

1

2013



Vedecký časopis pre potravinárstvo
Scientific Journal for Food Industry

číslo

www.potravinarstvo.com

Volume 7
Issue 1
2013

potravinárstvo 1 (7)
ISSN 1337-0960 (online)

Potravinárstvo

Vedecký časopis pre potravinárstvo

Šéfredaktor:

Ing. Peter Zajác, PhD.
SPU Nitra

Zástupca šéf redaktora:

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

Redaktori:

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

Predseda redakčnej rady:

prof. 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.,
Wroclav, 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,
Wroclav, Poland
Roman Labuda,
Tuln, Austria
Zuzana Bírošová,
Ministry of Agriculture SR

• **Potravinárstvo**® • **Ročník**: 7, č. 1/2013 • 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 nepravidelne niekoľko krát do roka v elektronickej forme • **Internetová stránka časopisu**: www.potravinarstvo.com • **Adresa redakcie**: Slivková 12, 951 01 Nitrianske Hrnčiarovce • **E-mail**: info@potravinarstvo.com • **Tel.**: +421908164361, +421904138562 • **Jazyková úprava**: Publikované články neprešli jazykovou úpravou • **Grafická úprava**: Flame-studio Nitra • **Tlač**: SPU Nitra • **Cena čísla**: nepredajné • **Distribuuje**: Združenie HACCP Consulting prostredníctvom internetovej stránky www.potravinarstvo.com • **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, DOAJ, Google Scholar a CrossRef, UlrichsWeb Global Serials Directory • **Názov a skratka pomocou ktorých je časopis indexovaný v medzinárodných databázach**: *Potravinárstvo, Potr.*
Všetky práva vyhradené, © 2012 Potravinárstvo®
Evidenčné číslo Ministerstva kultúry SR: 3771/09
ISSN 1337-0960 (elektronická verzia)



Katedra hygieny a bezpečnosti
potravín

H A C C P
CONSULTING

CHANGES OF PLASMA LIPIDS IN RELATION TO THE REGULAR CONSUMPTION OF BILBERRIES (*VACCINIUM MYRTILLUS L.*)

Marta Habánová, Miroslav Habán, Peter Chlebo, Marianna Schwarzová

ABSTRACT

In this work we studied the impact of regular consumption of bilberries on the lipid profile and triglycerides in the blood plasma. The research involved 18 women (average age 49.7) and 7 men (average age 52.8), who consumed 150 g of bilberries three times a week for 6 weeks. Based on these results, we can conclude that the average total cholesterol levels of women decreased from 5.65 mmol.l⁻¹ at the beginning of research to 5.11 mmol.l⁻¹. At end of the study, the average total cholesterol was 5.47 mmol.l⁻¹. Similar results were found in the LDL cholesterol - the level of cholesterol of the second blood collection dropped from 4.06 mmol.l⁻¹ to 3.70 mmol.l⁻¹ and at the end of the study it increased again to 4.00 mmol.l⁻¹. We observed a slight increase in HDL cholesterol (by 0.07 mmol.l⁻¹) and reduction of triglycerides (by 0.16 mmol.l⁻¹). The total cholesterol monitored men due to the regular consumption of bilberries decreased by 0.36 mmol.l⁻¹, LDL cholesterol by 0.31 mmol.l⁻¹, HDL cholesterol by 0.49 mmol.l⁻¹ and triglycerides by 0.49 mmol.l⁻¹. The improvement of triglycerides and lipid profile in blood plasma of monitored subjects can be evaluated positively. The observed data confirm the biological activity of bilberries and the effectiveness of their use in prevention and comprehensive treatment of cardiovascular diseases.

Keywords: bilberries; total cholesterol; LDL cholesterol; HDL cholesterol; triacylglycerides

ÚVOD

Drobné ovocie tvorí súčasť ľudskej výživy od doby neolitickej a mnohé druhy sú dodnes široko pestované, pretože sú významným zdrojom esenciálnych látok pre zdravie (Pomerleau et al., 2003; Riboli a Norat, 2003). Carlsen et al. (2003) poukazujú na to, že drobné ovocie sa vyznačuje vyšším obsahom celkových polyfenolov v porovnaní s ostatnými druhmi ovocia a zeleniny a disponuje silnou schopnosťou vychytávať voľné kyslíkové radikály, ako aj inhibíciu oxidačných procesov (Määttä - Riihinen et al., 2004). Častejšia konzumácia potravín bohatých na polyfenoly sa spája s nižším rizikom mŕtvice, ischemickej choroby srdca, zápalových markerov a oxidačného stresu u dospelých (Dauchet et al., 2006; Holt et al., 2009; Hermsdorff et al., 2010), diabetes mellitus 2. typu (Carter et al., 2010) ako aj ochorení spájajúcich sa s vekom (Halliwell, 2008) a s nimi súvisiace zhoršovanie pamäti a poznávania (Spencer et al., 2009). Viaceré štúdie potvrdzujú, že zvýšený tlak krvi je rizikovým faktorom kardiovaskulárnych ochorení (Evans, 2001; Mosterd et al., 2001; Svensson et al., 2010). Jennings et al. (2012) poukazujú na skutočnosť, že zvýšenie frekvencie príjmu celkových flavonoidov (1 - 2 porcie drobného ovocia denne) významne znižuje hodnoty krvného tlaku a prispieva tak k celkovému zníženiu rizika kardiovaskulárnych ochorení. Zo všetkých druhov ovocia práve bobuľové ovocie vykazuje vďaka vysokému obsahu polyfenolov značný kardio-ochranný efekt (Basu et al., 2010a), potvrdený viacerými epidemiologickými a klinickými štúdiami (Michalska et al., 2010; Basu et al., 2010b). Podobne aj Stoclet et al. (2004) uvádzajú, že výsledky *in vivo* pokusov s

potravínami bohatými na polyfenoly potvrdzujú ich blahodárne účinky pri liečbe hypertenzie a iných rizikových faktorov, ako napr. hyperlipidémia, prípadne následky fajčenia a objasnenie mechanizmu ich účinku by malo poskytnúť nový pohľad na kardiovaskulárnu biológiu a patofyziológiu a možno aj nové ciele pre výrobu protektívnych liečiv cievneho systému alebo výživových doplnkov. Brusnica čučoriedková (*Vaccinium myrtillus L.*) disponuje vysokým obsahom celkových polyfenolov ako aj antokyánov a jej fenolické zloženie je často predmetom rozličných štúdií (Jaakola et al., 2004; Määttä-Riihinen et al., 2005; Burdulis et al., 2007; Lätti et al., 2008; Riihinen et al., 2008; Habánová, 2012). Cieľom našej práce bolo overiť vplyv pravidelnej konzumácie čučoriedok na vybrané biochemické parametre krvného séra vybranej populácie.

MATERIÁL A METÓDY

Do experimentu bolo zaradených 25 probandov (18 žien s priemerným vekom 49,7 rokov a 7 mužov s priemerným vekom 52,8 rokov), ktorí boli oboznámení s podmienkami výskumu, čo potvrdili podpisom informovaného súhlasu. Probandi konzumovali 150 g čučoriedok 3-krát do týždňa počas 6 týždňov. Stravovanie počas trvania výskumu nebolo žiadnym spôsobom ovplyvňované, naopak probandi boli vyzvaní ku stravovaniu bez zmeny svojich stravovacích návykov a tiež bez zmeny životného štýlu. U probandov sme sledovali biochemické parametre krvného séra - lipidový profil, a to: celkový cholesterol, LDL cholesterol, HDL cholesterol a triacylglyceroly (TAG). Vzorka krvi bola probandom odobratá na začiatku, t.j. pred začatím konzumácie čučoriedok, ktorá bola

zároveň použitá ako kontrola. Ďalší odber krvi bol uskutočnený po 3 týždňoch konzumácie a posledný odber krvi bol vykonaný bezprostredne po skončení konzumácie čučoriedok (po 6 týždňoch). Krv bola odoberaná nalačno štandardným spôsobom. Po separovaní krvného séra boli vzorky skladované v hlbokomraziacom boxe pri teplote -80 °C do uskutočnenia analýz. Jednotlivé biochemické ukazovatele - celkový cholesterol, LDL cholesterol, HDL cholesterol a triacylglyceroly sa stanovovali z rozmrazených vzoriek krvnej plazmy pomocou biochemického analyzátoru LISA 200 s použitím dostupných setov. Parametre metódy boli naprogramované pomocou aplikačného protokolu, dodaného dodávateľom reagensii (Ecomed, Slovensko) a prispôbeného pre podmienky nášho laboratória. Stanovené biochemické parametre krvného séra sa porovnávali s referenčnými hodnotami podľa NCEP (NCEP ATP III., 2001), pričom pri prevoде jednotiek z mg.dl⁻¹ na mmol.l⁻¹ sme použili nasledovné prepočítavacie koeficienty: celkový cholesterol, HDL cholesterol a LDL cholesterol: mg.dl⁻¹ x 0,0259 = mmol.l⁻¹, triacylglyceroly: mg.dl⁻¹ x 0,0114 = mmol.l⁻¹. Na štatistické vyhodnotenie sme použili program Excel Anova.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Na základe získaných výsledkov môžeme konštatovať, že na začiatku pokusu bola priemerná hladina celkového cholesterolu u sledovaných žien 5,65 mmol.l⁻¹ a u mužov 5,40 mmol.l⁻¹ (tab. 1). Po 3 týždňovej konzumácii brusnice čučoriedkovej sme zaznamenali štatisticky významné zníženie hladiny celkového cholesterolu u žien o 0,54 mmol.l⁻¹, u mužov bolo zistené zníženie celkového cholesterolu o 0,04 mmol.l⁻¹. Po 6 týždňovej konzumácii došlo u žien k miernemu zvýšeniu priemernej hladiny celkového cholesterolu na 5,47 mmol.l⁻¹, pričom u mužov sme naopak zaznamenali ďalší, štatisticky významný pokles cholesterolu na hodnotu 5,04 mmol.l⁻¹. Pri ďalších sledovaných parametroch boli zistené zmeny, ktoré však neboli štatisticky významné okrem hladiny triacylglycerolov u mužov, kde bola zistená štatisticky významná zmena vplyvom konzumácie brusnice čučoriedkovej medzi 1. a 3. odberom a tak isto medzi 2. a 3. odberom krvi.

Podobné výsledky, kedy po konzumácii potravín s biologicky účinnými látkami pri 2. kontrolnom odbere došlo k zníženiu sledovaných parametrov a na konci výskumu k miernemu zvýšeniu, publikovali **Mrázová (2010)** a **Čížmárová (2009)**.

Napriek tomu, že niektoré výsledky sledovaných parametrov neboli štatisticky významné, zisťovali sme, koľkým sledovaným probandom a ako sa v priebehu trvania štúdie menili hodnoty vybraných biochemických ukazovateľov podľa NCEP. Z tabuľky 2 vyplýva, že

optimálnu hladinu celkového cholesterolu malo pri 1. odbere 38,9 % žien a pri ďalších dvoch odberoch sa ich podiel zvýšil na 50 %. U mužov sa počet probandov s optimálnou hladinou celkového cholesterolu zvýšil zo 42,8 % na začiatku výskumu na 85,7 % na konci výskumu. Počet probandov s hraničnou hladinou sa u žien podstatne nemenil, zaznamenali sme však výrazný pokles mužov v tejto kategórii a to z 42,8 % pri 1. odbere cez 28,6 % pri 2. odbere až na 14,3 % pri 3. odbere krvi. Tak isto sme zaznamenali pokles počtu sledovaných žien s vysokou hladinou cholesterolu (nad 6,2 mmol.l⁻¹) z 27,8 % na začiatku výskumu na 16,5 % po 6 týždňoch pravidelnej konzumácie čučoriedok. U mužov sme zistili zvýšenie počtu zo 14,4 % na začiatku sledovania na 28,6 % po 2. odbere. Na konci výskumu ani jeden muž nemal hodnotu celkového cholesterolu vyššiu ako 6,2 mmol.l⁻¹, čo hodnotíme veľmi pozitívne.

V tabuľke 3 sú uvedené počty probandov (%) na základe zistenej hladiny LDL cholesterolu. Optimálnu hodnotu LDL cholesterolu sme zistili iba u 11,2 % žien a to pri 2. odbere a u 14,3 % mužov pri 3. odbere krvi, teda po 6 týždňoch konzumácie čučoriedok. Pozitívne hodnotíme zmeny v hodnotách LDL cholesterolu u žien vplyvom pravidelnej konzumácie čučoriedok, predovšetkým zníženie počtu probandiek v intervale s veľmi vysokou hladinou (nad 4,9 mmol.l⁻¹) z 22,2 % na 11,2 % a v intervale s vysokou hladinou (4,2 - 4,9 mmol.l⁻¹) z 27,8 % na 11,21 %. Naopak zvýšený počet probandiek bol zaznamenaný v intervale s hraničnou hodnotou (3,4 - 4,1 mmol.l⁻¹) z 22,2 % na 55,5 %. Bol zaznamenaný presun z kategórii veľmi vysoká hladina a vysoká hladina do kategórii s hraničnými hodnotami, ni však do kategórie optimálne hodnoty. Pri mužoch sme zistili, že ani jeden proband nemal veľmi vysokú hodnotu LDL cholesterolu (nad 4,9 mmol.l⁻¹). Počet probandov s vysokou hladinou LDL cholesterolu (4,2 - 4,9 mmol.l⁻¹) poklesol zo 42,8 % na 14,3 % a títo respondenti sa presunuli do kategórie s hraničnou hodnotou (3,4 - 4,1 mmol.l⁻¹), čo tak isto hodnotíme pozitívne. Podobné výsledky o vplyve konzumácie čučoriedok na znižovanie hladiny LDL cholesterolu uvádzajú **Mool (2008)** a **Šimala (2010)**.

Hodnoty HDL cholesterolu nižšie ako 1,2 mmol.l⁻¹ u žien a nižšie ako 1,0 mmol.l⁻¹ u mužov sa považujú za ukazovatele zvýšeného rizika srdcovo-cievnych ochorení (**Franeková et al., 2006**). U žien v našom sledovanom súbore malo hladinu HDL cholesterolu vyššiu ako 1,55 mmol.l⁻¹ na začiatku výskumu 66,7 % žien, hraničnú hladinu HDL cholesterolu (1,04-1,54 mmol.l⁻¹) malo 27,8 % žien (tab. 4). Nízka hladina cholesterolu (pod 1,03 mmol.l⁻¹) bola zistená len u 5,5 % žien. Pozitívne hodnotíme zníženie podielu probandiek s hraničnou hodnotou pri 3. odbere krvi na 16,7 % a ich presun do kategórie s optimálnou hladinou (83,3 %).

Tabuľka 1 Priemerné hodnoty sledovaných parametrov (mmol.l⁻¹) v priebehu pokusu (Kruskall Wallisov test)

sledovaný parameter (mmol.l ⁻¹)	ženy (n = 18)			muži (n = 7)		
	1. odber	2. odber	3. odber	1. odber	2. odber	3. odber
celkový cholesterol	5,65 ^{a*}	5,11 ^b	5,47 ^a	5,40 ^a	5,36 ^a	5,04 ^b
LDL cholesterol	4,06 ^a	3,70 ^a	4,00 ^a	3,95 ^a	3,77 ^a	3,64 ^a
HDL cholesterol	1,71 ^a	1,79 ^a	1,78 ^a	1,61 ^a	1,55 ^a	1,53 ^a
triacylglyceroly (TAG)	1,42 ^a	1,32 ^a	1,26 ^a	2,49 ^a	2,45 ^a	2,00 ^b

* hodnoty označené rovnakým písmenom nie sú štatisticky preukazné (P<0,05)

potravinárstvo

Tabuľka 2 Počet probandov (%) na základe zistenej hladiny celkového cholesterolu podľa NCEP (Národný cholesterolový edukačný program pre dospelých)

celkový cholesterol	probandi (%)					
	ženy			muži		
	1. odber	2. odber	3. odber	1. odber	2. odber	3. odber
optimálna hladina (pod 5,2 mmol.l ⁻¹)	38,9	50,0	50,0	42,8	42,8	85,7
hraničná hladina (5,2 – 6,2 mmol.l ⁻¹)	33,3	27,7	33,3	42,8	28,6	14,3
vysoká hladina (nad 6,2 mmol.l ⁻¹)	27,8	22,3	16,5	14,4	28,6	0

Tabuľka 3 Počet probandov (%) na základe zistenej hladiny LDL cholesterolu podľa NCEP (NCEP ATP III. 2001)

LDL cholesterol	probandov (%)					
	ženy			muži		
	1. odber	2. odber	3. odber	1. odber	2. odber	3. odber
optimálna hladina (pod 2,6 mmol.l ⁻¹)	0	11,2	0	0	0	14,3
hladina blízko optima (2,6 – 3,3 mmol.l ⁻¹)	27,8	22,2	22,2	28,6	57,1	28,6
hraničná hladina (3,4 – 4,1 mmol.l ⁻¹)	22,2	38,9	55,4	28,6	14,3	42,8
vysoká hladina (4,2 – 4,9 mmol.l ⁻¹)	27,8	22,2	11,2	42,8	28,6	14,3
veľmi vysoká hladina (nad 4,9 mmol.l ⁻¹)	22,2	5,5	11,2	0	0	0

Tabuľka 4 Počet probandov (%) na základe zistenej hladiny HDL cholesterolu podľa NCEP (NCEP ATP III. 2001)

HDL cholesterol	probandov (%)					
	ženy			muži		
	1. odber	2. odber	3. odber	1. odber	2. odber	3. odber
optimálna hladina (nad 1,55 mmol.l ⁻¹)	66,7	77,8	83,3	42,8	57,2	57,2
hraničná hladina (1,04 – 1,54 mmol.l ⁻¹)	27,8	22,2	16,7	57,2	42,8	42,8
nízka hladina (pod 1,03 mmol.l ⁻¹)	5,5	0	0	0	0	0

Tabuľka 5 Počet probandov (%) na základe zistenej hladiny triacylglycerolov podľa NCEP (NCEP ATP III. 2001)

triacylglyceroly (TAG)	probandi (%)					
	ženy			muži		
	1. odber	2. odber	3. odber	1. odber	2. odber	3. odber
normálna hladina (pod 1,7 mmol.l ⁻¹)	66,8	77,9	83,4	42,8	42,8	57,1
hraničná hladina (1,70 – 2,25 mmol.l ⁻¹)	27,7	16,6	11,1	14,3	28,6	28,6
vysoká hladina (2,26-5,64 mmol.l ⁻¹)	5,5	5,5	5,5	28,6	28,6	14,3
veľmi vysoká hladina (nad 5,65 mmol.l ⁻¹)	0	0	0	14,3	0	0

Individuálne zlepšenia nastali aj v mužskej populácii, kde sme zistili, že 57,2 % probandov bolo zaradených do kategórie s nízkou hladinou (<1,03 mmol.l⁻¹). Pri 2. a 3. odbere sa časť mužov presunula do kategórie s optimálnou hodnotou ($\geq 1,55$ mmol.l⁻¹), pretože v tejto kategórii sme zaznamenali počas obidvoch kontrolných odberov 57,2 % mužov. **Fábryová (2002)** uvádza, že nízke hodnoty HDL cholesterolu sú potenciálnym prediktorom včasnej ischemickej choroby srdca. Rozsiahle genetické, epidemiologické, klinické a intervenčné údaje

podporujú úlohu HDL cholesterolu ako protektívneho faktora v ateroskleróze. Zvýšenie HDL o 0,026 mmol.l⁻¹ zodpovedá redukcii kardiovaskulárnych príhod o 2 % u mužov a o 3 % u žien, pričom riziko klesá pri vzostupe HDL-C nad 1,0 mmol.l⁻¹ (**Manninen et al. 1988; Gordon et al., 1989**). V tabuľke 5 je uvedený počet probandov na základe zistenej hladiny TAG podľa NCEP. Na základe tohto rozdelenia môžeme konštatovať, že počet žien s normálnou hladinou TAG sa zvýšil vplyvom pravidelnej

konzumácie čučoriedok z 66,8 % pri 1. odbere krvi cez 77,9 % pri 2. odbere krvi až na 83,4 % na konci výskumu. Podobne došlo k zvýšeniu počtu mužov v tejto kategórii zo 42,8 % na 57,1 %. Veľmi pozitívne hodnotíme skutočnosť, že došlo k zníženiu počtu žien s hraničnou hodnotou TAG z 27,7 % na začiatku výskumu na 11,1 % na konci výskumu a mužov s veľmi vysokou hladinou TAG z 28,6 % na 14,3 %. U jedného probanda sme zaznamenali pokles TAG z 5,67 mmol.l⁻¹ na začiatku sledovania na 4,35 mmol.l⁻¹ pri 2. odbere a na 3,06 mmol.l⁻¹ na konci výskumu.

