výkon auditov a pridelenia značiek. V niektorých prípadoch štátom autorizovaná organizácia vyberá a schvaľuje súkromné subjekty, ktoré za ňu vykonávajú tieto činnosti, pričom sama dohliada nad dodržiavaním legislatívnych a normatívnych požiadaviek (Hysing, 2009).

Podľa Ibaneza a Grolleaua (2008) jediný spôsob ako informovať spotrebiteľov o environmentálnej kvalite výrobku je označiť výrobky environmentálnou značkou.

Uplatňovaním tzv. „eko-označovania“ v potravinárskej praxi a skúmaním jeho vplyvu na spotrebiteľov sa zaoberal aj Mason (2010).

Logo platné od 1. júla 2010



Logo platné do 1. júla 2010



Obrázok 1 Logá EÚ pre označenie biopotravín

- Európska Komisia pripravila nové nariadenie, ktorým sa ku dňu 30. júna 2010 zruší v súčasnosti platné logo EÚ pre ekologickú poľnohospodársku výrobu.
- Od 1. júla 2010 sa produkty z ekologickej poľnohospodárskej výroby (nazývané aj bioprodukty,

medzi ktoré patria aj biopotraviny) budú označovať po novom.

- Národné a súkromné logá sa môžu používať pri označovaní, prezentácii a reklame produktov, ktoré spĺňajú požiadavky stanovené v nariadení ES 834/2007.

Slovenské logo

Logo SK certifikačného orgánu



**Obrázok 2 Slovenské logo pre produkty ekologického poľnohospodárstva a logo certifikačného orgánu certifikujúceho produkty ekologického poľnohospodárstva**

Každý prevádzkovateľ, ktorý vyrába, pripravuje, uskladňuje alebo dováža z tretej krajiny bioprodukty s cieľom ich ďalšieho predaja, alebo prevádzkovateľ, ktorý obchoduje s takýmito výrobkami, musí byť zaregistrovaný na Ústrednom kontrolnom a skúšobnom ústave poľnohospodárskom (ÚKSÚP) a musí svoje podnikanie podrobovať systému kontroly, ktorú vykonáva inšpekčná organizácia schválená ÚKSÚP-om.

**Cieľom práce** bolo zistiť vnímanie označovania biopotravín spotrebiteľmi na Slovensku.

### MATERIÁL A METÓDY

V zmysle stanoveného cieľa sme sa zamerali na analýzu poznania biopotravín spotrebiteľmi vo vzťahu k logám používaných pri ich označovaní.

Podkladom k jednotlivým analýzám príspevku bol anonymný dotazníkový prieskum uskutočnený v období mesiacov december 2009 až január 2010, v rámci ktorého sme oslovili 388 respondentov (74 % žien a 26 % mužov). Bezprostredne pred vyplňaním dotazníka boli respondenti krátkou inštrukciou oboznámení s cieľom prieskumu a s postupom vyplňania. V dotazníku sa respondenti vyjadrili k 12 otázkam týkajúcich sa názorov spotrebiteľov na biopotraviny a k 5 kvalifikačným otázkam (charakteristika súboru respondentov). Návratnosť dotazníkov bola 100 %.

Z metodologického hľadiska sme v rámci štatistického hodnotenia dosiahnutých výsledkov použili okrem základných metód deskriptívnej štatistiky aj metódu merania asociácií. Existencia štatisticky významných vzťahov bola overovaná  $\chi^2$  testu štvorcovej kontingencie. Štatistickú preukaznosť vzťahov sme posudzovali na základe významnosti testovacej charakteristiky (p-hodnoty). Tesnosť závislosti bola overovaná pomocou koeficientu kontingencie a Cramerovho koeficientu. Výpočty sme realizovali v štatistickom softvéri Statgraphics.

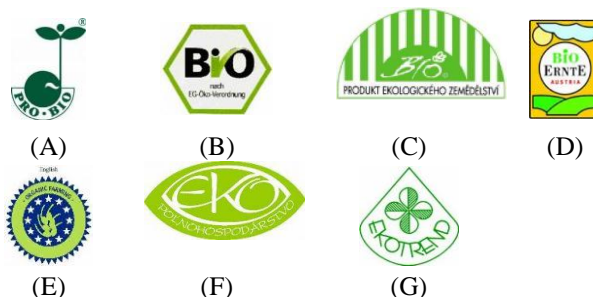
### VÝSLEDKY

V zmysle stanoveného cieľa sme sa zamerali na hodnotenie úrovne informovanosti spotrebiteľov

o označovaní biopotravín logami. Po súbore 12 otázok zameraných na zisťovanie názorov spotrebiteľov na biopotraviny nasledovali otázky týkajúce sa základných údajov o respondentoch. Odpovede na vlastné otázky dotazníka sme hodnotili z hľadiska veku, vzdelania, ekonomickej aktivity respondentov, ako aj z iných hľadísk. Z hľadiska **vekovej** štruktúry respondentov bola najviac zastúpená veková kategória mladých ľudí do 25 rokov (50 % z celkového počtu respondentov). Druhú najpočetnejšiu skupinu (28 %) predstavovala veková kategória od 26 do 35 rokov, za nimi nasledovala kategória ľudí vo veku od 36 do 45 rokov (17 %). Spotrebiteľia vo veku od 46 do 55 rokov tvorili 5 % výberového súboru a starší ľudia (nad 56 rokov) boli v zastúpení 0,5 %. Predpokladali sme, že na názory respondentov môže vplývať aj ich **vzdelanie**. Základné vzdelanie bolo zastúpené 0,26 % opýtaných, stredoškolské vzdelanie 56,19 % a vysokoškolské vzdelanie 43,56 %. V rámci kvalifikačných otázok sme tiež zisťovali **ekonomickú aktivitu** respondentov. V dotazníkovom prieskume bola najviac zastúpená skupina zamestnaných respondentov (48 %), za nimi nasledovali študenti (30 %) a tretiu pozíciu tvorila skupina podnikateľov (18 %). Na predposlednom mieste sa nachádzali nezamestnaní (4 %) a najmenej boli zastúpení dôchodcovia (1 %).

Zaujímali nás aj **príjem** respondentov, ktorý sme zisťovali nepriamo cez otázku „Druh zárobkovej činnosti“. V prieskume tvorili najväčšiu skupinu osoby, ktoré boli zamestnancami (53 %), za nimi nasledovali samostatne zárobkovo činné osoby (21 %) a na tretej pozícii boli majitelia firiem (2 %). Svoju zárobkovú činnosť neuviedlo 24 % respondentov, medzi ktorými boli študenti a nezamestnaní. Treba podotknúť, že prieskumu sa zúčastnili aj respondenti (34 %), ktorí boli počas realizácie prieskumu študentmi Fakulty biotechnológie a potravinárstva SPU v Nitre. U týchto študentov sme predpokladali erudovanejšie znalosti zo skúmanej problematiky.

V rámci hodnotenia vlastných otázok dotazníka sme sa respondentov pýtali, či poznajú pojem biopotraviny (otázka 1). Tento pojem je známy 97 % respondentov. Len 3 % (13) respondentov sa s týmto pojmom ešte nestretlo.

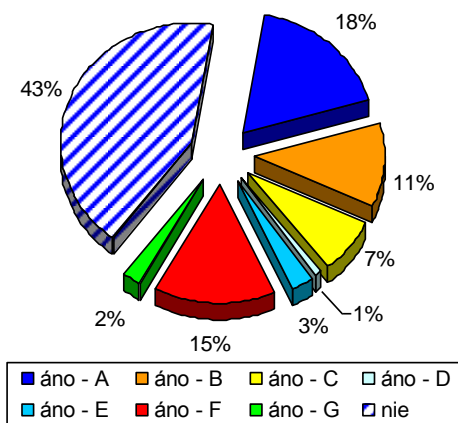


**Obrázok 3 Sledované logá**

Zisteniu ako spotrebiteľia poznajú označovanie biopotravín logami bola venovaná otázka 2. Vyhodnotením odpovedí sme zistili, že 57 % respondentov niektoré z uvádzaných lôg pozná a zvyšných 43 % respondentov tieto logá vôbec nepozná. V povedomí spotrebiteľov je najmä logo A – logo organizácie združujúcej ekologických poľnohospodárov, výrobcov, predajcov v Českej republike (18 % respondentov), za ním nasleduje logo F – logo ekologickej poľnohospodárskej výroby (EPV) na Slovensku (15 %

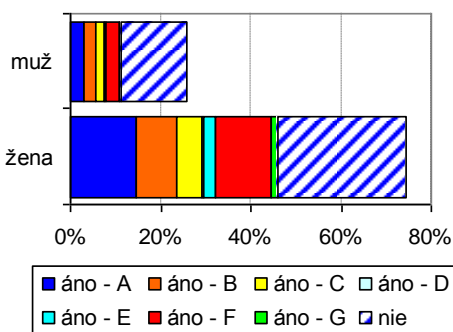


respondentov), tretie v poradí je logo B – logo ekologickej produkcie v Rakúsku (11 % respondentov) a ďalej nasledujú logá logo C - logo EPV v ČR (7 % respondentov), logo E – logo EPV spoločenstva (3 % respondentov), logo G – logo organizácie združujúcej ekologických poľnohospodárov a priateľov EPV na Slovensku (2 % respondentov) a logo D – logo EPV v Rakúsku (1 % respondentov).



Obrázok 4 Odpovede na otázku: „Poznáte niektoré z vyššie uvedených lôg“? (Vysvetlivky: obrázok 3)

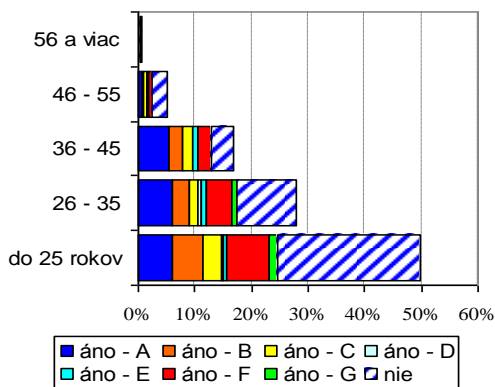
Porovnanie poznania lôg biopotravín podľa pohlavia ukázalo, že 72 % žien pozná minimálne jedno z týchto lôg. V ich povedomí sú najviac zastúpené logá označujúce produkty ekologickej poľnohospodárskej výroby v Českej republike, na Slovensku a v Rakúsku. Iba 28 % žien sa s týmito logami ešte nestretlo. Logá biopotravín nepozná 54 % mužov a u tých, ktorí ich poznajú, prevláda poznanie lôg rovnakých ako u žien.



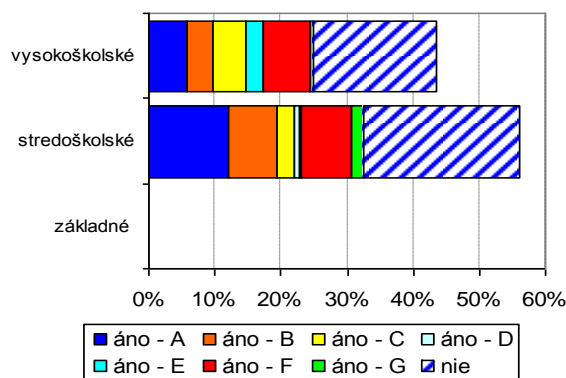
Obrázok 5 Poznanie lôg vo vzťahu k pohlaviu (Vysvetlivky: obrázok 3)

Skúmaním poznania lôg biopotravín podľa veku sme zistili, že aspoň jedno z uvedených lôg pozná 75 % respondentov vo veku od 36 do 45 rokov, 65 % respondentov vo veku od 26 do 35 rokov a zhodne 50 % respondentov v dvoch vekových kategóriách od 46 do 55 rokov a vo veku do 25 rokov (obrázok 6).

Z výsledkov nášho dotazníkového prieskumu vyplýva, že 58 % respondentov stredoškolského vzdelania a 57 % respondentov vysokoškolského vzdelania jedno a viac z uvádzaných lôg biopotravín pozná (obrázok 7).

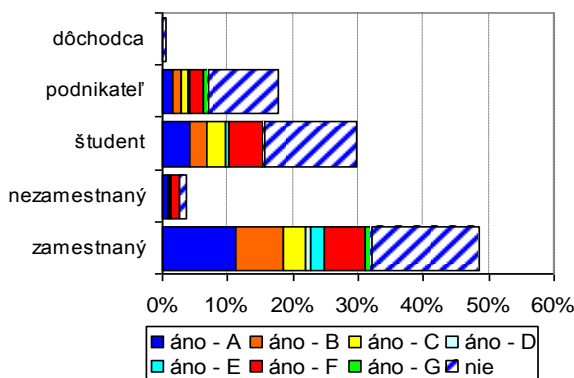


Obrázok 6 Poznanie lôg vo vzťahu k veku (Vysvetlivky: obrázok 3)



Obrázok 7 Poznanie lôg vo vzťahu ku vzdelaniu (Vysvetlivky: obrázok 3)

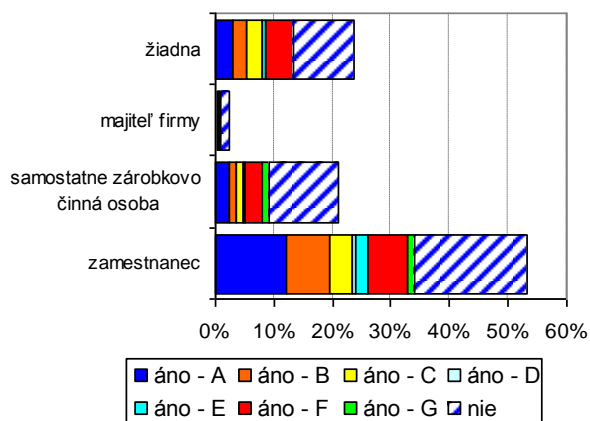
Analyzovali sme poznanie sledovaných lôg aj vo vzťahu k ekonomickej aktivite respondentov, pričom sme zistili, že aspoň jedno z týchto lôg pozná 66 % zamestnaných respondentov, 53 % študentov a 39 % podnikateľov. Až 71 % nezamestnaných, ktorí sú v podiele 3,6 % z celkového súboru respondentov, tieto logá pozná. Málopočetná skupina oslovených dôchodcov uvádzané logá nepozná (obrázok 8).



Obrázok 8 Poznanie lôg vo vzťahu k ekonomickej aktivite (Vysvetlivky: obrázok 3)

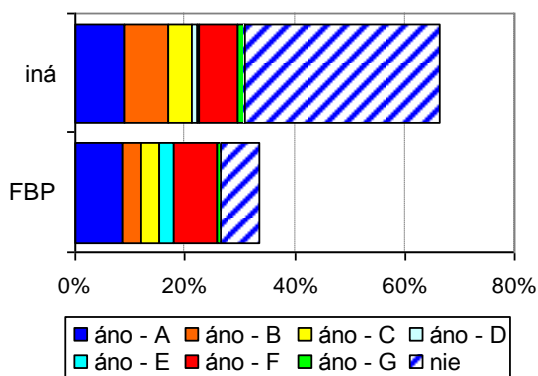
Z analýzy poznania lôg biopotravín vo vzťahu k zárobkovej činnosti vyplýva, že jedno a viac sledovaných lôg pozná 64 % respondentov z kategórie zamestnanec, 43 % samostatne zárobkovo činných osôb, 44 % majiteľov firiem a 57 % respondentov, ktorí počas priebehu

dotazníkového prieskumu nevyvíjali žiadnu zárobkovú činnosť (obrázok 9).



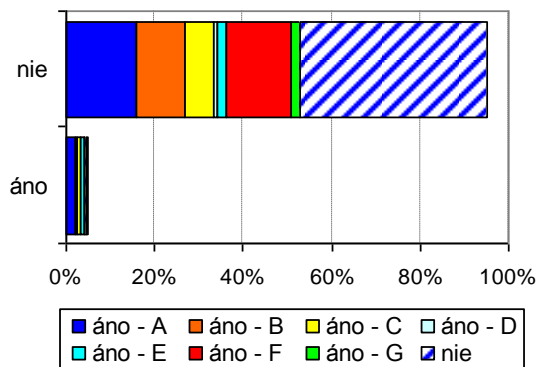
**Obrázok 9** Poznanie lôg vo vzťahu k zárobkovej činnosti (Vysvetlivky: obrázok 3)

Predpokladali sme, že respondenti, ktorí študujú na Fakulte biotechnológie a potravinárstva (FBP) SPU v Nitre, budú mať lepšie poznatky o označovaní biopotravin a budú sa lepšie v týchto logách orientovať. Obrázok 10 dokumentuje, že tento náš predpoklad bol správny a potvrdil sa, nakoľko 79 % respondentov študujúcich na FBP minimálne jedno z uvádzaných lôg pozná. V skupine respondentov ostatných, ktorá predstavuje 65 % z celkového súboru, 46 % respondentov niektoré z týchto lôg biopotravin pozná (obrázok 10).



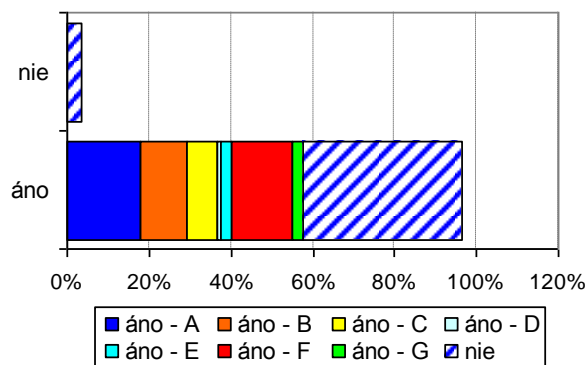
**Obrázok 10** Poznanie lôg vo vzťahu k fakulte FBP (Vysvetlivky: obrázok 3)

Z celého nami sledovaného súboru respondentov biopotraviny určitej značky alebo od konkrétneho výrobcu pri nákupe vyhľadáva 5 % respondentov, v logách biopotravin sa prevažne orientujú, pričom zanedbateľný menej ako 0,3 % -ný podiel predstavujú respondenti, ktorí uvádzané logá nepoznajú. Zo zvyšných 95 % respondentov, ktorí pri nákupe potravín nevyhľadávajú konkrétneho výrobcu biopotravin, 58 % z nich niektoré z týchto lôg biopotravin pozná (obrázok 11).



**Obrázok 11** Poznanie lôg vo vzťahu k vyhľadávaniu biopotravin respondentmi (Vysvetlivky: obrázok 3)

Zaujímalo nás, či respondenti poznajú logá biopotravin vo vzťahu k poznaniu pojmu biopotravina. Pojem biopotraviny pozná 97 % respondentov, prevláda poznanie lôg A, F a B, pričom 39 % respondentov žiadne z uvedených lôg nepozná. Pojem biopotraviny nepoznajú 3 % respondentov a tiež nepoznajú ani jednotlivé logá (obrázok 12).



**Obrázok 12** Poznanie lôg vo vzťahu k poznaniu pojmu biopotravina (Vysvetlivky: obrázok 3)

Pomocou  $\chi^2$  testu bola testovaná existencia závislosti medzi vybranými otázkami. Pri overovaní sme vychádzali z nasledovných hypotéz:

1. Spotrebitelia, ktorí poznajú pojem biopotraviny, budú poznať aj niektoré z uvažovaných označení.
2. Ženy poznajú skôr logá biopotravin ako muži.
3. Mladí ľudia poznajú skôr logá biopotravin.
4. Spotrebitelia s vyšším vzdelaním poznajú skôr logá biopotravin.
5. Ekonomicky aktívni spotrebitelia (zamestnanci, podnikatelia) poznajú skôr logá biopotravin.
6. Spotrebitelia, u ktorých predpokladáme vyšší príjem, poznajú skôr logá biopotravin.
7. Študenti študujúci na FBP fakulte poznajú skôr logá biopotravin.
8. Spotrebitelia, ktorí vyhľadávajú bioprodukty podľa výrobcov, poznajú skôr logá biopotravin.

Tabuľka 1 Výsledky testovania existencie závislosti odpovedí na otázku 2 a klasifikačných otázok

Klasifikačná otázka	$\chi^2$ charakteristika	p-hodnota	Záver testu: Existuje závislosť?	Koeficient kontingencie	Cramerov koeficient
Poznanie pojmu biopotravina	18,179	0,0112	Áno	0,2116	0,2165
Pohlavie	11,694	0,1111	Nie	0,1710	0,1736
Vek	40,319	0,0619	Nie	0,2068	0,1612
Vzdelanie	26,389	0,0231	Áno	0,2524	0,1844
Ekon. aktivita	40,149	0,0641	Nie	0,2062	0,1608
Druh zár. činnosti	42,375	0,0038	Áno	0,3138	0,1908
FBP fakulta	58,716	0,0000	Áno	0,3625	0,3890
Vyhľadavanie biopotravín	24,078	0,0011	Áno	0,2417	0,2491

Ako vyplýva zo stanovených hypotéz, testovali sme otázku vo vzťahu predovšetkým ku klasifikačným otázkam. Asociácie boli overované pomocou  $\chi^2$  testu štvorcovej kontingencie. Za štatisticky významnú závislosť považujeme vzťah, pri ktorom je p-hodnota menšia ako hladina významnosti  $\alpha=0,05$ . Výsledky testovania sa nachádzajú v tab.1.

Závislosť poznania uvedených lôg bola potvrdená z hľadiska poznania biopotravín (hypotéza 1), vzdelania (hypotéza 4), druhu zárobkovej činnosti (hypotéza 6), štúdia na FBP fakulte (hypotéza 7) a z hľadiska vyhľadávania biopotravín podľa výrobcov (hypotéza 8). Vychádzajúc z koeficienta kontingencie a Cramerovho koeficientu môžeme hovoriť o stredne silnej závislosti, pričom najväčší vplyv bol potvrdený z hľadiska štúdia na FBP fakulte, t.j. študenti, ktorí v čase realizácie dotazníkového prieskumu študovali na FBP fakulte, poznajú skôr logá biopotravín, keďže daná problematika patrí do náplne ich štúdia. Druhá najvyššia závislosť bola potvrdená v prípade výberu biopotravín podľa výrobcov. Potvrdila sa skutočnosť, že spotrebiteľia, ktorí si vyberajú bioprodukty podľa výrobcu, poznajú aj ich logá pod ktorými tieto produkty predávajú.

## ZÁVER

Z výsledkov nášho dotazníkového prieskumu vyplýva, že poznanie označovania biopotravín logami u spotrebiteľov je potrebné zvýšiť, najviac sú v povedomí respondentov logá ekologickej poľnohospodárskej výroby v Českej republike, na Slovensku a v Rakúsku. V záujme lepšej ochrany a informovanosti spotrebiteľov o týchto bezpečných poľnohospodárskych produktoch a potravinárskych výrobkoch a v súvislosti s nárastom falšovania potravín problematiku označovania biopotravín a ich certifikáciu považujeme za vysoko aktuálnu. „Eko-označovanie“ produkcie nielen v poľnohospodársko-potravinárskom komplexe, ale aj v ostatných odvetviach priemyselnej výroby môže predstavovať do istej miery environmentálne a ekonomicky efektívnu politiku šetrnú k životnému prostrediu.

## LITERATÚRA

- BOSTRÖM, M., KLINTMAN, M. 2006. State-centered versus nonstate-driven organic food standardization: A comparison of the US and Sweden. In *Agriculture and Human Values*, vol. 23, 2006, no 2, p. 163–180.
- BOSTRÖM, M. 2006. Regulatory credibility and authority through inclusiveness: Standardization organizations in cases of eco-labelling. In *Organization*, vol. 13, 2006, no 3, p. 345–367.
- BOSTRÖM, M., KLINTMAN, M. 2008. *Eco-standards, product labeling, and green consumerism*. New York, NY, USA : Palgrave Macmillan. 247 p. ISBN 978-0-230-53737-8.
- British Retail Consortium. *BRC Global Standard for Food Safety*. Issue 5, London, UK : TSO, January 2008. 92 p. ISBN 978-0-11-703791-5.
- CARTER, N. 2007. *The politics of the environment: Ideas, activism, policy*, 2nd ed. Cambridge, UK: Cambridge University Press. 432 p. ISBN: 978-0-521-68745-4.
- GERTZ, R. 2005. Eco-labelling: A case for deregulation? *Law, Probability and Risk.*, vol. 4, 2005, no. 3, p. 127–141.
- HDE - Hauptverband des Deutschen Einzelhandels (Germany), and FCD - Fédération des entreprises du Commerce et de la Distribution (France). *IFS International Food Standard. Standard for Auditing Retailer and Wholesaler Branded Food Products*. Version 5, Berlin, Germany : HDE Trade Services GmbH, august 2007. 117 p.
- HYSING, E. 2009. Governing without government? The private governance of forest certification in Sweden. In *Public Administration.*, vol. 87, 2009, no. 2, p. 312–326.
- IBANEZ, L., GROLLEAU, G. 2008. Can Ecolabeling Schemes Preserve the Environment? In *Environmental and Resource Economics*, vol. 40, 2008, no. 2, p. 233–249.
- JORDAN, A., WURZEL, R. K. W, BRÜCKNER, L. 2004. Consumer responsibility-taking and eco-labelling schemes in Europe. In *Politics, products, and markets: Exploring political consumerism past and present*. ed. M. MICHELETTI, A. FOLLESDAL, AND D. STOLLE, p. 161–180. New Brunswick, New Jersey : Transaction Publishers, 2004. 312 p. ISBN: 978-0-7658-0200-2.

KOZELOVÁ, D., MATEJKOVÁ, E., QINETI, A. 2010. Analyzing consumer's opinion on organic food, their safety and availability in the slovak food market. In *Potravinárstvo*, vol. 4, 2010, no. 3, p. 30-35, ISSN 1338-0230.

LOHR, L. 1998. Implications of organic certification for market structure and trade. In *American Journal of Agricultural Economics*, vol. 80, 1998, no. 5, p. 1125–1129. Proceedings Issue.

MASON, F. 2010. Eco-labeling and market equilibria with noisy certification tests. In *Environmental and Resource Economics*. Springer Netherlands 2010-09-18.

*Council Regulation (EC) No 834/2007 of 28 June 2007 on organic production and labelling of organic products and repealing Regulation (EEC) No 2092/91. OJ L 189, 20.7.2007, p. 1–23.*

*Commission Regulation (EC) No 889/2008 of 5 September 2008 laying down detailed rules for the implementation of Council Regulation (EC) No 834/2007 on organic production and labelling of organic products with regard to organic production, labelling and control. OJ L 250, 18.9.2008, p. 1–84.*

*Council Regulation (EC) No 967/2008 of 29 September 2008 amending Regulation (EC) No 834/2007 on organic production and labelling of organic products. OJ L 264, 3.10.2008, p. 1–2.*

*Commission Regulation (EC) No 1254/2008 of 15 December 2008 amending Regulation (EC) No 889/2008 laying down detailed rules for implementation of Council Regulation (EC) No 834/2007 on organic production and labelling of organic products with regard to organic production, labelling and control. OJ L 337, 16.12.2008, p. 80–82.*

*Commission Regulation (EC) No 1235/2008 of 8 December 2008 laying down detailed rules for implementation of Council Regulation (EC) No 834/2007 as regards the arrangements for imports of organic products from third countries. OJ L 334, 12.12.2008, p. 25–52.*

*Commission Regulation (EC) No 710/2009 of 5 August 2009 amending Regulation (EC) No 889/2008 laying down detailed rules for the implementation of Council Regulation (EC) No 834/2007, as regards laying down detailed rules on organic aquaculture animal and seaweed production. OJ L 204, 6.8.2009, p. 15–34.*

NILSSON, H., TUNCER, B., THIDELL, A. 2004. The use of eco-labeling like initiatives on food products to promote quality assurance - is there enough credibility? In *Journal of Cleaner Production*, vol. 12, 2004, no. 5, p. 517–526.

SONDERSKOV, K. M., DAUGBJERG, C. 2010. The state and consumer confidence in eco-labeling: organic labeling in Denmark, Sweden, The United Kingdom and The United States. In *Agriculture and Human Values*. Springer Netherlands 2010-11-11.

WARD, R., HUNNICUTT, L., KEITH, J. 2004. If you can't trust the farmer, who can you trust? The effect of certification types on purchases of organic produce. In *International Food and Agribusiness Management Review*. vol. 7, 2004, no. 1, p. 60–77.

*Zákon NR SR č. 189 z 29. apríla 2009 Z. z. o ekologickej poľnohospodárskej výrobe.*

### Contact address:

Ing. Dagmar Kozelová, PhD., Slovak University of Agriculture, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Department of Food Hygiene and Safety, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovakia, E-mail: dagmar.kozelova@uniag.sk

Ing. Peter Zajác, PhD. Slovak University of Agriculture, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Department of Food Hygiene and Safety, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovakia, E-mail: zajac@potravinarstvo.com

Ing. Eva Matejková, PhD., Slovak University of Agriculture, Faculty of Economics and Management, Department of Statistics and Operation Research, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovakia, E-mail: eva.matejkova@uniag.sk

Ing. Lucia Zelenáková, PhD, Slovak University of Agriculture, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Department of Food Hygiene and Safety, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovakia, E-mail: lucia.zelenakova@azet.sk

MVDr. Ľubomír Lopašovský, PhD., Slovak University of Agriculture, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Department of Food Hygiene and Safety, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovakia, E-mail: lubomir.lopasovsky@uniag.sk

Ing. et Bc. Ladislav Mura, PhD., Institute of Technology in Dubnica nad Váhom, Department of Specialized Subjects and IT, Sládkovičova 533/20, 018 41 Dubnica nad Váhom, Slovakia, E-mail: ladislav.mura@gmail.com

Ing. Jozef Čapla, PhD. Slovak University of Agriculture, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Department of Food Hygiene and Safety, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovakia, E-mail: capla@potravinarstvo.com

Ing. Vladimír Vietoris, PhD. Slovak University of Agriculture, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Department of Storing and Processing Plant Products, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovakia. E-mail: vietoris@afnet.uniag.sk

**EFFECT OF MILLING SOFTNESS ON BASIC TECHNOLOGICAL PARAMETERS OF WORT***Helena Frančáková, Miriam Lišková, Tatiana Bojňanská, Ján Mareček***ABSTRACT**

Crushing the malted grain in the process of milling enables extractive substances of malt to become available for water which accelerates dissolving and other chemical and physical processes during the time of mashing.