Pozitívne výsledky intervenčných štúdií zameraných na sledovanie vplyvu konzumácie ovocia bohatého na polyfenoly na zlepšenie zdravotného stavu publikovali viacerí autori (Pedersen et al., 2000; Kay a Holub, 2002; Ruel et al., 2005; Duthie et al., 2006; Erlund et al., 2008; Huntley, 2009), pričom uvádzajú, že pravidelná konzumácia drobného ovocia zohráva dôležitú úlohu v prevencii kardiovaskulárnych ochorení. Napriek tomu ešte stále chýbajú niektoré údaje, pretože táto problematika nie je jednoduchá. Pri niektorých ochoreniach sa môžu uplatňovať reaktívne druhy voľných radikálov, ktoré nie sú pre iné ochorenia dôležité, do intervenčných štúdií zameraných na sledovanie účinku antioxidantov sú často zaradovaní respondenti, ktorí už prekonalí patologické stavy (napr. ťažká fajčiari po prekonaní infarktu myokardu) a pre ktorých už nemajú takéto preventívne opatrenia potrebný účinok. Taktiež chýbajú dôkazy a údaje o použitých dávkach, pretože nižšie dávky a/alebo zmesi antioxidantov môžu mať viac výhod ako vyššie dávky jednotlivých látok (Halliwell, 2009). Okrem toho rozdielne výsledky môžu byť výsledkom rôznorodosti dizajnu štúdií, nedostatočnej kontroly, pomerne krátkej intervencie a nízkych dávok. Taktiež v niektorých štúdiách chýbajú podrobnosti o obsahu polyfenolov konzumovaných plodov, čo neguje porovnanie údajov. Na potvrdenie takýchto pozorovaní sa odporúčajú dobre organizované intervenčné štúdie, ktoré by skúmali širšiu škálu ovocia a vplyv ich dlhodobej konzumácie na organizmus (Chong et al., 2010).

ZÁVER

V práci sme sledovali vplyv pravidelnej konzumácie čučoriedok na lipidový profil a triacylglyceroly v krvnej plazme na vybranej skupine probandov. Výskumu sa zúčastnilo 18 žien s priemerným vekom 49,7 rokov a 7 mužov s priemerným vekom 52,8 rokov, ktorí konzumovali 150 g čučoriedok trikrát do týždňa počas 6 týždňov. Na základe získaných výsledkov môžeme konštatovať, že priemerná hodnota celkového cholesterolu sa u žien znížila z 5,65 mmol.l⁻¹ na začiatku výskumu na 5,11 mmol.l⁻¹ po troch týždňoch konzumácie. Na konci výskumu bola priemerná hladina celkového cholesterolu 5,47 mmol.l⁻¹. Podobný priebeh sme zaznamenali aj pri LDL cholesterolu - pri 2. odbere sa hladina znížila z 4,06 mmol.l⁻¹ na 3,70 mmol.l⁻¹ a na konci výskumu sa opäť zvýšila na 4,00 mmol.l⁻¹. Zaznamenali sme mierne zvýšenie HDL cholesterolu (o 0,07 mmol.l⁻¹) a zníženie TAG (o 0,16 mmol.l⁻¹).

Sledovaným mužom klesla hladina celkového cholesterolu vplyvom pravidelnej konzumácie čučoriedok o 0,36 mmol.l⁻¹, LDL cholesterolu o 0,31 mmol.l⁻¹, HDL cholesterolu o 0,08 mmol.l⁻¹ a TAG o 0,49 mmol.l⁻¹.

Pozitívne hodnotíme individuálne zlepšenia lipidového profilu a triacylglycerolov v krvnej plazme sledovaných probandov.

LITERATÚRA

- Basu, A., Du, M., Leyva, M. J., Sanchez, K., Betts, N. B., Wu, M., Aston, C. H. E., Lyons, T. J. 2010a. Blueberries Decrease Cardiovascular Risk Factors in Obese Men and Women with Metabolic Syndrome. *J Nutr.* vol. 140, no. 9, p.1582-1587. <http://dx.doi.org/10.3945/jn.110.124701> PMID:20660279
- Basu, A., Rhone, M., Lyons TJ. 2010b. Berries: emerging impact on cardiovascular health. *Nutr. Rev.*, vol 68, no. 3, p.168-177. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1753-4887.2010.00273.x> PMID:20384847
- Burdulis, D., Ivanauskas, L., Dirsė, V., Kazlauskas, S., Ražukas, A. 2007. Study of diversity of anthocyanin composition in bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) fruits. *Medicina*, vol. 43, p.971-977. PMID:18182842
- Carlsen, H., Myhrstad Mari, C. W., Thoresen, M., Moskaug, J. Q., Blomhoff, R. 2003. Berry Intake Increases the Activity of the γ -Glutamylcysteine Synthetase Promoter in Transgenic Reporter Mice. *J Nutr.*, vol. 133, no. 7, p. 2137-2140.
- Carter, P., Gray, L. J., Troughton, J., Khunti, K., Davies, M. J. 2010. Fruit and vegetable intake and incidence of type 2 diabetes mellitus: systematic review and meta-analysis. *BMJ* [online]. 2010 Aug 18;341:c4229. [cit. 2011-07-07]. <http://dx.doi.org/10.1136/bmj.c4229> PMID:21421004
- Čižmarová, M. 2009. *Antioxidačná kapacita a antiradikálová aktivita vybraných druhov vín*. Dizertačná práca. Nitra : SPU, 168 p.
- Dauchet, L., Amouyel, P., Hercberg, S., Dallongeville, J. 2006. Fruit and vegetable consumption and risk of coronary heart disease: a meta-analysis of cohort studies. *J Nutr.*, vol. 136, no. 10, p. 2588-2593. PMID:16988131
- Duthie, S. J., Jenkinson, A. McE., Crozier, A. et al. 2006. The effects of cranberry juice consumption on antioxidant status and biomarkers relating to heart disease and cancer in healthy human volunteers. *Eur. J. Nutr.*, vol. 45, No. 2, p. 113-122. PMID:16032375
- Evans, A., Tolonen, H., Hense, H. W., Ferrario, M., Sans S., Kuulasmaa, K. 2001. Who Monica trends in coronary risk factors in the WHO MONICA Project. *Int. J. Epidemiol.*, vol. 30, suppl. 1, p. S35-S40. http://dx.doi.org/10.1093/ije/30.suppl_1.S35 PMID:11759849
- Erlund, I., Koli, R., Alftan, G., Marniemi, J., Puukka, P., Mustonen, P., Mattila, P., Jula, A. 2008. Favorable effects of berry consumption on platelet function, blood pressure, and HDL cholesterol. *Am. J. Clin. Nutr.*, vol. 87, no. 2, p. 323-331. PMID:18258621
- Fábryová, F. 2002. Nové milénium - nové stratégie v prevencii a liečbe ischemickej choroby srdca: HDL cholesterol ako nový terapeutický cieľ. *Cardiol.*, vol. 11, no. 5, p. 307-316.
- Franeková, J., Friedecký, B., Jabor, A., Palička, V., Stožický, F., Soška V. 2006. Referenční meze, optimální a cílové hodnoty v kontextu klinického hodnocení lipidového profilu. *Klin. Biochem. Metab.*, 14 (35), no. 4, p. 207-210.
- Gordon, D. J., Probstfield, J. L., Garrison, R. J. et al. 1989. HDL cholesterol and cardiovascular disease. Four prospective American Studies. *Circulation* vol. 79, p.8-15. <http://dx.doi.org/10.1161/01.CIR.79.1.8> PMID:2642759
- Habánová, M. 2011. *Drobné ovocie ako významný zdroj antioxidantov vo výžive a profylaxii zdravia* : habilitačná práca : SPU, 110 p.

- Halliwell, B. 2009. The wanderings of a free radical. *Free Rad. Biol. Med.*, vol. 46, no. 5, p. 531-542. <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2008.11.008> PMID:19111608
- Hermisdorff, H. H., Zulet, M. A., Puchau, B., Martínez, J. A. 2010. Fruit and vegetable consumption and proinflammatory gene expression from peripheral blood mononuclear cells in young adults: a translational study. *Nutrition & Metabolism*, vol.13, no. 7, p. 42. <http://dx.doi.org/10.1186/1743-7075-7-42>
- Holt, E. M., Steffen, L. M., Moran, A., Basu, S., Steinberger, J., Ross, J. A., Hong, C. P., Sinaiko, A. R. 2009. Fruit and vegetable consumption and its relation to markers of inflammation and oxidative stress in adolescents. *J.Am Diet Assoc.*, vol. 109, no. 3, p. 414-421. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jada.2008.11.036> PMID:19248856
- Huntley, A. L. 2009. The health benefits of berry flavonoids for menopausal women: Cardiovascular disease, cancer and cognition. *Maturitas*, vol. 63, no. 4, p. 297-301. PMID:19520526
- Jaakola, L., Määttä-Riihinen, K., Kärenlampi, S., Hohtola, A. 2004. Activation of flavonoid biosynthesis by solar radiation in bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) leaves. *Planta*, vol. 218, no.5, p.721-728. <http://dx.doi.org/10.1007%2Fs00425-003-1161-x>
- Jennings, A., Welch, A. A., Fairweather, Tait, S. J. et al. 2012. Higher anthocyanin intake is associated with lower arterial stiffness and central blood pressure in women *Am. J. Clin. Nutr.*, vol. 96, no. 4, p. 781-788. <http://dx.doi.org/10.3945/ajcn.112.042036> PMID:22914551
- Jurkovičová, J. 2005. *Vieme zdravo žiť?* Univerzita Komenského v Bratislave : Bratislava, 166 s. ISBN 80-223-2132-X.
- Kay, C. D., HOLUB, B. J. 2002. The effect of wild blueberry (*Vaccinium angustifolium*) consumption on postprandial serum antioxidant status in humans subjects. *Bri. J. Nutr. Bri. J. Nutr.*, vol. 88, no. 4, p. 389-398. <http://dx.doi.org/10.1079/BJN2002665> PMID:12323088
- Lätti, A. K., Riihinen, K. R., Kainulainen, P. S. 2008. Analysis of Anthocyanin Variation in Wild Populations of Bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.). Finland *J. Agric. Food. Chem.*, vol. 56, no. 1, p 190-196. <http://dx.doi.org/10.1021/jf072857m> PMID:18072741
- Manninen, V., Elo, M. D., Frick, M. H. Et al. 1988. Lipid alternations and decline in the incidence of coronary heart disease in the Helsinki Heart Study. In *JAMA*, vol. 206, p. 641-651. <http://dx.doi.org/10.1001/jama.1988.03410050061031> PMID:3164788
- Määttä, Riihinen, K. R., Kamal, Eldin, A., Mattila, P. H., González-Paramás, A. M., Törrönen, A. R. 2004. Distribution and Contents of Phenolic Compounds in Eighteen Scandinavian Berry Species. *J. Agric. Food. Chem.*, vol. 52, no. 14, p. 4477-4486. <http://dx.doi.org/10.1021/jf049595y> PMID:15237955
- Määttä-Riihinen, K. R., Kähkönen, M. P., Törrönen, A. R., Heinen, I. M. 2005. Catechins and procyanidins in berries of *Vaccinium* species and their antioxidant activity. *J. Agric. Food. Chem.*, vol. 53, p. 8485-8491. <http://dx.doi.org/10.1021/jf0504081> PMID:16248542
- Michalska, M., Gluba, A., Mikhailidis, D. P., Nowak, P., Bielecka-Dabrowa, A., Rysz, J., Banach, M. 2010. The role of polyphenols in cardiovascular disease. *Medical Science Monitor*, vol. 16, no. 5, p. RA110-RA119. PMID:20424562
- Moll, J. 2008. What are the health benefits of blueberries. [online]. [cit. 2008-12-5]. Retrieved from the web: <http://cholesterol.about.com/od/cgolesterol/nutrition101/a/blueberries.htm>.
- Mosterd, A., Cost, B., Hoes, A. W., De Bruijne, M. C., Deckers, J. W., Hofman, A., Grobbee, D. E. 2001. The prognosis of heart failure in the general population: The rotterdam study. *Eur. Heart J.*, vol. 22, no. 15, p.1318-1327. <http://dx.doi.org/10.1053/euhj.2000.2533> PMID:11465964
- Mrázová, J. 2010. *Deficit selénu vo výžive ľudí a jeho suplementácia v bravčovom mäse*. Dizertačná práca. Nitra : SPU, 115 p.
- NCEP ATP III. 2001. Executive Summary of the third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III). *JAMA*, vol. 285, no. 19, p.2486-2496. <http://dx.doi.org/10.1001/jama.285.19.2486> PMID:11368702
- Pedersen, C. B., Kyle, J., Jenkinson, A. M., Gargner, P. T., Mcphail, D. B., Duthie, G. G. 2000. Effects of blueberry and cranberry juice consumption on the plasma antioxidant capacity of healthy female volunteers. *Eur. J. Clin. Nutr.*, vol. 54, no. 5, p. 405-408. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.ejcn.1600972> PMID:10822287
- Pomerleau, J., Mckee, M., Lobstein, T., Knai, C. 2003. The burden of disease attributable to nutrition in Europe. *Public Health Nutrition*, vol. 6, no. 5, p. 453-461. <http://dx.doi.org/10.1079/PHN2002456> PMID:12943561
- Riboli, E., Norat, T. 2003. Epidemiologic evidence of the protection of the protective effect of fruit and vegetables on cancer risk. *Am. J. Clin. Nutr.*, vol. 78, no. 3, p. 559S-569S. PMID:12936950
- Riihinen, K., Jaakola, L., Kärenlampi, S., Hohtola, A. 2008. Organ-specific distribution of phenolic compounds in bilberry (*Vaccinium myrtillus*) and 'northblue' blueberry (*Vaccinium corymbosum* x *V. angustifolium*). *Food. Chem.*, vol. 110, no. 1, p.156-160. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.01.057>,
- Ruel, G., Pomerleau, S., Couture, P., Lamarche, B., Couillard C. 2005. Changes in plasma antioxidant capacity and oxidised low-density lipoprotein levels in men after short-term cranberry juice consumption. *Metabolism*, vol. 54, no. 7, p. 856-861. <http://dx.doi.org/10.1016/j.metabol.2005.01.031> PMID:15988692
- Spencer, J. P. E., Vauzour, D., Rendeiro, C. 2009. Flavonoids and cognition: The molecular mechanisms underlying their behavioural effects. *Arch. Biochem. Biophys.* vol. 492, no. 1-2, p. 1- 9. <http://dx.doi.org/10.1016/j.abb.2009.10.003> PMID:19822127
- Stoclet, J. C., Chataigneau, T., Ndiaye, M., Oak, M. H., El Bedoui, J., Chataigneau, M., Schini-Kerth, V. B. 2004. Vascular protection by dietary polyphenols. *Eur. J. Pharm.*, vol.500, no. 1-3, p. 299-313. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2004.07.034> PMID:15464042
- Svensson, P., Sundberg, H., Lund, L.H., Stergren, J. 2010. Change in blood pressure during hospitalisation for acute heart failure predicts mortality. *Scandinavian Cardiovascular Journal*, vol. 44, no. 6, p. 325-330. <http://dx.doi.org/10.3109/14017431.2010.516367> PMID:21080863
- Šimala, D. 2010. Čučoriedka chocholíkátá. [online]. [cit. 2010-12-4]. <http://www.mountberry.sk/sk/pestovanie-ovocia/cucoriedka-chocholikata/>.

Acknowledgments:

This work was supported by grant VEGA 1/0166/13 and KEGA 025SPU-4/2012.

Contact address:

doc. Ing. Marta Habánová, PhD. Slovak University of Agriculture, Faculty of Agrobiological Sciences and Food Resources, Department of Human Nutrition, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovakia, E-mail: Marta.Habanova@uniag.sk

doc. Ing. Miroslav Habán, PhD. Slovak University of Agriculture, Faculty of Agrobiological Sciences and Food Resources, Department of Sustainable Agriculture and Herbology, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovakia, E-mail: Miroslav.Haban@uniag.sk

MUDr. Peter Chlebo, PhD. Slovak University of Agriculture, Faculty of Agrobiological Sciences and Food Resources, Department of Human Nutrition, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovakia, E-mail: Peter.Chlebo@uniag.sk

Ing. Marianna Schwarzová, Slovak University of Agriculture, Faculty of Agrobiological Sciences and Food Resources, Department of Human Nutrition, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovakia, E-mail: Marianna.Schwarzova@uniag.sk.

PREPARATION AND CHARACTERISTICS OF β -GLUCAN CONCENTRATE FROM BREWER'S YEAST AS THE ADDITIVE SUBSTANCE IN FOODS

Mária Kováčová, Ladislav Dodok, Livia Žofajová, Ľubomír Mikuš

ABSTRACT

The brewer's yeast was used for preparation of concentrate with content of β -glucan. Hot water extraction (100°C, 5 hours) and subsequently an alkaline extraction of sediment using 1 M NaOH at 90°C for 1 hour were used. β -glucan concentrate containing 59,15 % of β -glucan had good functional properties (water binding capacity 13,34 g water/1 g concentrate, fat binding capacity 6,86 g fat/1 g concentrate) and indicated biological action too. At concentration of 2 mg.ml⁻¹ DMSO (dimethylsulfoxid) was viability of murine L1210 leukemic cells reduced to 76.15 %. When observing the antioxidant activity it was identified, that the lipid peroxidation in linoleic acid samples was decreased during the presence of β -glucan concentrate. These results and good sensory properties like a bright colour and the pleasant taste and smell indicate, that prepared β -glucan concentrate has a potential to be used to improve the health – beneficial substances in the foods.

Keywords: *Saccharomyces cerevisiae*, brewer's yeast, β -glucan, antioxidative activity

ÚVOD

Glukány alebo β -glukány sú pomenovaním pre polysacharidy, ktorých jednotky glukózy sú viazané v polohách β -(1→3) glykozidovou väzbou (Freimund et al., 2003). Zdrojmi β -glukánov sú niektoré baktérie, vláknité huby, kvasinky, riasy a vyššie rastliny, predovšetkým obilniny (ovos, jačmeň). Kým v obilninách sú základné jednotky glukózy v reťazcoch β -glukánov viazané okrem β -(1→3) väzieb aj väzbami β -(1→4) (Velíšek, 1999), v mikroorganizmoch je štruktúra β -glukánov tvorená lineárnym centrálnym reťazcom z jednotiek D-glukózy pospájaných v polohe β -(1→3) a menších reťazcov, ktoré sa v rôznych intervaloch vetvia na hlavný lineárny reťazec v pozíciách β -(1→6) (Mantovani et al., 2008). Jedným z dôležitých zdrojov β -glukánov sú bunkové steny kvasiniek *Saccharomyces cerevisiae*, najmä v pekárskych a pivovarských kvasniciach. β -glukány bunkových stien pivovarských kvasiniek sa skladajú z β -(1→3) a β -(1→6) viazaných molekúl glukózy. Hlavnou štruktúrnou súčasťou steny kvasiniek sú β -(1→3) glukány, ktoré tvoria 30-45 % hmotnosti bunkovej steny, zatiaľ čo obsah β -(1→6) glukánov je relatívne malý (5-10 %), ale veľmi dôležitý (Soares & Soares, 2011). Kvasinkové β -glukány sú vo vode nerozpustné (Santipanichwong & Suphantharika, 2009). Rozpustné môžu byť po chemickej oxidácii (Giavasis & Biliaderis, 2007). Ako voľne žijúci organizmus *Saccharomyces cerevisiae* syntetizuje (1→3)- β -D-glukány so stupňom vetvenia 0,2, kým geneticky modifikované druhy známe ako Betafectin, produkujú (1→3)- β -D-glukány so stupňom vetvenia 0,5 (Giavasis & Biliaderis, 2007).

β -glukány kvasiniek priťahujú čoraz väčšiu pozornosť farmaceutického aj potravinárskeho priemyslu pre priaznivé účinky na zdravie ľudí. Výskumy pripisujú β -glukánom získaným z kvasiniek mnohostrannú biologickú aktivitu. Kvasinkové β -glukány zlepšujú profil krvných a pečňových lipidov, majú imunostimulačné vlastnosti, vykazujú prebiotickú účinnosť a antioxidačnú aktivitu (Piotrowska et al., 2009). Prejavujú sa antiparazitickými, antibakteriálnymi, antifungálnymi, protizápalovými, protinádorovými a hepatoprotektívnymi účinkami, majú vplyv na zníženie cholesterolu a antidiabetické a hypoglykemické účinky (Satrapai & Suphatharika, 2007; Mantovani et al., 2008). β -glukány boli opísané ako modulátory humorálnej aj bunkovej imunity. Ich účinky na stimuláciu imunitného systému sa prejavujú pozitívne proti najrôznejším baktériám, vírusom, plesniam a parazitom. β -(1→3)- (1→6) glukány aktivujú biele krvinky, ako sú makrofágy, granulocyty a monocyty, zodpovedné za obranu voči infekciám (Andrews et al., 2011).

Mechanizmus účinku β -glukánov nie je úplne objasnený, ale štúdie *in vitro* a *in vivo* dokazujú, že ich účinok súvisí so štruktúrou molekuly, ktorá závisí od molekulovej hmotnosti, stupňa vetvenia, prítomnosti sprievodných látok a konformačných vlastností (Freimund et al., 2003, Mantovani et al., 2008).

Prídavok β -glukánov do potravín zvyšuje nielen ich biologickú hodnotu, dôležitú pre zdravie, ale zároveň spôsobuje zmeny v ich senzorických a fyzikálno-chemických vlastnostiach, ktoré sú kľúčové pri rozhodovaní spotrebiteľa o kúpe potravín. β -glukány z pivovarských kvasníc môžu byť využité v rôznych potravinách ako zahusťovadlo, hydrokoloid, prísada

viažuca tuk či stabilizátor emulzií (Ferreira et al., 2010; Worrasinchai et al., 2006). Z dôvodu spotrebiteľskej akceptovateľnosti je veľmi dôležité, aby potraviny s prídavkom β -glukánov mali podobné alebo lepšie senzorické ukazovatele, ako potraviny bez ich prídavku (Piotrowska et al., 2009).

Cieľom našej práce bolo pripraviť a charakterizovať β -glukánový koncentrát z pivovarských kvasníc, určený na obohatenie potravín o zdraviu prospešné látky s biologickými účinkami na ľudský organizmus. Pozornosť bola venovaná tiež funkčným a organoleptickým vlastnostiam β -glukánového koncentráту.

MATERIÁL A METÓDY

Použitý materiál. Na prípravu β -glukánového koncentrátu sme použili komerčný prípravok sušené pivovarské kvasnice, krajina pôvodu Česká republika.

Stanovenie β -glukánu. Množstvo β -glukánu sme stanovili enzýmovou metódou pomocou komerčného kitu „Mushroom and yeast β -glucan“ (Megazyme, Írsko). Obsah β -glukánu sme vypočítali ako rozdiel stanoveného celkového glukánu a stanoveného α -glukánu podľa vzorca: β -glukán (% w/w) = [(Celkový glukán + oligoméry) (% w/w)] - [α -glukán + oligoméry) (% w/w)]. Na analýzu sme navážili 100 mg vzorky.

Príprava β -glukánového koncentrátu zo sušených pivovarských kvasníc. Pri príprave základného produktu z pivovarských sušených kvasníc sme postupovali kombináciou viacerých prác (Jaehrig et al., 2008; Zechner-Krpan et al., 2010) s malými obmenami. Vysterilizovanú suspenziu pivovarských kvasníc sme inkubovali na vodnom kúpeli 5 h pri 100°C, odstredili, nerozpustný podiel sme premyli destilovanou vodou a znovu odstredili, čím sme získali základný Produkt 1. Tento sme podrobili alkalickéj extrakcii (Suphantharika et al., 20003). Po premytí sedimentu destilovanou vodou a po jeho opracovaní ultrazvukom a premytí etanolom sme získali po vysušení výsledný β -glukánový koncentrát.

Stanovenie väznosti vody β -glukánového koncentrátu. Väznosť vody sme stanovili podľa literatúry (Ahmad et al., 2010). Väznosť vody sme určili ako hmotnosť vody zadržanej 1 g koncentrátu za podmienok metódy.

Stanovenie väznosti tuku β -glukánového koncentrátu. Postupovali sme podľa metódy uvedenej v literatúre (Pedroche et al., 2004) s malými modifikáciami. Väznosť tuku sme vyjadrili ako hmotnosť tuku zadržaného 1 g koncentrátu za podmienok metódy.

Stanovenie antioxidačnej aktivity β -glukánového koncentrátu. Antioxidačnú aktivitu sme stanovili na modelovom systéme kyseliny linolovej meraním množstva konjugovaných diénov spektrofotometricky v UV oblasti pri $\lambda = 234$ nm (Azizah et al., 1999). Na analýzu sme použili základný roztok β -glukánu s koncentráciou 10 mg/1 ml DMSO (dimetylsulfoxid).

Stanovenie viability buniek MTT testom. Účinok β -glukánového koncentrátu na myšaciu leukemickú bunkovú líniu (bunky L1210) sme testovali podľa (Carmichael et al, 1987). Podstatou testu je schopnosť mitochondriálnych dehydrogenáz redukovať rozpustnú tetrazóliovú soľ 3-(4,5-dimetyltiazol-2-yl)-2,5-difenylyltetrazolium bromid (MTT) žltej farby na

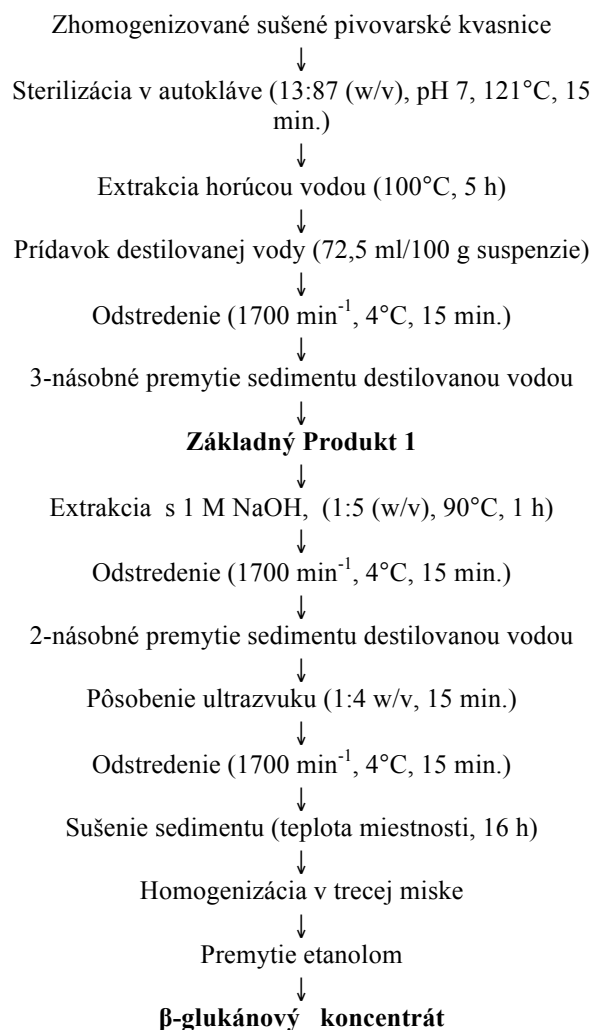
formazanové kryštály modrej farby. Viabilita buniek (%) sa vypočítala ako pomer absorpcie vzorky a absorpcie kontrolnej vzorky vynásobený číslom 100.

Senzorická analýza β -glukánového koncentrátu. Hodnotitelia hodnotili farbu a vôňu práškoveho koncentrátu a chuť suspenzie koncentrátu (100 mg koncentrátu/50 ml destilovanej vody). Intenzitu vnemu chuti a vône zaznamenávali na 10 cm úsečke, kde začiatok úsečky predstavoval 0 % a koniec 100 %. Pri hodnotení farby začiatok úsečky predstavoval bielu a koniec úsečky kakaovú farbu. Hodnotitelia posudzovali 4 vône (kvasnicová, bylinná, pivová, neutrálna), 9 chuťových kvalít (sladká, slaná, kyslá, horká, kvasnicová, bylinná, pivová, nešpecifikovaná, neutrálna) a príjemnosť vône a celkovej chuti koncentrátu (príjemná, nepríjemná).

VÝSLEDKY A DISKUSIA

1. Príprava a výtťažok β -glukánového koncentrátu

Postup prípravy β -glukánového koncentrátu zobrazuje schéma na Obrázku 1.



Obrázok 1 Postup prípravy β -glukánového koncentrátu z pivovarských kvasníc

Extrakciu horúcou vodou sa z pivovarských kvasníc odstránili vo vode rozpustné sprievodné látky. Výťažok mokrého Produktu 1 s obsahom 17,98 % sušiny bol 232,17 % na návažok pivovarských kvasníc. Po extrakcii Produktu 1 s hydroxidom sodným podľa schémy na Obrázku 1 sme získali ako sediment po odstredení mokrý β -glukánový koncentrát s výťažkom 1496,93 mg.l⁻¹g⁻¹ pivovarských kvasníc resp. 644,77 mg.l⁻¹g⁻¹ mokrého Produktu 1. Po vysušení β -glukánového koncentrátu tieto výťažky predstavovali 68,72 mg.l⁻¹g⁻¹ pivovarských kvasníc resp. 29,60 mg.l⁻¹g⁻¹ mokrého Produktu 1. Prítomnosť β -glukánu v pripravenom koncentráte sme dokázali IČ spektrometriou na základe absorpčných maxím v oblasti 1076 cm⁻¹ (prítomnosť glukopyranózy) a 898 cm⁻¹ (prítomnosť β -glykozidovej väzby) (Ahmad et al., 2010).

2. Obsah β -glukánu, funkčné vlastnosti a biologická aktivita β -glukánového koncentrátu

Obsahy celkového glukánu a α -glukánu stanovené enzýmovou metódou pomocou komerčného kitu, ktoré sú potrebné k výpočtu obsahu β -glukánu, sú uvedené v Tabuľke 1.

Tabuľka 1 Obsah celkového glukánu, α -glukánu a β -glukánu v pivovarských kvasniciach a β -glukánovom koncentráte

Vzorka	Celkový glukán (% w/w)	α -glukán (% w/w)	β -glukán (% w/w)
Pivovarské kvasnice	22,32 ±0,20	13,96 ±0,42	8,36
β -glukánový koncentrát	68,75 ±1,77	9,6 ±0,37	59,15

* **priemerná hodnota zo 4 stanovení ±smerodajná odchýlka

*** rozdiel priemerných hodnôt

Spracovaním kvasníc s alkalickým činidlom, ktoré spôsobí hydrolyzu a rozpustenie bunkových proteínov, nukleových kyselín, manánov a polárnych lipidov, sa obsah β -glukánu v β -glukánovom koncentráte výrazne

zvýšil v porovnaní s východiskovou surovinou (o 50,79 %). Koncentrát pripravený podľa schémy na Obrázku 1 mal vyšší obsah β -glukánu o 8,65 % ako produkt podľa Suphantharika et al. (2003).

Funkčné vlastnosti β -glukánového koncentrátu, ktoré sú významné z hľadiska využitia v potravinárstve, sme porovnali s kvasinkovým β -glukánovým štandardom a mikrokryštalickou celulórou (Tabuľka 2).

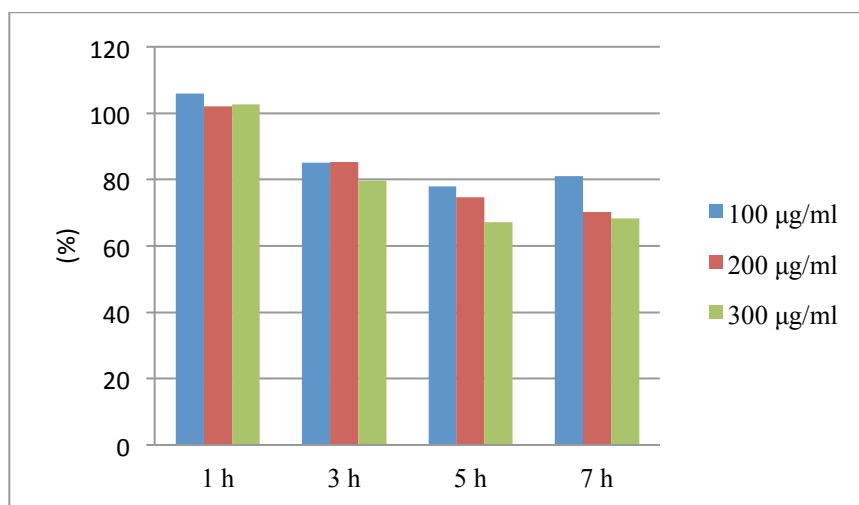
Tabuľka 2 Funkčné vlastnosti β -glukánového koncentrátu, kvasinkového β -glukánového štandardu a mikrokryštalickej celulózy

Vzorka	Väznosť vody* (g vody/1 g vzorky)	Väznosť tuku** (g tuku/1 g vzorky)
β -glukánový koncentrát	13,34 ±0,68	6,86 ±1,51
β -glukánový štandard	6,06 ±0,24	3,17 ±0,05
Mikrokryštalická celulóza	2,12 ±0,02	1,1 ±0,02

*, **priemerná hodnota z 3 stanovení ±smerodajná odchýlka

Najnižšiu väznosť vody aj tuku vykazuje mikrokryštalická celulóza, v ktorej sú jednotky glukózy pospájané β -(1→4) glykozidovými väzbami. Zaujímavé je zistenie, že nami pripravený β -glukánový koncentrát má približne dvojnásobnú väznosť vody aj tuku ako β -glukánový štandard, ktorý bol dodaný ako súčasť kitu na stanovenie β -glukánu. Výrobca uvádza porovnateľný obsah β -glukánu (59,50 %), ako má β -glukánový koncentrát (59,15 %). Môže to byť spôsobené tým, že ultrazvuk použitý pri príprave koncentrátu minimalizuje tvorbu aglomerátov počas sušenia, zlepšuje stabilitu β -glukánovej suspenzie a zabraňuje sedimentácii (Zechner-Krpan et al., 2010).