The aim of this work was at the basis of performed analyses to evaluate to what extent the grist composition with regard to different proportion of meal fraction affects the amount of extract and other technological parameters of malt. Analyzed malt was made from four varieties of malting barley as are Nitran, Ebson, Malz and Xanadu coming from the harvest year 2009. Composition of malt grist in great extent influenced the entire process of mashing, lautering and the amount of extract. The highest values of extract were measured by all varieties at the variant III. with the highest content (50%) of the softest fraction meal + powder meal. The difference between variant I. with 10% content of the softest fraction and variant III. with 50% content, was already 3%. The most significant increase of this parameter was found out by varieties Ebson and Malz. Mashing and lautering parameters have not been significantly influenced by the milling variants. More significant differences were found out with regard to wort turbidity. Only variety Malz showed out the turbidity up to 4 EBC units, measured by turbidity meter under the angle 90°. The highest turbidity was measured by variant I. with the lowest proportion of the fraction meal + powder meal.

**Keywords:** variety, malt, milling, extract, turbidity

**ÚVOD**

Slad ako základná surovina na výrobu piva a sladových výťažkov má veľký vplyv na kvalitu piva. Kvalita sladu je v podstate určujúcim faktorom kvality piva. Aby mohli sladové enzýmy dokonale štiepiť nerozpustný škrob a bielkoviny obsiahnuté v slade, musí sa sladové zrno zošrotovať. Zloženie šrotu zásadným spôsobom ovplyvňuje proces rmutovania, sciedzania a varný výťažok. Jemné rozomletie endospermu je predpokladom pre požadovaný priebeh rmutovania a vysoký varný výťažok (Kosař a Prochádzka, 2000; Warpala a Pandiella, 2000). Pri kličení postupuje rozlúštenie pôsobením enzýmov od zárodka smerom ku špičke zrna a taktiež i miera rozlúštenia sa mení pozdĺž predĺzenej osi zrna. Najmenej rozlúštená špička zrna tvorí pri šrotovaní hlavný podiel hrubej krupice, a naopak dobre rozlúštené spodné partie endospermu zrna sa pri prechode valcami ľahko rozdrvia na jemnú krupicu a múku. Hrubá krupica sa ťažko rozpúšťa a pomaly zcukruje. U dobre rozlúštených sladov je vyšší podiel múky a jemnej krupice, ktoré sú bohaté na enzýmy a pri rmutovaní ľahko prejdú do roztoku. Zle rozlúštené slady sa melú horšie, čo sa prejavuje väčším podielom hrubej krupice. Pri zle rozlúštených sladoch s vyšším podielom hrubej krupice sa musí počítať s horším výťažkom extraktu (Dendy a Dobraszczyk, 2001; Prugar, 2008). Na spôsob šrotovania má kľúčový vplyv spôsob sciedzovania. Šrot pre sciedzáciu kaňu má teda mať pokiaľ možno najviac vymleté, minimálne poškodené plevy, nízky podiel hrubej krupice a vysoký podiel jemnej krupice. Šrot pre sladínový filter má mať naopak dobre rozomleté plevy (Frančáková a Tóth, 2005). Okrem štandardných parametrov sladu venujú niektoré vedecké práce pozornosť skúmaniu zákalu sladiny (Prokeš a Hartmann, 2001; Siebert a Lynn, 2003; Douglas et al., 2006; Psota et al., 2009). Podľa Wackerbauera et al. (1992) významný vplyv na zákal sladiny má samotné mletie. Autori experimentálne zistili,

že použitím trojdenných sladov, za použitia jemného mletia a mletia na kladivkovom mlynčeku, bola nameraná hodnota zákalu sladiny 8 až 9 j. EBC. Sladiny z hrubého mletia dosiahli hodnotu zákalu nad 14 j. EBC. Pri hodnotení päťdenných sladov za použitia mletia na kladivkovom mlynčeku sa hodnoty zákalu znižovali na 2 j. EBC a sedemdenné slady dosiahli hodnoty zákalu len 1,8 j. EBC. Podľa Prokeša (2008) sa za prijateľné považujú hodnoty zákalu do 4 j. EBC, kedy je sladina i vizuálne hodnotená ako číra. Hodnoty zákalu nad 8 j. EBC už majú sladiny opalizujúce. Rozdiel extraktov múčka - šrot umožňuje posúdiť stupeň cytolytického rozlúštenia a vhodnosť sladu pre spracovanie vo varni. Určuje sa rozdiel extraktov medzi jemným (90 % múčka) a hrubým (25 % múčka) mletím sladu. V hrubom šrote zostáva pred enzymatickým štiepením tým viac látok tvoriacich extrakt, čím dokonalejšie je slad rozlúštený (Drdák, 1996; Lu et al., 2000; Ogusi et al., 2002). Formovanie technologických parametrov sladu ako sú relatívny extrakt pri 45 °C, Kolbachovo číslo a v menšej miere hodnoty extraktu a dosiahnuteľného stupňa prekvasenia môže výrazne ovplyvniť aj pozberové dozrievanie zrna jačmeňa (Woonton et al., 2005; Frančáková a Lišková, 2009; Lišková et al., 2010).

Cieľom práce bolo na základe uskutočnených analýz zhodnotiť vplyv zloženia šrotu sladu z pohľadu zastúpenia frakcie múky a múčky na základné technologické parametre svetlého sladu.

**MATERIÁL A METODIKA**

Hodnotenie technologických parametrov svetlého sladu (extrakt, scukrenie, stekanie, zákal) sa sledovalo u štyroch odrôd (Ebson, Nitran, Xanadu a Malz) jačmeňa sladovníckeho. Tieto odrody patria medzi výberové sladovnícke odrody. Analyzoval sa slad vyrobený z úrody jačmeňa sladovníckeho r. 2009. V metodike boli použité uznané metódy stanovení v rámci EBC, ktoré uvádza Basařová (1992).

## Príprava variantov šrotovania

V práci boli použité tri varianty zloženia šrotu. Slad sa zošrotoval na mlynčeku Miag. Jednotlivé podiely frakcií sa získali preosievaním na Pfungstadtskom preosievadle. Na prípravu sladiny bola použitá navážka 50 g s rôznym zastúpením frakcie.

Zastúpenie jednotlivých frakcií:

Variant I.: 10 % múka + múčka

Variant II.: 25 % múka + múčka

Variant III.: 50 % múka + múčka

## Príprava kongresnej sladiny a stanovenie extraktu svetlého sladu

50 g rozomletej vzorky sladu sa navážilo do rmutovacej nádoby. Za stáleho miešania sa ku vzorke prilialo 150 ml destilovanej vody 15 °C teplej. Rmutovacia nádoba sa vložila do rmutovacieho kúpeľa pri teplote 45 °C počas 30 min. Teplota sa zvyšovala na 70 °C po dobu 1 hodiny. Následne sa pridalo 100 ml destilovanej vody 70 °C teplej a za 10 minút sa odobrala vzorka na skúšku scukrenia. Rmut sa ochladil na teplotu 20 °C. Rmutovacia nádoba sa dovážila destilovanou vodou na 450 g. Po premiešaní sa rmut filtroval. Filtrácia sa ukončila keď obsah filtra popraskal. Filtrát sa premiešal a ihneď sa stanovila relatívna hustota pyknometricky.

## Stanovenie scukrenia sladiny

V priebehu prípravy kongresnej sladiny sa odobrala sklenou tyčinkou 10 minút po dosiahnutí teploty rmutu 70 °C, kvapka vzorky a kvapla sa na sadrovú doštičku, alebo kriedu. Pridala sa kvapka jódového roztoku. Ak bolo zafarbenie modré alebo hnedé, scukrenie neprebehlo dokonale a nová skúška sa urobila po piatich minútach a to v intervaloch tak dlho, až pokým nebola reakcia vzorky s jódovým roztokom žltá.

## Posúdenie doby stekania sladiny

Doba stekania sladiny sa posúdila počas filtrácie. Normálne stekanie u kongresných sladín je do 1 hodiny, pomalé do 2 hod., zlé nad 2 hod. Dobro rozlúštené slady stekajú normálne.

## Meranie zákalu

Na prístroji zákalomer typu MZN-2002 pod uhlom 90°.

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

K najdôležitejším kvalitatívnym parametrom sladu patrí výška extraktu (Kosař a Prochádzka, 2000). Výška extraktu na variante I. s množstvom 10 % najjemnejšieho podielu sa pohybovala od 77,8 % u odrody Malz až po 82,4 % u odrody Xanadu (tabuľka 3, 4). Požiadavkám STN na I. triedu kvality sladu z hľadiska výšky extraktu vyhovovali len odrody Ebson (80,6 %) a Xanadu (82,4 %) (tabuľka 1, 3). Extraktívnosť svetlých sladov sa obvykle pohybuje v rozsahu 76 až 82 % v sušine, výnimočne v niektorých ročníkoch dosahuje až 84 %. Scukrenie na variante I. prebehlo u všetkých odrôd do 10 minút, čo vyhovuje požiadavkám STN. Stekanie sledované počas filtrácie bolo skončené do 30 minút u všetkých odrôd variantu I. Rýchle stekanie je znakom dobrého rozlúštenia a dokonalého scukrenia sladiny

(Swanston a Taylor, 1990; Warpala a Pandiella, 2000), čo sa potvrdilo aj z našich výsledkov. Sladiny počas filtrácie vykazovali mierny opál, čo sa prejavilo na hodnotách zákalu. Zákal v jednotkách EBC sa pri odrodách Ebson, Nitran a Xanadu pohyboval nad 4 j. EBC (tabuľka 5). Len odroda Malz mala sladinu počas filtrácie čiru s hodnotou zákalu 2,24 j. EBC (tabuľka 4) čo vyhovuje požiadavkám STN pre svetlé slady. Extraktívnosť sladu zahŕňa súhrn všetkých extraktívnych látok sladu, ktoré prejdú do roztoku za podmienok kongresnej metódy, vyjadrené v %.

Extraktívnosť svetlých sladov na variante II., v ktorom bol podiel najjemnejšej frakcie 25 %, bola u odrôd Ebson, Xanadu a Malz nad 81 % (tabuľka 1, 3, 4). Tieto hodnoty spĺňajú požiadavky na I. triedu kvality. Odroda Nitran dosiahla hodnotu tohto významného ekonomického parametra len 78 % (tabuľka 2). Podľa hodnôt extraktu možno usúdiť, že množstvo škrobovej zložky pri odrode Nitran bolo nižšie. Škrobová zložka je nositeľom extraktívnosti sladu a ak je nedostatok škrobu v jačmeni, nie je možné žiadnou technológiou percento extraktu v slade zvýšiť (Prokeš, 2008). Doba scukrenia vyjadruje mieru aktivity  $\alpha$ -amylázy (Mousia et al., 2004). Scukrenie u všetkých odrôd prebehlo do 10 minút (tabuľka 5). Slad bol bohatý na amylolytické enzýmy, keďže scukrenie prebehlo veľmi rýchlo. Zloženie šrotu ani odroda tento parameter neovplyvnili. Stekanie, ktoré patrí k tradičnému hodnoteniu kvality sladu prebehlo do jednej hodiny u všetkých odrôd (tabuľka 5). Rýchle stekanie je podľa Basařovej (1992) znakom dobrého rozlúštenia a dokonalého scukrenia sladiny, čo sa potvrdilo aj z našich výsledkov. Hodnoty zákalu namerané na II. variante boli v porovnaní so zákalmi nameranými na variante I. nižšie. Odroda Ebson mala zákal sladiny vo výške 4,96 j. EBC (tabuľka 1), u odrody Xanadu bol zákal 4,85 j. EBC (tabuľka 3). U týchto dvoch odrôd hodnoty tohto parametra nespĺňajú požiadavky ani na II. triedu kvality. Ak slady dosahujú zákal najviac 4,4 j. EBC hodnotia sa ako slady II. triedy kvality. Odrodu Nitran so zákalom 3,40 j. EBC a odrodu Malz s hodnotou 2,06 j. EBC (tabuľka 2, 4) hodnotíme ako bez zákalu a vyhovujú požiadavkám STN na I. triedu kvality svetlých sladov. Optimálne hodnoty zákalu sladiny by sa mali pohybovať pod 2,5 j. EBC aj napriek tomu, že takmer 40 % sladov má túto hodnotu vyššiu. To sa potvrdilo aj z našich výsledkov.

Na variante III. s najvyšším zastúpením frakcie múka + múčka (50 %) u všetkých štyroch hodnotených odrôd boli dosiahnuté najvyššie hodnoty extraktu. To znamená, že so zvyšujúcim sa podielom múka + múčka pri jednotlivých variantoch sa zvyšovala aj hodnota extraktu v sladine. Odroda Ebson mala extrakt vo výške 84,1 %, Nitran 81,7 %, Xanadu 82,7 %, Malz 84,2 % (tabuľka 1, 2, 3, 4). Ako vyplýva z týchto hodnôt, najvyšší extrakt v % sme namerali u odrody Malz (tabuľka 4). Doba scukrenia, ktorá je dôležitým ukazovateľom účinnosti amylolytických enzýmov bola 10 minút u všetkých odrôd (tabuľka 5). Slady sa považujú za normálne rozlúštené, pretože doba scukrenia nebola dlhšia ako 10 - 15 minút. Stekanie sladiny posudzované pri filtrácii laboratórneho rmutu bolo skončené do 30 minút u odrôd Ebson, Nitran a Xanadu (tabuľka 1, 2, 3). Len u odrody Malz stekanie trvalo 35 minút (tabuľka 4). Podľa Kunzeho (1999), keď je filtrácia skončená do jednej hodiny, slady stekajú normálne. Na základe nameraných hodnôt je možné stekanie hodnotiť ako normálne. Medzi

dobami stekania pri všetkých troch použitých variantoch neboli významné rozdiely. Zloženie šrotu ani odroda tento parameter neovplyvnili. Zákal sladiny, na ktorý má významný vplyv mletie (Koliatsou a Palmer, 2004) sa u odrôd Ebson a Xanadu pohyboval nad 5 j. EBC (tabuľka 1, 3). Tieto slady nevyhovujú požiadavkám STN pre svetlé slady. Odrôda Nitran dosiahla hodnotu zákalu 3,58 j. EBC (tabuľka 2) a odroda Malz 4,0 j. EBC (tabuľka 4). Tieto hodnoty sa považujú za prijateľné. Sladina bola vizuálne hodnotená ako číra. Tieto slady podľa požiadaviek STN spĺňajú z pohľadu tohto parametra kritériá pre I. triedu kvality. Podľa Prokeša (2008) hodnoty zákalu nad 8 j. EBC už majú sladiny opalizujúce. Takáto hodnota nebola zistená ani pri jednej odrôde ani variante. Najvyšší zákal z pohľadu odrôd bol nameraný na I. variante s najnižším zastúpením najjemnejšej frakcie (múka + múčka), (tabuľka 6).

**Tabuľka 1 Technologické parametre sladu (odroda Ebson)**

Parametre	Variant I.	Variant II.	Variant III.
Extrakt v sušine (%)	80,6	81,7	84,1
Scukrenie (min.)	10	10	10
Stekanie (min.)	30	36	30
Zákal (j.EBC)	6,16	4,96	5,71

**Tabuľka 2 Technologické parametre sladu (odroda Nitran)**

Parametre	Variant I.	Variant II.	Variant III.
Extrakt v sušine (%)	79,0	78,0	81,7
Scukrenie (min.)	10	10	10
Stekanie (min.)	21	27	26
Zákal (j.EBC)	6,96	3,40	3,58

**Tabuľka 3 Technologické parametre sladu (odroda Xanadu)**

Parametre	Variant I.	Variant II.	Variant III.
Extrakt v sušine (%)	82,4	81,9	82,7
Scukrenie (min.)	10	10	10
Stekanie (min.)	24	20	20
Zákal (j.EBC)	5,84	4,85	5,31

**Tabuľka 4 Technologické parametre sladu (odroda Malz)**

Parametre	Variant I.	Variant II.	Variant III.
Extrakt v sušine (%)	77,8	83,7	84,2
Scukrenie (min.)	10	10	10
Stekanie (min.)	19	33	35
Zákal (j.EBC)	2,24	2,06	4,0

**Tabuľka 5 Technologické parametre sladu z pohľadu odrôd**

Parametre	Ebson	Nitran	Xanadu	Malz
Extrakt v sušine (%)	82,1	79,6	82,3	81,9
Scukrenie (min.)	10	10	10	10
Stekanie (min.)	32	25	21	29
Zákal (j.EBC)	5,61	4,65	5,33	2,76

**Tabuľka 6 Technologické parametre sladu z pohľadu variantov šrotovania**

Parametre	Variant I.	Variant II.	Variant III.
Extrakt v sušine (%)	80,0	81,3	83,2
Scukrenie (min.)	10	10	10
Stekanie (min.)	24	29	28
Zákal (j.EBC)	5,30	3,82	4,65

## ZÁVER

Skúmané odrody, z ktorých boli slady vyrobené, patria medzi výberové sladovnícke odrody. Na základe porovnania všetkých sledovaných technologických parametrov u jednotlivých sladov možno konštatovať, že najlepšie výsledky boli dosiahnuté pri odrôde Malz. Iba pri tejto odrôde boli hodnoty zákalu na všetkých variantoch do 4 j. EBC. Najvyrovnanjšie hodnoty extraktu sa namerali pri odrôde Xanadu, keď ani na jednom variante neklesla hodnota pod 81 %. Najnižšie hodnoty extraktu pod 80 % preukázala odroda Nitran. Takéto hodnoty sú z pohľadu spracovateľa veľmi nízke. Z pohľadu variantov bol najvyšší extrakt nameraný na variante III. s najvyšším zastúpením frakcie (múka+múčka).

## LITERATÚRA

- BASAŘOVÁ, G. 1992. *Pivovarsko – sladařská analytika*. Praha, 1992, Merkanta s.r.o., 388 p.
- DENDY, D. A. V., DOBRASZCZYK, B. J. 2001. *Cereals and Cereal Products, chemistry and technology*. Aspen Publication Inc., 2001, 428 p., ISBN 0834217678.
- DOUGLAS, P., MENESES, F. J., JIRANEK, V. 2006. Filtration, haze and foam characteristics of ferment wort



mediated by yeast strain. In *Journal of Applied Microbiology*, vol. 100, 2006, p. 58-64.

DRDÁK, M., STUDNICKÝ, J. MÓROVÁ, E., KAROVIČOVÁ, J. 1996. *Základy potravinárskych technológií*. Praha, 1996, 512 p. ISBN 80-967064-1-1.

FRANČÁKOVÁ, H., TÓTH, Ž. 2005. *Sladovníctvo a pivovarníctvo*. Nitra, SPU, 2005, 141 p. ISBN 80-8069-544-X.

FRANČÁKOVÁ, H., LÍŠKOVÁ, M. 2009. Dormancia sladovníckeho jačmeňa vo vzťahu k fyziologickým parametrom zrna jačmeňa. In *Acta fytotechnica et zootechnica*, vol. 12, 2009, no. 1, p. 20-23. ISSN 1335-258.

KOLIATSOU, M., PALMER, G. H. 2004. A New Method to Assess Mealiness and Steeliness of Barley Varieties and Relationship of Mealiness with Malting Parameters. In *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, vol. 61, 2004, no. 3, p. 114-118.

KOSAŘ, K., PROCHÁDZKA, S. 2000. *Technologie výroby sladu a piva*. Praha, VÚPS, 2000, 398 p. ISBN 80-902658-6-3.

KUNZE, W. 1999. *Technology brewing and malting*. Berlin: VLB, 1999, 726 p. ISBN 3-921690-39-0.

LÍŠKOVÁ, M., FRANČÁKOVÁ, H., MAREČEK, J. 2010. Vplyv dormancie na formovanie technologických parametrov sladu. In *Potravinárstvo*, vol. 4, 2010, no. 1, p. 45.

LU, M. Q., O'BRIEN, L., STUART, I. M. 2000. Barley malting quality and yield interrelationships and the effect on yield distribution of selection for malting barley quality in early generations. In *Australian Journal of Agricultural Research*, vol. 51, 2000, p. 247-258.

MOUSIA, Z., BALKIN, R. C., PANDIELLA, S. S., WEBB C. 2004. The effect of milling parameters on starch hydrolysis of milled malt in the brewing process. In *Process Biochemistry*, vol. 39, 2004, no. 12, p. 2213-2219.

OGUSI, K., LIM, P., BARR, A. R., TAKAHASIL, S., ASAKURA, T., ITO, K. 2002. Japanese barley meets Australia: Quality performance of malting barley grown in different countries. In *Journal of the Institute of Brewing*, vol. 108, 2002, no. 3, p. 303-309.

PSOTA, V., SKULILOVÁ, Z., HARTMANN, J. 2009. The effect of the barley variety, location and year crop on the haze of congress wort. In *Czech Journal of Food Science*, vol. 27, 2009, no. 3, p. 158-164.

PROKEŠ, J., HARTMANN, J. 2001. Evaluation of turbidity in malt of Czech origin. In *Monatsschrift für Brauwissenschaft*, vol. 54, 2001, p. 237-241.

PROKEŠ, J. 2008. *Hodnocení starších jakostních odrůd ječmene novými ukazovateli jakosti sladu:*

Dizertační práce. Brno: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, 2008, 86 p.

PRUGAR, J. 2008. *Kvalita rostlinných produktů na prahu 3. tisíciletí*. Praha: VÚPS, 2008, 327 p. ISBN 978-80-86576-28-2.

SIEBERT, K. J., LYNN, P. Y. 2003. Effects of alcohol and pH on protein-polyphenol haze intensity and particle size. In *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, vol. 61, 2003, p. 88-98.

SWANSTON, J., TAYLOR, K. 1990. The effects of different steeping regimes on water uptake, germination rate, milling energy and hot water extract. In *Journal of the Institute of Brewing*, vol. 96, 1990, no. 1, p. 3-6.

WACKERBAUER, K., ZUFALL, C., HOLSCHER, K. 1992. Der Einfluss von Hammermühlenschrot auf die Wurze, Brauwelt. In *Brauwelt*, vol. 29, 1992, p. 1366-1374.

WARPALA, I. W. S., PANDIELLA, S. S. 2000. Shorter Communication: Grist fractionation and starch modification during the milling of malt. In *Food and Bioproducts Processing: Transactions of the Institution of Chemical Engineers*, vol. 78, 2000, no. 2, p. 85-89.

WOONTON, B., JACOBSEN, J. V., SHERKAT, F., STUART, I. M. 2005. Changes in germination and malting quality during storage of barley. In *Journal of the Institute of Brewing*, vol. 111, 2005, no. 1, p. 33-41.

#### **Acknowledgments:**

This work was supported by grant VEGA 1/0282/10.

#### **Contact address:**

doc. Ing. Helena Frančáková, CSc., Slovak University of Agriculture in Nitra, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Department of Storage and Processing Plant Products, Tr. A. Hlinku 2, 94976 Nitra, E-mail: helena.francakova@uniag.sk

Ing. Miriam Líšková PhD., Slovak University of Agriculture in Nitra, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Department of Storage and Processing Plant Products, Tr. A. Hlinku 2, 94976 Nitra, E-mail: miriam.liskova@uniag.sk

doc. Ing. Tatiana Bojňanská, CSc., Slovak University of Agriculture in Nitra, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Department of Storage and Processing Plant Products, Tr. A. Hlinku 2, 94976 Nitra, E-mail: tatiana.bojnanska@uniag.sk

Ing. Ján Mareček PhD., Slovak University of Agriculture in Nitra, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Department of Storage and Processing Plant Products, Tr. A. Hlinku 2, 94976 Nitra, E-mail: jan.marecek@uniag.sk



**FREQUENTED SPECIES OF FIELD FUNGI ON WHEAT AND THEIR POTENTIAL PRODUCTION OF TOXIC METABOLITES***Zuzana Mašková, Dana Tančinová, Zuzana Barboráková, Michal Mokry***ABSTRACT**

The aim of this study was to monitor isolates of *Alternaria* and *Fusarium* species, isolated from Slovak wheat grains in 2006 – 2008, for ability to produce mycotoxins and to estimate a potential contamination risk of wheat grains by mycotoxins. Toxinogenicity of isolates was analyzed by means of thin layer chromatography (TLC) and liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (LC/MS/MS). A total of 302 *Alternaria* species (*A. alternata*, *A. arborescens*, *A. infectoria*, *A. tenuissima*) were tested by TLC method and a total of 238 *Fusarium* species (*F. acuminatum*, *F. avenaceum*, *F. crookwellense*, *F. culmorum*, *F. equiseti*, *F. graminearum*, *F. langsethiae*, *F. oxysporum*, *F. poae*, *F. proliferatum*, *F. semitectum*, *F. solani*, *F. sporotrichioides*, *F. subglutinans*, *F. tricinctum*, *F. verticillioides*) were analyzed by TLC as well as LC/MS/MS method. All *Alternaria* sp. strains, excepting *A. infectoria* strains, showed high potentiation to produce altenuen, alternariol and alternariol monomethylether. None of *A. infectoria* species strains produced any mycotoxins analyzed in this study. *Fusarium* sp. strains demonstrated, according to toxicology specificity, ability to produce trichothecenes (deoxynivalenol, diacetoxyscirpenol, fusarenone X, HT-2 toxin, monoacetoxyscirpenol, neosolaniol, nivalenol, T-2 toxin), fumonisins, zearalenones, moniliformine and rarely mentioned toxins as aurofusarine, beauvericine, enniatins, equisetin and chlamydo sporol. High potential production of mycotoxins and wide spectrum of toxic metabolites represent high risk of toxins production in real field conditions.

**Keywords:** *Alternaria*, *Fusarium*, mycotoxin, wheat

**ÚVOD**

Mikrobiologická kvalita pšenice má priamy vplyv na konečnú kvalitu mlynských produktov. Múky s väčším mikrobiálnym zastúpením pochádzajú prednostne zo pšenice nižšej mikrobiologickej kvality (Berghofer et al., 2002). Kolonizácia obilnín mikroorganizmami začína už pri klíčení. Baktérie sú obvyčajne prvými kolonizátormi, ale veľmi skoro ich nasledujú kvasinky a vláknité mikroskopické huby. Mikromycéty pokračujú vo vývoji počas rastu rastliny, zvlášť pri dozrievaní semien. Následne žatva výrazne narúša ekosystém zrna. Zrno sa dostáva z premenlivého prostredia klasu do relatívne stáleho prostredia skladu. Tento proces sprevádza značná zmena v zložení mikrocenózy (Lacey, 1989). Suvedeným súvisia dve tradične rozoznávané ekologické skupiny vláknitých mikroskopických húb, ktoré osídľujú obilné zrná – poľné a skladové huby (Pitt et Hocking, 1999; Jesenská, 1987). Poľné huby si pre svoj rast vyžadujú ľahko prístupnú vodu a naopak skladové huby sú schopné rásť v podmienkach s nízkou aktivitou vody (Magan et Lacey, 1988). Medzi poľné huby zaradujeme *Acremonium* sp., *Alternaria* sp., *Cladosporium* sp., *Cephalosporium* sp., *Epicoccum* sp., *Fusarium* sp., *Helminthosporium* sp., *Nigrospora* sp., *Phoma* sp. a ďalšie. Ak sa zrno po žatve vysuší čo najrýchlejšie, nie sú tieto poľné huby schopné ďalej rásť. Len niektoré z nich prežívajú v dormantnom štádiu a znovu vyklíčia po zasiatí zrna do pôdy (Jesenská, 1987). Ich nežiaduce produkty - mykotoxíny však zostávajú v zrnách. Navyše niektoré z nich sú vysoko stabilné a ich koncentrácie sa nemenia ani po technologickom spracovaní pšeničných zrn (Weidenbörner, 2001). Obilniny a olejnaté semená vo všeobecnosti patria medzi najvhodnejšie substráty pre tvorbu mykotoxínov (Weidenbörner, 2001). Spôsobujú redukciu ich kvality, znižujú klíčivosť i nutričné

vlastnosti (Medina et al., 2006; Ramos et al., 1998; Samson et al., 2002a).