Údaje o **antioxidačnej aktivite β -glukánového koncentrátu** poskytuje graf na Obrázku 2. Konjugované diény vznikajúce oxidáciou kyseliny linolovej pri zvýšenej teplote (inkubácia modelového roztoku pri 50 °C)



Obrázok 2 Inhibičný účinok β -glukánu na vznik konjugovaných diénov počas inkubácie modelového systému s kyselinou linolovou

sme merali pri vlnovej dĺžke $\lambda = 234 \text{ nm}$ vo vopred zvolených časových intervaloch pre 3 koncentrácie β -glukánového koncentrátu. Z nameraných hodnôt absorbancií sme pre každú vzorku v zodpovedajúcej dĺžke inkubácie vyjadrili množstvo konjugovaných diénov v %, vzhľadom na hodnotu absorpcie slepého pokusu nameranej za rovnakých podmienok inkubácie.

Výsledky stanovenia antioxidačnej aktivity naznačujú, že kým na začiatku inkubácie pri teplote $50 \text{ }^\circ\text{C}$ β -glukánový koncentrát nevykazoval inhibičný účinok vzniku konjugovaných diénov, v priebehu ďalšej inkubácie bol inhibičný účinok pozorovaný. Vplyv koncentrácie β -glukánového koncentrátu na antioxidačnú aktivitu je výraznejší až v 5. hodine inkubácie. Zníženú peroxidáciu lipidov v prítomnosti β -glukánu pozorovali aj **Dietrich-Muszalska et al. (2011)** v krvnej plazme. **Jaehrig et al. (2008)** stanovovali antioxidačnú aktivitu β -glukánu izolovaného z kvasiniek *Saccharomyces cerevisiae* W34/70 inými metódami (EPR spektrometriou, metódou s ABTS• a pomocou biosenzorov). β -glukán vykazoval slabú antioxidačnú aktivitu, ale vzhľadom na použitie rôznych metód tieto výsledky s našimi hodnotami nemôžeme porovnať.

Účinok β -glukánového koncentrátu na myšaciu leukemickú bunkovú líniu (bunky L1210) sme testovali pri dvoch koncentráciách ($1 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ dimetylsulfoxidu a $2 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ dimetylsulfoxidu) a vyjadrili ako % viability (životnosti) buniek. Absorbancie vzoriek a slepého pokusu bez prídavku β -glukánového koncentrátu, z ktorých bola vypočítaná viabilita buniek L1210, obsahuje Tabuľka 3.

Tabuľka 3 Viabilita buniek L1210 po pôsobení β -glukánového koncentrátu

Vzorka	Absorbancia*	Viabilita buniek (%)
Kontrolka	0,253	100,00
β -glukánový koncentrát (1 mg/ml)	0,256	101,05
β -glukánový koncentrát (2 mg/ml)	0,193	76,15

*priemerná hodnota absorbancie z 3 stanovení

β -glukánový koncentrát aplikovaný pri vyššej testovanej koncentrácii ($2 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$) mal pozitívny účinok na usmrtenie myšacej leukemickej bunkovej línie, viabilita buniek L1210 sa po jeho pôsobení znížila na 76,15 %. Cytotoxický efekt β -glukánu izolovaného z kvasiniek *Saccharomyces cerevisiae* potvrdili aj **Magnani et al. (2009)** MTT testom, po 24 h expozícii na bunky CHO-K1 (ovariálne bunky čínskeho škrečka).

3. Senzorické hodnotenie β -glukánového koncentrátu

Cieľom sensorického hodnotenia bolo určiť farbu a charakter vône a chuti, ako aj celkovú príjemnosť vône a chuti β -glukánového koncentrátu. 10 hodnotitelia hodnotili farbu a vôňu práškového koncentrátu a chuť suspenzie β -glukánového koncentrátu vo vode. Priemerné hodnoty profilového testu pre jednotlivé deskriptyory obsahuje Tabuľka 4.

Tabuľka 4 Výsledky sensorického hodnotenia farby, chuti a vône β -glukánového koncentrátu

Deskriptor	Charakteristika	Priemer* (%)
Farba	Biela až kakaová	26,1
	Kvasnicová	18,0
Vôňa	Bylinná	3,3
	Pivová	8,6
	Neutrálna	23,4
	Príjemná	53,9
	Nepriemná	2,2
Chuť	Sladká	23,0
	Slaná	4,5
	Kyslá	1,9
	Horká	18,0
	Kvasnicová	7,4
	Bylinná	5,5
	Pivová	4,7
	Nešpecifikovaná	32,7
	Neutrálna	30,9
	Príjemná	50,1
	Nepriemná	4,2

*priemerná hodnota z hodnôt určených desiatimi hodnotiteľmi

Podľa výsledkov sensorického hodnotenia β -glukánový koncentrát má svetlú farbu (bližšie k bielej ako kakaovej), prevláda neutrálna a nešpecifikovaná chuť, bez zjavných príchutí kvasníc a piva, napriek tomu, že bol pripravený z pivovarských kvasníc. Pri posudzovaní vône je najvyššie hodnotená vôňa neutrálna. Vôňu aj chuť určili hodnotitelia ako príjemnú, čo sú dôležité vlastnosti pre jeho využitie ako aditívnej látky do potravín.

ZÁVER

Napriek tomu, že bunkové steny kvasiniek rodu *Saccharomyces* sú zdrojom β -glukánu, homopolyméru glukózy s imunostimulačnými vlastnosťami, v súčasnosti sa biomasa pivovarských kvasníc využíva hlavne ako potrava pre ošípané a prežúvavce. Potenciálne aplikácie pivovarských kvasníc, ktoré sú druhým hlavným vedľajším produktom pivovarského priemyslu, sú v súčasnosti predmetom štúdia viacerých autorov (**Ferreira et al., 2010; Hoseinifar et al., 2011**). Nami pripravený **β -glukánový koncentrát je určený na obohatenie potravín o zdraviu prospešné látky**. Potenciál pre uplatnenie tohto koncentrátu v potravinárstve mu dodávajú aj priaznivo hodnotené organoleptické vlastnosti – farba, vôňa a chuť koncentrátu a dobré funkčné vlastnosti.

LITERATÚRA

- Ahmad, A., Anjum, F. M., Zahoor, T., Nawaz, H., Ahmed, Z. 2010. Extraction and characterization of β -D-glucan from oat for industrial utilization. *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 46, p. 304-309. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2010.01.002> PMID:20083136
- Andrews, S. R., Sahu, N. P., Pal, A. K., Mukherjee, S. C., Kumar, S. 2011. Yeast extract, brewer's yeast and spirulina in diets for Labeo rohita fingerlings affect haemato-immunological responses and survival following Aeromonas

- hydrophila challenge. *Research in Veterinary Science*, vol. 91, p. 103-109. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rvsc.2010.08.009> PMID:20825959
- Azizah, A. H., Nik Ruslawati, N. M., Swee Tee, T. 1999. Extraction and characterization of antioxidant from cocoa by-products. *Food Chemistry*, vol. 64, p. 199-202. [http://dx.doi.org/10.1016/S0308-8146\(98\)00121-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0308-8146(98)00121-6)
- Carmichael, J., Degraff, W. G., Gazdar, A. F., Minna, J. D., Mitchell, J. B. 1987. Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Research*, vol. 47, 1987, p. 936-942. PMID:3802100
- Dietrich-Muszalska, A., Olas, B., Kontek, B., Rabe-Jabłońska, J. 2011. Beta-glucan from *Saccharomyces cerevisiae* reduces plasma lipid peroxidation induced by haloperidol. *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 49, p. 113-116. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2011.03.007> PMID:21421004
- Ferreira, I. M. P. L. V. O., Pinho, O., Vieira, E., Tavarella, J. G. 2010. Brewer's *saccharomyces* yeast biomass: characteristics and potential applications. *Trend in Food Science & Technology*, vol. 21, p. 77-84.
- Freumund, S., Sauter, M., Käppeli, O., Dutler, H., 2003. A new non-degrading isolation process for 1,3- β -D-glucan of high purity from baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Carbohydrate Polymers*, vol. 54, p. 159-171. [http://dx.doi.org/10.1016/S0144-8617\(03\)00162-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0144-8617(03)00162-0)
- Giavasis, I., Biliaderis, C. G. 2006. Microbial Polysaccharides. BILIADERIS, C. G. & IZYDORCZYK, M. S. *Functional Food Carbohydrates*. 1. vyd. CRC Press Int.: London, p. 176-200. ISBN-10: 10:0-8493-1822-X.
- Hoseinifar, S. H., Mirvaghefi, A., Merrifield, D. L. 2011. The effects of dietary inactive brewer's yeast *Saccharomyces cerevisiae* var. ellipsoideus on the growth, physiological responses and gut microbiota of juvenile beluga (*Huso huso*). *Aquaculture*, vol. 318, p. 90-94. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.04.043>
- Jaehrig, S. C., Rohn, S., Kroh, L. W., Wildenauer, F. X., Lisdat, F., Fleischer, L. G., Kurz, T. 2008. Antioxidative activity of (1 \rightarrow 3), (1 \rightarrow 6)- β -D-glucan from *Saccharomyces cerevisiae* grown on different media. *LWT*, vol. 41, p. 868-877.
- Magnani, M., Calliari, C. M., Macedo Jr., F. C., Mori, M. P., Cólus, I. M. S., Castro-Gomez, R. J. H. 2009. Optimized methodology for extraction of (1 \rightarrow 3)(1 \rightarrow 6)- β -D-glucan from *Saccharomyces cerevisiae* and in vitro evaluation of the cytotoxicity and genotoxicity of the corresponding carboxymethyl derivate. *Carbohydrate Polymers*, vol. 78, p. 658-665. <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2009.05.023>
- Mantovani, M. S., Bellini, M. F., Angeli, J. P. F., Oliviera, R. J., Silva, A. F., Ribeiro, L. R. 2008. β -glucan in promoting health: Prevention against mutation and cancer. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, vol. 658, p. 154-161. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mrrrev.2007.07.002> PMID:17827055
- Pedroche, J., Yust M. M., Lqari, H., Cirón-Calle, J., Alaiz, M., Vioque, J., Millán, F., 2004. *Brassica carinata* protein isolates: chemical composition, protein characterization and improvement of functional properties by hydrolysis. *Food Chemistry*, vol. 88, p. 337-346. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.01.045>
- Piotrowska, A., Waszkiewicz-Robak, B., Świdorski, F., 2009. Possibility of β -glucan from spent brewer's yeast addition to yogurts. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, vol. 59, p. 99-302.
- Santipanichwong, R., Suphantharika, M. 2009. Influence of different β -glucan on the physical and rheological properties egg yolk stabilized oil-in-water emulsions. *Food Hydrocolloids*, vol. 23, p. 1279-1287. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2008.10.006>
- Satrapai, S., Suphantharika, M. 2007. Influence of spent brewer's yeast β -glucan on gelatinization and retrogradation of rise starch. *Carbohydrate Polymers*, vol. 67, p. 500-510. <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2006.06.028>
- Soares, E. V., Soares, H. M. V. M. 2012. Bioremediation of industrial effluents containing heavy metals using brewing cells of *Saccharomyces cerevisiae* as a green technology: a review. *Environmental Science & Pollution Research*, vol. 19, p. 1066-1083. <http://dx.doi.org/10.1007/s11356-011-0671-5> PMID:22139299
- Suphantharika, M., Khunrae, P., Thanardkit, P., Verduyn, C. 2003. Preparation of spent brewer's yeast β -glucans with a potential application as an immunostimulant for black tiger shrimp, *Penaeus monodon*. *Bioresource Technology*, vol. 88, p. 55-60. [http://dx.doi.org/10.1016/S0960-8524\(02\)00257-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0960-8524(02)00257-2)
- Velišek, J. 1999. *Chemie potravin I*. 1. vyd. OSSIS : Tábor, 328 p., ISBN 80-902391-3-7.
- Worrasinchai, S., Suphantharika, M., Pinjai, S., Jamnong, P. 2006. β -glucan prepared from spent brewer's yeast as a fat replacer in mayonnaise. *Food Hydrocolloids*, vol. 20, p. 68-78. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2005.03.005>
- Zechner-Krpan, V., Petrović-Tominac, V., Galović, P., Galović, V., Filipović-Grčić, J., Srećec, S. 2010. Application of different drying methods on β -glucan isolated from spent brewer's yeast using alkaline procedure. *Agriculturae Conspectus Scientificus*, vol. 75, 2010, p. 45-50.

Acknowledgments:

This work was supported by The Agency of the Ministry of Education, Science, Research and Sport of the Slovak Republic for the Structural Funds of EU, OP R&D of ERDF within the frame of the project „Evaluation of natural substances and their selection for prevention and treatment of lifestyle diseases“ (ITMS 26240220040).

Contact address:

Ing. Mária Kováčová, PhD., Slovak University of Technology, Faculty of Chemical and Food Technology, Institute of Biochemistry, Nutrition and Health Protection, Radlinského 9, 812 37 Bratislava, Slovakia, E-mail: maria_kovacova@stuba.sk.

doc. Ing. Ladislav Dodok, PhD., Slovak University of Technology, Faculty of Chemical and Food Technology, Institute of Biochemistry, Nutrition and Health Protection, Radlinského 9, 812 37 Bratislava, Slovakia, E-mail: ladislav.dodok@stuba.sk.

Ing. Livia Žofajová, Slovak University of Technology, Faculty of Chemical and Food Technology, Institute of Biochemistry, Nutrition and Health Protection, Radlinského 9, 812 37 Bratislava, Slovakia, E-mail: lika.zof@gmail.com.

Ing. Ľubomír Mikuš, PhD., Slovak University of Technology, Faculty of Chemical and Food Technology, Institute of Biochemistry, Nutrition and Health Protection, Radlinského 9, 812 37 Bratislava, Slovakia, E-mail: lubomir.mikus1@gmail.com.

PERCEPTION OF BASIC TASTES AND THRESHOLD SENSITIVITY DURING TESTING OF SELECTED JUDGES

Petra Barborová, Jana Jančovičová, Peter Zajác, Jozef Čapla, Vladimír Vietoris

ABSTRACT

The sense of taste is one of the most important human senses. Alteration in taste perception can greatly interfere to our lives, because it influences our dietary habits and consequently general human health. Many physiological and external factors can cause the loss of taste perception. These factors include for example certain diseases, the side effect of the use of certain medicaments, head trauma, gender, dietary habits, smoking, role of saliva, age, stress and many more. In this paper we are discussing perception of basic tastes and threshold sensitivity during testing of selected groups of 500 sensory judges. A resolution taste test and sensitivity threshold test were performed using basic tastes (sour, bitter, salty, sweet, umami, astringent, metallic). We have found that the perception of basic tastes decrease with human age. Smoking leads to significant errors in the determination of basic tastes. Different mistakes occur in different age categories. This study suggests further researches, investigating various factors influencing taste perception.

Keywords: taste perception; smoking; threshold sensitivity; judge

ÚVOD

Schopnosť rozlišovať chuť a čuch nám umožňuje vybrať si potraviny presne podľa našich požiadaviek. Taktiež nám tieto zmysly umožňujú odhaliť potraviny s prebiehajúcimi nežiaducimi procesmi kazení (**Ritchie, 2002**).

Skutočné vnímanie chuti závisí od submikroskopických javov odohrávajúcich sa na molekulárnej úrovni biochemických pochodov organizmu. Molekuly chemických látok zodpovedných za chuť potraviny vstupujú do interakcií s membránami receptorových buniek v apikálnom póre chuťového pohárika. Táto interakcia následne vytvára elektrické zmeny v receptorovej bunke a tie vzápätí stimulujú aj reakciu súvisiacej nervovej bunky. Príslušné informácie putujú bezprostredne priamo do mozgu. Aby v mozgu vznikol chuťový vnem, musia do vnútra mozgu doraziť impulzy z niekoľkých susediacich senzoričných buniek súčasne (**The Human Body, 1989**).

Chuťové vnemy vznikajú v kôre temenných lalokov. Rozoznávame štyri základné chuťové vnemy - sladkú, horkú, kyslú a slanú. Ostatné chuťové vnemy sú zmiešané a možno ich z týchto odvodiť. Chuť má menšiu citlivosť ako čuch.

Aby ľudský organizmus dokázal vnímať chuť, musia byť chemické látky v tekutej forme. Dôležitú úlohu tu preto zohrávajú sliny. Suché potraviny poskytujú veľmi málo presných chuťových vnemov, pretože ich chuť sa prejaví až po rozpustení slinami (**Hummel a Welge-Lüssen, 2006**).

Chuťové impulzy vedú z jazyka dva nervy – lícný (*nervus facialis*) a jazykovohtanový (*nervus glossopharyngeus*) najskôr do špecializovaných buniek v mozgovom kmeni. Táto oblasť v mozgového kmeňa

taktiež slúži ako prvá zastávka pre iné pocity prichádzajúce z úst. Po prvotnom spracovaní v tomto centre mozgového kmeňa, odkiaľ stúpajú do talamu. Talamus je ďalšou stanicou, kde sa analyzujú chuťové impulzy skôr, ako sa informácia preniesie do časti mozgovej kôry, ktorá sa zúčastňuje na skutočnom uvedomení chuti. Kôra sa zaoberá i inými vnemami z jazyka a vytvára jemné odtiene.

Túto analýzu, prebiehajúcu v dolnej časti temenného laloku v kôre, ovplyvňujú aj čuchové informácie analyzované v susednom spánkovom laloku. Väčšina odtieňov chuťových vnemov vzniká vďaka čuchovým vnemom (**Binovský, 2010**).

Problematku vzniku chuťového vnemu v ústach a extra-orálnych tkanivách podrobne popísali (**Yamamoto a Ishimaru, 2012**), ktorý uvádzajú, že bunky tkaniva nachádzajúceho sa v ústnej dutine ako aj v extra-orálne tkanivá aktivujú gény kódujúce chuťové receptory a molekuly prenášajúce signál. Molekuly vyvolávajúce podnety sladkej chute, umami a horkej chute sú detegované GPCR (G proteín viazaný receptor) receptormi (T1R2 + T1R3, T1R1 + T1R3 a T2R) a indukujú depolarizáciu TRC (bunky chuťových receptorov) receptorov prostredníctvom známej intracelulárnej cesty prenosu signálu.

Heath et al., 2006 uvádzajú, že prah citlivosti na základné chute je u ľudí ovplyvnený serotonínom a noradrenalínom.

Väčšinu chuťových podnetov vyvolávajú neprchavé, hydrofilné molekuly rozpustené v slinách. Ako príklad je možné uviesť NaCl, cukry a kyseliny. Molekuly vyvolávajúce podnet horkej chute zahŕňajú rastlinné alkaloidy ako atropínne, chinín, strychnín. Chuťové receptory dokážu identifikovať informácie o množstve ako

aj totožnosti podnetov. Všeobecne platí, že čím vyššia je koncentrácia podnetu, tým väčšia je intenzita vnímanej chute. Prahové koncentrácie základných chutí sú pomerne vysoké, avšak napríklad prahová koncentrácia kyseliny citrónovej je približne 2 mmol, u soli (NaCl) 10 mmol a u sacharózy 20 mmol. Vzhľadom k tomu, že ľudské telo vyžaduje značné koncentrácie soli a sacharidov, môžu chuťové bunky reagovať len na pomerne vysoké koncentrácie týchto základných látok, aby sa podporil ich príjem do ľudského organizmu. Opačná situácia je pri vnímaní horkej chute. Ľudský organizmus dokáže zistiť prítomnosť horkej chute už pri veľmi nízkych koncentráciách 0,0001mmol. Je to preto, že horké látky sa väčšinou nachádzajú v rastlinách, niektoré môžu byť pre ľudí jedovaté a rastliny ich využívajú ako súčasť obraného mechanizmu (Purves, et al., 2001).

Okrem každodenného používania zmyslov na vnímanie okolia je možné percepciu využiť aj v oblasti senzorickej analýzy. Senzorická analýza je vedná disciplína, ktorá využíva citlivosť ľudských zmyslov vybranej skupiny hodnotiteľov, ktorými sa posudzuje a hodnotí senzoričná kvalita potravín (Kopeck, 1997).

Pri hodnotení sa využívajú jednotlivé zmysly človeka, pomocou ktorých je možné posúdiť vlastnosti danej potraviny, ako je jej chuť, pach, konzistencia, vzhľad, tiež celková chutnosť a prijateľnosť danej potraviny (Horčín, 2002).

O objektivite výsledkov v oblasti senzorickej analýzy sa síce polemizuje, ale pri dodržaní objektívnych a vhodných podmienok posudzovania a pri výbere vhodných posudzovateľov je možné dosahovať objektívne výsledky. Rovnako dôležité je zvolenie správnej metodiky. Niektoré štúdie dokazujú, že rozdiel vo vnímaní môže byť spôsobený vekom hodnotiteľov (Murphy 1979, 1986) prípadne citlivosť prahových rozdielov definuje výber v sortimente potravín (Pasquet, 2002).

Podľa Leshema et al., (2008) existujú rozdiely vo vnímaní základných chutí aj medzi pohlaviami.

Zmyslové vnímanie vonkajších vzruchov je zložitý a komplikovaný proces. Napriek tejto zložitosti človek dokáže vyhodnocovať vzniknuté vnemy len pomocou vlastných zmyslov na takej úrovni, že môžeme senzoričnú analýzu zaradiť medzi exaktné vedy za predpokladu optimálnych hodnotiteľských podmienok, výberu hodnotiteľov, vhodných metód a náležitého štatistického vyhodnotenia výsledkov. Nároky na kvalitu potravín neustále rastú, a tak stúpajú aj nároky na metódy stanovenia ich kvality.

Výber hodnotiteľov spočíva v zaškolení osôb, ich výcviku, preskúšania ich znalostí a testovania citlivosti jednotlivých zmyslov, neskôr opätovnom preškolení (Bartoshuk, 1994, Hong, 2005).

Testy, ktorými sa testujú zmysly sú špecificky zostavené tak, aby došlo k preskúšaniu citlivosti chute, čuchu, farbocitu, poskytujú informácie o prahových citlivostiach na základné chute u jednotlivých probandov, chuťovej pamäte, rozpoznávanie základných chutí a pachov (Miller, 1990).

Existuje veľa patofyziologických podmienok ako aj denných návykov, ktoré majú úzky vzťah ku vnímaniu základných chutí (Ritchie, 2002).

Ľudské reakcie na jednotlivé chute sú čiastočne ovplyvnené tým, akú potravu človek potrebuje a môže

priať a podľa toho vedome a zámerne vytvára určité preferencie. Niektoré mechanizmy preferencií sú vrodene. Chuťové vnemy môže ovplyvniť aj choroba. Pri respiračných infekčných ochoreniach, ktoré narúšajú čuch. Bez čuchu sa potravina zdá byť mdlá, hoci nie sú poškodené ani narušené chuťové poháriky. Chuťová averzia zas podvedome núti odmietat určité potraviny (The Human Body, 1989).

Strata zmyslu môže mať veľa príčin. Môže byť spôsobená niektorými ochoreniami, ako vedľajší účinok používania niektorých liekov, pri úrazoch hlavy, môže byť vrodene alebo vzniknúť ako dôsledok starnutia človeka.

Vplyv veku človeka na vnímanie základných chutí skúmali (Mojet et al., 2001). Títo autori zisťovali prah citlivosti na NaCl, KCl, sacharózu, kyselinu octovú, citrónovú, kofeín, chinín, glutamát sodný a inozín 5'-monofosfát na skupinách 19-33 ročných ľudí a 60-75 ročných ľudí. Autori zistili preukazné rozdiely v prahovej citlivosti medzi mladými a staršími ľuďmi. Rozdiely nepotvrdili v prípade pohlaví. Starší muži mali v porovnaní s mladými mužmi a ženami zhoršený prah citlivosti na prítomnosť molekúl kyseliny citrónovej, sacharózy, kyseliny citrónovej, NaCl, KCl a inozín 5'-monofosfátu.

Bergdahl et al. (2002) vypracovali štúdiu, ktorej cieľom bolo odhaliť prevalenciu poruchy chuti a analyzovať jej vzťah k veku, pohlaviu, množstvu slín, páleniu v ústach, liekom a psychologickým faktorom. Štúdie sa zúčastnilo 547 mužov a 656 žien vo veku 20 – 69 rokov. Dospelu sa k záveru, že na vnímanie chuti pôsobia rôzne zdravotné faktory ako sú ochorenia alebo psychická kondícia.

Suliburska et al., (2004). Sa zaoberali vplyvom fajčenia na citlivosť chute u dospelých ľudí. Štúdie sa zúčastnilo 28 fajčiarov a 33 nefajčiarov vo veku od 30 do 60 rokov. Autori zistili, že fajčiari majú v porovnaní s nefajčiarimi preukazne horšiu citlivosť vnímania slanej chute. Autori ďalej uvádzajú, že v prípade sladkej, slanej a kyslej chute majú fajčiari v porovnaní s nefajčiarimi mierne znížený prah citlivosti receptorov jazyka.

Gromysz-Kalkowska et al., (2002) uskutočnili podobnú štúdiu, v ktorej nepotvrdili zásadný vplyv fajčenia na vnímanie základných chutí. Výskum však preukázal, že vnímanie základných chutí môže byť rozdielne u pohlaví.

Podľa Hočina (2002), je možné skúšky chuti vykonávať viacerými metódami. Využíva sa skúšanie rozlišovacej schopnosti, skúška prahovej citlivosti a skúška prahovej pamäti.

Štátny veterinárny a potravinový ústav Bratislava – Certifikačný orgán pre certifikáciu osôb vykonávajúcich senzoričné posudzovanie potravinárskych a poľnohospodárskych výrobkov (akreditovaný SNAS podľa STN EN ISO/IEC 17024) udeľuje certifikáty na 1, 3 alebo 5 rokov na základe splnenia požiadaviek a skúšok spôsobilosti. Tieto skúšky sa skladajú z:

- výcviku a výberu,
- senzoričných skúšok základných.

Ročne sa zúčastní niekoľko osôb na preskúšaní. Skúšky sú zostavené tak, aby došlo k preskúšaní citlivosti chute, čuchu, farbocitu, poskytujú informácie o prahových citlivostiach na základné chute u jednotlivých osôb, chuťovej pamäte, rozpoznávanie základných chutí a pachov.

Tabuľka 1 Koncentrácia zásobných roztokov

Chuť	Referenčná látka	Koncentrácia základného roztoku (g.l ⁻¹)
Kyslá	Kyselina citrónová	1,00
Horká	Kofeín	0,50
Slaná	Chlorid sodný	5,00
Sladká	Sacharóza	16,00
Umami	Glutaman sodný	2,00
Zvieravá	Kyselina taninová	1,00
Kovová	Heptahydrát síranu železnatého	0,01

Tabuľka 2 Koncentrácia látok v g.l⁻¹ referenčnej látky pri skúške rozlíšenia chuti

Referenčná látka	Koncentrácia základného roztoku (g.l ⁻¹)
Kyselina citrónová	0,43
Kofeín	0,195
Chlorid sodný	1,19
Sacharóza	5,76
Glutaman sodný	0,595
Tanín	0,50

Tabuľka 3 Koncentrácia látok v g.l⁻¹ referenčnej látky pri skúške prahovej citlivosti

Poradie podávanej vzorky	Kyslá g.l ⁻¹	Horká g.l ⁻¹	Slaná g.l ⁻¹	Sladká g.l ⁻¹	Umami g.l ⁻¹	Zvieravá g.l ⁻¹	Kovová g.l ⁻¹
1	0,13	0,06	0,16	0,34	0,08	0,105	0,0007
2	0,16	0,07	0,24	0,55	0,12	0,131	0,0009
3	0,20	0,09	0,34	0,94	0,17	0,164	0,0013
4	0,25	0,11	0,48	1,56	0,24	0,205	0,0019
5	0,31	0,14	0,69	2,59	0,34	0,256	0,0027
6	0,38	0,17	0,98	4,32	0,49	0,320	0,0039
7	0,48	0,22	1,40	7,20	0,70	0,400	0,0056
8	0,60	0,27	2,00	12,00	1,00	0,500	0,0080

MATERIÁL A METÓDY

Počas experimentu sme zhodnotili výsledky 500 osôb, ktoré sa zúčastnili sensorických skúšok v rokoch 2006 – 2011. Týchto 500 osôb, ktoré sa zúčastnili sensorických skúšok, tvorilo 391 žien a 109 mužov. Vek osôb bol rôzny a zadelený do 5 vekových kategórií: do 25 rokov, 26 – 35 rokov, 36 – 45 rokov, 46 – 55 rokov, 56 a viac rokov. Medzi týmito ľuďmi sa vyskytovalo 99 fajčiarov, pričom 401 bolo nefajčiarov. Počet ľudí s alergiou bol 64, pričom ľudí bez alergie bolo 436.

Senzorické skúšanie bolo vykonané v akreditovanom laboratóriu v súlade s medzinárodnou normou ISO 8589.

Koncentrácia zásobných roztokov použitých na prípravu pracovných roztokov je uvedená v tabuľke 1.

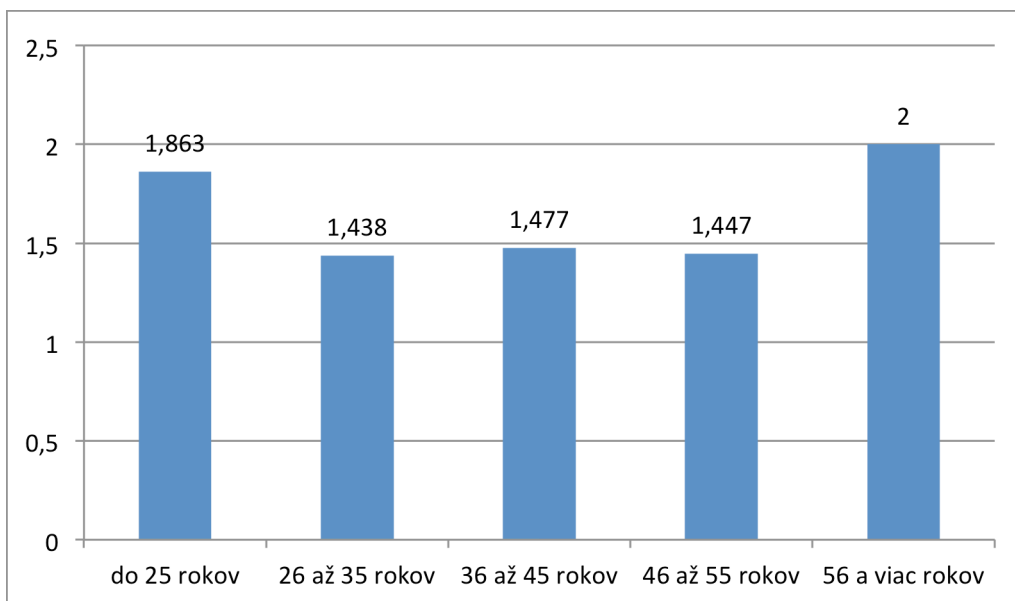
Skúška rozlíšenia chuti

Skúška rozlíšenia chuti je založená na určení charakteru desiatich rôznych chutí, pričom v rámci použitej metodiky sa niektorá z chutí mohla aj opakovať. Pri skúšaní sa používa aj čistá vzorka vody bez prídavku referenčnej látky. Pri našom skúšaní sa použili roztoky sladkej, slanej, kyslej, horkej, kovovej, zvieravej, umami chute a čistá

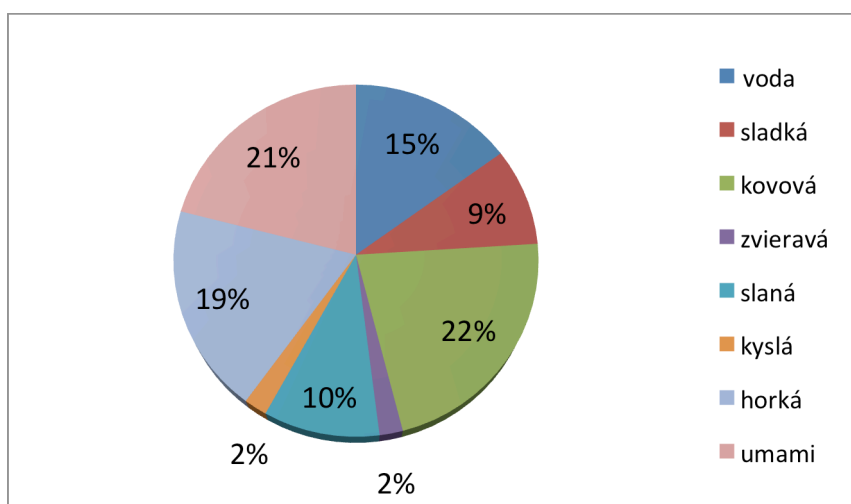
voda. Koncentrácie referenčných látok použitých pri skúške rozlíšenia chuti sú uvedené v tabuľke 2. Pre porovnanie sú v tabuľke 3 uvedené aj koncentrácie referenčných látok, ktoré sa používajú pri skúškach prahovej citlivosti. Nami zvolené koncentrácie referenčných látok pri skúške rozlíšenia chuti boli podstatne vyššie ako minimálne koncentrácie, ktorými sa začína skúška prahovej citlivosti.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

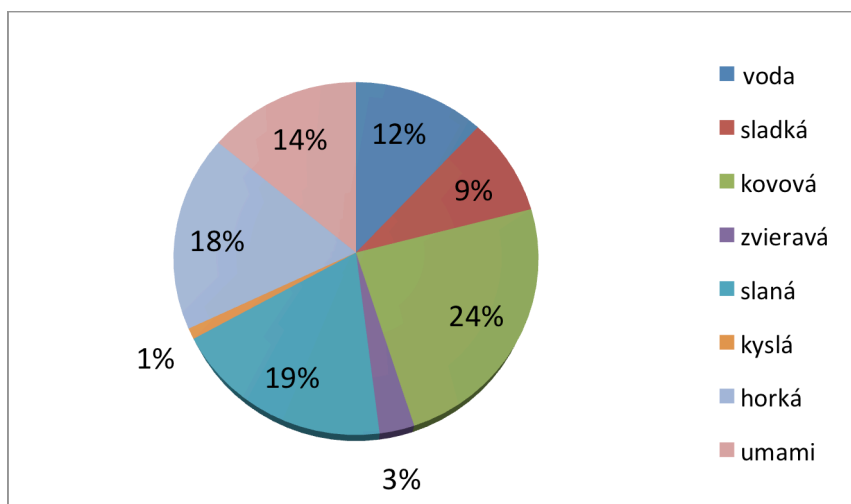
Pri skúške rozlíšenia chuti sa v 360 testoch dvakrát vyskytuje chuť umami a sladká, vo zvyšných 140 testoch sa vyskytuje dvakrát chuť kovová a slaná. Priemerný počet urobených chýb na osobu je 1,502. Priemerný počet chýb v závislosti od veku je uvedený v obrázku 1. poukazuje na najvyšší priemerný počet (2,00) u ľudí vo veku 56 a viac rokov. Druhý najvyšší (1,863) bol u vekovej skupiny do 25 rokov. Veková kategória 26 – 35 rokov mala najnižší priemerný počet chýb (1,438), kategória 36 – 45 rokov mala priemerný počet chýb 1,477 a kategória 46 – 55 rokov o niečo nižší – 1,447.