Štúdiá týkajúca sa sledovania mikrocenózy pšenice slovenského pôvodu ukázala pomerne vysoké zastúpenie izolátov poľných mikromycét rodov *Alternaria* a *Fusarium*, a to v povrchovej i endogénnej mykocenóze pšenice (Mašková, 2010). Ich vysoké počty spôsobujú znepokojenie predovšetkým kvôli ich potenciálnym toxínogénnym vlastnostiam. Je známych vyše 70 alternáriových metabolitov rôznej štruktúry a biologickej aktivity. Ich toxicita doteraz nebola preštudovaná do takej miery ako u iných rodov, ako sú napríklad *Fusarium* alebo *Aspergillus* (Chielkowski et Visconti, 1992). Jednotlivé štúdie však odhadujú, že okolo 68 % alternáriových kmeňov je toxických. Výsledky toxikologického hodnotenia jednotlivých alternáriových mykotoxínov sú zamerané hlavne na akútnu toxicitu, mutagenitu a karcinogenitu. Ich mykotoxíny však nie sú významne akútne toxické, a preto im je venovaná nižšia pozornosť (Schrader et al., 2001). Najdôležitejšie toxíny produkované rodom *Alternaria* kontaminujúce potraviny sú alternárioly, altenuény, altertoxíny a kyselina tenuazónová, ktorých produkcia je privilegovaná vysokou vlhkosťou a daždivým počasím pred zberom a to v relatívne vysokých množstvách (Weidenbörner, 2001). Izoláty rodu *Fusarium* sú bohatým zdrojom širokej palety bioaktívnych sekundárnych metabolitov, trichotecénov, zearalenonov a fumonizínov a v posledných rokoch vstúpili do pozornosti i mnohé ďalšie dôležité mykotoxíny, ako sú moniliformín, enniatíny, beauvericín a fuzaproliferín (Sorensen, 2009). Diaz (2005) uvádza, že v globálnom meradle sú práve fuzáriové mykotoxíny ekonomicky najvýznamnejšie mykotoxíny v potravinách a krmivách.

Autori Andersen et Thrane (2006) pokladajú výskyt špecifických alternáriových a fuzáriových metabolitov a ich potenciálnu toxicitu za vážny problém a do budúcnosti ho

považujú za hlavnú výzvu pre mykológov. Z toho dôvodu bolo cieľom predkladanej štúdie sledovať schopnosť izolátov rodov *Alternaria* a *Fusarium* produkovať sekundárne toxické metabolity a tak odhadnúť potenciálne riziko kontaminácie pšeničných zŕn mykotoxínmi. Štúdia by mala zároveň poskytnúť prehľad o potencii izolátov z našich komodít produkovať určité mykotoxíny a nasmerovať ich sledovanie aj v podmienkach *in vivo*.

## MATERIÁL A METODIKA

Izoláty poľných mikroskopických húb rodov *Alternaria* a *Fusarium* (Tabuľka 1), testované v predkladanej štúdii na potenciálnu schopnosť produkcie vybraných mykotoxínov, boli izolované z endogénnej a exogénnej mykobioty pšenice (*Triticum aestivum* L.) slovenského pôvodu v rokoch 2006 až 2008, podľa metodiky **Mašková (2010)**. Vzorky pšenice pochádzali zo všetkých krajov Slovenska (s výnimkou Košického kraja) a izoláty boli získané výlučne z asymptomatických zŕn.

Vybrané izoláty uvedených rodov boli naočkované na platne s YES agarom (kvasničný agar so sacharózou) (**Samson et al., 2002a**) a kultivované v tme pri teplote  $25 \pm 1$  °C po dobu 7 dní. V prípade nejasného, alebo

negatívneho výsledku bola kultivácia predĺžená na 14 dní. Vyrastené kolónie boli použité na analýzu toxigenity, t. j. schopnosť produkovať vybrané mykotoxíny kvalitatívnou metódou tenkovrstvovej chromatografie (TLC) a ich kvantitatívne stanovenie pomocou kvapalinovej chromatografie spojenej s tandemovou hmotnostnou spektrometriou (LC/MS/MS).

### Kvalitatívne stanovenie mykotoxínov TLC metódou

Kvalitatívne analýzy toxigenity vybraných izolátov TLC metódou boli prevedené podľa metodiky **Samson et al. (2002b)** s modifikáciou podľa **Labuda et Tančinová (2006)**. Z narastených kolónií boli aj so živnou pôdou vykrojené štvorce o približnej veľkosti 2 cm x 2 cm a v malých kúskoch vložené do Eppendorfovej skúmavky spolu s 0,5 ml extrakčného činidla. Obsah skúmaviek bol po dobu 5 minút miešaný rýchlosťou číslo 7 pomocou prístroja Vortex Genie® 2 (MO BIO Laboratories, Inc. – Carlsbad, CA). Získané extrakty boli nanesené na chromatografickú platňu so silikagélom (Alugram®SIL G, Macherey – Nagel, Nemecko) a následne ponorené do vyvíjacej sústavy. Identita stanovených mykotoxínov bola potvrdená porovnaním so štandardmi mykotoxínov. Analyzované mykotoxíny a použité metodiky sú uvedené v Tabuľke 2.

**Tabuľka 1** Kmene rodov *Alternaria* a *Fusarium*, testované metódami tenkovrstvovej chromatografie (TLC) a kvapalinovej chromatografie spojenej s tandemovou hmotnostnou spektrometriou (LC/MS/MS) na produkciu vybraných mykotoxínov (v zátvorkách sú uvedené počty testovaných kmeňov)

Metóda	Testované kmene
TLC (446)	<i>Alternaria alternata</i> (9), <i>A. arborescens</i> (21), <i>A. infectoria</i> (136), <i>A. tenuissima</i> (133), <i>Alternaria alternata / arborescens</i> (1), <i>Alternaria</i> sp. (2), <i>Fusarium acuminatum</i> (2), <i>F. avenaceum</i> (28), <i>F. crookwellense</i> (1), <i>F. culmorum</i> (8), <i>F. equiseti</i> (1), <i>F. graminearum</i> (48), <i>F. langsethiae</i> (1), <i>F. poae</i> (33), <i>F. semitectum</i> (1), <i>F. sporotrichioides</i> (17), <i>F. tricinctum</i> (4)
LC/MS/MS (94)	<i>Fusarium acuminatum</i> (2), <i>F. avenaceum</i> (2), <i>F. crookwellense</i> (1), <i>F. culmorum</i> (6), <i>F. equiseti</i> (1), <i>F. graminearum</i> (2), <i>F. langsethiae</i> (1), <i>F. oxysporum</i> (1), <i>F. poae</i> (57), <i>F. proliferatum</i> (10), <i>F. semitectum</i> (1), <i>F. solani</i> (1), <i>F. sporotrichioides</i> (2), <i>F. subglutinans</i> (2), <i>F. tricinctum</i> (4), <i>F. verticillioides</i> (1)

**Tabuľka 2** Extrakčné činidlá, vyvíjacie sústavy a spôsoby vizualizácie použité pri analýze vybraných mykotoxínov metódou tenkovrstvovej chromatografie

Mykotoxín	Extrakčné činidlo	Vyvíjacia sústava	Spôsob vizualizácie
altenuén	ch:m	TEF	UV svetlo s vln. dĺžkou 254 a 366 nm
alternáriol monometyléter	ch:m	TEF	UV svetlo s vln. dĺžkou 254 a 366 nm
alternáriol	ch:m	TEF	UV svetlo s vln. dĺžkou 254 a 366 nm
deoxynivalenol	ch:m	TAM	20 % AlCl <sub>3</sub> v 60 % etanole, zahriatie
diacetoxyscirpenol	ch:m / a:w	TAM	20 % AlCl <sub>3</sub> v 60 % etanole, zahriatie, 20 % H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> vo vode, zahriatie
HT-2 toxín	a:w	TAM	20 % H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> vo vode, zahriatie
moniliformín	a:w	BAW	MBTH v 1 % metanole, zahriatie
T-2 toxín	a:w	TAM	20 % H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> vo vode, zahriatie
zearalenon	ch:m / a:w	TAM	20 % AlCl <sub>3</sub> v 60 % etanole, zahriatie, 20 % H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> vo vode, zahriatie

ch:m – chloroform : metanol (2:1) (**Samson et al., 2002a**); a:w – acetonitril : voda (50:50) (**Mubatanhema et al., 1999**); TEF – toluén : etylacetát : kyselina mravčia (5:4:1) (**Samson et al., 2002a**); TAM – toluén : acetón : metanol (5:3:2) (**Thrane, 1986**); BAW – butanol : kyselina octová : H<sub>2</sub>O (20:10:7) (**Mubatanhema et al., 1999**); MBTH – 0,5 % metylbenzotiazolon-hydrochlorid vo vode (**Samson et al., 2002a**)

**Kvantitatívne stanovenie mykotoxínov pomocou LC/MS/MS (kvapalinová chromatografia spojená s tandemovou hmotnostnou spektrometriou)**

Kvantitatívne stanovenie bolo zamerané na mykotoxíny aurofuzarín (AUR), beauvericín (BEA), deoxynivalenol (DON), diacetoxyscirpenol (DAS), equisetín (EQU), fumonizíny B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>3</sub> (FUM B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>3</sub>), fuzarenon-X (FX), HT-2 toxín (HT-2), moniliformín (MON), monoacetoxyscirpenol (MAS), neosolaniol (NEO), nivalenol (NIV), T-2 toxín (T-2) a zearalenon (ZEA). Extrakcia mykotoxínov (ako pri TLC metóde) bola vykonaná pomocou 0,5 ml roztoku chloroform : metanol (2:1), výdatným miešaním sústavy po dobu 5 min na vortexe (V1 plus, Boeco, Nemecko), pričom surové extrakty boli následne prefiltrované a koncentrované vysušením pri teplote cca 60 °C. Pred samotnou detekciou bola vzorka (extrakt) zmiešaná s 1000 µl roztoku acetonitril : voda (1:1; v/v) a následne premiešaná na prístroji IKA MS1 Minishaker (IKA Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Nemecko). Filtrácia zriedeného extraktu do HPLC vialiek bola vykonaná pomocou filtrovacej striekačky (Minisart SRP 4 Satorius, Nemecko) o priemere 4 mm, s veľkosťou pórov 0,45 µm. Toxíny boli detegované a kvantifikované podľa metodiky Sulyok et al. (2006) na zariadení QTrap 4000 LC/MS/MS vybavenom TurboIonSpray ESI zdrojom a 1100 Series HPLC systémom. Chromatografická separácia bola vykonaná pri teplote 25 ± 1 °C na zariadení Gemini 5 µ C<sub>18</sub>, 150 mm x 4,6 mm (Phenomenex, USA).

**VÝSLEDKY A DISKUSIA**

**Toxinogenita izolátov zistená pomocou tenkovrstvovej chromatografie (TLC)**

Celkom 302 kmeňov rodu *Alternaria* bolo pomocou tenkovrstvovej chromatografie (TLC) testovaných na produkciu altenuénu (ALT), alternáriolu monometyléru (AME) a alternáriolu (AOH) (Tabuľka 3). Najväčší počet testovaných kmeňov pochádzal zo skupín *A. infectoria* a *A. tenuissima*, a to z dôvodu ich vysokej frekvencie výskytu a relatívnej denzity na pšenici slovenského pôvodu, zistenej v predchádzajúcej štúdii (Mašková et Tančinová, 2009). Z celkového počtu 136 testovaných izolátov skupiny *A. infectoria* sa ani v jednom prípade nepotvrdila produkcia mykotoxínov ALT, AME a AOH. I podľa iných autorov sa táto skupina výrazne odlišuje od ostatných izolovaných skupín v produkcii sekundárnych metabolitov, pretože dodnes nimi nebola preukázaná produkcia nijakých známych mykotoxínov (Andersen et al. 2002; Andersen et Thrane, 1996; Labuda et al, 2008; Piovarčiová et al., 2007; Pitt et Hocking, 1997). Pravdou však je, že donedávna bolo metabolitom rodu *Alternaria*, a špeciálne skupiny *A. infectoria*, venované len málo pozornosti. Až v poslednej dobe sa objavili publikácie o možných toxických účinkoch niektorých jej menej známych metabolitov, ktoré uvádzajú Larsen et al. (2003) a Christensen et al. (2005). Podľa nich sa jedná o možné fytotoxíny a potenciálne mykotoxíny. Ivanova et al. (2010) ďalej odhalili spojitosť niektorých produktov izolátov skupiny *A. infectoria* (kyselina linolová, kyselina α-linolénová, pyrón) s cytotoxicitou. Testované izoláty skupiny *A. tenuissima* sa ukázali ako

vysoko toxinogénne a z počtu 133 izolátov len 1 neprodukoval žiadny z testovaných mykotoxínov. Všetky ostatné kmene produkovali minimálne 1 mykotoxín. U niektorých kmeňov sa prejavila pomalšia produkcia ALT a na 7. deň nebola na TLC platniach zistená jeho prítomnosť. V takých prípadoch bola kultivácia predĺžená a analýza toxinogenity zopakovaná. Naopak produkcia AOH a AME bola obvyčajne viditeľná už na 7. deň. Izoláty skupín *A. alternata* a *A. arborescens* taktiež preukázali vysokú schopnosť produkcie sledovaných toxických metabolitov. Z celkového počtu 9 izolátov skupiny *A. alternata* len 1 kmeň neprejavil schopnosť produkovať žiadny zo sledovaných mykotoxínov a 1 kmeň neprodukoval AOH, ale tvoril ostatné toxíny. Botalico et Logrieco (1992) uvádzajú, že podľa ich výskumov je *A. alternata* schopná produkovať veľké množstvá toxínov a uvádzajú, že jej prirodzený výskyt v obilninách predstavuje skutočné riziko. Čo sa týka skupiny *A. arborescens*, z počtu 21 izolátov sa všetky kmene prejavili ako toxinogénne. Len jediný izolát neprodukoval ALT, no tvoril AME a AOH.

Rozšírený výskyt alternárií na pšenici a ich schopnosť produkovať mykotoxíny poukazuje zároveň na možnú prítomnosť toxínov v pšenici, prirodzene infikovanej touto hubou. Údajov o prítomnosti týchto toxických látok na pšenici je však veľmi málo. Na jednej strane autori Chielkowski et Visconti (1992) a Medina et al. (2006) uvádzajú, že alternárioly a ostatné alternáriové toxíny boli na zrnách detegované len zriedkavo, na druhej strane Ostrý et al. (2005) vo svojej štúdii zistili prítomnosť ALT vo všetkých testovaných vzorkách pšenice a AOH v 28,6 % vzoriek. Značný výskyt týchto toxínov na obilninách, vrátane pšenice, uvádzajú aj Scott (2001) a Webley et al. (1997).

**Tabuľka 3 Produkcia vybraných mykotoxínov testovanými kmeňmi rodu *Alternaria*, izolovanými zo pšenice slovenského pôvodu na kvasničnom agare so sacharózou (YES), zistená metódou tenkovrstvovej chromatografie (v zátvorkách sú uvedené počty testovaných kmeňov)**

Skupina	% pozitívnych testov		
	ALT <sup>1</sup>	AME <sup>2</sup>	AOH <sup>3</sup>
<i>A. alternata</i> (9)	88,9	88,9	77,8
<i>A. arborescens</i> (21)	95,2	100,0	100,0
<i>A. infectoria</i> (136)	0,0	0,0	0,0
<i>A. tenuissima</i> (133)	91,0	97,7	97,7
<i>A. alternata / arborescens</i> (1)	100,0	100,0	100,0
<i>Alternaria</i> sp. (2)	50,0	50,0	50,0

<sup>1</sup>altenuén, <sup>2</sup>alternáriol monometyléter, <sup>3</sup>alternáriol

Medzi ďalších potenciálnych producentov mykotoxínov z radov poľných mikroskopických húb patria zástupcovia rodu *Fusarium*. Spolu 144 kmeňov, testovaných na prítomnosť diacetoxyscirpenolu (DAS), deoxynivalenolu (DON), HT-2 toxínu (HT-2), moniliformínu (MON), T-2 toxínu (T-2) a zearalenonu (ZEA), preukázalo pomerne vysokú schopnosť ich produkcie (Tabuľka 4).

Toxinogenita izolátov zistená pomocou kvapalinovej chromatografie spojennej s tandemovou hmotnostnou spektrometriou (LC/MS/MS)

Tabuľka 4 Produkcia vybraných mykotoxínov testovanými kmeňmi rodu *Fusarium*, izolovanými zo pšenice slovenského pôvodu na kvasničnom agare so sacharózou (YES) v rokoch 2006 až 2008, zistená metódou tenkovrstvovej chromatografie

Druhy	Počet testovaných kmeňov / % pozitívnych testov					
	DAS <sup>1</sup>	DON <sup>2</sup>	HT-2 <sup>3</sup>	MON <sup>4</sup>	T-2 <sup>5</sup>	ZEA <sup>6</sup>
<i>F. acuminatum</i>	-	-	-	2 / 50,0	-	-
<i>F. avenaceum</i>	-	-	-	28 / 82,1	-	-
<i>F. crookwellense</i>	-	-	-	-	-	1 / 100,0
<i>F. culmorum</i>	-	-	-	8 / 0,0	-	8 / 50,0
<i>F. equiseti</i>	1 / 100,0	-	1 / 100,0	-	1 / 100,0	-
<i>F. graminearum</i>	-	10 / 0,0	-	-	-	48 / 72,9
<i>F. langsethiae</i>	1 / 100,0	-	1 / 100,0	-	1 / 100,0	-
<i>F. poae</i>	33 / 100,0	-	23 / 47,8	-	23 / 4,5	-
<i>F. semitectum</i>	-	-	-	1 / 0,0	-	1 / 0,0
<i>F. sporotrichioides</i>	17 / 47,1	-	1 / 100,0	16 / 62,5	17 / 88,2	-
<i>F. tricinctum</i>	-	-	-	4 / 100,0	-	1 / 0,0

<sup>1</sup>diacetoxyscirpenol, <sup>2</sup>deoxynivalenol, <sup>3</sup>HT-2 toxín, <sup>4</sup>moniliformín, <sup>5</sup>T-2 toxín, <sup>6</sup>zearalenon

Kvalitatívne testy poukazujúce na schopnosť vybraných kmeňov rodu *Fusarium* produkovať rôzne mykotoxíny boli doplnené o kvantitatívne analýzy metódou LC/MS/MS. Najväčšia pozornosť bola venovaná kmeňom druhov *F. poae*, *F. graminearum* a *F. avenaceum*, ktoré boli v predchádzajúcej štúdii (Mašková, 2010) vo vzorkách pšenice diagnostikované s najvyššou frekvenciou a zároveň s vysokou relatívnou denzitou v rámci tohto rodu. Celkom 57 kmeňov *F. poae* bolo analyzovaných na produkciu trichotecénov skupiny A a B, zearalenonu (ZEA), beauvericínu (BEA), fumonizínov (FUM) a aurofuzarínu (AUR), ktoré patria medzi ich najdôležitejšie metabolity (Moss et Thrane, 2004; Thrane et al., 2004; Desjardins, 2006). Práve produkciou B – trichotecénov sa *F. poae* chemicky odlišuje od blízkych príbuzných v sekcii *Sporotrichiella*, a to od druhov *F. sporotrichioides* a *F. langsethiae* (Torp et Nirenberg, 2004; Thrane et al., 2004). Ako vyplýva z Tabuľky 5, je zrejmé, že *F. poae* nepredstavuje výrazné riziko, pokiaľ ide o produkciu A – trichotecénov T-2 a HT-2 toxínov, avšak situácia je iná v prípade A – trichotecénov diacetoxyscirpenolu (DAS), monoacetoxyscirpenolu (MAS) a neosolaniolu (NEO), ktoré boli detegované v pomerne vysokých kvantitách.

Porovnateľné výsledky uvádzajú aj Thrane et al. (2004), ktorí zaznamenali produkciu T-2 a HT-2 toxínov len u malého percenta testovaných kmeňov z rôznych

oblastí Európy, pričom DAS a MAS produkovalo 46, resp. 45 zo 49 testovaných kmeňov. Z B – trichotecénov, izoláty *F. poae* testované v štúdiu autorov produkovali najčastejšie fuzarenon X (FX) (88 % kmeňov), zatiaľ čo nivalenol (NIV) bol produkovaný len 12 % kmeňov. V našej štúdiu síce FX produkovalo porovnateľne 88,7 % izolátov, no zároveň i počet producentov NIV bol pomerne vysoký (80 %). Všetky testované kmene boli zároveň schopné syntetizovať aurofuzarín (AUR) a beauvericín (BEA), čo uvádzajú i Logrieco et al. (2002) a Thrane (2001).

Izoláty druhu *F. graminearum* boli analyzované na schopnosť produkovať mykotoxíny uvedené v Tabuľke 6. V rámci štúdie boli testované 2 kmene na produkciu DON, no ich priemerné množstvo 37,1 µg.l<sup>-1</sup> bolo pomerne nízke. Navyše 10 kmeňov sa metódou TLC prejavilo negatívne. Je potrebné však brať na vedomie, že produkcia mykotoxínov je determinovaná nielen genetickými faktormi, ale aj podmienkami prostredia (Sudakin, 2003), ktoré sú ťažko ovplyvniteľné. Ďalším častým produktom tohto druhu je zearalenon (ZEA) (Bottalico et Perrone, 2002). Metódou TLC sa ukázala jeho pomerne častá produkcia testovanými izolátmi. Zo 48 kmeňov celkom 72,9 % syntetizovalo tento metabolit. Metódou LC/MS/MS boli sledované 2 kmene a 1 z nich sa ukázal ako vysoko produkčný (3 900,0 µg.l<sup>-1</sup>). Okrem ZEA a DON Desjardins (2006) tiež uvádza ako možné produkty aurofuzarín (AUR) a chlamydošporol (CHS), no nestratil sa s produkciou beauvericínu (BEA)

Tabuľka 5 Produkcia vybraných mykotoxínov kmeňmi *Fusarium poae*, izolovanými zo slovenskej pšenice na kvasničnom agare so sacharózou (YES) v sezónach 2006 až 2008, zistená metódou kvapalinovej chromatografie spojenej s tandemovou hmotnostnou spektrometriou (LC/MS/MS)

Mykotoxín	Počet testovaných kmeňov	% pozitívnych testov	Množstvo vyprodukovaného mykotoxínu (µg.l <sup>-1</sup> )		
			priemer	minimum	maximum
aurofuzarín	9	100,0	1213,9	8,3	5050,0
beauvericín	57	100,0	537,9	3,6	1910,0
diacetoxyscirpenol	57	100,0	3153,9	2,7	15800,0
fuzarenon X	53	88,7	271,6	0,0	3690,0
monoacetoxyscirpenol	53	96,2	683,3	0,0	5540,0
neosolaniol	50	98,0	220,0	0,0	1460,0
nivalenol	5	80,0	375,7	0,0	1860,0
T-2 toxín	24	29,0	4,2	0,0	36,0

**Tabuľka 6** Produkcia vybraných mykotoxínov kmeňmi druhu *Fusarium graminearum*, izolovanými zo pšenice slovenského pôvodu na kvasničnom agare so sacharózou (YES) v sezónach 2006 až 2008, zistená metódou kvapalinovej chromatografie spojenej s tandemovou hmotnostnou spektrometriou (LC/MS/MS)

Mykotoxín	Počet testovaných kmeňov	% pozitívnych testov	Množstvo vyprodukovaného mykotoxínu ( $\mu\text{g.l}^{-1}$ )		
			priemer	minimum	maximum
aurofuzarín	2	100,0	798,5	71,9	1525,1
diacetoxyscirpenol	2	100,0	37,1	22,4	51,7
equisetín	2	50,0	26450,0	0,0	52900,0
zearalenon	2	50,0	1950,0	0,0	3900,0

**Tabuľka 7** Produkcia vybraných mykotoxínov kmeňmi druhu *Fusarium avenaceum*, izolovanými zo pšenice slovenského pôvodu na kvasničnom agare so sacharózou (YES) v sezónach 2006 až 2008, zistená metódou kvapalinovej chromatografie spojenej s tandemovou hmotnostnou spektrometriou (LC/MS/MS)

Mykotoxín	Počet testovaných kmeňov	% pozitívnych testov	Množstvo vyprodukovaného mykotoxínu ( $\mu\text{g.l}^{-1}$ )		
			priemer	minimum	maximum
aurofuzarín	2	100,0	177911,0	80595,0	275227,0
eniatín A	2	100,0	1170,0	9,9	2330,0
eniatín A <sub>1</sub>	2	100,0	3986,8	173,5	7800,0
eniatín B	2	100,0	1182,5	770,0	1595,0
eniatín B <sub>1</sub>	2	100,0	5035,0	1120,0	8950,0
eniatín B <sub>2</sub>	2	100,0	3267,5	235,0	6300,0
eniatín B <sub>3</sub>	2	100,0	80,0	2,5	157,5
chlamydosporol	2	100,0	19950,0	18050,0	21850,0
moniliformín	2	50,0	996,5	0,0	1993,0

a moniliformínu (MON). To súhlasí s našimi výsledkami, s výnimkou CHS, ktorý metódou LC/MS/MS u 2 testovaných kmeňov nebol detegovaný. Zaujímavá bola tvorba equisetínu (EQU), s ktorým sme sa stretli u 1 z 2 testovaných kmeňov, a to vo vysokom množstve (52 900,0  $\mu\text{g.l}^{-1}$ ). So syntézou EQU izolátmi *F. graminearum* sme sa v literatúre doteraz nestretli, no mohlo sa jednať aj o nežiaducu kontamináciu.

Tretím najfrekvencovanejším druhom vo vzorkách pšenice bolo *F. avenaceum*, ktoré je známe predovšetkým syntézou moniliformínu (MON). Jeho produkcia izolátmi *F. avenaceum* bola za posledných vyše 20 rokov potvrdená v Európe, Severnej Amerike a Južnej Afrike (Abramson et al., 2001; Morrison et al., 2002; Rabie et al., 1982). Z celkového počtu 28 izolátov testovaných TLC metódou sa na prítomnosť MON prejavilo pozitívne 82,1 %. LC/MS/MS metódou boli sledované len 2 kmene a MON tvoril iba jeden z nich (1993,0  $\mu\text{g.l}^{-1}$ ). Podľa Bottalico et Perrone (2002) z výskumov vyplýva, že obsah MON v zrnách pšenice koreluje s výskytom izolátov tohto druhu. Ďalšími známymi metabolitmi *F. avenaceum* sú AUR, BEA, CHS a eniatíny (ENS) (Thrane, 2001). Uvedené látky, s výnimkou BEA, syntetizovali všetky nami testované kmene, a to v pomerne vysokých množstvách (Tabuľka 7). Preto i napriek tomu, že *F. avenaceum* neprodukuje trichotecény, zearalenony, alebo fumonizíny, mala by mu byť venovaná zvýšená pozornosť.

Zriedkavejšie alebo občasne len ojedinele vyskytujúce sa druhy fuzárií, ako sú *F. acuminatum*, *F. crookwellense*, *F. culmorum*, *F. equiseti*, *F.*

*langsethiae*, *F. oxysporum*, *F. proliferatum*, *F. sambucinum*, *F. semitectum*, *F. solani*, *F. sporotrichioides*, *F. subglutinans*, *F. tricinctum* a *F. verticillioides* (Mašková, 2010), samostatne síce nemusia vzbudzovať podozrenie na vysokú kontamináciu zrn toxickými metabolitmi, no spolu s ostatnými izolátmi iných druhov môžu prispievať k znižovaniu ich kvality a toxikologickej bezpečnosti. Andersen et Thrane (2006) uvádzajú, že viaceré druhy húb toho istého rodu, získané z jedného substrátu, môžu produkovať tie isté mykotoxíny (napr. trichotecény, produkované viacerými druhmi rodu *Fusarium* na obilninách). V Tabuľke 8 uvádzame metabolity, ktorých produkcia bola zaznamenaná pomocou LC/MS/MS. Tieto látky môžeme považovať za potenciálne kontaminanty pšenice. Rozdielny mykotoxikologický potenciál jednotlivých druhov, môže mať preto za následok prítomnosť širokého spektra mykotoxínov na obilninách.

Vzhľadom na to, že pri metóde LC/MS/MS neboli použité presné množstvá substrátu, uvedené výsledky nám nepodávajú definitívny údaj o potencii, ale slúžia skôr ako skríning. Táto metóda taktiež nezaručuje úplné vyextrahovanie požadovaných mykotoxínov v určitom čase, pretože môžu byť rôzne špecificky viazané, a preto môžeme predpokladať aj vyššie vyprodukované hladiny sledovaných mykotoxínov. Okrem toho podľa Andersen et Thrane (2006) je dôležité si uvedomovať, že mykotoxíny nakumulované v poľných podmienkach alebo v skorých obdobiach skladovania sú odolné voči skladovacím podmienkam i technologickému spracovaniu zrn počas výroby potravín, či krmív.