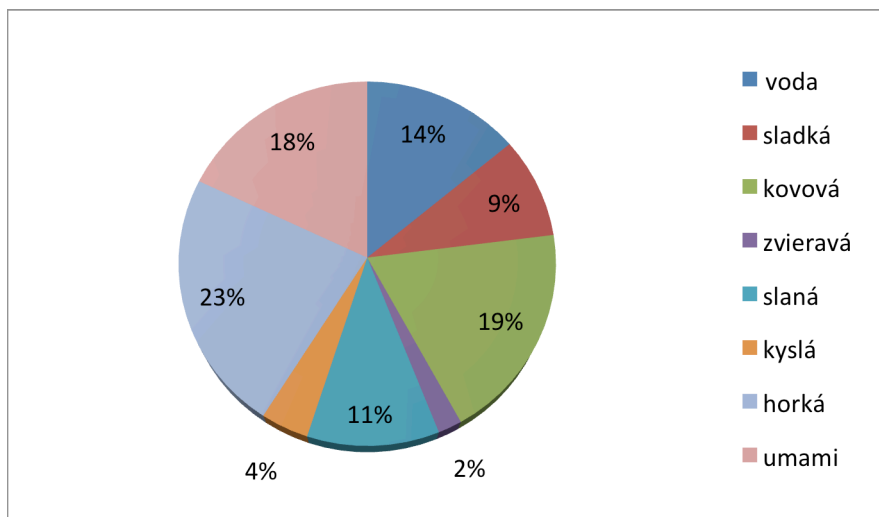
Obrázok 1 Priemerný počet chýb v skúške rozlíšenia chutí v závislosti od veku



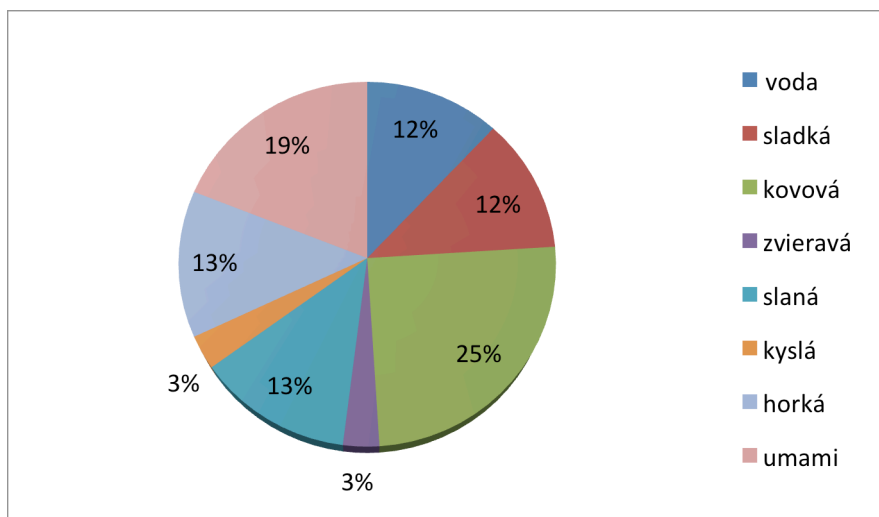
Obrázok 2 Priemerný počet chýb žien pri jednotlivých chutiach v skúške rozlíšenia chutí



Obrázok 3 Priemerný počet chýb mužov pri jednotlivých chutiach v skúške rozlíšenia chutí



Obrázok 4 Priemerný počet chýb fajčiarov pri jednotlivých chutiach v skúške rozlíšenia chuti



Obrázok 5 Priemerný počet chýb alergikov pri jednotlivých chutiach v skúške rozlíšenia chuti

Priemerný počet chýb v závislosti od pohlavia je znázornený na obrázkoch 2 a 3. Priemerný počet chýb bol mierne vyšší u žien (1,510) oproti mužom (1,477).

Priemerný počet chýb fajčiarov v skúške rozlíšenia chuti je znázornený na obrázku 4. Priemerný počet chýb v skúške rozlíšenia chuti bol u fajčiarov (1,576). Táto hodnota je len o málo vyššia ako u nefajčiarov, u ktorých bol priemerný počet chýb v tejto skúške 1,484.

Priemerný počet chýb u alergikov je znázornený na obrázku 5. U alergikov bol priemerný počet chýb urobených v skúške rozlíšenia chuti nižší (1,437) ako u ľudí bez alergie (1,511).

V jednotlivých vekových kategóriách sa ľudia najčastejšie mýlili v chutiach kovová a umami. Naopak najmenej sa mýlili pri chutiach kyslá a zvieravá. Osoby vo vekovej kategórii do 25 rokov, ktoré sa zúčastnili tohto testu, bolo 22. Najvyšší súčet chýb (11) bol urobený pri chuti kovová, len o 1 chybu menej (10) bolo urobených v chuti horká, 9 chýb pri chuti umami. Naopak žiadna chyba nebola urobená pri chuti zvieravá u osôb v tejto vekovej kategórii.

Osôb vo vekovej kategórii 26 – 35 rokov, ktoré sa zúčastnili testu, bolo 146. Tieto urobili najviac chýb

v chuti umami (49) a v chuti kovovej (43). Účastníci skúšky urobili 36 v chuti horkej. Pri vode a slanej chuti bolo urobených po 26 chýb, pri sladkej 20 chýb a najmenej – po 6 chýb v chutiach kyslá a zvieravá.

Vekovú kategóriu 36 – 45 rokov tvorilo 153 osôb. Tí mali najvyšší súčet chýb v kovovej chuti (52), u horkej a umami to bolo po 46 a u vody 40 chýb. Najmenej chýb bolo urobených pri zvieravej (3) a žiadna chyba pri kyslej chuti. Vekovú kategóriu 46 – 55 rokov tvorilo 152 osôb. U nich, podobne ako u väčšiny ostatných vekových kategórií bolo najviac urobených chýb (49) pri kovovej chuti. O niečo menej to bolo pri horkej (46), u umami 35, pri vode 32. Najmenej chýb bolo urobených pri kyslej (3) a pri zvieravej (5). Vo vekovej kategórii 56 a viac rokov sa zúčastnilo testu 27 osôb. Tie urobili najviac chýb (14) pri kovovej chuti a (11) pri vode, pri slanej to bolo 8 chýb, pri sladkej, horkej a umami po 6 chýb. Najmenej (3 chyby) to bolo u kyslej chuti, pri zvieravej osoby z tejto vekovej kategórie neurobili žiadnu chybu.

Najvyšší počet chýb u jednotlivých vekových kategórií okrem kategórie 26 – 35 rokov bol pri kovovej chuti. Pri kategórii 26 – 35 rokov bol najvyšší podiel chýb pri chuti umami. Na druhom mieste v najvyššom počte chýb bola

pri vekových kategóriách do 25 rokov, 36 – 45 rokov, 46 – 55 rokov chuť horká. Vo vekovej kategórii 26 – 35 rokov to bola chuť kovová, v kategórii 56 a viac rokov voda. Tretia v poradí v najvyššom počte chýb bola chuť umami u vekových kategórií do 25 rokov, 36 – 45 rokov a 46 – 55 rokov. V kategórii 26 – 35 rokov to bola horká chuť a v kategórii 56 a viac rokov slaná.

Kovová chuť bola najčastejšie nesprávne pomenovaná ako horká, voda alebo zvieravá. Umami bola najčastejšie nesprávne pomenovaná ako slaná, horká alebo kovová. Horká chuť bola zas najčastejšie nesprávne pomenovaná ako kovová a voda. Slaná bola najviac zamieňaná za umami, kyslú a vodu, voda zase za kovovú chuť.

ZÁVER

Na základe zistených výsledkov možno konštatovať, že so stúpajúcim vekom sa schopnosť rozoznávať základné chute znižuje, pričom dôležitú úlohu zohrávajú návyky, pohlavie a predispozícia hodnotiteľa. Veková kategória 26 – 35 rokov mala najnižší priemerný počet chýb (1,438), kategória 36 – 45 rokov mala priemerný počet chýb 1,477 a kategória 46 – 55 rokov o niečo nižší – 1,447. Priemerný počet chýb bol mierne vyšší u žien (1,510) oproti mužom (1,477). U alergikov bol priemerný počet chýb urobených v skúške rozlíšenia chutí nižší (1,437) ako u ľudí bez alergie (1,511). V jednotlivých vekových kategóriách sa ľudia najčastejšie mýlili v chutiach kovová a umami. Naopak najmenej sa mýlili pri chutiach kyslá a zvieravá.

Z uvedeného vyplýva, že ľudia, ktorí chcú vykonávať senzorické skúšky by sa mali v pravidelných intervaloch podrobovať senzorickým skúškam. Senzorické skúšky by mali vykonávať iba vyškolení senzorickí hodnotitelia, ktorí majú citlivé zmysly a dokážu sa sústrediť na svoju prácu. Iba takýmto spôsobom je možné dosahovať v senzorickej analýze objektívne výsledky.

LITERATÚRA

- Bartoshuk, L. M., Duffy, V. B., Miller, I. J. 1994. PTC/PROP tasting: anatomy, psychophysics, and sex effects, *Physiol Behav*, vol. 56, p. 1165-1171. [http://dx.doi.org/10.1016/0031-9384\(94\)90361-1](http://dx.doi.org/10.1016/0031-9384(94)90361-1)
- Gromysz-Kalkowska, K., Wójcik, K., Szubartowska, E., Unkiewicz-Winiarczyk, A. 2002. The perception of cigarette smokers. *Ann Univ Mariae Curie Skłodowska Med.*, vol. 57, no. 2, p. 143-154. [PMid:12898832](http://dx.doi.org/10.1016/0031-9384(94)90361-1)
- Heath, T. P., Melichar, J. K., Nutt, D. J., Donaldson, L. F. 2006. Human taste thresholds are modulated by serotonin and noradrenaline. *Journal of Neuroscience*, vol. 49, p. 12664-12671. <http://dx.doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3459-06.2006>
- Horčín, V. 2002. *Senzorické hodnotenie potravín*. Učebné texty SPU, Nitra 2002, ISBN 80-80-8069-112-6.
- Hummel, T., Welge-Lüssen, A. 2006. *Taste and smell*. Karger Publishers : Basel, Switzerland, 294 p. ISBN-10: 3-8055-8123-8
- Ju-Hee Hong, Jin-Woo Chung, Young-Ku Kim, Sung-Chang Chung, Sung-Woo Lee, Hong-Seop Kho. 2005. The relationship between PTC taster status and taste thresholds in young adults, *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*, vol. 99, issue 6, p. 711-715, ISSN 1079-2104 <http://dx.doi.org/10.1016/j.tripleo.2004.08.004>
- Kopec, K., Horčín, V. 1997. *Senzorická analýza ovocia a zeleniny*. 1. Vyd. Universum : Bratislava, 194 p.

Leshem, M., Haliwa, M., Hochman, A., Manasherov, M., Yaccobi, A. Gender differences in basic taste perception. *Appetite*, vol. 51, issue 2, p. 380 <http://dx.doi.org/10.1016/j.appet.2008.04.146>

Miller, I. J., Reedy, F. E. 1990. Variations in human taste bud density and taste intensity perception, *Physiol Behav*, vol. 47, p. 1213-1219. [http://dx.doi.org/10.1016/0031-9384\(90\)90374-D](http://dx.doi.org/10.1016/0031-9384(90)90374-D)

Mojet, J., Hazelhof, E., Heidema, J. 2001. Taste Perception with Age: Generic or Specific Losses in Threshold Sensitivity to the Five Basic Tastes? *Chemical Senses*, vol. 26, issue 7, p. 845-860. <http://dx.doi.org/10.1093/chemse/26.7.845> [PMid:11555480](http://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11555480/)

Murphy, C. 1979. The effects of age on taste sensitivity. In Han, S. S., Coons, D. H. (eds), *Special Senses in Aging*. University of Ann Arbor, Institute of Gerontology, Ann Arbor, MI, p. 21-33.

Murphy, C. 1986. Taste and smell in the elderly. In Meiselman, H. L. and Rivlin, R. S. (eds), *Clinical Measurements of Taste and Smell*. Macmillan : New York, p. 343-371. [PMid:3961902](http://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3961902/)

Pasquet, B., Oberti, J., Ati, E., Hladik, C. M. 2002. Relationships between threshold-based PROP sensitivity and food preferences of Tunisians, *Appetite*, vol. 39, p. 167-173. <http://dx.doi.org/10.1006/appe.2002.0503> [PMid:12354685](http://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12354685/)

Purves, D., Augustine, G. J., Fitzpatrick, D., Katz, L. C., LaMantia, A. S., McNamara, J. O., Williams, S. M. 2001. *Neuroscience*, 2nd ed., Sinauer Associates, Inc. : Sunderland (MA), 681 p., ISBN-10: 0-87893-740-0.

Ritchie, C. S. 2002. Oral health, taste and olfaction. *Clin. Geriatr. Med.* vol. 18, p. 709-717. [http://dx.doi.org/10.1016/S0749-0690\(02\)00041-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0749-0690(02)00041-1)

Suliburska, J., Duda, G., Pupek-Musialik, D. 2004. Effect of tobacco smoking on taste sensitivity in adults. *Przegl Lek.*, vol 61, no. 10, p. 1174-1176. [PMid:15794282](http://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15794282/)

Yamamoto, K., Ishimaru, Y. 2012. Oral and extra-oral taste perception. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, In Press, <http://dx.doi.org/10.1016/j.semcdb.2012.08.005>

Acknowledgments:

This work was supported by State Veterinary and Food Institute Bratislava, Botanická 15, 842 52 Bratislava.

Contact address:

Ing. Petra Barborová, Eurofins, E-mail: petra.barborova@gmail.com.

Ing. Jana Jančovičová, State Veterinary and Food Institute Bratislava, Botanická 15, 842 52 Bratislava, Slovakia.

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. 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 Processing of Plant Products, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovak Republic, E-mail: vladimir.vietoris@uniag.sk

ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF OREGANO AND SAGE PLANT EXTRACTS AGAINST DECARBOXYLASE-POSITIVE ENTEROCOCCI ISOLATED FROM RABBIT MEAT

Renáta Szabóová, Andrea Lauková, Eubica Chrastinová

ABSTRACT

The effect of plant extracts (sage, oregano) against decarboxylase-positive enterococci from rabbit back limb meat was reported in this study. Oregano plant extract inhibited the growth of all 34 tested enterococci (the inhibitory zones: 12 to 45 mm). The growth of the majority of strains (n=23) was inhibited by oregano plant extract (the high size inhibitory zones (higher than 25 mm). The growth of 11 strains was inhibited by oregano extract reaching medium size inhibitory zones (10 to 25mm). The most sensitive strain to oregano extract was *E. faecium* M7bA (45 mm). Sage extract was less active against tested enterococci (n=16) reaching lower inhibitory zones (up to 10 mm).

Keywords: *Labiatae*; effect; inhibition; meat; rabbit

INTRODUCTION

Enterococci belong to the Phylum Firmicutes, to the Family Enterococcaceae and to the genus Enterococcus. They represent Gram-positive, catalase-negative, coccus-shaped bacteria producing lactic acid as the major product of glucose fermentation. Currently, 37 species of enterococci are validly described (De Vos et al., 2009) which fall into 7 species groups on the basis of 16S rRNA gene similarity (Franz et al., 2007). Although some enterococci have possessed probiotic properties (Franz et al., 2007; Szabóová 2011) on the other hand, some strains can also cause food intoxication through production of biogenic amines and for virulence traits (Kučerová et al., 2009). Biogenic amines (BA) are natural antinutrition factors and are important from a hygienic point of view (Shalaby 1996). In spite of amines being considered as endogenous to food originating from plant matter, such as fruits and vegetables, BA are formed in other foods such as fish and meat products, eggs, cheeses, etc. as a result of microbial action during aging and storage. The most important BA occurring in foods are histamine, putrescine, cadaverine, tyramine, tryptamine, p-phenylethylamine, spermine, and spermidine. The factors which influence the formation of BA in foods include the availability of free amino acids, the presence of microorganisms that can decarboxylate amino acids, the favourable conditions of such microorganisms for the growth and production of their enzymes (Shalaby 1999). Concerning the meats, enterococci can be associated with processed meat products, but they can be already found in raw meats (Lauková et al., 2011; Talon et al., 2011), rabbit meat including (Szabóová 2011). Rabbit meat is a lean meat rich in proteins of a high biological value and it is characterized by high levels of essential aminoacids. Furthermore, rabbit meat is also an important source of highly available micronutrients, such as vitamins and

minerals. Rabbit meat is characterized by its lower energetic value compared with red meats (Dalle Zotte 2004) due to its low fat content. Fat content varies widely depending of the carcass portion from 0.6 to 14.4% with an average value of 6.8% (Hernández 2008), proteins level is 20-21% (Dalle Zote 2004). The amount of cholesterol in rabbit meat is about 59 mg/100 g of muscle (Combes 2004), lower values than those presented in meat from other species (61 mg in pork, 70 mg in beef, 81 mg in chicken). The mineral fraction of rabbit meat is characterized by its low contents in sodium (49 and 37 mg.100 g⁻¹; Dalle Zote 2004). Rabbit meat is also an important source of B vitamins. Consumption of 100 g of rabbit meat contributes to 8% of daily vitamin B2, 12% of vitamin B5, 21% of vitamin B6, and 77% of vitamin B3 requirements, and provides a fulfillment of the daily vitamin B12 requirement (Combes 2004).

Rabbit breeds selection by producers tends to improve the quantitative aspects of the production, such as growth rate and development of muscularity, but pays less attention to meat quality aspects. Meat quality can be evaluated objectively by measuring some biophysical or biochemical traits such as pH, water holding capacity, colour, texture, flavour. These attributes are determined by both, biological and productive factors as well as by ante-mortem, and post-mortem treatments (Dalle Zote 2004). Post-mortem biochemical changes in the muscle determine the transition from muscle into meat and can influence the final meat quality. Safety and shelf life of meat are limited by microbial growth and contamination.

As former mentioned, enterococci can be detected in the meat as a result of environmental influence i.e. during processing or slaughtering (Simonová et al., 2009; Lauková et al., 2011). The herbal extracts and/or essential oils obtained from plants are considered one of the most important natural substances with antimicrobial activity.

They are also known for their antioxidant and anti-inflammatory properties (borneol and cineol obtained from *Salvia* sp.; Milos et al., 2000). In general, the efficiency of herbal extracts and/or plant essential oils has been found common for many years before and just at present time it is becoming increasingly topical because to return to all natural. Delamare et al. (2007) presented *in vitro* antimicrobial effect of sage extract; the growth of *Bacillus cereus*, *B. subtilis* and *B. megatherium* as well as of *E. coli* and *S. aureus* was inhibited. There are many studies demonstrating the potential antibacterial effects of essential oils and components obtained from *Origanum vulgare* L. (such as carvacrol, thymol) in food and feed (Burt 2004).

MATERIAL AND METHODOLOGY

Table 1 The inhibitory activity of sage and oregano plant extracts against indicator strains – enterococci from rabbit meat.

Indicator strain	Oregano PE	Sage PE
	Inhibitory zone in mm and -/+ / ++	
EF M1C	25 / ++	5 / -
EF M2C	24 / +	8 / -
EF M7C	31 / ++	12 / +
EF M7b	17 / +	10 / +
EF M4C	15 / +	9 / -
EF M6C	28 / ++	9 / -
EF M5a	28 / ++	8 / -
EF M3b	30 / ++	7 / -
EF M1b	21 / +	9 / -
EF M2a	30 / ++	10 / +
EF M2cA	12 / +	11 / +
EF M2cB	35 / ++	10 / +
EF M3a	16 / +	11 / +
EF M4aA	40 / ++	9 / -
EF M4aB	16 / +	11 / +
E.sp.M5aA	32 / ++	8 / -
EF M5aB	12 / +	9 / -
E.sp.M6b	31 / ++	9 / -
EF M7bA	45 / ++	0 / -
EF M7bB	26 / ++	11 / +
EF 1BM	34 / ++	8 / -
E.sp.3AM	40 / ++	10 / +
EF 4BM1	25 / ++	10 / +
EF 4BM2	30 / ++	10 / +
EF 5BM1	18 / +	9 / -
E.sp.5BM2	26 / ++	12 / +
EF M1B	20 / +	8 / -
EF M2c	25 / ++	8 / -
EF M1c	25 / ++	14 / +
E.sp.M5a	25 / ++	11 / +
EF M6c	32 / ++	8 / -
E.sp.M3A	28 / ++	10 / +
EF M4B	30 / ++	7 / -
EF M2A	34 / ++	10 / +

PE – plant extract; EF – *Enterococcus faecium*; E.sp. – *Enterococcus* species; the size of inhibitory zone < 10 mm (-; no inhibitory zone); the size of inhibitory zone in the range from 10 to 25 mm (+; inhibitory zone- medium size); the size of inhibitory zone higher than 25 mm (++; inhibitory zone- high size)

Enterococci were isolated from healthy farming rabbits-breed Hyplus, age 56 days; they were identified and characterized as was described previously by Szabóová et al. (2012). Among 34 isolates, 28 were allotted to the species *Enterococcus faecium* (Szabóová et al., 2012a) and 6 isolates were not specified. But all strains were found dacarboxylase-positive (Pleva et al., 2012). These strains were tested to their sensitivity to oregano and sage plant extracts respectively effect of both extracts was tested against enterococci. For the test, the amount 10 µl of both extracts was used and the agar spot test (De Vuyst et al., 1996). Testing was provided on Brian Heart Infusion Agar (0.7 and 1.5 %; Becton and Dickinson, USA). Oregano plant extract obtained from the tops of *Origanum vulgare* L. (*Lamiaceae* family; density: 0.959 ± 0.002 g/cm³; refractive index: 1.515 ± 0.001; gas chromatography analysis: carvacrol: 55.000 ± 3.000 %; Calendula a.s., Nová Ľubovňa, Slovak Republic) as well as sage plant extract obtained from the leaves of *Salvia officinalis* L. (*Lamiaceae* family; density: 0.915 ± 0.001 g/cm³; refractive index: 1.469 ± 0.001; gas chromatography analysis: cineol: 15.000 ± 1.000 %, thujone: 24.000 ± 1.000 %, borneol: 18.000 ± 1.000 %; Calendula a.s., Nová Ľubovňa, Slovak Republic) were kindly provided by Dr. Šalamon and Dr. Poráčová (University of Prešov, Slovak Republic). Effect of both extracts against tested strains was expressed as the size of the inhibitory zones in mm (Table 1).

RESULTS AND DISCUSSION

Oregano plant extract inhibited the growth of all tested enterococci (the inhibitory zones in the range from 12 to 45 mm, Table 1). The growth of the majority of strains (n=23) was inhibited by oregano plant extract reaching the medium size inhibitory zones (higher than 25 mm, ++, Table 1). The growth of 11 strains was inhibited by oregano reaching medium size inhibitory zones (10-25 mm, +, Table 1). The most sensitive strain to oregano plant extract was *Enterococcus faecium* M7bA (45 mm). Sage plant extract was less active against tested enterococci; the growth of 16 strains was inhibited (inhibitory zones up to 10 mm, +). Di Pasqua et al. (2005) confirmed the inhibitory effect of oils (extracts) isolated from *Origanum vulgare* L. and *Salvia officinalis* L.; in their *in vitro* experiment were the most sensitive strains *Staphylococcus* sp. including *S. aureus*, *E. coli* O157: H7, *L. monocytogenes* ATCC 7644 and *Lactococcus* sp. Smith-Palmer et al. (1998) reported bacteriostatic and bactericide activity of sage extract on the growth of *E. coli* and *S. aureus*. The most important components from chemical composition view of *Origanum vulgare* are thymol and carvacrol; in *Origanum* sp. were detected also acyclic monoterpenoids geraniol, linalool, kamfor and borneol. The concentration of plant essential oils components fluctuates during the seasons (Skoula & Harborne, 2002). There is a relationship between chemical structure of essential oil components and its antibacterial potential, it is described as the big correlation with the concentration of essential oil and its active compounds (phenols, alcohols, ketones, esters) and pH of test media under *in vitro* conditions (Baricevic & Bartol, 2002). Bozin et al. (2006) demonstrated an antibacterial activity of oregano essential oils/extracts against

multiresistant strains of *Pseudomonas aeruginosa* and *E. coli* in *in vitro* experiments. The mechanism of inhibition is probably given by damage of permeability and the integrity of cell membrane, pH homeostasis (pH gradient - ΔpH , Helander et al., 1998), the balance of inorganic ions (membrane potential - $\Delta\psi$; Sikkema et al., 1995). Carvacrol, the active component of many essential oils, destabilizes the cytoplasmic membrane of cell, reduces the pH gradient, causes ATP depletion by leakage of ions, amino acids and nucleic acids followed by cell death (Ultee et al., 2002). The antimicrobial effect of plant extracts obtained from *Origanum vulgare* L. and *Salvia officinalis* L. was reported under *in vitro* as well as *in vivo* conditions e. g. in rabbits; reduction of coagulase-positive staphylococci and *Clostridium*-like sp. was demonstrated after administration oregano and sage plant extracts (Szabóová et al., 2011; 2012b).

CONCLUSION

Oregano and sage plant extracts are effective bioactive substances. The results obtained are useble to prevent contamination during rabbit meat processing. Consumers prefer dietetic healthy, nutritive and non-contaminated food. In addition, natural alternatives are requested to replace the additives used up to now but recently banned.

REFERENCES

Baricevic, D., Bartol, T. 2002. The biological/pharmacological activity of the oregano genus. In Kintzios S., Medicinal and Aromatic Plants – *Industrial Profiles – Oregano: The genera Origanum and Lipia*, Taylor & Francis : London, 2002, p. 177-214.

Bozin, B., Mimica-Dukic, N., Simin, N., Anackov, G., 2006. Characterization of the volatile composition of essentials oils of some lamiaceae spices and the antimicrobial and antioxidant activities of the entire oils. *J. Agric. Food Chem.*, vol. 54, 2006, no. 5, p. 1822-1828. [PMid:16506839](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16506839/)

Burt, S. A. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *Int. J. Food Microbiol.*, vol. 94, 2004, p. 223-253. [http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022](https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022), [PMid:15246235](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15246235/)

Combes, S. 2004. Valeur nutritionnelle de la viande de lapin, *INRA Productions Animales*, vol. 17, 2004, p. 373-383.

Dalle Zotte, A., 2004. Dietary advantages: rabbit must tame consumers. *Viandes et Produits Carnés*, vol. 23, 2004, p. 161-167.

Delamare, A. P. L., Moschen-Pistorello, I. T., Atti-Serafini, L. A. L., Echeverrigaray, S. 2007. Antibacterial activity of the essential oils of *Salvia officinalis* L. and *Salvia triloba* L. cultivated in South Brasil. *Food Chem.*, vol. 100, 2007, p. 603-608. [http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.09.078](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.09.078)

De Vos, P., Garrity, G., Jones, D., Krieg, N. R., Ludwig, W., Rainey, F. A., Schleifer, K. H., Whitman, W. B. 2009. *Bergeys manual of systematic bacteriology*, Second Eds. Springer : New York, Vol. 3., 2009. [PMCID:2844535](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2844535/)

De Vuyst, L., Callewart, R., Crabbe, K. 1996. Primary metabolite kinetics of bacteriocin biosynthesis by *Lactobacillus amylovorus* and evidence for stimulation of bacteriocin production under unfavourable growth conditions. *Microbiol.*, vol. 142, 1996, p. 817-827. [http://dx.doi.org/10.1099/00221287-142-4-817](https://doi.org/10.1099/00221287-142-4-817)

Di Pasqua, R., De Feo, V., Villani, F., Mauriello, G. 2005. *In vitro* antimicrobial activity of essential oils from Mediterranean Apiaceae, Verbenaceae and Lamiaceae against

foodborne pathogens and spoilage bacteria. *Microbiol.*, vol. 55, 2005, no. 2, p. 139-143.

Franz, C. M. A. P., Van Belkum, M. J., Holzapfel, W. H., Abriouel, H., Gálvez, A. 2007. Diversity of enterococcal bacteriocins and their grouping in a new classification scheme. *FEMS Microbiol. Rev.*, vol. 31, 2007, p. 293-310. [http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6976.2007.00064.x](https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2007.00064.x), [PMid:17298586](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17298586/)

Helander, I. K., Alakomi, H. L., Latva-Kala, K., Mattila-Sandholm, T., Pol, I., Smid, E. J., Von Wright, A. 1998. Characterization of the action of selected essential oil components on Gram negative bacteria. *J. Agricult. Chem.*, vol. 46, 1998, p. 3590-3595. [http://dx.doi.org/10.1021/jf980154m](https://doi.org/10.1021/jf980154m).

Kučerová, K., Svobodová, H., Tůma, Š., Ondráčková, I., Ploková, M. 2009. Production of Biogenic Amines by Enterococci. *Czech J. Food Sci.*, vol. 27, 2009, p. S2-50-55.

Lauková, A., Fraqueza, M. J., Stropfová, V., Simonová, M. P., Elias, M., Barreto, A. 2011. Bacteriocinogenic activity of *Enterococcus faecalis* strains from chouriço, traditional sausage produced in Southern Portugal. *Afric. J. Microbiol. Res.*, vol. 5, 2011, p. 334-339.

Milos, M., Mastelic, J., Jerkovic, I. 2000. Chemical composition and antioxidant effect of glycosidically bound volatile compounds of oregano (*Origanum vulgare* L. spp. hirtum). *Food Chem.*, vol. 71, 2000, p. 79-83. [http://dx.doi.org/10.1016/S0308-8146\(00\)00144-8](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(00)00144-8)

Pleva, P., Buňková, L., Lauková, A., Lorencová, E., Kubáň, V., Buňka, F. 2012. Decarboxylation activity of enterococci isolated from rabbit meat and staphylococci isolated from trout intestines. *Vet. Microbiol.*, vol. 159, 2012, p. 438-442. [http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.04.028](https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.04.028), [PMid:22608104](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22608104/)

Shalaby, A. R. 1996. Significance of biogenic amines to food safety and human health. *Food Res. Inter.*, vol. 29, 1996, p. 675-690. [http://dx.doi.org/10.1016/S0963-9969\(96\)00066-X](https://doi.org/10.1016/S0963-9969(96)00066-X)

Shalaby, A. R. 1999. Simple, rapid and valid thin layer chromatographic method for determining biogenic amines in foods. *Food Chem.*, vol. 65, 1999, p. 117-121. [http://dx.doi.org/10.1016/S0308-8146\(98\)00113-7](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(98)00113-7)

Sikkema, J., De Bont, J. A. M., Poolman, B. 1995. Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiol. Rev.*, vol. 59, 1995, p. 201-222. [PMid:7603409](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7603409/)

Simonová, M. P., Lauková, A., Chrastinová, E., Szabóová, R., Mojto, J., Stropfová, V., Rafay, J. 2009. Quality of rabbit meat after application of bacteriocinogenic and probiotic strain *Enterococcus faecium* CCM 4231 in rabbits. *Int. J. Prob. Preb.*, vol. 4, 2009, no.1, p. 1-6.

Skoula, M., Harborne, J. B. 2002. The taxonomy and chemistry of Origanum. In Kintzios S., *Medicinal and Aromatic Plants – Industrial Profiles – Oregan*, The genera Origanum and Lipia, Taylor & Francis : London, 2002, p. 67-108.

Smith-Palmer, A., Stewart, J., Fyle, L. 1998. Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens. *Lett. Appl. Microbiol.*, vol. 26, 1998, p. 118-122. [http://dx.doi.org/10.1046/j.1472-765X.1998.00303.x](https://doi.org/10.1046/j.1472-765X.1998.00303.x), [PMid:9569693](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9569693/)

Szabóová, R., 2011. Natural substances and its use in rabbits husbandry. In Slovak In PhD thesis, University of Veterinary Medicine and Pharmacy, Košice, Slovak Republic and Institute of Animal Physiology of Slovak Academy of Sciences, Košice, Slovak Republic, 2011, p. 55-59.

Szabóová, R., Lauková, A., Pogány Simonová, M., Stropfová, V., Chrastinová, E. 2012a. Bacteriocin-

producing enterococci from rabbit meat. *Malays. J. Microbiol.*, vol. 8, 2012, p. 211-218.

Szabóová, R., Lauková, A., Chrastinová, Ľ., Stropfiová, V., Pogány Simonová, M., Vasilková, Z., Čobanová, K., Plachá, I., Chrenková, M., 2012b. Effect of combined administration of enterocin 4231 and sage in rabbits. *Pol. J. Vet. Sci.*, vol. 14, 2012, no. 3, p. 359-366. [PMid:21957728](#)

Talon, R., Lebert, I., Lebert, A., Leroy, S., Garriga, M., Aymerich, T., Drosinos, E. H., Zanardi, E., Ianieri, A., Fraqueza, M. J., Patarata, L., Lauková, A., 2011. Microbial ecosystem of traditional dry fermented sausages in Mediterranean countries and Slovakia. *Mediterranean Ecosystems: Dynamics, Management and Conservation, Earth Sciences in the 21st Century Environmental Science, Engineering and Technology*, Ed. Columbus F., Nova Science Publishers Inc., Ed. Gina S. Williams, 2011, p. 355-359.

Ultee, A., Bennik, M. H. J., Moezelaar, R., 2002. The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 68, 2002, p. 1561-1568. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.68.4.1561-1568.2002>, [PMid:11916669](#)

Acknowledgments:

This work was supported by the Slovak Scientific Agency VEGA (project no. 2/0002/11) as well as by Slovak Research and Development Agency (project no. SK-HU-0006-08). The authors would like to thank Mrs. Margita Bodnárová for her excellent technical assistance.

Contact address:

MVDr. Renáta Szabóová, PhD., Institute of Animal Physiology Slovak Academy of Sciences, Šoltésovej 4-6, 040 01 Košice, Slovakia, E-mail: szaboova@saske.sk.

MVDr. Andrea Lauková, CSc., Institute of Animal Physiology Slovak Academy of Sciences, Šoltésovej 4-6, 040 01 Košice, Slovakia, E-mail: laukova@saske.sk.

Ing. Ľubica Chrastinová, PhD., Animal Production Research Centre Nitra, Institute of Nutrition, Hlohovecká 2, 951 41 Lužianky, Slovakia, E-mail: chrastinova@cvzv.sk

SUITABILITY OF CEREAL PORRIDGES AS SUBSTRATE FOR PROBIOTIC STRAIN *LACTOBACILLUS RHAMNOSUS* GG

Monika Kocková, Ľubomír Valík

ABSTRACT

The aim of this work was to find new substrates suitable for growth and metabolism of probiotic strain *Lactobacillus rhamnosus* GG, which would be interesting for development of new functional food. The growth and metabolic activity of *Lb. rhamnosus* GG in cereal (rye, barley, oat and millet) porridges were monitored during fermentation process. Cereal and porridges, were inoculated with this strain at two initial levels to obtain approximately 5 or 6 log colony form units per gram of suspension after sterilization and cooling. Fermentation was led stationary at 37 °C for 48 hours and viable cell count, pH value, titratable acidity and organic acids were analysed. Metabolic activity of *Lb. rhamnosus* GG was influenced by inoculation level and by the type of cereal used. The cereals fermented by lactic acid bacteria, especially probiotic strains, might broaden the offer of probiotic products for those suffering from milk allergy.

Keywords: cereal; pseudocereal; fermentation; probiotic; *Lactobacillus rhamnosus* GG

ÚVOD

Cereálie tvoria základ potravinovej pyramídy. Pre prevažnú časť ľudstva našej Zeme sú najdôležitejšou a základnou potravinou, ktorá je v prirodzenom stave zdrojom sacharidov, ale dodáva nám aj vysokohodnotné proteíny, vitamíny, minerálne látky i dôležitú vlákninu.