**Tabuľka 8** Druhy rodu *Fusarium* a ich toxické metabolity, ktorých produkcia bola zistená pomocou LC/MS/MS, pri *in vitro* analýzach izolátov získaných zo pšenice

Druh	Potenciálny toxický metabolit
<i>F. acuminatum</i>	AUR <sup>1</sup>
<i>F. crookwellense</i>	AUR <sup>1</sup> , ZEA <sup>15</sup>
<i>F. culmorum</i>	AUR <sup>1</sup> , DON <sup>3</sup> , ZEA <sup>15</sup>
<i>F. equiseti</i>	BEA <sup>2</sup>
<i>F. langsethiae</i>	AUR <sup>1</sup> , DAS <sup>4</sup> , ENS <sup>5</sup> , CHS <sup>10</sup> , MAS <sup>12</sup> , MON <sup>11</sup>
<i>F. oxysporum</i>	AUR <sup>1</sup> , BEA <sup>2</sup> , DAS <sup>4</sup> , DON <sup>3</sup> , HT-2 <sup>9</sup> , NEO <sup>13</sup> , T-2 <sup>14</sup>
<i>F. proliferatum</i>	BEA <sup>2</sup> , DAS <sup>4</sup> , EQU <sup>5</sup> , FUM <sup>7</sup> B <sub>1</sub> , FUM <sup>7</sup> B <sub>2</sub> , FUM <sup>7</sup> B <sub>3</sub> , FX <sup>8</sup> , MAS <sup>12</sup> , MON <sup>11</sup> , NEO <sup>13</sup>
<i>F. semitectum</i>	BEA <sup>2</sup> , DAS <sup>4</sup> , HT-2 <sup>9</sup> , CHS <sup>10</sup> , MAS <sup>12</sup> , NEO <sup>13</sup> , T-2 <sup>14</sup>
<i>F. solani</i>	AUR <sup>1</sup> , DON <sup>3</sup> , ZEA <sup>15</sup>
<i>F. sporotrichioides</i>	AUR <sup>1</sup> , BEA <sup>2</sup> , CHS <sup>10</sup>
<i>F. subglutinans</i>	AUR <sup>1</sup> , BEA <sup>2</sup> , DON <sup>3</sup> , ZEA <sup>15</sup>
<i>F. tricinctum</i>	AUR <sup>1</sup> , ENS <sup>5</sup> , CHS <sup>10</sup> , MON <sup>11</sup>
<i>F. verticillioides</i>	MON <sup>11</sup>

<sup>1</sup>aurofuzarín, <sup>2</sup>beauvericín, <sup>3</sup>deoxynivalenol, <sup>4</sup>diacetoxyscirpenol, <sup>5</sup>enniatiín, <sup>6</sup>equisetín, <sup>7</sup>fumonizín, <sup>8</sup>fuzarenon-X, <sup>9</sup>HT-2 toxín, <sup>10</sup>chlamydosporol, <sup>11</sup>moniliformín, <sup>12</sup>monoacetoxyscirpenol, <sup>13</sup>neosolaniol, <sup>14</sup>T-2 toxín, <sup>15</sup>zearalenon

## ZÁVER

Výsledky štúdie poukazujú na to, že zástupcovia poľných mikromycét rodov *Alternaria* a *Fusarium* na zrnách pšenice predstavujú reálne riziko prítomnosti mykotoxínov. Obilniny sa samozrejme len zriedkakedy využívajú na konzum v ich prirodzenom stave. Rôznymi spôsobmi sa spracovávajú a každý krok pri úprave pred spracovaním a mletím redukuje populácie mikroorganizmov. Avšak i napriek tomu je možný značný prenos mykotoxínov, pretože sú rezistentné na čistenie zrn, mletie, varenie, pečenie a iné technologické operácie.

Nami testované izoláty sa preukázali ako potenciálni producenti viacerých toxických metabolitov a vzhľadom na ich frekventovaný výskyt predstavujú vážne riziko kontaminácie pšeničných zrn nebezpečnými mykotoxínmi. Všetky izoláty rodu *Alternaria* analyzované v tejto štúdii (s výnimkou izolátov skupiny *A. infectoria*) sa preukázali ako vysoko toxigénne, t.j. produkujúce mykotoxíny alternáriol, alternáriol monometyléter a altenuén. Mykotoxíny rodu *Fusarium* sú už tradične spájané s obilninami mierneho pásma, čo sa potvrdilo i v našej štúdii. Najčastejšie sa vyskytujúce druhy na obilninách slovenského pôvodu (*F. avenaceum*, *F. graminearum* a *F. poae*) preukázali v podmienkach *in vitro* produkčný potenciál tvoriť trichotecény, zearalenony, fumonizíny a moniliformín. Okrem „tradičných“ mykotoxínov bolo množstvo analyzovaných kmeňov schopných produkovať aj iné sekundárne toxické metabolity, ktoré vstúpili do povedomia až v posledných rokoch. Bola zaznamenaná produkcia aurofuzarínu, beauvericínu, enniatiínov,

equisetínu, či chlamydosporolu. Až doposiaľ je o týchto metabolitoch a ich produkcii k dispozícii len obmedzené množstvo informácií, čo je spôsobené až ich neskorším zaradením medzi mykotoxíny.

Prevedené analýzy toxigenity extraktov z čistých kultúr mikromycét nám indikujú ich vysoký produkčný potenciál a poskytujú nám prehľad o širokom spektre produkovaných metabolitov. V záujme dosiahnutia bezpečnosti potravín na báze obilnín, je nevyhnutné venovať veľkú pozornosť mykotoxínom, detegovaným v predloženej práci v podmienkach *in vitro*.

## LITERATÚRA

- ABRAMSON, D., CLEAR, R. M., GABA, D., SMITH, D. M., PATRICK, S. K., SAYDAK, D. 2001. Trichothecene and moniliformin production by *Fusarium* species from western Canadian wheat. In *Journal of Food Protection*, 2001, vol. 64, p. 1220-1225.
- ANDERSEN, B., KROGER, E., ROBERTS, R. G. 2002. Chemical and morphological segregation of *Alternaria arborescens*, *A. infectoria* and *A. tenuissima* species-groups. In *Mycological Research*, 2002, vol. 106, p. 170-182.
- ANDERSEN, B., THRANE, U. 1996. Differentiation of *Alternaria infectoria* and *Alternaria alternata* based on morphology, metabolite profiles and cultural characteristics. In *Canadian Journal of Microbiology*, 1996, vol. 42, p. 685-689.
- ANDERSEN, B., THRANE, U. 2006. Food-borne fungi in fruit and cereals and their production of mycotoxins. In *Hocking, A. D., Pitt, J. I., Samson, R. A., Thrane, U. 2006. Advances in Food Mycology*, 2006, vol. 571, p. 137-152.
- BERGHOFER, L. K., HOCKING, A. D., MISKELLY, D., JANSSON, E. 2002. Microbiology of wheat and flour milling in Australia. In *International Journal of Food Microbiology*, 2002, vol. 85, p. 137-149.
- BOTTALICO, A., LOGRIECO, A. 1992. *Alternaria* plant diseases in Mediterranean countries and associated mycotoxins. In *Chelkowski, J., Visconti, A., 1992. Alternaria Biology, Plant Diseases and Metabolites*. Elsevier : London, 1992, 564 p. ISBN 0-444-88998-1.
- BOTTALICO, A., PERRONE, G. 2002. Toxigenic *Fusarium* species and mycotoxins associated with head blight in small-grain cereals in Europe. In *European Journal of Plant Pathology*, 2002, vol. 108, p. 611-624.
- DESJARDINS, A. E. 2006. *Fusarium Mycotoxins. Chemistry, Genetics, and Biology*. St. Paul : The American Phytopathological Society, 2006, 260 p. ISBN 0-89054-335-6.
- DIAZ, D. 2005. *The mycotoxin Blue Book*. University Press : Nottingham, 2005, 349 p. ISBN 1-904761-19-4.
- CHIELKOWSKI, J., VISCONTI, A. 1992. *Alternaria – Biology, Plant Diseases and Metabolites*. London : Elsevier, 1992, 573 p. ISBN 0-444-88998-1.
- CHRISTENSEN, K. B., VAN KLINK, J. W., WEAVERS, R. T., LARSEN, T. O. ANDERSEN, B., PHIPPS, R. K. 2005. Novel chemotaxonomic markers of the *Alternaria infectoria* species-group. In *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2005, vol. 53, p. 9431-9435.
- IVANOVA, L., PETERSEN, D., UHLIG, S. 2010. Phomenins and fatty acids from *Alternaria infectoria*. In *Toxicon*, 2010, vol. 55, p. 1007-1114.
- JESENSKÁ, Z. 1987. *Mikroskopické huby v požívatinách a v krmivách*. Bratislava : Alfa, 1987, 319 p.

- LABUDA, R., TANČINOVÁ, D. 2006. Fungi recovered from Slovakian poultry feed mixtures and their toxinogenicity. In *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 2006, vol. 13, p. 193-200.
- LACEY, J. 1989. Pre- and post-harvest ecology of fungi causing spoilage of foods and other stored products. In *Journal of Applied Bacteriology Supplement*, 1989, vol. 67, p. 11 – 25.
- LARSEN, T. O., PERRY, N. B., ANDERSEN, B. 2003. Infectopyrone, a potential mycotoxin from *Alternaria infectoria*. In *Tetrahedron Letters*, 2003, vol. 44, p. 4511-4513.
- LOGRIECO, A., MORETTI, A., RITIENI, A., CAIFFA, M. F., MACCHIA, L., 2002. Beauvericin: chemistry, biology and significance. In *Upadhyay, R. K. 2002. Advances in Microbial Toxin Research and Its Biotechnological Exploitation*. New York : Kluwer Academic/Plenum Publishers, p. 23–30.
- MAGAN, N., LACEY, J. 1988. Ecological determinants of mould growth in stored grain. In *International Journal of Food Microbiology*, Vol. 7, 1988, no. 3, p. 245-256.
- MAŠKOVÁ, Z., TANČINOVÁ, D. 2009. Spektrum mikromycét rodu *Alternaria* izolovaných zo pšenice slovenského pôvodu v sezóne 2008. In *IV. Vedecká konferencia doktorandov s medzinárodnou účasťou*. Nitra : SPU, 2009, p. 293 – 296.
- MAŠKOVÁ, Z. 2010. Štúdium mikroskopických húb rodov *Alternaria* a *Fusarium* a ich toxických metabolitov v pšenici (*Triticum aestivum* L.) : dizertačná práca. Nitra : SPU, 2010, 165 p.
- MEDINA, Á., VALLE-ALGARRA, F. M., MATEO, R., GIMENO-ADELANTADO, J. V., MATEO, F., JIMÉNEZ, M. 2006. Survey of the mycobiota of Spanish malting barley and evaluation of the mycotoxin producing potential of species of *Alternaria*, *Aspergillus* and *Fusarium*. In *International Journal of Food Microbiology*, 2006, vol. 108, no. 2, p. 196-203.
- MORRISON, E., KOSIAK, B., RITIENI, A., AASTVEIT, A. H., UHLIG, S., BERNHOFT, A. 2002. Mycotoxin production by *Fusarium avenaceum* strains isolated from Norwegian grain and the cytotoxicity of rice culture extracts to porcine epithelial cells. In *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2002, vol. 50, p. 3070-3075.
- MOSS, M. O., THRANE, U., 2004. *Fusarium* taxonomy with relation to trichothecene formation. In *Toxicology Letters*, 2004, vol. 153, p. 23-28.
- MUBATANHEMA, W., MOSS, M. O., FRANK, M. J., WILSON, D. M. 1999. Prevalence of *Fusarium* species of the *Liseola* section on Zimbabwean corn and their ability to produce the mycotoxins zearalenone, moniliformin and fumonisin B1. In *Mycopathologia*, 1999, vol. 148, p.157-163.
- OSTRÝ, V., ŠKARKOVÁ, J., NEDĚLNÍK, J., RUPRICH, J., MORAVCOVÁ, H. 2005. Occurrence of *Alternaria* and *Fusarium* mycotoxins in winter wheat from domestic crop in year 2003. In *Mycotoxin Research*, 2005, vol. 21, p. 23-25.
- PIOVARČIOVÁ, Z., LABUDA, R., TANČINOVÁ, D. 2007. Výskyt *Alternaria* spp. na zrnách potravinárskej pšenice dopestovanej na Slovensku v sezóne 2006. In *Sborník příspěvků z workshopu MICROMYCO 2007*. České Budejovice : Ústav půdní biologie, 2007, p. 124-132.
- PITT, J. I., HOCKING, A. D. 1997. *Fungi and food spoilage*. London : Blackie Academic & Professional, 1997, 593 p. ISBN 0-8342-1306-0.
- PITT, J. I., HOCKING, A. D. 1999. *Fungi and Food Spoilage*. 2. vyd. Maryland: An Aspen Publication, 1999, 593 p. ISBN 0-8342-1306-0.
- RABIE, C. J., MARASAS, W. F. O., THIEL, P. G., LÜBBEN, A., VLEGGAAR, R. 1982. Moniliformin production and toxicity of different *Fusarium* species from southern Africa. In *Applied and Environmental Microbiology*, 1982, vol. 43, p. 517-521.
- RAMOS, A. J., LABERNIA, N., MARÍN, S., SANCHIS, V., MAGAN, N. 1998. Effect of water activity and temperature on growth and ochratoxin production by three strains of *Aspergillus ochraceus* on a barley extract medium and on barley grains. In *International Journal of Food Microbiology*, 1998, vol. 44, p. 133-140.
- SAMSON, R. A., HOEKSTRA, E. S., FRISVAD, J. C., FILTENBORG, O. 2002a. *Introduction to food- and airborne fungi*. Utrecht : Centraalbureau voor Schimmelcultures, 2002, 389 p., ISBN 90-70351-42-0.
- SAMSON, R. A., HOEKSTRA, E. S., LUND, F., FILTENBORG, O., FRISVAD, J.C. 2002b. Method for the detection, isolation and characterisation of food-borne fungi. In: *Samson, R. A., Hoekstra, E. S., Frisvad, J. C. & Filtenborg, O. Introduction to food- and airborne fungi*. Utrecht : Centraalbureau voor Schimmelcultures, 2002, p. 283-297. ISBN 90-70351-42-0.
- SCOTT, P. M. 2001. Analysis of agricultural commodities and foods for *Alternaria* mycotoxins. In *Journal of AOAC International*, 2001, vol. 84, p. 1809-1817.
- SCHRADER, T. J., CHERRY, W., SOPER, K., LANGLOIS, I., VIJAY, H. M. 2001. Examination of *Alternaria alternata* mutagenicity and effects of nitrosylation using the Ames Salmonella test. In *Teratogens, Carcinogens and Mutagens*, 2001, vol. 21, p. 261-274.
- SORENSEN, J. L. 2009. Preharvest fungi and their mycotoxins in maize : dizertačná práca. Lyngby : Center for Microbial Biotechnology, 2009. ISBN 978-87-91494-68-0.
- SUDAKIN, D. L. 2003. Trichothecenes in the environment: relevance to human health. In *Toxicology Letters*, vol. 143, 2003, p. 97-107.
- SULYOK, M., BERTILLER, F., KRŠKA, R., SCHUHMACHER, R., 2006. Development and validation of a liquid chromatography / tandem mass spectrometric method for the determination of 39 mycotoxins in wheat and maize. In *Rapid communications in mass spectrometry*, 2006, vol. 20, p. 2649-2659.
- THRANE, U. 1986. Detection of toxigenic *Fusarium* isolates by thin layer chromatography. In *Letters in Applied Microbiology*, 1986, vol. 3, p. 93-96.
- THRANE, U. 2001. Developments in the taxonomy of *Fusarium* species based on secondary metabolites. In *Summerell, B. A., Leslie, J. F., Backhouse, D., Bryden, W. L., Burgess, L. W. 2001. Fusarium: Paul E. Nelson Memorial Symposium*. St. Paul : American Phytopathological Society, 2001, p. 29-49.
- THRANE, U., ADLER, A., CLASEN, E., GALVANO, F., LANGSETH, W., LEW, H., LOGRIECO, A., NIELSEN, K. F., RITIENI, A. 2004. Diversity in metabolite production by *Fusarium langsethiae*, *Fusarium poae*, and *Fusarium*

*sporotrichioides*. In *International Journal of Food Microbiology*, vol. 95, 2004, no. 3, p. 257-266.

TORP, M., NIRENBERG, H. I., 2004. *Fusarium langsethiae* sp. nov. on cereals in Europe. In *International Journal of Food Microbiology*, 2004, vol. 95, p. 247-256.

WEBLEY, D. J., JACKSON, K. L., MULLINS, J. D., HOCKING, A. D., PITT, J. I. 1997. *Alternaria* toxins in weather-damaged wheat and sorghum in the 1995-1996 Australian harvest. In *Australian Journal of Agricultural Research*, 1997, vol. 48, p. 1249-1255.

WEIDENBÖRNER, M. 2001. *Encyclopedia of Food Mycotoxins*. Springer : London, 2001, 294 p., ISBN 3540675566.

### Pod'akovanie:

Práca bola financovaná projektom VEGA 1/0282/10. Pod'akovanie patrí doc. Ing. Romanovi Labudovi, PhD. za jeho cenné rady a Ass. Dr. Michaelovi Sulyokovi za analýzy pomocou LC/MS/MS.

### Contact address:

Ing. Zuzana Mašková, PhD., Department of Microbiology, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Slovak University of Agriculture, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovakia, E-mail: zuzana.maskova@uniag.sk

doc. Ing. Dana Tančinová, PhD., Department of Microbiology, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Slovak University of Agriculture, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovakia, E-mail: dana.tancinova@uniag.sk

Ing. Zuzana Barboráková, Department of Microbiology, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Slovak University of Agriculture, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovakia, E-mail: zuzana.barborakova@uniag.sk

Ing. Michal Mokry, Department of Microbiology, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Slovak University of Agriculture, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovakia, E-mail: michal.mokry@sk.nestle.com



**APPLICATION OF WESTERN BLOT ANALYSIS FOR DETECTION OF PROLAMIN PROTEINS IN CEREAL GRAINS AND BREAD.***Peter Socha, Barbara Mickowska, Elżbieta Mazur, Dana Urminská, Ewa Cieřlik***ABSTRACT**

Celiac disease is an inflammatory condition of the small intestine in genetically susceptible individuals caused by ingestion of wheat gluten and corresponding proteins from barley and rye. Cereal storage proteins (prolamins) are responsible for immunological response of patients with celiac disease. Prolamins are alcohol soluble fractions, namely gliadins (wheat), hordeins (barley) and secalins (rye). The main triggering factor is wheat fraction with low molecular weight (20-30 kDa) called  $\alpha$ -gliadins. Immunochemical detection of celiac active proteins is based on reactivity of gluten-detecting antibodies with prolamins extracted from cereals. In our study, we used Western blot analysis for detection of prolamins complex in cereal grains and processed foods (breads). Western blot was carried out by polyclonal antibody raised against wheat gluten. Reaction was positive for all kind of cereal grains. The samples of wheat and spelt wheat show much more positive affinity to antibody than rye and oat. As well as for cereal grains, all samples of bread showed positive immunological reaction with used antibody. Western blot analysis with gluten polyclonal antibody is suitable method for qualitative detection of prolamins complex in cereal grains and processed foods.

**Keywords:** Western blot, prolamins, cereal, celiac disease

---

**ÚVOD**

Obilniny tvoria najvýznamnejšiu skupinu plodín rastlinnej výroby na celom svete, pretože sú hlavným zdrojom energie a bielkovín a tiež poskytujú mnoho ďalších nutrične významných látok. Bielkoviny obilnín sú obyčajne klasifikované na základe ich rozpustnosti na: albumíny rozpustné vo vode, globulíny rozpustné v roztokoch solí, prolamíny rozpustné v alkohole a glutelíny rozpustné v zriedených roztokoch kyselín a zásad (Ciccocioppo et al., 2005; Yalçin, 2010). Prolamíny sú zásobné bielkoviny endospermu zrna cereálií (hlavne pšenice, raže a jačmeňa), pričom tvoria až 30-50 % z celkového obsahu bielkovín (Yalçin, 2010). V pšenici sa prolamíny nazývajú gliadíny, v jačmeni hordeíny, v raži sekalíny a v ovse aveníny. Glutelíny sa v pšenici nazývajú gluteníny. Hlavný rozdiel medzi gliadínmi a glutenínmi pšenice je v analýze ich funkčnosti. Gliadíny sú monoméne polypeptidové reťazce s molekulovou hmotnosťou 30-80 kDa a gluteníny sú viaceréazcové štruktúry polypeptidov navzájom pospájané disulfidickými väzbami s molekulovou hmotnosťou 15-150 kDa (Weber et al., 2009; van Eckert et al., 2010). Vaccino et al. (2009) rozčleňujú prolamíny do troch skupín: prolamíny chudobné na síru, prolamíny bohaté na síru a vysokomolekulárne (HMW) prolamíny. Prolamíny chudobné na síru sú tvorené prevažne  $\omega$ -gliadínmi, pričom obsahujú malé množstvo alebo žiadne cysteínové zvyšky. Prolamíny bohaté na síru sú tvorené prevažne  $\alpha/\beta$ - a  $\gamma$ -gliadínmi. HMW prolamíny pozostávajú z HMW glutenínových podjednotiek. Je všeobecne známe, že prolamíny sú hlavným spúšťajúcim faktorom celiakálneho ochorenia (Hill, McMillan, 2006).

Celiakálne ochorenie je jednou z najčastejšie sa vyskytujúcich vážnych potravinových intolerancií v ekonomicky vyspelých krajinách a vzniká ako dôsledok príjmu pšeničných, ražných, jačmenných a možných ovsených produktov v spojení s genetickou

predispozíciou u detí a dospelých (Ciacci et al., 2002; Wieser, Koehler, 2008). Celiakia sa môže vyskytnúť v akomkoľvek veku, pričom klinický prejav je rôzny, od subklinických až po ťažké symptómy. Hoci ochorenie primárne poškodzuje tenké črevo, vyskytovať sa môžu rozličné gastrointestinálne a extraintestinálne manifestácie (Hill, McMillan, 2006). Jedinou efektívnou liečbou celiakálneho ochorenia je celoživotná bezlepková diéta. Pacienti musia z potravy vylúčiť všetky výrobky z cereálií, ktoré obsahujú múku z pšenice (vrátane pšenice kamut, tvrdej a špaldovej), raže, jačmeňa, triticale a ovsa (Pruska-Kędzior et al., 2008). Podľa Codex Alimentarius Commission, ktorý bol v roku 2008 zrevidovaný, sú bezlepkové potraviny (tzv. „gluten-free“) definované ako potraviny obsahujúce menej než 20 ppm ( $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) bielkovín z pšenice, jačmeňa, raže a/alebo akýchkoľvek ich hybridných druhov (Weber et al., 2009). Naopak, vhodnými pre potreby bezlepkovej diéty sú niektoré ďalšie plodiny, pričom najčastejšie využívanými sú kukurica, ryža a sója. V súčasnej dobe sa pre potreby bezlepkovej diéty stále väčšia pozornosť venuje využívaniu tzv. pseudocereálií, a to pre ich nízky obsah prolamínovej frakcie a naopak vysoký obsah plnohodnotných bielkovín, tukov, minerálnych a balastných látok a obsahu škrobu. Môžu sa využívať aj ako čiastočná náhrada chlebového obilia (Zingone et al., 2010).

Prolamínové bielkoviny sa vyznačujú niekoľkými unikátnymi vlastnosťami, ktoré prispievajú k ich imunogenicite. Sú bohaté na aminokyseliny prolín a glutamín. Vďaka vysokému obsahu prolínu sú prolamíny relatívne rezistentné voči proteolyze v gastrointestinálnom trakte z dôvodu nedostatočnej post-prolínovej štiepiacej aktivity. Navyše, vysoký obsah glutamínu činí z prolamínov dobrý substrát pre enzým tkanivovú transglutaminázu (tTG). Prolamínové bielkoviny sú známe aj tým, že kódujú mnoho peptidov, ktoré sú schopné stimulovať T-bunky a vrodenu imunitnú reakciu. Najznámejší je 33-merný imunodominantný gliadínový peptid pozostávajúci z 33 zvyškov aminokyselín (56-88), ktorý je po deaminácii

enzýmom tTG významným stimulátorom T-buniek (Arendt, Dal Bello, 2008).

Pšeničné gliadíny a gluteníny plnia významnú úlohu aj z hľadiska reologických vlastností cesta, pričom ich funkcia je odlišná. Hydratované gliadíny sú viac elastickejšie a menej kohézne ako gluteníny a majú predovšetkým vplyv na viskozitu (rozťažnosť) cesta. Hydratované gluteníny sú kohézne, aj elasticke a sú zodpovedné za pevnosť a elasticitu cesta (Starovičová et al., 2003; Wieser, 2007). Takto hydratované gliadíny a gluteníny majú schopnosť vytvárať súvislú lepkavú mriežkovitú štruktúru, označovanú ako lepok (glutén). Tento jav je dôležitý z hľadiska prípravy kysnutého cesta a pečených produktov (Petr et al., 2003).

Pšeničná múka, ktorá sa získava z prevažnej časti endospermu zrna pšenice, slúži k výrobe rôznych produktov, napr. chleba, cestovín a pod. Obsahuje okolo 80 % celkových bielkovín zrna, z ktorých väčšinu predstavujú lepkové bielkoviny, gliadíny a gluteníny (Shewry, Halford, 2002). Kvalitu pšeničnej múky, rovnako ako aj visko-elastické a ťažné vlastnosti pšeničného cesta determinuje práve komplex glutenínov a gliadínov (Xie et al., 2010). Za technologické vlastnosti pečených produktov, najmä chleba, sú zodpovedné opäť spomínané lepkové bielkoviny (Sciarini et al., 2010).

Dôležitým kritériom pre stanovenie prítomnosti a obsahu prolaminov v zrne cereálií je výber vhodnej analytickej metódy (Ebo, Stevens, 2001). Základnými metódami pre stanovenie prítomnosti prolaminov sú frakcionácia cereálnych bielkovín na základe ich rozdielnej rozpustnosti v rôznych rozpúšťadlách a elektroforetická separácia bielkovín v polyakrylamidových géloch, SDS-PAGE a A-PAGE (Urminská et al., 2009). Tieto metódy sú však nepostačujúce na dôkladnú analýzu prolaminového komplexu zrna cereálií a preto sa v súčasnosti čoraz viac do popredia dostávajú imunochemické metódy, ako je napr. ELISA (enzýmová imunoabsorbentná analýza) a imunoblotting po SDS-PAGE (Battais et al., 2003). Tieto metódy poskytujú dôležité informácie, ako pre medicínsky výskum, tak aj pre oblasť cereálnej chémie. Poukazujú na imunoafinitu prolaminových bielkovín k sérovým protilátkam a na vzťahy medzi štruktúrnymi vlastnosťami bielkovín a ich alergenicitou (Waga, Zientarski, 2007).

Cieľom práce bolo stanoviť vhodnosť použitia metódy Western blotu s využitím polyklonálnej anti-gluténovej protilátky na kvalitatívnu detekciu prolaminovej frakcie bielkovín zrna cereálií a na identifikáciu prolaminov v hotovom výrobku, konkrétne v chlebe.

### MATERIÁL A METODIKA

Biologický materiál bol získaný z Katedry sacharidových technológií, Fakulty potravinových technológií, Poľnohospodárskej univerzity v Krakove (Poľsko).

Na analýzy boli použité:

1. zrná cereálií: pšenica letná (*Triticum aestivum L.*) – odroda Sakwa, pšenica špaldová (*Triticum spelta L.*) – odroda Schwabenkorn, odroda Jary B10 a obchodná bez špecifikácie odrody, raž siata (*Secale cereale L.*) –

odroda Amilo, ovos siaty (*Avena sativa L.*) – odroda Polar;

2. chleby z pšenice letnej (*Triticum aestivum L.*) a pšenice špaldovej (*Triticum spelta L.*): zmes pšeničnej miešanky BIO I. a BIO II. dostupná v obchodnej sieti, špaldový chlieb z odrody Oberkulmer Rothkorn, špaldový chlieb z odrody Frankienkorn a dva špaldové chleby z múky dostupnej v obchodnej sieti.

Vzorky zrn cereálií a chlebov boli zomleté na celozrnný šrot na laboratórnom mlyne.

Extrakcia bielkovín zo zrna cereálií a chlebov bola realizovaná pomocou magnetického miešadla s 15 ml rozpúšťadla na 1g vzorky po dobu 1 hod. pri laboratórnej teplote. Albumíny a globulíny boli extrahované 0,5 mol.dm<sup>-3</sup> NaCl (dvakrát po sebe), zvyšky NaCl boli premyté destilovanou vodou a prolaminové boli extrahované 70 % etanolom. Supernatant bol zakaždým centrifugovaný a prolaminové lyofilizované.

SDS-PAGE prolaminov bola vykonaná podľa metodiky Schägger a von Jagov (Schägger, von Jagov, 1987). Elektrotransfer bielkovín na PVDF membránu ImmobilonP<sup>SQ</sup> prebiehal 1,5 hod. pri 170 mA s použitím tmivého roztoku CAPS podľa postupu výrobcu (Millipore, USA). Bielkoviny na membráne boli vizualizované pomocou reverzibilnej farby Ponceau S.

Western blot bol realizovaný nasledovne:

1. blokovanie membrány 1 hod. (1% hovädzi sérový albumín v TBS; pH 7,6)
2. premytie membrány pomocou TBS 4-krát po dobu 15 min.
3. inkubácia s primárnou protilátkou 1,5 hod. (riedenie 1:1000)
4. premytie membrány pomocou TBS 5-krát po dobu 15 min.
5. inkubácia so sekundárnou protilátkou 1 hod. (riedenie 1:2000)
6. premytie membrány pomocou TBS 6-krát po dobu 15 min.
7. detekcia bielkovín na membráne pomocou 3,3'-diaminobenzidínu podľa odporúčania výrobcu (Sigma, USA)

Primárna anti-gluténová polyklonálna protilátka proti pšeničnému gluténu bola od firmy USBiological (USA) a sekundárna HRP protilátka, pripravená imunizáciou králikov, pochádzala od firmy BD Pharmingen (USA).

### VÝSLEDKY A DISKUSIA

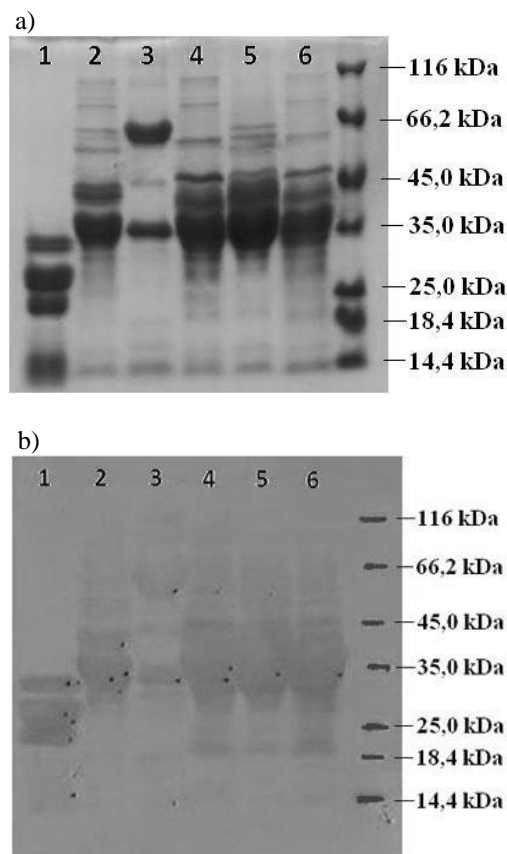
V práci boli analyzované prolaminové frakcie bielkovín, extrahované zo zrna vybraných cereálií a chlebov, a to pomocou imunologickej metódy Western blotting. Izolované prolaminové boli separované na polyakrylamidovom géli prostredníctvom SDS-PAGE a vizualizované pomocou Coomassie Brilliant Blue. Po elektrotransfere prolaminov z gélu na PVDF membránu boli farbené reverzibilnou farbou Ponceau S. Membrána s naviazanými prolaminmi bola najprv inkubovaná s primárnou anti-gluténovou protilátkou a následne so sekundárnou protilátkou značenou enzýmom chrenovou peroxidázou. Po imunoblottingu boli prolaminové vizualizované pomocou 3,3'-diaminobenzidínu. Fragmenty bielkovín na membráne sa porovnávali s detekovanými bielkovinami na polyakrylamidovom géli.

Analýzou vzoriek pšeníc *Triticum aestivum* a *Triticum spelta* sa zistilo, že separované prolamíny sa svojou molekulovou hmotnosťou výrazne od seba neodlišujú (obrázok 1a). V pšenici špaldovej sú fragmenty výraznejšie ako v pšenici letnej. Na základe použitého markera pre SDS-PAGE je možné stanoviť molekulové hmotnosti jednotlivých prolamínových frakcií. Van Eckert et al. (2010) udávajú, že molekulové hmotnosti gliadínov sú nasledovné: 32 kDa pre  $\alpha$ -gliadíny, 38-42 kDa pre  $\gamma$ -gliadíny, 55-79 kDa pre  $\omega$ -gliadíny. Bielkoviny s molekulovou hmotnosťou vyššou ako 90 kDa sú HMW glutenínové podjednotky. V tejto gliadínovej frakcii sú prítomné celiakálne aktívne epitopy a vo vzťahu k celiakii je najviac riziková frakcia s molekulovou hmotnosťou okolo 20-30 kDa, nazývaná  $\alpha$ -gliadíny (Petr et al., 2003; Urminská et al., 2009). Práve tieto  $\alpha$ -gliadíny sú vo veľkom množstve zastúpené ako v pšenici letnej, tak aj v troch analyzovaných vzorkách pšenice špaldovej. Pri posudzovaní reakcie blotovaných bielkovín s polyklonálnou protilátkou je možné konštatovať, že všetky prolamínové frakcie pšeníc s molekulovou hmotnosťou vyššou ako  $\approx$  20 kDa vysoko pozitívne reagovali a boli vizualizované na membráne. Imunologická reakcia nebola pozorovaná pri frakciách s nižšou molekulovou hmotnosťou (< 20 kDa), ktoré nereagovali s protilátkou (obrázok 1b). Na základe získaných výsledkov sa potvrdilo, že pšenica (vrátane pšenice špaldovej) obsahuje vysoké koncentrácie celiakálne aktívnych bielkovín.

Prolamíny raže (*Secale cereale* L.) sa skladajú z dvoch hlavných fragmentov veľkých približne 35 kDa a 66 kDa, čo poukazuje na prítomnosť bielkovín typu  $\alpha$ -gliadínov (35 kDa) a tiež  $\omega$ -gliadínov (66 kDa), ktoré sú v pšenici menej výrazné (obrázok 1a). Prolamínové frakcie raže vykázali slabšiu afinitu k použitej polyklonálnej protilátke, ako tomu bolo v prípade pšeničných bielkovín. Napriek tomu, že bola imunologická reakcia slabšia, protilátka detegovala prítomnosť celiakálne aktívnych bielkovín aj v raži (obrázok 1b).

Ovos siaty (*Avena sativa* L.) ako jediná analyzovaná cereália obsahoval prolamínové frakcie s molekulovou hmotnosťou nižšou ako 35 kDa (obrázok 1a). Reakciou s polyklonálnou protilátkou boli aj v ovse detegované alergénne peptidy (obrázok 1b), napriek tomu, že viacerí autori (Størsrud et al., 2003; Arentz-Hansen et al., 2004) tvrdia, že bielkoviny ovsu nemajú epitopy, ktoré vyvolávajú celiakiu. Napríklad monoklonálna protilátka R5 používaná pri sendvičovej ELISA analýze reaguje iba s prolamínmi pšenice, jačmeňa a raže a nevykazuje žiadnu krížovú reakciu s bielkovinami ovsu a tiež kukurice, ryže, prosa, pohánky, quinoi a láskavca (Petr et al., 2003). Polyklonálne protilátky majú väčší počet väzobných miest pre rozpoznávanie epitopov bielkovín, čiže existuje pri nich väčšia pravdepodobnosť vzniku krížových reakcií. Podľa niektorých autorov je konzumácia čistých ovsených produktov bezpečná pre pacientov s celiakiou, kým názory ďalších autorov sú rozdielne a výrobky z ovsu vylučujú z bezpečkovej diéty. Silano et al. (2007) vo svojej práci uviedli, že ovos je bezpečný pre celiatikov a môže byť zahrnutý do bezpečkovej diéty. Podobne, Janatuinen et al. (1995 a 2002) vo svojej štúdií uviedli, že ovos bol veľmi dobre

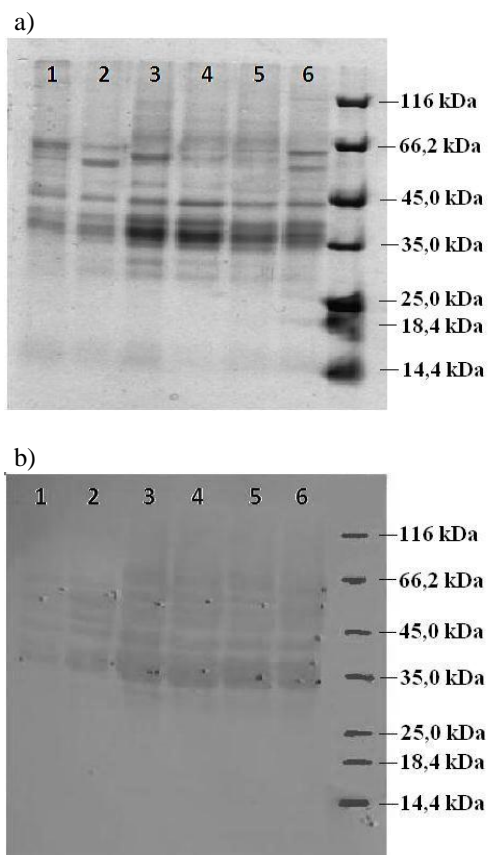
tolerovaný celiatikmi, nebol príčinou histologických zmien a neindukoval imunitnú reakciu. Petr et al. (2003) uvádza, že ovos môže byť zaradený do výživy celiatikov pre priaznivé zloženie bielkovinových frakcií a plnohodnotnejšie aminokyselinové zloženie ako majú bielkoviny pšenice, raže a jačmeňa. Naproti tomu, Lundin et al. (2003) pozorovali u niektorých pacientov s celiakiou konzumujúcich ovos čiastočnú atrofiu klkov a prítomnosť T-buniek reaktívnych voči avenínom ovsu.



Obrázok 1 (a) SDS-PAGE elektroforéza a (b) Western blot prolamínov ovsu siateho (*Avena sativa* L.), raže siatej (*Secale cereale* L.), pšenice letnej (*Triticum aestivum* L.) a pšenice špaldovej (*Triticum spelta* L.): 1. ovos Polar, 2. pšenica letná Sakwa, 3. raž Amilo, 4. pšenica špaldová Jary B10, 5. pšenica špaldová – obchodná, 6. pšenica špaldová Schwabenkorn.

Pomocou metódy Western blot boli analyzované aj prolamínové frakcie bielkovín v chlebe, a to v chlebe pripravenom zo zmesi múk pšenice letnej a pšenice špaldovej a chleby pripravené iba zo špaldovej múky. Elektroforetickou analýzou sa zistilo, že prolamínové fragmenty na polyakrylamidovom géli boli menej výraznejšie, a v menšom množstve, v porovnaní s prolamínmi izolovanými zo zrna cereálií (obrázok 2a). Pravdepodobnou príčinou je enzymatická hydrolyzáza a tepelné spracovanie počas pečenia, a tiež možná nekompletná extrakcia prolamínových bielkovín z tepelne spracovaných potravín. V chleboch z múky pšenice letnej je možné pozorovať malé množstvo slabšie viditeľných fragmentov s molekulovou hmotnosťou väčšou ako 30 kDa. V chleboch z múky pšenice špaldovej sú tieto fragmenty viditeľnejšie, výrazné sú predovšetkým peptidy s

molekulovou hmotnosťou 35-45 kDa. Reakciu s polyklonálnou protilátkou bola detekovaná prítomnosť všetkých prolaminových frakcií s molekulovou hmotnosťou väčšou ako 30 kDa, a to vo všetkých vzorkách pšeničných chlebov (obrázok 2b). Silná pozitívna imunologická reakcia bola pozorovaná aj pri frakciách prolaminov, ktoré boli slabšie separované elektroforetickým delením. Analýzy potvrdili prítomnosť celiakálne aktívnych frakcií bielkovín aj v hotových pekárenských výrobkoch, teda aj po tepelnej úprave rastlinnej suroviny.



**Obrázok 2 (a) SDS-PAGE elektroforéza a (b) Western blot prolaminov extrahovaných z chlebov z pšenice letnej (*Triticum aestivum* L.) a pšenice špaldovej (*Triticum spelta* L.): 1. zmes pšeničnej miešanky BIO I., 2. zmes pšeničnej miešanky BIO II., 3. špaldový chlieb z odrody Oberkulmer Rothkorn, 4. špaldový chlieb z múky dostupnej v obchodnej sieti, 5. špaldový chlieb z odrody Frankienkorn, 6. špaldový chlieb z múky dostupnej v obchodnej sieti.**

Polyklonálne a monoklonálne anti-gliadinové protilátky rozpoznávajú epitopy v pšeničnom lepku a tiež prolamíny v jačmeni a raži. Monoklonálne protilátky sú oveľa viac citlivejšie a špecifickejšie a sú navrhnuté proti konkrétnym sekvenciám aminokyselín v polypeptidovom reťazci, čo predstavuje ich obrovskú výhodu. Napríklad monoklonálna protilátka R5 používaná pri sendvičovej ELISA analýze reaguje s epitopmi aminokyselinových sekvencií QQFPF, QQQFP, LQFPF a QLFPF. Ďalšia monoklonálna protilátka PN3 bola navrhnutá proti syntetickému peptidu pozostávajúcemu z 19 aminokyselín, ktorý v natívnom stave tvorí časť  $\alpha$ -

gliadínu (Ellis et al., 1998). Polyklonálne protilátky rozpoznávajú väčšie množstvo epitopov prolaminových bielkovín, čiže je tu vyššia pravdepodobnosť vzniku krížových reakcií. Okrem definovania imunologických vlastností prolaminov, poskytuje Western blot aj informácie o ich fyzikálno-chemických vlastnostiach, ktoré sa získavajú z elektroforetických profilov (Waga, Węgrzyn, 2000). V porovnaní s ELISA analýzou je to výhoda, pretože tá poskytuje informácie iba o kvantite prolaminov.

## ZÁVER

V práci bola použitá metóda Western blot s využitím polyklonálnej protilátky na analýzu prolaminového komplexu vybraných druhov cereálií a hotových výrobkov, chlebov. V analyzovaných vzorkách zrna obilnín bola pozitívne potvrdená reakcia s použitou polyklonálnou protilátkou vo všetkých druhoch cereálií. Najviac reaktívne boli vzorky pšenice letnej a pšenice špaldovej, kde sa potvrdila prítomnosť celiakálne aktívnych bielkovín. Pozitívna reakcia s protilátkou sa potvrdila aj v zrnách raže a ovsu. Prolamíny extrahované z chlebov sa po elektroforéze separovali na menšie fragmenty v menšom množstve, ale s použitou protilátkou vykázali rovnakú afinitu ako prolamíny extrahované zo zrn obilnín. Na základe získaných výsledkov detekcie prolaminových frakcií bielkovín v analyzovanom biologickom materiáli, je možné konštatovať, že použitá metóda Western blot je vhodná na stanovenie prítomnosti prolaminov v obilninách a tiež v tepelne spracovaných produktoch z obilnín.

## LITERATÚRA

- ARENDE, E. K., DAL BELLO, F., 2008. *Gluten-free cereal products and beverage*. USA: Elsevier Inc., 2008, 445 p. ISBN 978-0-12-373739-7.
- ARENZ-HANSEN, H., FLECKENSTEIN, B., MOLBERG, Ø., SCOTT, H., KONING, F., JUNG, G., ROEPSTORFF, P., LUNDIN, K. E. A., SOLLID, L. M., 2004. The molecular basis for oat intolerance in patients with celiac disease. In *PLoS Medicine*, vol. 1, 2004, no. 1, p. 84-92.
- BATTAIS, F., PINEAU, F., POPINEAU, Y., APARICIO, C., KANNY, G., GUERIN, L., MONERET-VAUTRIN, D. A., DENERY-PAPINI, P., 2003. Food allergy to wheat: identification of immunoglobulin E and immunoglobulin G-binding proteins with sequential extracts and purified proteins from wheat flour. In *Clinical & Experimental Allergy*, vol. 33, 2003, no. 7, p. 962-970.
- CIACCI, C., CIRILLO, M., CAVALLARO, R., MAZZACCA, G., 2002. Long-term follow-up of celiac adults on gluten-free diet: prevalence and correlates of intestinal damage. In *Digestion*, vol. 66, 2002, no. 3, p. 178-185.
- CICCOCIOPPO, R., DI SABATINO, A., CORAZZA, G. R., 2005. The immune recognition of gluten in celiac disease. In *Clinical and Experimental Immunology*, vol. 140, 2005, no. 3, p. 408-416.
- EBO, D. G., STEVENS, W. J., 2001. IgE-mediated food allergy – extensive review of the literature. In *Acta Clinica Belgica*, vol. 56, 2001, no. 4, p. 234-247.
- ECKERT van, R., BOND, J., RAWSON, P., KLEIN, CH. L., STERN, M., JORDAN, T. W., 2010. Reactivity of gluten detecting monoclonal antibodies to a gliadin reference material. In *Journal of Cereal Science*, vol. 51, 2010, no. 2, p. 198-204.
- ELLIS, H. J., ROSEN-BRONSON, P., O'REILLY, N., CICLITIRA, P. J., 1998. Measurement of gluten using a

- monoclonal antibody against a coeliac toxic peptide of A gliadin. In *Gut*, vol. 43, 1998, no. 2, p. 190-195.
- HILL, P. G., McMILLAN, P. A., 2006. Anti-tissue transglutaminase antibodies and their role in the investigation of coeliac disease. In *Annals of Clinical Biochemistry*, vol. 43, 2006, no. 2, p. 105-117.
- JANATUINEN, E. K., PIKKARAINEN, P. H., KEMPPAINEN, T. A., KOSMA, V. M., JÄRVINEN, R. M. K., UUSITUPA, M. I. J., JULKUNEN, R. J. K., 1995. A comparison of diets with and without oats in adults with coeliac disease. In *The New England Journal of Medicine*, vol. 333, 1995, no. 16, p. 1033-1037.
- JANATUINEN, E. K., KEMPPAINEN, T. A., JULKUNEN, R. J. K., KOSMA, V. M., MÄKI, M., HEIKKINEN, M., UUSITUPA, M. I. J., 2002. No harm from five year ingestion of oats in coeliac disease. In *Gut*, vol. 50, 2002, no. 3, p. 332-335.
- LUNDIN, K. E. A., NILSEN, E. M., SCOTT, H. G., LØBERG, E. M., GJØEN, A., BRATLIE, J., SKAR, V., MENDEZ, E., LØVIK, A., KETT, K., 2003. Oats induced villous atrophy in coeliac disease. In *Gut*, vol. 52, 2003, no. 11, p. 1649-1652.
- PETR, J., MICHALÍK, I., TLASKALOVÁ, H., CAPOUCHOVÁ, I., FAMĚRA, O., URMINSKÁ, D., TUČKOVÁ, L., KNOBLOCHOVÁ, H., 2003. Extension of the spectra of plant products for the diet in coeliac disease. In *Czech Journal of Food Sciences*, vol. 21, 2003, no. 2, p. 59-70.
- PRUSKA-KĘDZIOR, A., KĘDZIOR, Z., GORĄCY, M., PIETROWSKA, K., PRZYBYLSKA, A., SPYCHALSKA, K., 2008. Comparison of rheological, fermentative and baking properties of gluten-free dough formulations. In *European Food Research and Technology*, vol. 227, 2008, no. 5, p. 1523-1536.
- SCIARINI, L. P., RIBOTTA, P. D., LEÓN, A. E., PÉREZ, G. T., 2010. Influence of gluten-free flours and their mixtures on batter properties and bread quality. In *Food and Bioprocess Technology*, vol. 3, 2010, no. 4, p. 577-585.
- SHEWRY, P. R., HALFORD, N. G., 2002. Cereal seed storage proteins: structure, properties and role in grain utilization. In *Journal of Experimental Botany*, vol. 53, 2002, no. 370, p. 947-958.
- SCHÄGGER, H., VON JAGOW, G., 1987. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. In *Analytical Biochemistry*, vol. 166, 1987, no. 2, p. 368-379.
- SILANO, M., BENEDETTO, R., MAIALETTI, F., VINCENZI, A., CALCATERRA, R., CORNELL, H. J., VINCENZI, M., 2007. Avenins from different cultivars of oats elicit response by coeliac peripheral lymphocytes. In *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, vol. 42, 2007, no. 11, p. 1302-1305.
- STAROVIČOVÁ, M., GÁLOVÁ, Z., KNOBLOCHOVÁ, H., 2003. Identification of glutenin marker in cultivars of three wheat species. In *Czech Journal of Genetics and Plant Breeding*, vol. 39, 2003, no. 2, p. 51-57.
- STØRSRUD, P., HULTHÉN, L. R., LENNER, R. A., 2003. Beneficial effects of oats in the gluten-free diet of adults with special reference to nutrient status, symptoms and subjective experiences. In *British Journal of Nutrition*, vol. 90, 2003, no. 1, p. 101-107.
- URMINSKÁ, D., SOCHA, P., VOLLMANNOVÁ, A., 2009. ELISA and PAGE analysis of protein determinants from cereal and pseudocereal grain causing human coeliac disease. In *FEBS Journal*, vol. 276, 2009, no. 1, p. 94.
- VACCINO, P., BECKER, H. A., BRANDOLINI, A., SALAMINI, F., KILIAN, B., 2009. A catalogue of *Triticum monococcum* genes encoding toxic and immunogenic peptides for coeliac disease patients. In *Molecular Genetics and Genomics*, vol. 281, 2009, no. 3, p. 289-300.
- WAGA, J., WĘGRZYN, P., 2000. Relationship between some gliadin protein subunits and variation of agronomic traits winter wheat cultivars and strains. In *Biuletyn IHAR*, vol. 215, 2000, p. 61-67.
- WAGA, J., ZIENTARSKI, J., 2007. Isolation and purification of individual gliadin proteins by preparative acid polyacrylamide gel electrophoresis (A-PAGE) for allergenic research. In *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, vol. 57, 2007, no. 1, p. 91-96.
- WEBER, D., CLÉROUX, CH., GODEFROY, P. B., 2009. Emerging analytical methods to determine gluten markers in processed foods – method development in support of standard setting. In *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, vol. 395, 2009, no. 1, p. 111-117.
- WIESER, H., 2007. Chemistry of gluten proteins. In *Food Microbiology*, vol. 24, 2007, no. 2, p. 115-119.
- WEISER, H., KOEHLER, P., 2008. The biochemical basis of coeliac disease. In *Cereal Chemistry*, vol. 85, 2008, no. 1, p. 1-14.
- XIE, Z., WANG, C., WANG, K., WANG, P., LI, X., ZHANG, Z., MA, W., YAN, Y., 2010. Molecular characterization of the coeliac disease epitope domains in a-gliadin genes in *Aegilops tauschii* and hexaploid wheats (*Triticum aestivum* L.). In *Theoretical and Applied Genetics*, vol. 121, 2010, no. 7, p. 1239-1251.
- YALÇIN, E., 2010. Effect of partial removal of prolamins on some chemical and functional properties of barley flours. In *Food Science and Biotechnology*, vol. 19, 2010, no. 3, p. 735-742.
- ZINGONE, F., CAPONE, P., CIACCI, C., 2010. Coeliac disease: Alternatives to a gluten free diet. In *World Journal of Gastrointestinal Pharmacology and Therapeutics*, vol. 1, 2010, no. 1, p. 36-39.

**Acknowledgements:**

This work was realized under the direction of supervisor Dr. Barbara Mickowska, Malopolska Centre of Food Monitoring and Certification, Krakow and carried out with the financial support of project KEGA 334-013SPU-4/2010 and project OP EU ITMS 26220120054.

**Contact address:**

Peter Socha, Department of Biochemistry and Biotechnology, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Slovak University of Agriculture in Nitra, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovakia. E-mail: ing.peter.socha@gmail.com

Barbara Mickowska, Malopolska Centre of Food Monitoring and Certification, Faculty of Food Technology, Agriculture University in Cracow, Balicka 122, 30-149 Cracow, Poland. E-mail: bmickowska@ar.krakow.pl

Elżbieta Mazur, Malopolska Centre of Food Monitoring and Certification, Faculty of Food Technology, Agriculture University in Cracow, Balicka 122, 30-149 Cracow, Poland. E-mail: ela\_mazur@interia.pl

Dana Urmínská, Department of Biochemistry and Biotechnology, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Slovak University of Agriculture in Nitra, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovakia. E-mail: Dana.Urminska@uniag.sk

Ewa Cieślík, Malopolska Centre of Food Monitoring and Certification, Faculty of Food Technology, Agriculture University in Cracow, Balicka 122, 30-149 Cracow, Poland. E-mail: rrciesli@cyf-kr.edu.pl

## MINERALS, TRACE ELEMENTS AND FLAVONOIDS CONTENT IN WHITE AND COLOURED KIDNEY BEAN

Mária Timoracká, Alena Vollmannová, Dalaram S. Ismael

### ABSTRACT

The aim of the study was to determine the contents of mineral elements (Ca, K, Mg, N, P), trace elements (Cu, Fe, Mn, Cd, Pb, Ni, Co, Cr, and Zn), and certain phenolic compounds (flavonoids, isoflavones) in the fourteen varieties of cultivated raw kidney beans (*Phaseolus vulgaris* L.). Heavy metals and mineral elements were analyzed by AAS methods, phenolics were detected by HPLC. Compared with vegetables, legumes proved to be a good source of many minerals and elements, e.g., the contents of K, Mg, P, Fe, and Zn varied in the ranges 13.02 - 23.08 g.kg<sup>-1</sup>, 1.41 - 2.52 g.kg<sup>-1</sup>, 3.81 - 5.26 g.kg<sup>-1</sup>, 0.064 - 0.121 g.kg<sup>-1</sup>, and 0.026 - 0.037 g.kg<sup>-1</sup> dw, respectively. Kidney beans, both species, contained no or few amounts of phenolics (only four cultivars) and the levels of kaempferol and apigenin were comparable to isoflavone genistein and quite higher than isoflavon daidzein content.

**Keywords:** kidney bean, AAS, HPLC

### INTRODUCTION

The kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L.) is one of the most important food legumes, consumed worldwide as pods of green beans or culinary processed seeds of dry beans. Nowadays, common kidney beans are regarded as functional foods that contribute health benefits and have therapeutic properties. The bean consumption is associated with a reduction risk of cardiovascular disease, diabetes mellitus, obesity, and diseases of digestive tract. The common bean is rich and inexpensive source of proteins, carbohydrates, dietary fibers to millions of peoples. In addition to being an important source of protein, legumes are also reported to be a good source of minerals (K, P, Ca, Mg) and trace elements. Metals, such as iron, zinc and manganese are essential metals, since they play an important role in biological systems. Cu and Zn are essential micronutrients, they can be toxic when taken in excess. Lead and cadmium are non essential metals as they are toxic, even in trace (Genççelep et al., 2009).

The potential health benefits of bean have also been attributed to presence of secondary metabolites such as phenolic compounds that possess antioxidant properties (Luthria, Pastor-Corrales, 2006). Nowadays, polyphenolics are being studied for their potential role in the prevention and treatment of a number of chronic diseases including certain forms of cancer, osteoporosis, and heart disease, and also for their ability to relieve menopausal symptoms. Phenolics are known as natural antioxidants and due to qualitative diversity, they are divided to some groups: phenolic acids, flavonoids, isoflavons, tannins etc. The most important of these phenolic compounds in beans are flavonols quercetin and kaempferol, flavon apigenin and some phenolic acids (e.g. *p*-coumaric acid or ferulic acid). Composition and content of phenolic acids in beans published several authors (Troszyńska et al., 2006; Amarowicz, Pegg, 2008; Kalogeropoulos et al., 2010), but there are few reports about flavonoids content of kidney bean. The individual flavonoid content of green and yellow bean was reported Hempel, Bohm (1996) and Price et al. (1998), but this report did not include flavonoid composition of dry bean seeds. Our attention was also

focused on isoflavons, which are typical for phenolic composition of soyabean, and their presence in foods and their consumption is associated with estrogenic and potential anticarcinogenic properties.

In this study, the levels of minerals, essential micronutrients and non-essential heavy metals in kidney bean samples were determined by AAS. Chosen isoflavons – daidzein, genistein, and flavonoids - kaempferol, apigenin – were determined by HPLC.

### MATERIAL AND METHODS

#### Materials

Eleven varieties of white bean and three coloured cultivars (Ultima, Viola, Kreola) were purchased from fy Legusem Horná Streda (Slovak Republic).

#### Methods

*Minerals, trace elements.* Major mineral elements (K, Ca, Mg) and trace elements (Fe, Mn, Zn, Cu, Co, Ni, Cr, Pb, Cd) were determined using a Varian AA240FS atomic absorption spectrometer equipped with a D2 lamp background correction system, using an air-acetylene flame. Between 0.9 and 1.1 g of dried sample was weighed into digestion tubes and HNO<sub>3</sub> were added. The samples were incinerated in a Nabertherm muffle furnace. Ashes were dissolved in nitric acid and passed through an ash-free, acidwashed filter paper and diluted to a certain volume with water. Determinations were carried out in duplicate. Minerals concentrations were determined on a dry weight basis as g.kg<sup>-1</sup>, microelements values as mg.kg<sup>-1</sup>.

*Phosphorus.* Phosphorus was measured using tartare antimonylo-potassium and molybdate ammonium reagent on the UV-1800 UV-VIS spectrophotometer (Shimadzu). In short, 1 mL of the concentrated acid solution obtained for the determination of minerals was transferred into volumetric flask, and 8 mL of tartate-molybdate reagent was added. The volume was adjusted to 50 mL by adding of distilled water. The absorbance at 666 nm was measured after 60 min.



**Nitrogen.** Nitrogen was determined by the Kjeldahl method. The method consisted of mineralizing the sample with concentrated sulphuric acid and alkalinizing with sodium hydroxide solution. The ammonium liberated was collected by distillation and recovered in boric acid solution. Subsequent titration with hydrochloric acid made it possible to calculate the initial amount of ammonium present in sample.

**Flavonoids.** The flavonoids – genistein, daizein, kaempferol and apigenin – were determined as aglycons according to Wang, Murphy (1990) with some modifications. Acid hydrolysis was chosen to convert the selected flavonoids conjugates into their aglycons. Ten grams of dried, milled sample was placed in a stoppered Erlenmayer flask containing 1M HCl. After 2 hours hydrolysis at 100 °C methanol was added. The sample was filtered under vacuum, the eluate was evaporated to dryness, redissolved in the mobile phase and determined by HPLC (L 6200 A, Merck-Hitachi) using the RP C18 column (LiChroCART 125-4 Purospher RP18e, 5 µm, Merck) with methanol : 1mM acetate ammonium (6:4), as a mobile phase. Identification of flavonoids was based on retention time UV spectra by comparison with commercial standards.

**RESULTS AND DISCUSSION**

In this study, the existence of five minerals was determined in two species of bean, K was predominant, followed by P, Mg, Ca (Tables 1, 2). The values in kidney bean seeds show imbalance between the potassium content and other minerals. Mineral supplementation can be used as an alternative approach to correct this imbalance (Tůma et al., 2004). On the other hand, high potassium content in the diet contributes to regulation of water and salt balance in organism. The mean Ca:P ratio in beans, being ≈ 0.2, reveals a high concentration of phosphorus compared to calcium. This ratio should not be less than 1.0 (Iqbal et al., 2006). Calcium values are lower than those in the literature (Augustin et al., 1981; Campos-Vega et al., 2010). The Mg, K, P levels are adequate. The very high values of nitrogen are associated with bacteria *Rhizobium* activity and nitrogen fixation in roots. Kjeldahl-N was determined and crude protein content in seeds was calculated by the factor 6,25. On the basis results, protein content in bean seeds is between 18,2 - 24,9 % which corresponds with a data Vojtašáková et al. (1999).

The determination of macro- and trace elements in foodstuffs is an important part of nutritional and toxicological analyses. Cadmium and lead are best known for their toxicological properties. Pb and Cd can be accumulated in biological systems becoming potential contaminants along the alimentary chain. Copper, chromium, iron, and zinc in adequate amounts are essential micronutrients for human health. These elements play an important role in human metabolism, and interest in these elements is increasing together with reports of relationships between trace element status and oxidative diseases. On the other hand, e.g. Cu and Zn are essential micronutrients, they can be risk elements when taken in excess.

**Table 1 Minerals content (g.kg<sup>-1</sup>) in white and coloured beans**

Cultivar	Type	Ca	Mg	K
Lucka	w	1.24	2.03	18.12
Sara	w	0.33	2.04	23.08
Sina	w	0.86	2.31	14.76
Diana	w	0.91	1.84	13.02
Petra	w	0.82	1.80	14.76
Anka	w	1.76	2.12	15.25
Gesta	w	0.90	2.52	15.70
Salva	w	0.78	2.08	14.89
Gama Z	w	0.86	2.21	15.88
Masai	w	0.99	2.21	20.63
Luna	w	0.67	1.69	15.34
mean±SD	w	0.92±0.37	2.07±0.24	16.49±2.96
minimum	w	0.33	1.69	13.02
maximum	w	1.76	2.52	23.08
Ultima	c	0.91	1.41	13.92
Kreola	c	0.44	1.62	14.86
Viola	c	0.59	1.54	15.1
mean±SD	c	0.65±0.23	1.52±0.11	14.63±0.62
minimum	c	0.466	1.409	13.92
maximum	c	0.906	1.619	15.1

w-white, c-coloured, SD-standard deviation, minimum and maximum content

**Table 2 Minerals content (g.kg<sup>-1</sup>) and dry mater (DM) in % in white and coloured beans**

Cultivar	Type	P	N	DM
Lucka	w	4.20	34.69	92.80
Sara	w	3.81	30.71	92.30
Sina	w	4.42	29.13	91.30
Diana	w	3.85	39.9	92.10
Petra	w	4.86	28.5	92.10
Anka	w	4.03	32.9	92.55
Gesta	w	4.52	35.63	91.35
Salva	w	4.13	38.82	91.95
Gama Z	w	4.32	36.76	93.30
Masai	w	4.95	33.75	92.30
Luna	w	5.26	38.78	92.95
mean±SD	w	4.39±0.46	34.51±3.93	92.20±0.70
minimum	w	3.81	28.5	91.30
maximum	w	5.26	39.9	93.30
Ultima	c	4.33	35.89	91.65
Kreola	c	4.71	30.85	90.75
Viola	c	4.94	36.36	92.40
mean±SD	c	4.66±0.30	34.37±3.05	91.20±0.64
minimum	c	4.33	30.85	90.75
maximum	c	4.94	36.36	92.4

w-white, c-coloured, SD-standard deviation, minimum and maximum content



**Table 3 Trace elements content (mg.kg<sup>-1</sup>) in white and coloured bean**

Cultivar	Fe	Mn	Zn	Cu	Co	Ni	Cr	Pb	Cd	Na
Lucka	121.17	20.74	31.95	8.41	0.75	3.12	0.32	0.7	0.14	51.45
Sara	76.7	16.03	36.83	9.75	0.38	1.78	0.38	0.76	0.15	33.53
Sina	107.66	16.32	36.09	7.72	0.44	6.68	0.49	0.93	0.13	37.34
Diana	64.87	14.44	31.48	7.76	0.49	4.34	0.16	0.87	0.08	40.12
Petra	110.96	14.82	26.65	8.14	0.49	2.01	0.16	0.81	0.12	36.8
Anka	114.58	19.71	28.2	8.21	0.54	2.64	0.32	0.92	0.14	36.52
Gesta	106.51	15.65	33.01	11.38	0.55	6.56	0.22	0.76	0.11	56.75
Salva	85.37	15.6	37.35	8.21	0.38	4.13	0.11	0.76	0.13	44.15
Gama	108.73	15.81	32.74	8.89	0.69	2.89	0.32	0.85	0.16	52.3
Masai	103.14	16.52	28.43	8.5	0.76	4.55	0.32	0.7	0.17	58.28
Luna	110.7	17.64	29.26	8.6	0.81	3.17	0.27	0.86	0.13	25.28
mean±SD	100.94±17.50	16.66±1.96	31.99±3.65	8.41±1.05	0.57±0.15	3.80±1.64	0.28±0.11	0.81±0.08	0.13±0.02	42.96±10.52
minimum	64.87	14.44	26.65	7.72	0.38	1.78	0.11	0.70	0.08	25.28
maximum	121.17	20.74	37.35	11.38	0.81	6.68	0.49	0.93	0.17	58.28
Ultima	91.27	13.2	28.42	8.18	0.55	3.49	0.22	0.71	0.12	53.68
Kreola	96.47	13.66	29.75	8.1	0.33	4.02	0.16	0.66	0.12	52.26
Viola	77.11	11.9	32.41	8.71	0.38	1.35	0.38	0.65	0.12	41.77
mean±SD	88.28±	12.92±0.91	30.19±2.03	8.33±0.33	0.42±0.11	2.95±1.41	0.25±0.11	0.67±0.03	0.12±0.00	42.96±6.51
minimum	77.11	11.90	28.42	8.1	0.33	1.35	0.16	0.65	0.12	41.77
maximum	96.47	13.66	32.41	8.71	0.55	4.02	0.38	0.71	0.12	53.68

The Codex Alimentarius has set a limit for the maximum levels of chosen risk elements in legumes; for cadmium, lead, chromium, cuprum and nickel are maximum values 0.1; 1.0; 4.0; 15.0; 6.0 mg.kg<sup>-1</sup>, respectively.

Limits for contaminants in the slovak food commodities are harmonized with EU limits (Cimbaláková, Nováková, 2009).

The concentration levels of the elements (Fe, Mn, Zn, Cu, Co, Ni, Pb, Cr, Cd, Na) measured in our two beans species are given in Table 3. The order of the levels of the elements in the samples was determined to be: Fe > Na > Zn > Mn > Cu > Ni > Pb > Co > Cr > Cd. The levels of essential elements in tested beans were higher than those of toxic elements. With respect to Fe, the concentrations obtained by us were similar to the concentration published by some researches (Augustin et al., 1981; Campos-Vega et al., 2010).

The iron values of the samples varied from 64.87 to 121.17 mg.kg<sup>-1</sup> – higher values than data found in the literature, because the composition of legume depends, not only on the species or varieties, but also on the growing conditions, such as soil and other conditions. Higher average values of iron were found in white species of bean. Sodium was found in relatively higher amounts. Nevertheless, Na : K ratios were significantly below 1.5 in all the samples studied (mean 0.0026 and 0.0033 in white and coloured beans, respectively), which is very interesting and recommended from the point of view of nutrition, since the intake of sodium chloride and diets with a high Na : K ratio have been related to the incidence of hypertension (Rupérez, 2002). Kalafová et al. (2009) examined effect of zinc and nickel supplementation on mineral blood parameters in animal organism. Authors found the insignificant highest concentrations of potassium and slightly lower value of sodium in blood of tested animal after supplementation Ni<sup>2+</sup> + Zn<sup>2+</sup> in comparison with groups without zinc application.

Legumes are known as zinc accumulators (Gençcelep et al., 2009) and average zinc concentrations of our tested beans ranged from 26.65 to 37.35 mg.kg<sup>-1</sup>. The maximum and minimum zinc levels were found in white beans. Zinc has been recognized e.g. as a co-factor of the superoxide dismutase enzyme, which is involved in protection against oxidative processes too. The copper concentration (7.72–11.38 mg.kg<sup>-1</sup>) was under the

maximum levels of chosen risk elements in Codex Alimentarius valid in Slovak Republic. Copper can be found in many enzymes, some of which are essential for Fe metabolism and there are probably direct correlation between the dietary Zn and Cu ratio and the incidence of cardiovascular disease (Campos-Vega et al., 2010). The manganese contents of samples were between 11.90 and 20.74 mg.kg<sup>-1</sup>. The lowest and highest manganese concentrations were found in cv. Viola (coloured) and cv. Lucka (white), respectively. Chromium content ranged from 0.11 mg.kg<sup>-1</sup> to 0.49 mg.kg<sup>-1</sup>. Manganese and chromium are recognised as essentials trace elements for humans and their metabolic roles are studied (e.g. Mn-containing enzym system, Cr in relationship to insulin function and carbohydrate metabolism). The nickel and cobalt levels in bean samples were found to be in the range of 1.35-6.68 mg.kg<sup>-1</sup> and 0.33-0.81 mg.kg<sup>-1</sup>, respectively. Nickel is an essential mineral element that may accumulate to toxic levels in soils due to anthropogenic activities. The toxic risk elements contents were between 0.65-0.93 mg.kg<sup>-1</sup> (Pb) and 0.08-0.17 mg.kg<sup>-1</sup> (Cd). Most of the trace elements present in bean, their content is generally below the limit values or few higher (Cd) as the maximum level allowed in Codex Alimentarius valid in Slovak Republic.

Tables 4 and 5 show the amount of isoflavons and flavonoids in the hydrolysed samples of bean seeds. The results show that in 10 cultivars from a total of 14 values were not measured at detectable levels of flavonoids. Comparing data in Tables 4, 5 suggest that the beans have not large differences in content of phenolic substances, regardless of the type variety. Isoflavones genistein and daidzein are largely undetectable. The presence of isoflavones in raw bean seeds was not confirmed by Diaz-Batala et al. (2006). Espinosa-Alonso et al. (2006) were found isoflavones in only low levels. The major flavonoids in tested beans are kaempferol and apigenin. These flavonoids were determined in 4 genotypes and their content ranged from 7.657 to 16.556 mg. kg<sup>-1</sup> DW (kaempferol), 7.529 to 13.710 mg. kg<sup>-1</sup> DW (apigenin). The most favorable results have been found in cultivars Lucka and Sara, which have all identified observed flavonoids. Sara bean cultivar

contains higher levels of flavonoids than the cultivar Lucka and the differences are statistically significant. The content of the flavonoids of both varieties in order of decreasing apigenin > kaempferol > genistein > daidzein. In view of the content of macro- and microcomponents for the consumer, white cultivars Lucka and Sara seems to be the best among the bean cultivars.

**Table 4 Isoflavons content (mg.kg<sup>-1</sup>) in white and coloured beans**

Cultivar	Type	Daidzein	Genistein
Lucka	w	3.190 ± 0.01 a	10.090 ± 0.42 a
Sara	w	3.860 ± 0.08 b	12.120 ± 0.40 b
Sina	w	nd	nd.
Petra	w	nd	nd.
Diana	w	nd	nd.
Anka	w	nd	nd.
Gesta	w	nd	nd.
Salva	w	nd	nd.
Gama Z	w	nd	nd.
Masai	w	nd	nd.
Luna	w	nd	nd.
Ultima	c	nd	9.985 ± 0.36 c
Viola	c	nd	nd.
Kreola	c	nd	nd.

w-white, c-coloured, nd.-under detection

Values in the same column with different letters present significant differences at  $p < 0.05$  using t-test for independent samples. Each column contains mean of four replication ± standard deviation.

**Table 5 Flavonoids content (mg.kg<sup>-1</sup>) in white and coloured beans**

Cultivar	Type	Kaempferol	Apigenin
Lucka	w	11,050 ± 0,33 a	12,630 ± 0,22 a
Sara	w	13,320 ± 0,30 b	13,710 ± 0,20 b
Sina	w	16,556 ± 0,35 c	8,268 ± 0,18 c
Petra	w	nd.	nd.
Diana	w	nd.	nd.
Anka	w	nd.	nd.
Gesta	w	nd.	nd.
Salva	w	nd.	nd.
Gama Z	w	nd.	nd.
Masai	w	nd.	nd.
Luna	w	nd.	nd.
Ultima	c	7,657 ± 0,15 d	7,529 ± 0,10 d
Viola 311	c	nd.	nd.
Kreola	c	nd.	nd.

w-white, c-coloured, nd.-under detection

Values in the same column with different letters present significant differences at  $p < 0.05$  using t-test for independent samples. Each column contains mean of four replication ± standard deviation.

## CONCLUSION

Beans, as one of the most frequent consumed crops for us, are long appreciated for its composition and nutrient content, but generally its nutritional properties are little

discussed and presented. As a conclusion of this study, it can be said that legume are a valuable agricultural product, based on their rich and beneficial composition. These results may be useful for the evaluation of dietary information and concluded that legumes are the good source of minerals.

Our results also show that although cultivated kidney bean is not good source of flavonoids, but probably contain another types of phenolics (phenolic acids, anthocyanins in coloured bean). For this reason is a need to identify and quantify these important antioxidant compounds in beans for use in breeding programs focused on nutrition and health.

Dry bean is an integral part of diets in a significant portion of the world population, but the potential benefits of consuming beans from a nutraceutical standpoint have largely been overlooked. Since dry beans contain compounds that may have significant antioxidant potential, it will be useful to investigate their identification, potential and maximizing their use in food industry.

## REFERENCES

- AMAROWICZ, R., PEGG, R. B. 2008. Legumes as a source of natural antioxidants. In *European Journal of Lipid Science and Technology*, vol. 11, 2008, no. 10, p. 865-878.
- AUGUSTIN, J., BECK, C. B., KALBFLEISH, G., KAGEL, L. C., MATTHEWS, R. H. 1981. Variation in the vitamin and mineral content of raw and cooked commercial *Phaseolus vulgaris* classes. In *Journal of Food Science*, vol. 46, 1981, p. 1701-1706.
- CAMPOS-VEGA, R., LOARCA-PIÑA, G., DAVE OOMAH, B. 2010. Minor components of pulses and their potential impact on human health. In *Food Research International*, vol. 43, 2010, p. 461-482.
- CIMBOLÁKOVÁ, I., NOVÁKOVÁ, J. 2009. Heavy metals – the important element of the food chain. In *Potravinárstvo*, vol. 3, 2009, no. 3, p. 14-16.
- CODEX ALIMENTARIUS. 2004. Výnos Ministerstva pôdohospodárstva Slovenskej republiky a Ministerstva zdravotníctva Slovenskej republiky z 15. marca 2004 č. 608/3/2004 - 100, ktorým sa vydáva hlava Potravinového kódexu Slovenskej republiky upravujúca kontaminanty v potravinách.
- DÍAZ-BATALLA, L., WIDHOLM, J. M., FAHEY, G. C., CASTAÑO-TOSTADO, E., PAREDES-LÓPEZ, O. 2006. Chemical components with health implications in wild and cultivated Mexican common bean seeds (*Phaseolus vulgaris* L.). In *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 54, 2006, no. 6, p. 2045-2052.
- ESPINOSA-ALONSO, L. G., LYGIN, A., WIDHOLM, J. M., VALVERDE, M. E., PAREDES-LÓPEZ, O. 2006. Polyphenols in wild and weedy Mexican common beans (*Phaseolus vulgaris* L.). In *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 54, 2006, no. 12, p. 4436-4444.
- GENÇCELEP, H., UZUN, Y., TUNÇTÜRK, Y., DEMIREL, K. 2009. Determination of mineral content of wild-grown edible mushrooms. In *Food Chemistry*, vol. 133, 2009, p. 1033-1036.
- HEMPEL, J., BOHM, H. 1996. Quality and quantity of prevailing flavonoid glycosides of yellow and green French bean. In *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 44, 1996, no. 8, p. 2114-2116.
- IQBAL, A., KHALIL, I. A., ATEEQ, N., KHAN, M. S. 2006. Nutritional quality of important food legumes. In *Food Chemistry*, vol. 97, 2006, p. 331-335.
- KALAFOVÁ, A., MASSÁNYI, P., CHRENEK, P., KOVÁČIK, J., LUKÁČ, N., CHRASTINOVÁ, Ľ., SCHNEIDGENOVÁ, M., ČUPKA, P., JURČÍK, R. 2009. The effect of single nickel and combined nickel and zinc peroral administration on selected mineral blood parameters in female rabbits. In *Potravinárstvo*, vol.

3, 2009, no. 4, p. 26-29.

KALOGEROPOULOS, N., CHIOU, A., IOANNOU, M., KARATHANOS, T., HASSAPIDOU, M., ANDRIKOPOULLOS, N. K. 2010. Nutritional evaluation and bioactive microconstituents (phyosterols, tocopherols, polyphenols, triterpenic acids) in cooked dry legumes usually consumed in the Mediterranean countries. In *Food Chemistry*, vol. 121, 2010, p. 682-690.

LUTHRIA, D. L., PASTOR-CORRALES, M. A. 2006. Phenolic acids content of fifteen dry edible bean (*Phaseolus vulgaris* L.) varieties. In *Journal of Food Composition and Analysis*, vol. 19, 2006, no. 2/3, p. 205-211.

PRICE, K. R., COLQUHOUN, I. J., BARNES, K. A., RHODES, M. J. C. 1998. Composition and content of flavonol glycosides in green beans and their fate during processing. In *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 46, 1998, no. 12, p. 4898-4903.

RUPÉREZ, P. 2002. Mineral content of edible marine seaweeds. In *Food Chemistry*, vol. 79, 2002, p. 23-26. PII S0308-8146(02)00171-1.

TROSZYŃSKA, A., AMAROWICZ, R., LAMPARSKI, G., WOLEJSZO, A., BARYŁKO-PIKIELNA, N. 2006. Investigation of astringency of extracts obtained from selected tannins-rich legume seeds. In *Food Quality and Preference*, vol. 17, 2006, p. 31-35.

TŮMA, J., SKALICKÝ, M., TŮMOVÁ, L., BLÁHOVÁ, P., ROSŮLKOVÁ, M. 2004. Potassium, magnesium and calcium

content in individual parts of *Phaseolus vulgaris* L. plant as related to potassium and magnesium nutrition. In *Plant Soil Environ.*, vol. 50, 2004, no.1, p. 18-26.

VOJTAŠŠÁKOVÁ, A., KOVÁČIKOVÁ, E., SIMONOVÁ, E., HOLČÍKOVÁ, K. 1999. Obilniny a strukoviny – potravinové tabuľky. Bratislava: VÚP, 1999. 265 s. ISBN 80-85330-62-8.

WANG, G., MURPHY, P. 1990. A simplified HPLC methods for the determination of phytoestrogens in soybean and its processed products. In *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 38, 1990, p. 185-190.

### Contact address:

Ing. Mária Timoracká PhD., Slovak Agricultural University in Nitra, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Department of Chemistry, Tr. A. Hlinku 2, 94901 Nitra, Slovak Republic, E-mail: maria.timoracka@uniag.sk

doc. RNDr. Alena Vollmannová, PhD., Slovak Agricultural University in Nitra, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Department of Chemistry, Tr. A. Hlinku 2, 94901 Nitra, Slovak Republic, E-mail: alena.vollmannová@uniag.sk

Dalaram S. Ismael, Slovak Agricultural University in Nitra, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Department of Chemistry, Tr. A. Hlinku 2, 94901 Nitra, Slovak Republic, E-mail: dlaram.dizayee@gmail.com

## THE INFLUENCE OF FIRST WORT PART AND AFTERWORDS ON SACCHARIFICATION OF WORT

*Žigmund Tóth, Štefan Dráb, Helena Frančáková, Miriam Lišková, Jana Návojská*

### ABSTRACT

Wort is a basic product of mashing, which forms the first intermediate in beer production and constitute the base of its final value. For qualitative value wort has the greatest impact grist per brew, which is a description of materials, they bring to brew extract and determine its the volume and concentration. The main component grist per brew for light and dark beers is stored pale malt and possibly a smaller proportion of adjuncts.

The aim of our work was to assess the qualitative parameters of malt in terms of content extract and its impact on the amount of produced the first wort part and afterwort and their qualitative values expressed in % saccharification and volumes. We measured 3 types of malts with the content of the extract 75.2%, 76.1%, 77.2% in the original sample, which determined mainly reached saccharification of first part wort and other afterwort parts one and two. In terms attained of saccharification it was necessary to use on sparge of spent grains at afterwort number two only the amount of water, which would be not affect the total saccharification of wort and its qualitative parameters.

**Keywords:** malt, wort, first wort, afterwort, saccharification, volume

### ÚVOD

Sladina je prvým medziproduktom pri produkcii piva, pričom jej výroba pozostáva z procesu vystierania zošrotovaného sladku a procesu rmutovania. Na konci rmutovania je sladina obsahujúca extrakt oddelená od nerozpustných látok – mláta. Takáto sladina má vysokú mernú hmotnosť a označuje sa ako predok. Určité množstvo extraktu zostáva v mláte, a je ho možné získať vysladzovaním - premývaním mláta horúcou varnou vodou, čím možno vytvoriť sladinu s nižšou hustotou označovanú ako výstrelok (Briggs et al., 2004).

Prvým a základným predpokladom kvalitnej sladiny je proces šrotovania sladku. Šrotovanie zvyšuje reakčné plochy sladku pre pôsobenie enzýmov, čím sú zložky sladku ľahšie rozpustné. Plevy by mali byť v dostatočnej miere zachované, pretože slúžia ako filtračná vrstva počas sciedzania. V niektorých pivovaroch sa ako alternatíva sciedzacích nádob používa sladínový filter, pri ktorom plevy, prípadne hrubšie častice sladku nie sú potrebné (Narziss, 1992; Kunze, 1999; Briggs et al., 2004). Medzi procesom šrotovania sladku a hydrolyzou škrobu v sladine je významný vzťah. Dôležitú úlohu zohráva typ použitého šrotovania. Kladivkové šrotovanie môže byť lepšie ako valcové, no valcové šrotovanie výrazne ovplyvňujú faktory, ako mlecia medzera, rýchlosť valcov a rozdielna rýchlosť otáčania valcov (Mousia et al., 2003). Väčšie poškodenie pliev znižuje porozitu mláta a negatívne ovplyvňuje chuť piva. Pleva obsahuje okrem nerozpustnej celulózy polyfenoly, pentozany, horké a farebné látky, ktorých vyluhovanie vzrastá s časom kontaktu a poškodením plevy. Jemné rozomletie endospermu je naopak predpokladom pre požadovaný priebeh rmutovania a vysoký varný výťažok. Hlavný podiel hrubej krupice pri šrotovaní tvorí najmenej rozlúštená špička zrna, na jemnú krupicu sa ľahko rozdrví dobre rozlúštené spodné partie endospermu zrna. Hrubá krupica sa ťažko rozpúšťa a pomaly scukruje. Pokiaľ jej je viac narastá obsah nescukreného extraktu v mláte, preto je potrebné v tomto prípade aj dlhšie intenzívnejšie rmutovanie. Preto pre

sciedzanie v sciedzacej nádobe volíme najlepšie vymleté, minimálne poškodené plevy, nízky podiel hrubej krupice a vysoký podiel jemnej krupice. Obsah múčky – najjemnejšieho šrotu musíme prispôbiť podmienkam pri sciedzaní najmä zaťaženiu sciedzacieho dna a sciedzacej rýchlosti (Lejsek, Topka, 1991). Podiel múčky by nemal prekročiť hodnotu 12% v podiele šrotu. Počas rmutovania menšia časť extraktu 15 až 17% je priamo rozpustná a prejde pri rmutovaní do roztoku jednoduchým miešaním a pôsobením teploty. Väčšiu časť však dostaneme do roztoku až po ich rozštiepení sladovými enzýmami. Základnou požiadavkou rmutovacích procesov je dostať do roztoku všetok škrob i vhodný podiel bielkovín (Chládek, 2007). Škrob sa skladá z amylózy a amylopektíu. Ich rozklad prebieha v troch krokoch: mazovatenie, stekutenie, scukrenie. Škrobové molekuly absorbujú vodu počas mazovatenia najskôr napučávajú a potom praskajú. Sladový škrob s prítomnosťou amyláz mazovatie pri 60°C. Zmazovtený škrob je väčšinou štiepený amylázami v priebehu stekucovania (Wunderlich a Back, 2009). Keď je slad extrahovaný s vodou, ktorej teplota sa zvyšuje riadeným spôsobom, priemyselný proces sa nazýva rmutovanie a výsledný produkt je označovaný ako sladina. Proces rmutovania sa môže meniť v závislosti od požadovaných hodnôt finálnej sladiny a piva (Jones, 2005).

V priebehu rmutovania prebiehajú tri hlavné enzymatické reakcie, a to hydrolyza zmazovateného škrobu na skvasiteľné cukry (glukóza, fruktóza, sacharóza, maltóza a maltotriózu), hydrolyza proteínov na voľné aminokyseliny a degradácia β-glukánových reťazcov. Tieto procesy prebiehajú činnosťou amyláz, proteáz a β-glukanáz (Brandam et al., 2003). Najdôležitejšia reakcia v rámci procesu rmutovania je enzymatická hydrolyza zmazovateného škrobu, pretože tá určuje množstvo vytvorených skvasiteľných cukrov a tým aj obsah alkoholu vo finálnom produkte. Z toho dôvodu je prirodzeným cieľom rmutovania maximalizovať produkciu takýchto skvasiteľných látok (Durand et al., 2009). Pre svetlé piva bežných typov by mal extrakt sladiny obsahovať približne 10% monosacharidov, 50% disacharidov a 20% vyšších

dextrínov. Priebeh štiepenia škrobu pri rmutovaní ovplyvňuje celý rad faktorov a to najmä kvalita sladu z hľadiska extraktívnosti, zloženie sypania pokiaľ sa použijú sladové náhradky, jemnosť šrotu v závislosti od spôsobu a kvality šrotovania a podmienky rmutovania ako sú najmä teplota, pH a hustota výstierky, časový priebeh teplôt, počet rmutov a spôsob ich spracovania pokiaľ sa jedná o dekokčný spôsob rmutovania. Podľa spôsobu zvyšovania teploty pri rmutovaní rozlišujeme infúzny a dekokčný spôsob rmutovania (Ďopka, Ďopka ml, 2000). Pri infúznom postupe je celý objem rmutu vyhrievaný (s príslušnými fázami odpočinku) až po finálnu teplotu scukrenia. Táto metóda začína s teplotou 45°C (proteolýza) a následne sa teplota zvyšuje na 62-65°C (činnosť  $\beta$ -amylázy). Ďalšia fáza rmutovania prebieha pri teplote 70 – 75°C až po kompletné scukrenie rmutu (činnosť  $\alpha$ -amylázy) a celý proces končí pri teplote 78°C (O'Rourke, 1996). Pri dekokčnom procese sa teplota zvyšuje presúvaním časti rmutu z vystieracej nádoby do rmutovacieho kotla, kde je varený. Jeho prečerpaním do zvyšku rmutu ktorý je vo vystieracej nádobe je teplota celého rmutu zvýšená na požadovanú hodnotu. V závislosti na počte varených rmutov môžu byť dekokčné metódy klasifikované ako jedno-, dvoj- a trojrmutové. V súčasnosti sú používané iba jedno- alebo dvojrmutové procesy. Trojrmutový proces spotrebuje veľké množstvo energie a je používaný len pre výrobu určitých špeciálnych pív (Willaert, 2007). Jednotlivé spôsoby rmutovania možno kombinovať. Podľa Montanariho et al. (2004) je jednormutová metóda dekokcie spojená s infúznym rmutovaním výhodnejšou metódou ako dvojité dekokčné rmutovanie. Dosahujú sa ňou vyššie objemové výťažky piva a je energeticky úspornejšia až o 20 %. Pre zaistenie vysokého varného výťažku je potrebné spracovávať dokonale rozlúštený slad s vysokou enzymatickou aktivitou. Kontakt enzýmov a substrátu je potrebné podporiť trvalým miešaním i pri teplotných odpočinkoch. (Ďopka, Ďopka ml, 2000).

Cieľom práce bolo na základe uskutočnených värok zhodnotiť vplyv množstva vystieracej vody a sladu na sacharizáciu a množstvo predku, a na sacharizáciu a množstvo 1. i 2. výstrelku.

### MATERIÁL A METODIKA

Hodnotenie množstva a sacharizácie predku, 1. a 2. výstrelku sme sledovali v rámci sladiny pripravenej z 3 druhov sladov, u ktorých sme najskôr stanovili hodnotu obsahu extraktu. Použili sa 2 rôzne množstvá sypania svetlého plzenského sladu a pomer nálevu sme upravili prídavkom vystieracej a zaparovacej vody v troch rôznych množstvách.

#### Stanovenie extraktu v slade

Do rmutovacej nádoby sme odvážili 50 g sladového šrotu s obsahom múčky 90 % a pridali 100 cm<sup>3</sup> destilovanej vody s teplotou 45 °C. Obsah nádoby sme premiešali s ďalšími 100 cm<sup>3</sup> vody tej istej teploty, pričom sme dôkladne opláchli steny nádoby i tyčinku. Nádobka s výstierkou bola vložená do rmutovacieho kúpeľa vyhriateho na teplotu 45 °C. Pri tejto teplote rmutovanie prebiehalo 30 minút. Potom bola teplota

kúpeľa zvyšovaná v priebehu 25 minút na 70°C (1°C za 1 minútu). Následne sme do vzorky pridali 100 cm<sup>3</sup> vody s teplotou 70°C, pričom rmutovanie pokračovalo pri uvedenej teplote 1 hodinu. Scukrenie sladiny bolo skúšané jódovou skúškou 10 minút po dosiahnutí 70 °C. Rmut bol v priebehu 20 minút ochladený na teplotu 20°C a dovážaný na hmotnosť 450 g pomocou destilovanej vody vytemperovanej na 20°C. Obsah rmutovacej nádoby sme potom dôkladne premiešali sklenenou tyčinkou a naraz vyliali na suchý skladaný filter s priemerom 32 cm. Prvých 100 cm<sup>3</sup> filtrátu sme vrátili späť na filter. Po ukončení filtrácie sme filtrát premiešali a jeho relatívna hustota bola stanovená pyknometricky.

Relatívna hustota vzorky sladiny bola stanovená v pyknometri (podľa Reischauera), pri ktorom bol presne stanovený objem na destilovanú vodu (vodná hodnota). Za predpísaných podmienok bol k zistenej relatívnej hustote sladiny určený hmotnostný zlomok extraktu sladiny v % a následne vypočítaný obsah extraktu v pôvodnom slade.

#### Príprava sladiny v minipivovare

Zošrotovaný slad bol vystieraný do presne stanoveného množstva vody s teplotou 50°C, pričom uvedená teplota výstierky bola udržiavaná 20 minút. Potom bol substrát postupne vyhrievaný na 65°C a pri tejto teplote sa nechal prebehnúť proces rmutovania 30 minút. Následne bolo dielo zahriate na teplotu 76°C, pričom táto fáza procesu rmutovania trvala 30 minút. V rámci tohto kroku bolo kontrolované scukrenie sladiny jódovou skúškou. Pri uvedenej teplote nastal proces odrmutovania – deaktivácie prítomných enzýmov. Počas všetkých týchto procesov bolo miešadlo rmutovo-vystieracej nádoby neustále v činnosti. Po ukončení procesu odrmutovania bolo miešadlo vypnuté, aby sa vytvorila filtračná vrstva mláta, ktorej kvalita určuje priebeh sciedzacieho – filtračného procesu. V prvej fáze sciedzania bol oddelený hlavný podiel sladiny tzv. predku a v druhej fáze bolo mláto premývané horúcou vodou s teplotou 78 °C. Pomocou takéhoto procesu vysladzovania bola získaná zriedená sladina nazývaná výstrelky. Na dosiahnutie požadovaného objemu sladiny bolo zvolené dvojnásobné vysladzovanie.

#### Určenie sacharizácie predku a výstrelkov sacharometrom

Do odmerného valca sme naliali prvý podiel rmutu-predku, alebo 1. a 2. výstrelku. Následne bol celý odmerný valec ponorený do vodného kúpeľa, v ktorom bol vytemperovaný na 20°C. Potom sme sacharometer postupne ponárali do vzorky. Vzorka sa vylievala cez okraje valca a spolu s ňou vytekala aj pena, ktorá by mohla znemožňovať meranie. Po vytemperovaní vzorky bolo priamo na stupnici sacharometru odčítané percento sacharizácie. V prípade nedodržania predpísanej teploty bola vykonaná korekcia podľa návodu uvedeného na stupnici sacharometru.

#### Určenie objemu predku a výstrelkov pomocou meracej tyče

Objem podielu predku ako i podielov 1. a 2. výstrelku bol meraný pomocou meracej nerezovej tyče, ktorá mala po obvode vyznačené hodnoty v dm<sup>3</sup>. Objemy boli merané vždy po odčerpaní sladiny do mladného kotla pred procesom chmeľovaru.

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

K najdôležitejším parametrom kvality sladu patrí obsah extraktu v pôvodnej vzorke, ktorá by mala dosahovať minimálnu hodnotu 75 %. Táto hodnota sa považuje za tzv. štandardnú hodnotu. V našich prípadoch všetky tri vzorky plzenského sladu tieto parametre dosahovali. V prvom prípade to bolo 75,2 %, v druhom 76,1 % a v treťom 77,2 % extraktu v pôvodnej vzorke.

Podľa teoretických predpokladov u 10 % a 12 % svetlej sladiny sa koncentrácia predku pohybuje v rozmedzí 16-18 %, u tmavých sladín 18-20 %. Pomer nálevu k sypaniu je u svetlých pív 3,5 - 4 hl, u tmavých sladín 3 - 3,5 hl na 100 kg sladu (**Kosař, Procházka, 2000**). V našom prípade sme zvolili 2 rôzne varianty množstva sypania (12 a 13 kg) plzenského sladu a 3 rôzne objemy vystieracej a zaparovacej vody (od 35 dm<sup>3</sup> po 37 dm<sup>3</sup>), a to najmä z dôvodu zabezpečenia predpísaných teoretických hodnôt sacharizácie predku. Výsledky, ktoré sme dosiahli sú prezentované v tabuľkách.

**Tabuľka 1 Sypanie 12 kg – extrakt 75,2% v pôvodnej vzorke**

Objem vody dm <sup>3</sup>	Predok		1.výstrelok		2.výstrelok		Sladina spolu	
	%	dm <sup>3</sup>	%	dm <sup>3</sup>	%	dm <sup>3</sup>	%	dm <sup>3</sup>
35	14,1	26	7,8	25	3,2	20	8,8	71
36	14	26	7,9	24	3,1	20	8,79	70
37	13,9	25	7,7	25	3,2	19	8,71	69

**Tabuľka 2 Sypanie 12 kg – extrakt 76,1% v pôvodnej vzorke**

Objem vody dm <sup>3</sup>	Predok		1.výstrelok		2.výstrelok		Sladina spolu	
	%	dm <sup>3</sup>	%	dm <sup>3</sup>	%	dm <sup>3</sup>	%	dm <sup>3</sup>
35	15,2	25	9,7	26	3,3	19	9,9	70
36	15	25	10	25	3,4	20	9,9	70
37	14,7	25	9,9	26	3,5	20	9,79	71

**Tabuľka 3 Sypanie 12 kg – extrakt 77,2% v pôvodnej vzorke**

Objem vody dm <sup>3</sup>	Predok		1.výstrelok		2.výstrelok		Sladina Spolu	
	%	dm <sup>3</sup>	%	dm <sup>3</sup>	%	dm <sup>3</sup>	%	dm <sup>3</sup>
35	16	24	9,2	24	3,2	22	9,65	70
36	15,9	25	9,8	25	3,3	22	9,93	72
37	15,6	24	9,6	26	3,2	23	9,56	73

**Tabuľka 4 Sypanie 13 kg – extrakt 75,2% v pôvodnej vzorke**

Objem vody dm <sup>3</sup>	Predok		1.výstrelok		2.výstrelok		Sladina spolu	
	%	dm <sup>3</sup>	%	dm <sup>3</sup>	%	dm <sup>3</sup>	%	dm <sup>3</sup>
35	15,2	25	8,3	26	3,4	21	9,27	72
36	15,1	25	8,3	25	3,4	19	9,41	69
37	14,9	26	8,2	25	3,4	19	9,39	70

**Tabuľka 5 Sypanie 13 kg – extrakt 76,1% v pôvodnej vzorke**

Objem vody dm <sup>3</sup>	Predok		1.výstrelok		2.výstrelok		Sladina spolu	
	%	dm <sup>3</sup>	%	dm <sup>3</sup>	%	dm <sup>3</sup>	%	dm <sup>3</sup>
35	16,2	25	9,7	26	3,3	19	10,28	70
36	16,1	25	10,0	25	3,4	20	10,29	70
37	15,9	25	9,9	26	3,5	20	10,21	71

**Tabuľka 6 Sypanie 13 kg – extrakt 77,2% v pôvodnej vzorke**

Objem vody dm <sup>3</sup>	Predok		1.výstrelok		2.výstrelok		Sladina spolu	
	%	dm <sup>3</sup>	%	dm <sup>3</sup>	%	dm <sup>3</sup>	%	dm <sup>3</sup>
35	17,2	25	9,7	25	3,4	23	10,29	73
36	16,9	26	10,1	25	3,3	22	10,61	73
37	16,8	25	10,0	24	3,3	21	10,42	70

V podstatnej miere sú hodnoty ovplyvnené obsahom extraktu sladu, ktorý sme použili na varenie sladiny. Čím viac sypania bolo použitého na varenie sladiny, tým sa zvyšovala i hodnota sacharizácie predku. Zvýšením množstva vystieracej a zaparovacej vody sa zvyšoval aj pomer nálevu k sypaniu, a to od 2,92 po 3,1 hl na 100 kg sladu, čo malo vplyv na pokles sacharizácie predku.

Pri použití sypania 12 kg plzenského sladu sa obsah sacharizácie predku pohyboval od 14,1% po 16% (tabuľka 1,2,3), samozrejme v závislosti od obsahu extraktu v pôvodnom slade. Ako možno vidieť, tieto hodnoty boli dosiahnuté pri použití najmenšieho množstva vystieracej a zaparovacej vody 35 dm<sup>3</sup> a najvyššie boli pri obsahu extraktu sladu 77,2 %. Zvyšovanie pomeru nálevu k sypaniu znížilo hodnoty sacharizácie predku. Najviac sa to prejavilo pri slade s extraktom 76,1 % a 77,2 % a to poklesom v hodnotách 0,4 % až 0,5 % (tabuľka 2,3).

V druhej variante varenia sladiny sme použili vyššie množstvo sypania plzenského sladu a to 13 kg, čím sa nám znížil pomer nálevu ku sypaniu na hodnoty 2,69 až 2,85 hl na 100 kg sladu. Tieto hodnoty prezentujú výstierku podstatne hustejšiu ako je to v odbornej literatúre (**Kosař, Procházka, 2000**). K tomuto kroku sme prišli z dôvodov predchádzajúcich pokusov, nakoľko hodnoty predku pri použití väčšieho množstva nálevu ku sypaniu, boli veľmi nízke a z toho vyplývala i nízka hodnota stupňovitosti vyrobeného piva. V prípade použitia hustejších výstierok sa parametre dosiahnutých hodnôt predku pohybovali od 15,2% až po 17,2% (tabuľka 4,5,6), čo je porovnateľné s hodnotami prezentovanými v odbornej literatúre. Musíme však konštatovať, že použitím nižšieho pomeru nálevu ku sypaniu klesá varný výťažok a efektívnosť vareného procesu sa znižuje. Hodnoty objemov prvého podielu počas varenia sa pohybovali v rozmedzí od 24 dm<sup>3</sup> až po 26 dm<sup>3</sup> (tabuľka 1,2,3,4,5,6). I keď z teoretického hľadiska množstvo predku malo byť vyššie pri použití vyššieho množstva zaparovacej a vystieracej vody tieto výsledky boli vyrovnané a rozdiely minimálne.

Ďalšou problematikou, ktorou sme sa zaoberali boli hodnoty sacharizácie a objemov 1. a 2. výstrelok. Ako sa uvádza v odbornej literatúre (**Kosař, Procházka, 2000**), proces vysladzovania - premývania filtračného koláča, ktorý

je tvorený mlátom by mal prebiehať až dovtedy, kým sa v poslednom výstreku nedosiahne sacharizácia 1,3 %. Prezentácia našich výsledkov hovorí o hodnotách od 3,1% po 3,6% (tabuľka 1,2,3,4,5,6). Množstvo výstrelkov vyjadrené objemom sa pohybovalo od 24 po 26 dm<sup>3</sup> pri 1. výstreku a od 19 dm<sup>3</sup> po 23 dm<sup>3</sup> pri 2. Výstreku, pričom bolo v podstatnej miere ovplyvnené množstvom vody o teplote 76-78 °C, ktorá bola použitá na proces vysladzovania. Množstvo výstrelkov pri 2. výstreku sme volili na základe celkového množstva uvarenej sladiny, nakoľko kapacita mladinového kotla by v mnohých prípadoch nestačila uvariť väčšie množstvo mladiny. Hodnoty uvarenej sladiny sa pohybovali v rozmedzí od 8,71 až 10,61% (tabuľka 1,2,3,4,5,6), avšak tieto namerané údaje nevyjadrujú konečnú stupňovitosť piva, nakoľko počas ďalších procesov dochádza ku zvyšovaniu tejto hodnoty odparom počas varenia sladiny s chmeľom.

## ZÁVER

V prezentovanej práci bol uplatnený infúzný spôsob rmutovania. Na dosiahnuté výsledky mal veľký vplyv obsah extraktu používaného sladu, ktorý v najväčšej miere charakterizoval dosiahnutú sacharizáciu prvého podielu - predku i ďalších podielov - 1. výstrelku a 2. výstrelku. Ďalší faktor, ktorý ovplyvnil sacharizáciu uvarenej sladiny a jej jednotlivých podielov bolo zloženie sladového šrotu. Objemy jednotlivých podielov boli ovplyvnené najmä pri vysladzovaní mláta, a to jednak množstvom použitej vysladzovacej vody, ale najmä jej teplotou, ktorú sme udržiavali na úrovni 76-78 °C. Z hľadiska efektívneho využitia varných nádob však musíme hovoriť o nižšej efektívnosti nakoľko 2. výstrelok bol vo všetkých prípadoch pomerne vysoký - nad 3% sacharizácie, takže veľké množstvo cukornatých látok zostávalo v mláte. Z hľadiska dosiahnutej sacharizácie však bolo nutné použiť na vysladzovanie mláta pri 2. výstreku len také množstvo vysladzovacej vody, ktorá neovplyvnila sacharizáciu celkového množstva uvarenej sladiny a neovplyvnila ani jej kvalitatívne parametre.

## LITERATÚRA

BRANDAM, C., MEYER, X. M., PROTH, J., STREHAIANO, P., PINGAUD, H. 2003. An original kinetic model for the enzymatic hydrolysis of starch during mashing. In *Biochemical Engineering Journal*, vol. 13, 2003, p. 43-52.

BRIGGS, D. E., BOULTON, CH. A., BROOKES, P. A., STEVENS, R. 2004. *Brewing Science and Practice*, Boca Raton : CRC Press, 2004. ISBN 0-8493-2547-1.

DURAND, G. A., CORAZZA, M. L., BLANCO, A. M., CORAZZA, F. C. 2009. Dynamic optimization of the mashing process. In *Food Control*, vol. 20, 2009, no. 12, p. 1127-1140.

CHLÁDEK, L. 2007. *Pivovarnictví*. Praha: Grada Publishing, 2007, 207 p. ISBN 978-80-247-1616-9.

JONES, B. L. 2005. Endoproteases of barley and malt. In *Journal of Cereal Science*, vol. 42, 2005, p. 139-156.

KOSAŘ, K., PROCHÁZKA, S. 2000. *Technologie výroby sladu a piva*. Brno : VÚPS, 2000. 398 p. ISBN 80-902658-6-3.

KUNZE, W. 1999. *Technology of Brewing and Malting, 2nd edition*, VLB Berlin, Germany 1999, ISBN 3-921 690-49-8.

LEJSEK, T., ŤOPKA, P. 1991. *Stroje a zařízení pro učební odbor biochemik-biochemička se zaměřením pro výrobu piva a sladu*. Praha: Institut výchovy a vzdělávání MZe ČR, 1991, 194 p.

MONTANARI, L., FLORIDI, S., MARCONI, O., TIRONZELLI, M., FANTOZZI, P. 2004. Effect of mashing procedures on brewing. In *European Food Research and Technology*, vol. 221, 2005, no. 1-2, p. 175-179.

MOUSIA, Z., BALKIN, R. C., PANDIELLA, S. S., WEBB, C. 2003. The effect of milling parameters on starch hydrolysis of milled malt in the brewing process. In *Process Biochemistry*, vol. 39, 2003, p. 2213-2219.

NARZISS, L. 1992. *Die Bierbrauerei, Band II: Die Technologie der Würzebereitung*, 7th ed. Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart, 1992.

O'ROURKE, T. 1996. *Brewing*. In *Industrial enzymology*. New York: Stockton Press, 1996. ISBN 0-333-59464-9.

ŤOPKA, P., ŤOPKA, P. ml, 2000. Vystírání a Rmutování. In KOSAŘ, K., PROCHÁZKA, S. 2000. *Technologie výroby sladu a piva*. Brno : VÚPS, 2000. p. 174 - 189. ISBN 80-902658-6-3.

WILLAERT, R. 2007. The Beer Brewing Process: Wort Production and Beer Fermentation. In HUI, Y. H., CHANDAN, R. C., CLARK, S., CROSS, N. A., DOBBS, J. C., SHIMONI, E., SINHA, N., SMITH, E. B., SURAPAT, S., TOLDRÁ, F., TITCHENAL, A. 2007. *Handbook of Food Products Manufacturing*. Hoboken : Wiley, 2007. p. 444-452. ISBN 978-0-470-12524-3.

WUNDERLICH, S., BACK, W. 2009. Overview of Manufacturing Beer: Ingredients, Processes, and Quality Criteria. In *Beer in Health and Disease Prevention*. Burlington : Elsevier, 2009, ISBN 978-0-12-373891-2.

## Contact address:

Ing. Zigmund Tóth PhD., Department of Storing and Processing Plant Products, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Slovak University of Agriculture, Tr. A. Hlinku 2, 949 01 Nitra, Slovakia, E-mail: ztoth1@centrum.sk

Ing. Štefan Dráb, Department of Storing and Processing Plant Products, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Slovak University of Agriculture, Tr. A. Hlinku 2, 949 01 Nitra, Slovakia, E-mail: stefan.drab@uniag.sk

doc. Ing. Helena Frančáková CSC., Department of Storing and Processing Plant Products, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Slovak University of Agriculture, Tr. A. Hlinku 2, 949 01 Nitra, Slovakia, E-mail: helena.francakova@uniag.sk

Ing. Miriam Lišková PhD., Department of Storing and Processing Plant Products, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Slovak University of Agriculture, Tr. A. Hlinku 2, 949 01 Nitra, Slovakia, E-mail: miriam.liskova@uniag.sk

Ing. Jana Návojská, Department of Storing and Processing Plant Products, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Slovak University of Agriculture, Tr. A. Hlinku 2, 949 01 Nitra, Slovakia, Email: jana.navojska@uniag.sk

## RELATIONSHIPS AMONG PROCESSING AND RHEOLOGIC PARAMETERS DURING WHEAT DOUGH MIXING AND THEIR ASSETS FOR THE INDUSTRIAL PROCESSING

*Boris Žitný, Ladislav Haris, Zdenka Muchová, Miriam Líšková*

### ABSTRACT

The wheat dough mixing process today, is not perceived only as the blending process of the input materials. During the wheat dough mixing there are many factors which affect the final quality and processibility of wheat doughs. This study describe the rheologic behaviour of doughs mixed on the Diosna SP12 kneader in particular stages of their development in dependency from the mixing settings. The processing parameters as mixing energy, temperature increase and spiral rotation was monitored with the causal relationships to the evolving rheologic parameters of processed dough. The basic presumptions about interrelations among rheologic and processing parameters during dough development for used flours and mixer were adumbrated. The relations among rheological and processing properties towards to product quality were determined by baking tests.

**Keywords:** rheology, wheat dough, mixing

### INTRODUCTION

Wheat flour today, is the basic material for the production of modern bakery products in the world. The dough production is elemental condition for production in bakeries. From the sixties of last century, the wheat dough and the process of its creation and development were subjected to wide scientific research. **Kilborn and Tipples (1972)** formulated, that there are two basic conditions, which must be satisfied for the proper dough creation. The imparted mixing energy must be higher as the critical minimum for the dough and gluten development and the mixing intensity must be above the border for the dough creation. In the same work, they find out, that the amount of rotations of mixing element is different if the angular velocity of the element is different (if the amount of mixer work is constant). These results were confirmed by **Frazier et.al. (1975)** and proven by later authors. It is well known that dough properties can be affected by many features with different significance, therefore the dough development and processing optimization towards best quality bakery products is quite difficult problem. The quality and quantity of gluten macropolymers is the main factor, which determine the dough rheologic parameters, and therefore the products properties as well (**Gras et.al. 2000, Don et.al. 2005, Wang et.al. 2007**). However, the starch influence on the dough rheology is not insignificant (**Hoseney et.al. 1995**). The way, by which the proteins are formed during dough mixing are not random, what is supported by depolymerisation process during mixing (**Aussenac et. al. 2001, Skerritt et.al. 1999**). By depolymerisation, the content of GMP decrease from the start to the end of mixing, however the extent of depolymerisation is dissimilar for each particular quality of flour (**Lefebvre et.al. 2003, Kuktaite et. al. 2004**). The amount of GMP is well correlated with extensographic parameters, relaxation properties and loaf volume, but poor correlations are for dough consistency during dough development (**Gras et. al. 2000, Weegels et. al. 1997**). **Belton (2005)** sceptically thinking about the interrelations between proteins extracted from the doughs and their importance

as descriptors of the mixing process and argue, that these extracted proteins are only part from whole macromolecule, and furthermore it is chemically treated. Therefore their inner composition and properties are changed. Due to this, the extracted part is not same as the part of macromolecules which have major influence on the dough properties. The differences in quality of proteins extracts obtained from same flour sample is emphasized in work of **Kuktaite et.al. (2004)**. **Don et. al. (2003b)** presented, that the specific voluminosity of proteins might play key role in relation to changes in dough consistency during mixing. With the increase of GMP voluminosity, the amount of physically bonded water in GMP gel increase. This is possible only if molecular weight of GMP and inner GMP bonds increase as well. These results are in concordance with the observations of **Alava et.al. (2001)** and **Wesley et.al. (1998)**, where the water mobility measured by NIR and NMR during dough development, were minimal. Presumably, it is consequence of maximal aggregation of proteins at these stages of mixing. From this point, the proteins and other flour constituents react on the mechanical treatment during mixing and by evaluation of their reactions on these process is probably possible to determine that ones, which have major influence on the mixing process. Mixing process can be affected by the parameters of mixer as mixer geometry and speed of mixing (**Haraszy et.al. 2008, Gras et.al. 2000**), which play a key role during creation of dough matrix and final quality of bakery products (**Aamodt et. al. 2003, Basaran a Göcmen 2003**). By increasing of mixer speed (Farinograph), the dough consistency increasing too, while the stability decrease (**Olivier and Allen 1992**). The mixer geometry play significant role during dough formation, what is highlighted in the paper of **Mani et.al. (2002)**, where the comparable consistency of dough were achieved on three mixers independently with the same flour sample (Farinograph, Mixograph and Hobart mixer), but the time of mixing were different for each mixer. The wet gluten was washed from dough in different stages of mixing in work of **Abang Zaidel et.al. (2008)**, the results conform that the elasticity of gluten were higher in point of maximal development with higher values for stronger flours. The elasticity of gluten altered in dependency from the mixing



stage (from which the gluten was washed). The elasticity of dough was higher as elasticity of gluten, what is contrary with findings of **Kuktaite et.al. (2005)**, which determine opposite trend in strong flours. For the determination of optimal consistency, the energy consumption profile of mixer could be utilizable. This approach were applied by **Hwang and Gunasekaran (2001)**, where the maximum of work input were evaluated as optimal consistency. The optimum was differ for strong and weak flours. Furthermore, the amount of energy per kg of dough was dependent from amount of mixed dough. The main problem in wheat dough mixing optimization is, that there are poor corelations between dough parameters evaluated from laboratory mixers in comparison to parameters of doughs prepared in industrial mixers (**Haraszi et. al. 2008, Don et al., 2005, Zounis a Qualil 1997**). The consequences of mixer geometry lie in the complexity of mixing forces which are applied during mixing inside active mixing space. The different force vectors cause different changes and reactions in dough molecular structures (**Dobrasczyk and Morgenstern 2003**). **Weegels et.al. (1996)** in their effort eliminated the differences in mixer geometries define the point of mixing action equality as the point in which the content of GMP is same for the same sample. The same content of GMP was determined for Mixigraph (3.5 min.), Farinograph 10 (7.0 min) and Farinograph 50 (12.0 min.).

Due to the complexity of the creation of dough during dough development and numerous factors which play role in these processes, it is needed to provide measurable relations for industrial usage, which must be derived from the industrial mixer. For this purpose, all measurement of mixing energy, templerature and rotation were evaluated with using of the model of industrial kneader - Diosna SP12, which possess same mixer geometry as industrial devices. The resulting rheologic parameters and bakery test were evaluated in relation to mixing parameters.

## MATERIAL AND METHODOLOGY

For the determination of changes during mixing, the two samples of flour type T512 (Vitaflora Kolárovo, Slovakia) with defined properties were used. The samples of the flours were evaluated according to the described methods. The content of the ash (ICC standard 104/1, 1990), content of the nitrogenous components (STN ISO 1871, 1997), moisture content (ICC standard 110/1, 1976) content of the wet gluten (ICC standard No. 106/2, 1984), content of starch (STN EN ISO 10520, 2002), falling number (ICC standard 107/1, 1995), extensibility of the gluten (STN 46 101-9, 1997) and Zeleny index (ICC standard 115/1, 1994) have been determined. The characterization of the rheological properties was performed by the Farinograph-E (Brabender OhG, Duisburg, Germany) (ICC standard 115/1, 1997), Extensograph-E (Brabender OhG) (ICC standard 114/1, 1992), Amylograph-E (Brabender OhG) (ICC standard 126/1, 1992). Falling number characterization was determined by Falling number 1500 Perten (ICC standard 107/1, 1995).

The dough was prepared with addition of 2.23% NaCl (db), saccharose 1.0% (wb), yeast (4% wb) and with distilled water (Farinograph waterabsorption to 500 FU adjusted without yeast). Each flour sample were mixed according to the various regimes of mixing by Diosna SP12, where the following parameters were evaluated: temperature increase (with use of electronic thermal test probe Pt 100), the number of revolutions of mixing spiral, the mixing speed as revolution frequency per second at the constant rounds of the mixing bowl and energy consumption on the rotor (energy requirement). Finished dough was subsequently evaluated by the Farinograph and Extensograph modified methodologies according to **Zitny et. al. (2010)**. During baking test, the formed dough loaf were placed to the baking form and rise in the rise chamber (30°C/30 min.). The baking tests were performed in the MIWE condo oven, during 35 min., temperature/time of first baking step = 220°C/20 min, and for second step = 240°C/15 min. Doughs were mixed by DIOSNA SP12 with all recipe components at once. The penetration tests were performed on Extensograph-E, by using of penetration solid sphere made from lead (Pb) with diameter 7.0 mm, which was connected with the moving hook of Extensograph device by fibre (length 0.3 m / material - nylon). The volume of loafs were measured after 4 hour cooling (lab. Temperature 25°C) and measured by using of seeds. Setting of the Diosna SP 12 mixer during tests is shown in Table 1.

**Table 1 Settings of the Diosna SP12 mixer**

$\omega$ [Hz] / R [U] / $\omega_D$ [Hz]	$\omega$ [Hz] / R [U] / $\omega_D$ [Hz]
30 Hz/ 450 U /50 Hz	70 Hz/ 550U /50 Hz
30 Hz/ 750 U /50 Hz	70 Hz/ 1000U /50 Hz
50 Hz/ 500U /50 Hz	70 Hz/ 520U /30 Hz
50 Hz/ 880U /50 Hz	70 Hz/ 940U /30 Hz
50 Hz/ 1000U /50 Hz	70 Hz/ 1000U /30 Hz
60 Hz/ 580U /50 Hz	80 Hz/ 580U /50 Hz
60 Hz/ 880U /50 Hz	80 Hz/ 880U /50 Hz
60 Hz/ 1000U /50 Hz	80 Hz/ 1000U /50 Hz

$\omega$  [Hz] – speed of spiral, R [U] – number of revolutions of mixer spiral,  $\omega_D$  [Hz] – speed of mixing bowl.

**Table 2 The parameters evaluated for individual tests**

<b>G.5</b>	viscoelastic index after 5 cm (resistance after 5 cm/ extensibility)
<b>Gmax</b>	viscoelastic index in maximum of extensographic curve (resistance in max / extensibility)
<b>Fp</b>	penetration force
<b>ExE</b>	extensographic energy
<b>Vm</b>	loaf density (volume per gram of crust)
<b>dE/dU</b>	the changes of mixinf energy over rotation of spiral
<b>dT/dU</b>	the changes of temperature progress during mixing over number of spiral rotation

## RESULTS AND DISCUSION

The used flour samples are evaluated in Table 3. Both samples are suitable for bakery production and accomplish requests for bakery flours.

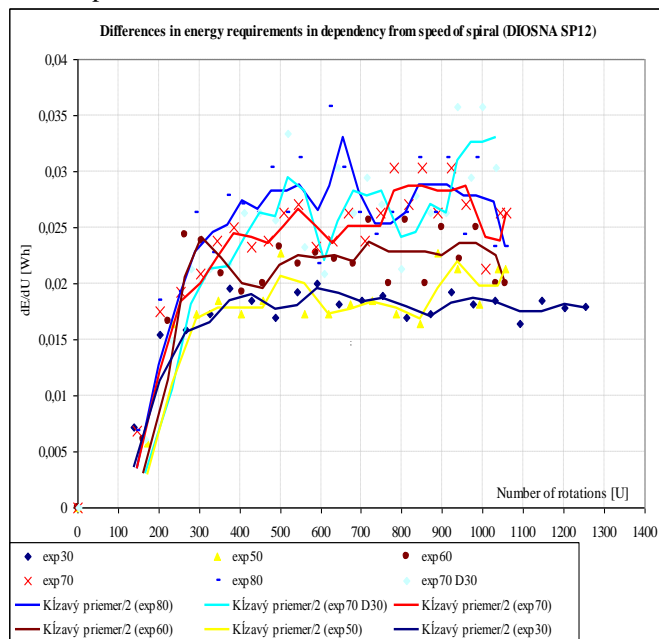
**Table 3 Flour sample characteristics.**

Flour properties	Sample A	Sample B
Ash [%]	0.55 ± 0.02	0.54 ± 0.02
Falling number [s]	261 ± 9	298 ± 14
N x 5.25 [hm.%]	11.9 ± 0.2	12.2 ± 0.1
Starch content [%]	71.5 ± 0.4	72.1 ± 0.3
Zeleny test [cm <sup>3</sup> ]	35 ± 1	39 ± 1
Max. Consistency [FU]	504 ± 8	500 ± 5
Waterabsorption 500 FU [%]	54.8 ± 0.1	58.8 ± 0.1
Waterabsorption (14 %) [%]	54.2 ± 0.1	58.7 ± 0.1
Development time [min]	1.7 ± 0.1	2.5 ± 0.1
Stability [min]	9.4 ± 0.1	11.3 ± 0.1
Degree of softening [FU]	32 ± 6	20 ± 5
Degree of softening ICC [FU]	59 ± 5	33 ± 5
Farinograph quality number (FQN)	97 ± 18	131 ± 9
Begin of gelatinization [°C]	62.6 ± 0.1	59.3 ± 0.2
Gelatinization maximum [AU]	465 ± 12	798 ± 35
Temperature in maximum [°C]	82.0 ± 0.0	86.1 ± 0.2

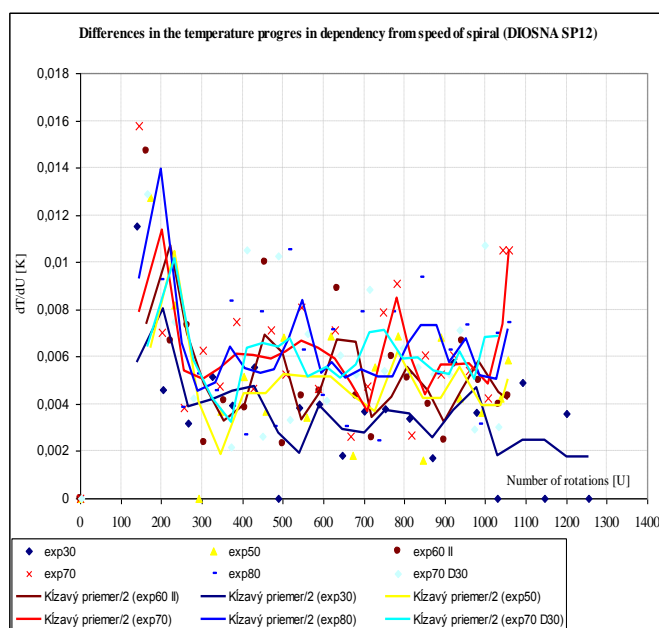
During dough development, the energy requirements for spiral motion and temperature increase of dough vary in a wide range (Fig.1 and Fig.2). With the increasing of mixing speed, the energy demands for one spiral revolution is higher with some stages, which could be described as peaks of kneaders work input. These peaks are not in same interval of number of revolutions, and depends from angular velocity of mixing spiral. These claims are fundamentally consistent with results of Zounies and Qualil (1997) or other authors (Haraszi et.al. 2008, Oliveier and Allen 1992). Zheng et.al. (2000) determine the exact amount of mixing energy for strong and weak flour samples (as [Wh.kg<sup>-1</sup>], strong flour 18 and weak flour 9.7) for double blade mixer. These results are inconsistent with our measurement, probably due to the different mixer geometry and dissimilar speeds of mixing elements. This have significant influence for dough development (Mani et.al. 2002, Hwang a Gunasekaran, 2001) and gluten structure (Weegels et.al 1996).

The temperature progress during mixing is strictly connected to the processes which are play role during particular stages of mixing, from flour hydration through dough development to dough overmixing. The temperature flow on figure 2 are represented by temperature change in the same measuring intervals as the measuring intervals for energy consumption on figure 1. It is visible that initial hydration in interval around 200U caused dissipation of energy in form of heat, in interval from 300U to 400U, the temperature increase was low, probably due to the dough structure formation, during which the energy is used more for creation of inner bounds than for dissipation in form of heat. Further course of changes in temperature could be described in details only within limited accuracy. By comparison of fig.1 and fig.2 for each one mixing speed, there are some perceptible connections. The energy consumption during processing of dough with lower spiral speed at 30 Hz, is similar in peaks localisation. For 50 Hz and 60 Hz, the

progress of curves for energy requirements and temperature flow show some rough tendentions. When the work input increase (behind of 400U) the temperature decrease or is almost constant and vice versa. When the work input is almost constant, the temperature start to rise. Over the border of 800U, the changes of temperature growth and work input have similar course (the ending of the curves is excluded due to the ending of process – turn off the mixer). There is only rough approximation, which could play role in mixing process optimization. The detailed study of these thermal processes is needed and it is theme for further work.



**Fig.1 Energy consumption profiles of Diosna SP12 mixer during dough mixing under differend speeds of spiral (the lines represent the moving average of measured work inputs)**



**Fig.2 Temperature progress during mixing proces on Diosna SP12 mixer under differend speeds of spiral (the lines represent the moving average of points)**

The maximal consistency of dough could be probably connected with maximal work input, but this is not

necessary, if is taken to account, that the applied forces and therefore energy requirements in active mixing space can be affected not only by dough elasticity, but with forces arising from sticky dough behaviour after protein matrix degradation, as well. The extensographic evaluation (Ex. energy Fig. 3, and indexes of viscoelasticity G.5, Gmax – Fig. 4) shown, that extensographic energy increased with the speed of mixing, but only the maximal peak of extensographic energy (Ex.E) for each one speed regime is considered. The elasticity in these maximal peaks of Ex.E, is higher in comparison to other values, measured under same mixing conditions. Important is, that extensograph energy can rise up with increasing of both, elasticity and plasticity. Substantial is, if the ratio between elastic and plastic response of dough is in equilibrium or not. This is presumably the reason, why Ex.E can rise up even if elasticity (Gmax, G.5) falling down at the end of the mixing spectra (Fig. 3 and 4). This is probably implication of depolymerisation effect, when the proteins molecular weight inside dough matrix decreased as consequence of imparted mixing energy behind the point of maximal consistency (Don et.al. 2003 a,b,c, Gras et. al. 2000, Lefebvre et. al. 2003). This is rheologically accompanied with decreasing of consistency and elasticity of doughs. At the end of the mixing spectra (around 1000 U), the elasticity of all dough decreased, while Ex.E decreased slightly, but only for speeds over 70 Hz. During relaxation phase (Fig. 3 and Fig. 4) the doughs tested after 30 min. with previous extension showed higher elasticity (G.5.15+ and Gmax.15+) opposite to elasticity of doughs only rested 30 min (G5.30 and Gmax.30). Furthermore, their elasticity was higher in comparison to doughs tested after 15 min. of resting. This observation is valid for all mixing speeds, and probably relate with claims about reaggregation of GMP during resting, where the partially rested doughs are more mobile inside dough matrix, therefore are able to create new crosslinks and entanglements among protein chains, which finally lead to the increasing of dough resistance and hence elasticity (Li et al. 2003, Rao et.al. 2000). The trend of Ex.E values and values of loaf volume are very similar for mixing speeds up to 50 Hz, over this border, the course of loaf volume values are more close to Gmax values. With the increasing of volume per gram of loaf crust (Fig. 5), the penetration force (Fig. 6) decrease. According to Don et. al. (2005) and many other authors (Haraszi et. al. 2008, Kuktaite et. al. 2005, Weegels et. al. 1996) the volume of wheat loafs is well correlated to amount of GMP, and GMP are well correlated with results of extension test (extensibility, resistance to uniaxial extension). The optimally mixed dough must lead to bigger loaf volumes with elastic crumb. Crumb elasticity depend from cell wall elasticity, and is well known, that it is function of cell gas volume (with the increasing of gas volume, the cell wall is more thinner and loss the elasticity). So, the consequence of this claim is, that the objective comparison of crumb elasticity (performed by penetration test) could be performed only on the loafs with same volume (under same processing conditions). Anyway, the course of changes in penetration force is

fundamentally comparable with viscoelastic moduli G.5 and Gmax from extensographic tests. The loaf density trends is contrary well comparable with course of changes of Ex.E. Only the results from speed 60 Hz and 580U is out of this connection. For the further work, the mathematical reciprocal correlations for all properties and features will provide.

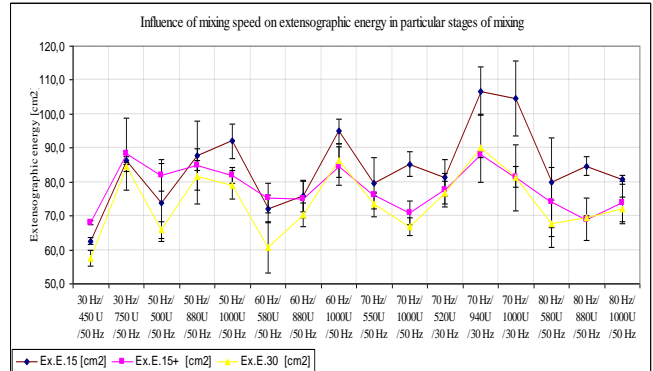


Fig. 3. The changes of extensographic energy in dependency from speed of mixing and number of spiral revolutions

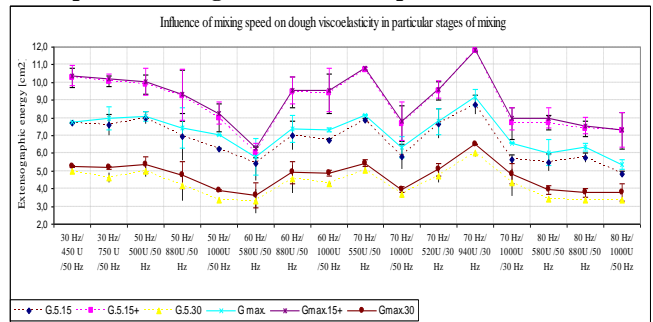


Fig. 4. The changes of dough viscoelastic properties - dependency from speed of mixing and number of spiral revolutions

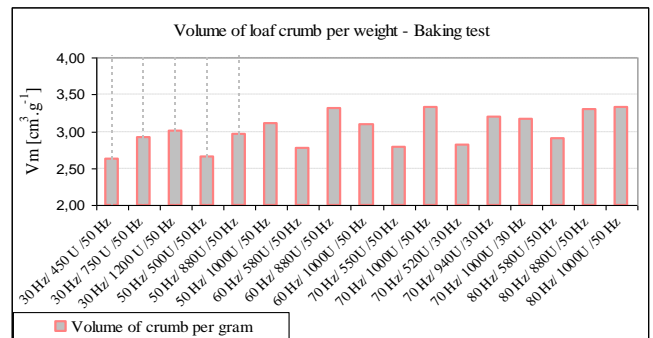


Fig. 5. The changes of loaf crumb density - dependency of loaf density from speed of mixing and number of spiral revolutions

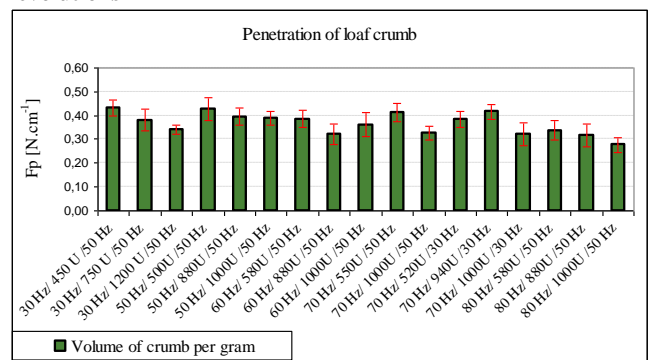


Fig. 6 The changes in penetration force in dependency from speed of mixing and number of spiral revolutions

## CONCLUSION

This paper described the changes in energy requirements during dough development and mixing. With increasing of spiral speed, the work input for spiral rotation increase too. The progress of energy requirements among the particular speeds of mixer in different, furthermore, the the increase of work input is caused by different physical forces at the start and at the end of mixing. During first stage the dough is more elastic, while at the end of mixing period became more plastic, what contrary cause the increase of work input. The plastic and elastic response of dough had influence on the way of temperature progress behaviour. However these observations are only rough, there are fundamental perception about interrelations, which could be possible applied for optimization of mixing process. The penetration tests reveals its close relation to viscoelasticity of dough, while density of baked loafs are connected to extensographic energy. The crumb elasticity and density of crumb are inversely correlated. All results were connected only to used flour samples and laboratory equipment, therefore usability and versatility of results are limited.

## REFERENCES

- AAMODT, A., MAGNUS, E. M., FAERGESTAD, E. M. 2003. Effect of flour quality, ascorbic acid, and DATEM on dough Rheological parameters and hearth loves characteristics. In *Journal of Food Science*, vol. 68, 2003, p. 2201-2210.
- ABANG ZAIDEL, D.N., CHIN, N. L., ABDUL RAHMAN, R., KARIM, R. 2008. Rheological characterisation of gluten from extensibility measurement. In *Journal of Food Engineering*, vol. 86, 2008, p. 549-556.
- ALAVA, J. M., MILLAR, P. J., SALMON, S. E. 2001. The Determination of Wheat Breadmaking Performance and Bread Dough Mixing Time by NIR Spectroscopy for High Speed Mixers. In *Journal of Cereal Science*, vol. 33, 2001, p. 71-81.
- AUSSENAC, T., CARRCELLER, J. L., KLEIBER, D. 2001. Changes in SDS solubility of Glutenin Polymers During Dough Mixing and Resting. In *Cereal Chemistry*, vol. 78, 2001, p. 39-45.
- BASARAN, A., GÖCMEN, D. 2003. Effect of low mixing temperature on dough rheology and bread properties. In *European Food Research Technology*, vol. 217, 2003, p. 134-142.
- BELTON, P. S. 2005. New approaches to study the molecular basis of the mechanical properties of gluten. In *Journal of Cereal Science*, vol. 41, 2005, p. 203-211.
- DOBRA SZCZYK, B. J., MORGENSTERN, M. P. 2003. Rheology and the breadmaking process. In *Journal of Cereal Science*, vol. 38, 2003, p. 229-245.
- DON, C., LICHTENDONK, W. J., PLIJTER, J. J., HAMER, R. J. 2003a. Glutenin macropolymer: a gel formed by particles. In *Journal of Cereal Science*, vol. 37, 2003, p. 1-7.
- DON, C., LICHTENDONK, W. J., PLIJTER, J. J., HAMER, R. J. 2003b. Understanding the link between GMP and dough: from glutenin particles in flour towards developed dough. In *Journal of Cereal Science*, vol. 38, p. 157-165.
- DON, C., LICHTENDONK, W., PLIJTER, J. J., HAMER, R. J. 2003c. Glutenin macropolymer is a gel formed by particles: average particle size determines the gel rigidity. In: Dickinson, E., Van Vliet, T. 2003. *Food Colloids—Biopolymers and Materials 2003*. Cambridge : Royal Society of Chemistry, 2003, p. 275-283. ISBN 978-0-85404-871-7.
- 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. In *Journal of Cereal Science*, vol. 41, 2005, p. 69-83.
- FRAZIER, P. J., DANIELS, N. W. R., RUSSELL, E. P.W. 1975. Rheology and the continuous breadmaking process. In *Cereal Chemistry*, vol. 52, 1975, p. 106-130.
- GRAS, P. W., CARPENTER, H. C., ANDERSEN, R. S. 2000. Modelling the developmental rheology of wheat flour dough using extension tests. In *Journal of Cereal Science*, vol. 31, 2000, p. 1-13.
- HARASZI, R., LARROQUE, O. R., BUTOW, B. J., GALE, K. R., BEKES, F. 2008. Differential mixing action effects on functional properties and polymeric protein size distribution of wheat dough. In *Journal of cereal Science*, vol. 47, 2008, p. 41-51.
- HOSENEY, R. C. 1994. *Principles of cereal science and technology*. St. Paul, Minesota: AACC, USA, 1994, 378 p. ISBN 0913250791.
- ICC, 2003: *Standard Methods*. International Association for Cereal Science and Technology. Retrieved from the web: <[www.icc.or.at/publ.php](http://www.icc.or.at/publ.php)>.
- HWANG, C. H., GUNASEKARAN, S. 2001. Determining Dough mixing Characteristics Power Consumption Profile of a Conventional Mixer. In *Cereal Chemistry*, vol. 78, 2001, p. 88-92.
- KILBORN, R. H., TIPPLES, K. H. 1972. Factors affecting mechanical dough development. I. Effect of mixing intensity and work input. In *Cereal chemistry*, vol. 49, 1972, p. 34-37.
- KUKTAITE, R., LARSSON, H., JOHANSSON, E. 2004. Variation in protein composition of wheat flour and its relationship to dough mixing behaviour. In *Journal of Cereal Science*, vol. 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. In *Cereal Chemistry*, vol. 82, 2005, p. 375-384.
- LEFEBVRE, J., VAN VLIET, T. 2003. Physico-chemical aspects of gluten proteins. In *Progress in Biotechnology*, vol. 23, 2003, p. 94-102.
- LI, W., DOBRASZCZYK, B. J., SCHOFIELD, J. D. 2003. Stress relaxation behaviour of wheat dough, gluten and gluten protein fractions. In *Cereal Chemistry*, vol. 80, 2003, p. 333-338.
- MANI, K., TRAGARDH, C., ELIASSON, A. CH., LINDAHL, L. 1992. Water content, water soluble fraction, and mixing affect fundamental rheological properties of wheat flour doughs. In *Journal of Food Science*, vol. 57, 1992, p. 1198-1209.
- OLIVIER, J. R., ALLEN, H. M. 1992. The prediction of Bread Making Performance using of Farinograph and

Extensograph. In *Journal of Cereal Science*, vol. 15, 1992, p. 79-89.

RAO V. K., MULVANEY, S. J., DEXTER, J. E. 2000. Rheological Characterisation of Long- and Short- mixing Fluors Based on Stress Relaxation. In *Journal of Cereal Science*, vol. 31, 2000, p. 159-171.

SKERRITT, J. H., HAC, L., LINDSAY, M. P., BEKES, F. 1999. Depolymerization of the Glutenin Macropolymer: II. Differences in Retention of Specific Glutenin Subunits. In *Cereal Chemistry*, vol. 76, 1999, p. 402-409.

WANG, J. S., ZHAOA, M. M., ZHAO, Q. Z. 2007. Correlation of glutenin macropolymer with viscoelastic properties during dough mixing. In *Journal of Cereal Science*, vol. 45, 2007, p. 128-133.

WEEGELS, P. L., 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. In *Journal of cereal Science*, vol. 23, 1996, p. 103-111.

WEEGELS, P. L., HAMER, R. J., SCHOFIELD, J. D. 1997. Functional Properties of Low Mr Wheat Proteins III. Effects on Composition of the Glutenin Macropolymer During Dough Mixing and Resting. In *Journal of cereal Science*, vol. 25, 1997, p. 165-173.

WESLEY, I. J., LARSEN, N., OSBORNE, B. G., SKERRITT, J. H. 1998. Non-invasive monitoring of dough mixing by near infrared spectroscopy. In *Journal of Cereal Science*, vol. 27, 1998, p. 61-69.

ZHENG, H., MORGENSTERN, M. P., CAMPANELLA, O. H., LARSEN, N. G. 2000. Rheological Properties of Dough During Mechanical Dough Development. In *Journal of Cereal Science*, vol. 32, 2000, p. 293-306.

ZOUNIS, S., QUAIL, K. J., 1997. Predicting test Bakery Requirements from Laboratory Mixing Tests. In *Journal of Cereal Science*, vol. 27, 1997, p. 185-196.

ŽITNÝ, B., MUCHOVÁ, Z. 2010. New Approach to the Study of Dough Mixing Processes. In *Czech Journal of Food Science*, vol. 28, 2010, p. 94 -107.

**Acknowledgments:**

This article was supported by grant project VEGA 1/0661/09.

**Contact address:**

Boris Žitný, Department of Storage and Processing of Plant Products, Faculty of Biotechnology and Food Science, Slovak University of Agriculture, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovakia, E-mail: zitnyb@t-zones.sk

Ladislav Haris, Department of Storage and Processing of Plant Products, Faculty of Biotechnology and Food Science, Slovak University of Agriculture, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovakia, E-mail: labor@vitaflora.sk

Zdenka Muchová, Department of Storage and Processing of Plant Products, Faculty of Biotechnology and Food Science, Slovak University of Agriculture, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovakia. E-mail: zdenka.muchova@uniao.sk

Miriám Líšková, Department of Storage and Processing of Plant Products, Faculty of Biotechnology and Food Science, Slovak University of Agriculture, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra Slovakia, E-mail: miriam.liskova@uniao.sk

# H A C C P

---

# C O N S U L T I N G

---

## Školenia akreditované Ministerstvom školsťva SR

- **Školenie:** Zásady Správnej výrobnnej praxe a systému HACCP
- **Školenie:** Systém manažérstva bezpečnosti potravín podľa STN EN ISO 22000:2005

**Vydávame osvedčenie o absolvovaní školenia s  
celoživotnou platnosťou**

- HACCP
- IFS
- BRC
- ISO 22000
- ISO 9001
- Recenzia etikiet
- Prevádzkové poriadky
- Audity

**HACCP Consulting**  
**0908164361, 0904138562**  
**[www.haccp.szm.sk](http://www.haccp.szm.sk)**





FAKULTA BIOTECHNOLÓGIE A POTRAVINÁRSTVA



*Chuť, ktorá Vás nasýti.*

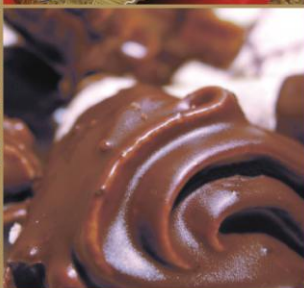
MLYN



CESTOVINÁREŇ



PEKÁREŇ



CUKRÁREŇ

*MPC CESSI a.s., Mlynská 22, 052 01 Spišská Nová Ves  
tel.: 053/4182 281, fax: 053/4424 216  
e-mail: obchod@mpc.sk, www.cessi.sk*

**centralchem**<sup>®</sup>

chemická obchodná spoločnosť

Plynárenská 2, 821 09  
BRATISLAVA

tel. +421-2-534 14 156

fax +421-2-534 13 657

E-mail:

centralchem@centralchem.sk

www.centralchem.sk

**ecol Trade**

SEPAROVANÝ ZBER RASTLINNÝCH  
OLEJOV A TUKOV

0948 52 32 14

J. Haška 1, 949 01 NITRA

E-mail: ecoltrade@ecoltrade.sk

www.ecoltrade.sk



<b>PROCESS OF OBTAINING OF SUGAR FROM SUGAR BEET AND INFLUENCE ON ITS QUALITY</b> <i>Tatiana Bojňanská, Marek Bennár, Helena Frančáková, Marián Tokár</i> .....	1-4
<b>ANALYSE OF TRAITS OF MILK PRODUCTION IN DAIRY COWS</b> <i>Lenka Duchoňová, Ernest Jozef Bujko, Roman Kocman, Julius Žitný, Anna Trakovická, Cyril Hrnčar</i> .....	5-9
<b>CHANGES IN MILK COMPOSITION AS A RESULT OF METABOLIC DISORDERS OF DAIRY COWS</b> <i>Terézia Filipejová, Jaroslav Kováčik, Katarína Kirchnerová, Vladimír Foltýs</i> .....	10-16
<b>SURFACE GROWTH OF GEOTRICHUM CANDIDUM: EFFECT OF THE ENVIRONMENTAL FACTORS ON ITS DYNAMICS</b> <i>Anna Hudecová, Ľubomír Valík, Denisa Liptáková</i> .....	17-22
<b>EFFECT OF NICKEL AND ZINC PERORAL ADMINISTRATION ON MEAT QUALITY OF RABBITS</b> <i>Anna Kalafova, Jaroslav Kováčik, Peter Massányi, Norbert Lukáčik, Rastislav Jurčík, Monika Schneidgenová</i> .....	23-26
<b>MICROBIAL QUALITY OF HONEY MIXTURE WITH POLLEN</b> <i>Vladimíra Kňazovická, Miroslava Kačániová, Mária Dovičičová, Martin Melich, Miriam Kadási-Horáková, Zuzana Barboráková, Ján Mareček</i> .....	27-32
<b>PERCEPTION OF BIO-FOOD LABELING BY CONSUMERS IN SLOVAKIA</b> <i>Dagmar Kozelová, Peter Zajác, Eva Matejková, Lucia Zeleňáková, Ľubomír Lopašovský, Ladislav Mura, Jozef Čapla, Vladimír Vietoris</i> .....	33-38
<b>EFFECT OF MILLING SOFTNESS ON BASIC TECHNOLOGICAL PARAMETERS OF WORT</b> <i>Miriám Líšková, Miriám Líšková, Tatiana Bojňanská, Ján Mareček</i> .....	39-42
<b>FREQUENTED SPECIES OF FIELD FUNGI ON WHEAT AND THEIR POTENTIAL PRODUCTION OF TOXIC METABOLITES</b> <i>Zuzana Mašková, Dana Tančinová, Zuzana Barboráková, Michal Mokry</i> .....	43-50
<b>APPLICATION OF WESTERN BLOT ANALYSIS FOR DETECTION OF PROLAMIN PROTEINS IN CEREAL GRAINS AND BREAD</b> <i>Peter Socha, Barbara Mickowska, Elżbieta Mazur, Dana Urmínská, Ewa Ciešlik</i> .....	51-55
<b>MINERALS, TRACE ELEMENTS AND FLAVONOIDS CONTENT IN WHITE AND COLOURED KIDNEY BEAN</b> <i>Mária Timoracká, Alena Vollmannová, Dalaram Ismael</i> .....	56-60
<b>THE INFLUENCE OF FIRST WORT PART AND AFTERWORDS ON SACCHARIFICATION OF WORT</b> <i>Žigmund Tóth, Štefan Dráb, Helena Frančáková, Miriám Líšková, Jana Návojská</i> .....	61-64
<b>RELATIONSHIPS AMONG PROCESSING AND RHEOLOGIC PARAMETERS DURING WHEAT DOUGH MIXING AND THEIR ASSETS FOR THE INDUSTRIAL PROCESSING</b> <i>Boris Žitný, Ladislav Haris, Zdenka Muchová, Miriám Líšková</i> .....	65-70



## Laboratóriá + lekárne + servis = TRILAB

# 3lab

**Napriek tomu že spoločnosť TRILAB s. r. o. vznikla iba pred necelými dvoma rokmi, má za sebou úspešný štart a mnoho významných referencií.**

Zameriavame sa na špičkové riešenia pre laboratóriá. Mokré stoly, digestory, vzduchotechnika a široké spektrum laboratórnej techniky to je naša doména. V oblasti lekárni a oficín sa venujeme komplexnému servisu prístrojov a zariadení pre lekárne a nábytkovým riešeniam aj špeciálnemu nábytku.

Samozrejmosťou aj v našej firme je prispôbovanie sa vkusu a potrebám zákazníka. Procesu prípravy a konzultácií venujeme niekoľkonásobne viac času ako samotnej výrobe. Naša činnosť prirodzene zahŕňa poradenstvo a know – how nahromadený rokmi skúseností našich spolupracovníkov.

Kvalitu a servis berieme vážne. V laboratóriách vieme vyriešiť odolnosť takmer voči všetkým používaným chemikáliám, ktoré sú často veľmi limitujúce. Veda a technika napredujú míľovými krokmi a vďaka tomu, to čo bolo pred niekoľkými rokmi nemysliteľné je dnes celkom bežné a možno o tom ani neviete. Stačí sa nás opýtať...

Splniť vysoké nároky pri laboratórnom nábytku je možné iba vďaka použitiu špičkových certifikovaných vstupných materiálov. Kvalitnú chemicky odolnú keramiku,

rezistentné dosky, ventily a batérie či polypropylén dovážame zo zahraničia. Nábytok a digestory sú vlastnej výroby a neustále hľadáme možnosti, ako sa posunúť smerom k absolútne ideálnej funkčnosti a tiež variabilite v rámci prísne obmedzených možností.

V obchode s laboratórnymi prístrojmi sa orientujeme na vybavenie laboratórií, le-

**« Klienti dnes stále viac hľadajú odbornosť, ktorú nedosiahneme bez odborníkov. Všetko je o ľuďoch a na tých máme asi šťastie. »**

kární a priemyslu, váhami, destilačnými prístrojmi, mikroskopmi, sterilizátormi, laboratórnym sklom a podobne.

Na Slovensku sme výhradným predajcom a servisom pre analytické, presné a priemyselné váhy japonskej značky A&D. Predávame a zabezpečujeme servis aj teplotnej technike nemeckej značky GFL, teda destilačným prístrojom, hlboko mraziacim boxom, trepačkám a miešačkám. Paletu predávaného sortimentu sme rozšírili o ventilátory s príslušenstvom francúzskej značky SEAT, ktoré sú určené do najnáročnejších chemických a fyzikálnych podmienok laboratórií. Simulátory, anatomické modely a lekár-

ske trenažéry Adam Rouilly sú na Slovensku zatiaľ tiež iba vďaka firme TRILAB. Sme radi, že prispievame aj ku skvalitneniu školského procesu a podieľame sa na obnove mnohých školských laboratórií vrátane komplexných stavebných úprav, úprav elektro rozvodov, rozvodov plynu a vody vrátane revízií.

Odborníci, ktorí v spoločnosti TRILAB s. r. o. pracujú majú na starosti poradenstvo, záručný a pozáručný servis. Sme schopní veľmi pružne reagovať na potreby zákazníkov v každom regióne.

Možnosť víkendových montáží robí naše dodávky maximálne flexibilné a montážna čata prirodzene zanecháva čistú prácu. To všetko z nás robí hráča s ktorým treba počítať a v blízkej budúcnosti vám radi pomôžeme pri realizácii vašich snov o funkčnom, peknom a bezpečnom laboratóriu. Odborne poradíme a pomôžeme nájsť optimálne riešenia. Pekné a funkčné veci nemusia byť nedostupné...

BC. MICHAL KUDLA  
KONATEL  
TRILAB s. r. o.  
KUDLA@TRILAB.SK  
WWW.TRILAB.SK