Sacharidy sú kvantitatívne najdôležitejšou zložkou týchto plodín, tvoria dve tretiny až tri štvrtiny sušiny. Z monosacharidov sú v zrnách najčastejšie zastúpené hexózy (fruktóza, glukóza a galaktóza) a pentózy (arabinóza a xylóza). Sacharóza a maltóza sú bežne sa vyskytujúce disacharidy cereálnych zŕn. Z polysacharidov sa v zrnách vyskytujú najmä škrob, celulóza a xylány (Navrus, Sorghaug, 2006; Chibbar et al., 2004).

Cereálie vo výžive ľudí patria tiež k významným zdrojom proteínov, ktoré sú dobrým zdrojom väčšiny esenciálnych aminokyselín, okrem lyzínu a tryptofánu (Serna Saldívar, 2003; Bekes, Wrigley, 2004).

Stráviteľnosť cereálnych proteínov je nižšia v porovnaní so živočíšnymi proteínmi (v rozmedzí od 80 do 90 %), čo je zapríčinené kyselinou fytovou, tanínmi a polyfenolmi, ktoré viažu proteíny do nerozpustných komplexov (Charalampopoulos, 2002; Serna Saldívar, 2003).

Lipidy sú minoritnou zložkou cereálnych zŕn, sú však bohaté na esenciálne mastné kyseliny a neobsahujú takmer žiadne nasýtené mastné kyseliny (Serna Saldívar, 2003).

Perikarb, klíček a aleurónová vrstva cereálnych zŕn sú bohaté na vitamíny a minerálne látky. Všeobecne môžeme obilniny považovať za zdroj vitamínov skupiny B. V obalových vrstvách sa vyskytujú najmä vitamíny B1, B2 a B6. Pšenica a jačmeň obsahujú aj vyššie množstvá kyseliny nikotínovej a nikotiamidu. V klíčkoch sa v značnom množstve vyskytuje aj vitamín E. Obsah minerálnych látok sa pohybuje v rozmedzí od 1,25 do 2,5 %. Celé zrná poskytujú minerálne látky ako vápnik, draslík, horčík, železo, zinok, meď, fosfor, ktorých obsah

sa však znižuje lúpaním a mletím (Serna Saldívar, 2003; Poutanen et al., 2009).

História výroby fermentovaných potravín siaha až do čias starovekého Egypta, kedy bol proces výroby veľmi jednoduchý, bez uvedomovania si prítomnosti a úlohy mikroorganizmov v ňom. Medzi tradičné fermentované cereálne produkty, kysnuté, či kvasené patrí chlieb, ovsená kaša a nápoje (alkoholické aj nealkoholické), ktoré sú rozšírené najmä v Ázii a Afrike (Helland et al., 2004; Charalampopoulos et al., 2002). Obilie, najmä pšenica a raž, sa v západných krajinách využívali najčastejšie, napríklad, pri výrobe kvásku, na zlepšenie kvality cesta, reologických vlastností finálneho produktu a pod. (Charalampopoulos et al., 2002).

Primárnym účelom fermentácie potravín bolo predĺženie trvanlivosti východiskových surovín. Baktérie mliečneho kysnutia produkujú širokú škálu látok s antimikrobiálnym účinkom, ako organické kyseliny, oxid uhličitý, etanol, peroxid vodíka, diacetyl, mastné kyseliny, bakteriocíny a antibiotiká (Caplice, Fitzgerald, 1999; Navrus, Sorhaug, 2006; Valerio et al., 2008; Katina, et al., 2002; Messens, De Vuyst, 2002). Okrem toho, že fermentáciou sa predlžuje skladovateľnosť potravín, zvyšuje sa ich nutričná hodnota, stráviteľnosť, v niektorých prípadoch sa môže znížiť aj toxicita východiskových surovín, napr. odbúrание lepku v pšenici. Počas fermentácie sa zvyšuje dostupnosť proteínov bakteriálnou enzymatickou hydrolyzou, zvyšuje sa stráviteľnosť škrobu, dochádza k produkcii vitamínov, najmä skupiny B a dochádza k redukcii antinutričných látok (Arora et al., 2010; Charalampopoulos, et al., 2002; Rivera-Espinoza, Gallardo-Navarro, 2010; Taylor, 2003).

Fermentácia sa stala aj procesom zabezpečujúcim zdravotnú neškodnosť potravín vyrobených aj bez teplotného opracovania (Leroy, De Vuyst, 2004, Caplice, Fitzgerald, 1999).

Organoleptické vlastnosti sú základom úspešnosti fermentovaných pokrmov, pretože tieto produkty majú výrazne lepšiu arómu, chuť a vzhľad v porovnaní s východzími materiálmi (Hutkins, 2006; Corsetti, Settanni, 2007). BMK prispievajú k zlepšeniu chuti a vône fermentovaných výrobkov tým, že okysľujú potraviny, čím sa zvyšuje ich proteolytická a lipolytická aktivita, ktorá prispieva k vzniku aromatických zlúčenín. K celkovej tvorbe arómy prispievajú aj degradačné reakcie aminokyselín, z ktorých kľúčová je Ehrlichova cesta, ktorá vedie k tvorbe aldehydov a príslušných alkoholov.

Použitím probiotických baktérií vo fermentačných technológiách môžeme navyše prispieť k rozšíreniu ponuky probiotických výrobkov na našom trhu, ktorá z prevažnej väčšiny pozostáva z mliečnych výrobkov. Probiotické mliečne výrobky sú však nevhodné pre ľudí trpiacich alergiou na mliečne proteíny. Nakoľko títo pacienti sú odkázaní na užívanie probiotík v tabletovej forme, našou prirodzenou ambíciou je pripraviť pre nich adekvátne výrobky na cereálnom alebo pseudocereálnom základe.

Cieľom našej práce bolo posúdiť vhodnosť cereálnych substrátov pre rast a metabolickú aktivitu probiotického kmeňa *Lactobacillus rhamnosus* GG počas fermentačných pokusov a zdokumentovať vplyv počiatočnej inokulácie na rast a metabolizmus vybraného kmeňa.

MATERIÁL A METÓDY

Materiál: V práci bolo použitých 6 druhov cereálií zakúpených v mlyne (Mlyn Zrno, SR) a v obchodnej sieti – ražná múka svetlá (RM), raž zrná (RZ), jačmenná múka svetlá (JMS), jačmenná múka celozrnná (JMC), ovsená múka celozrnná (OMC), a proso zrná (PZ).

Príprava médií a fermentačný proces: 20 gramov pomletej a preosiatej vzorky sa zmiešalo so 180 ml deionizovanej vody, vysterilizovalo v autokláve (121 °C, 15 min.), ochladilo a naočkovalo nočnou kultúrou *Lb. rhamnosus* GG na počiatočnú koncentráciu 5 resp. 6 log KTJ/g. Fermentácia prebiehala pri teplote 37 °C počas 48 hodín, vzorky na stanovenia (počet živých buniek, pH, titračná kyslosť, organické kyseliny) sa odoberali každých 24 hodín.

Mikroorganizmy: Kmeň *Lactobacillus rhamnosus* GG bol poskytnutý Dr. Salinenom (Univerzita v Turku, Fínsko) prostredníctvom Dr. Laukovej (Štátny veterinárny a potravinový ústav, Košice, SR).

Mikrobiálna analýza: Počty *Lb. rhamnosus* GG boli stanovené po desiatkovom riedení a kultivácii na MRS agare (Merck, Nemecko) podľa STN ISO 15214.

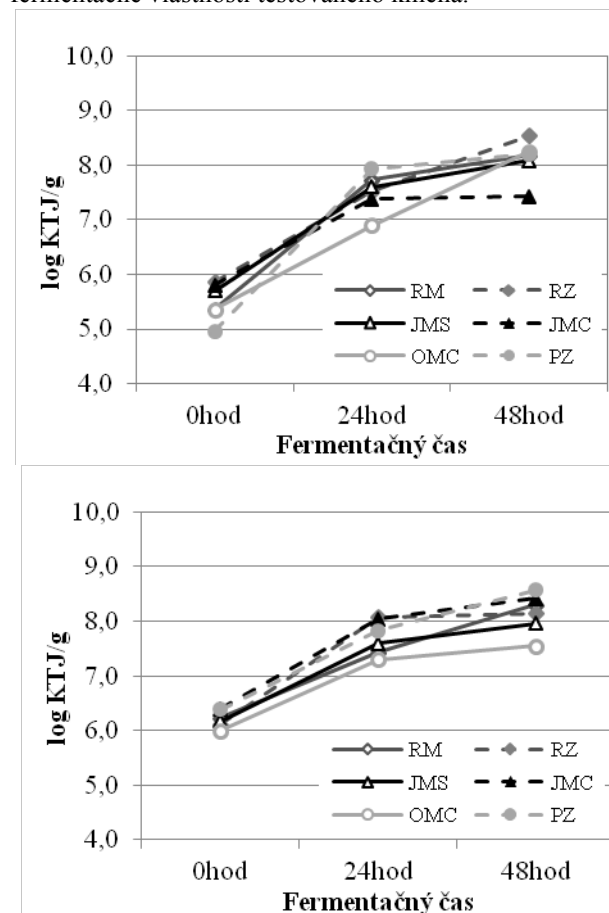
Chemická analýza: Na stanovenie pH hodnoty bol použitý pH-meter typ CG 843 (SCHOTT, Nemecko), meranie sa vykonalo podľa postupu uvedeného v užívateľskej príručke. Celková titračná kyslosť sa stanovovala vizuálnou titráciou s 0,01 M roztokom NaOH (Lachema, ČR) na fenolftaleín postupom uvedeným v literatúre (IST ISO 56 0512). Výsledok bol prepočítaný na kyselinu mliečnu. Organické kyseliny sme stanovovali izotachoforetickou metódou. Kvantitatívne vyhodnotenie bolo vykonané metódou analytickej čiary, ktorá bola stanovená pre organické kyseliny pomocou štandardných roztokov kyseliny

mliečnej (Lachema, ČR) a kyseliny octovej (Lachema, ČR).

Štatistická analýza: Výsledky reprezentujú stredné hodnoty so štandardnou odchýlkou. Štatistická analýza bola vykonaná pomocou programu Microsoft Excel 2007. Dáta boli podrobené Studentovmu t-testu na hladine pravdepodobnosti 95 %.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Fermentačné pokusy sa uskutočnili za účelom zhodnotenia fermentačných vlastností *Lb. rhamnosus* GG, stanovením poklesu pH-hodnoty, nárastu titračnej kyslosti, produkcie organických kyselín (mliečnej a octovej) a hodnotenia rastu probiotického kmeňa v cereálnych substrátoch. Titračná kyslosť (vyjadrená ako percentuálne zastúpenie organických kyselín, v našom prípade kyseliny mliečnej ako prevládajúcej kyseliny) a hodnoty pH patria k dôležitým ukazovateľom priebehu fermentačného procesu. Zmeny hodnôt pH sú zároveň aj ukazovateľom kvality daného kmeňa a sú výsledkom jeho metabolickej aktivity. Sledovali sme aj vplyv počiatočnej veľkosti inokula na fermentačné vlastnosti testovaného kmeňa.



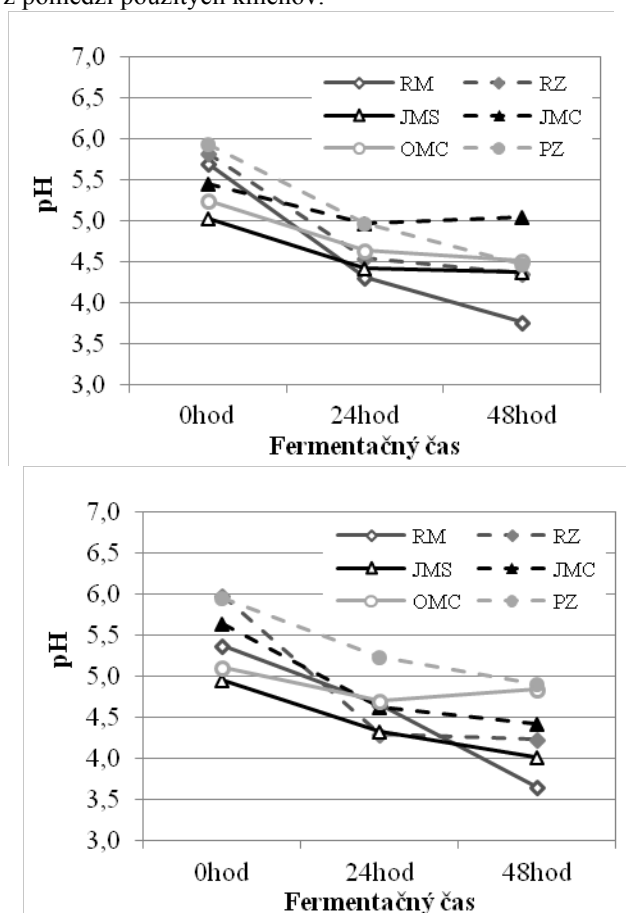
Obr.1: Hodnotenie rastu *Lb. rhamnosus* GG počas fermentácie pri teplote 37 °C počas 48 hodín v cereálnych kašiach s počiatočnou inokuláciou 5 (hora) resp. 6 (dole) log KTJ/g.

Ako vyplýva z výsledkov na Obr. 1, *Lb. rhamnosus* GG bol schopný rásť v kašiach pripravených z vybraných cereálií. Pri kašiach s nižšou počiatočnou inokuláciou bol zaznamenaný nárast počtu buniek z pôvodných 4,95 – 5,86 log KTJ/g na konečných 7,43 – 8,54 log KTJ/g.

Najnižšie počty na konci fermentačného pokusu sme stanovili vo vzorke jačmennej múky celozrnnej.

V kašiach s vyššou počiatočnou inokuláciou sa počiatocné počty *Lb. rhamnosus* GG pohybovali v rozmedzí 6,00 – 6,40 log KTJ/g a konečné v rozmedzí 7,54 – 8,57 log KTJ/g, pričom najnižšie počty na konci fermentácie boli stanovené v kaši z ovsenej múky celozrnnej.

Helland et al. (2004a, 2004b) sledovali rast probiotických a potenciálne probiotických kmeňov vo vodných a mliečnych cereálnych (kukurica a ryža) pudingoch a v kukuričných kašiach, pričom dosiahli podobné počty živých buniek na konci fermentačného procesu, pričom *Lb. rhamnosus* GG bol jediný kmeň, ktorý bol schopný prežívať vo vodných pudingoch počas chladiarenského skladovania. Rast probiotických baktérií sledovala aj Pelikánová et al. (2011) a bolo zistené, že *Lb. rhamnosus* GG vykazoval najlepšie rastové vlastnosti z pomedzi použitých kmeňov.



Obr.2: Hodnotenie zmien pH v cereálnych kašiach fermentovaných kmeňom *Lb. rhamnosus* GG pri teplote 37 °C počas 48 hodín pri počiatocnej inokulácii 5 (hore) resp. 6 (dole) KTJ/g.

Hodnoty pH počas fermentačného pokusu klesli vo vzorkách s nižšou počiatočnou inokuláciou z počiatocných 5,03 – 5,94 na konečných 3,76 – 5,05, pričom k rýchlejšiemu poklesu dochádzalo v priebehu prvých 24 hodín. Vo vzorke jačmennej múky celozrnnej sme dokonca zaznamenali mierny nárast pH od 24. po 48 hodinu. Vo vzorkách s vyššou počiatočnou inokuláciou došlo k poklesu pH z pôvodných 4,96 - 5,98 na konečných 3,66 – 4,90. Vo vzorke ovsenej múky celozrnnej sme tak

isto zaznamenali nárast pH od 24. do 48 hodiny fermentačného pokusu. *Lb. rhamnosus* nebol schopný výrazne znižovať pH prostredia v porovnaní s inými baktériami mliečneho kysnutia použitými v cereálnych fermentáciách. Metabolickou aktivitou *Lb. plantarum* alebo *Lb. acidophilus* v sladových, jačmenných a sladovo-jačmenných substrátoch došlo k poklesu pH pod hodnotu 3,5 po 24 hodinovom fermentačnom pokuse (Rathore et al, 2012).

Vplyv veľkosti počiatocnej inokulácie na pokles hodnôt pH bol významný iba pri dvoch vzorkách, a to v jačmennej múke svetlej a celozrnnej. V ovsenej múke celozrnnej a v zrnách prosa sme zaznamenali vyššie pH na konci fermentačného pokusu vo vzorkách s vyššou počiatočnou inokuláciou.

Počas fermentačného pokusu bola sledovaná aj produkcia organických kyselín, jednak ako obsah celkových titrovateľných kyselín a jednak bola izotachoforeticky vyhodnotená produkcia kyseliny mliečnej a octovej ako hlavných metabolitov.

Titračná kyslosť v kašiach inokulovaných na počiatocnú denzitu buniek 5 log KTJ/g vzrástla z pôvodných 255,7 až 807,8 mg/kg na konečných 499,3 až 1216,0 mg/kg. Najnižší nárast titrovateľných kyselín sme zaznamenali vo vzorke pohánkovej múky svetlej, v ktorej bola dokonca v 48. hodine stanovená nižšia titračná kyslosť ako v 24. hodine. Podobný pokles sme zaznamenali aj v prípade ražných zŕn, napriek tomu bol v tejto vzorke najvyšší nárast obsahu titrovateľných kyselín.

V kašiach s vyššou počiatočnou inokuláciou bol zaznamenaný nárast celkovej titračnej kyslosti z počiatocných 336,9 až 917,0 mg/kg na konečných 737,6 až 1261,4 mg/kg. Najvyšší nárast titrovateľných kyselín sme zaznamenali vo vzorke ražnej múky, najnižší v jačmennej múke svetlej rovnako ako pri nižšie inokulovaných kašiach. Čo sa týka vplyvu veľkosti počiatocnej inokulácie na produkciu organických kyselín, pozitívny vplyv sa prejavil vo všetkých vzorkách okrem kaše pripravenej zo zŕn raže.

Izotachoforetickou metódou sme stanovili kyselinu mliečnu a octovú, avšak počas fermentácie dochádzalo k produkcii aj iných organických kyselín, ako mravčej, jantárovej a ďalších a k redukcii kyseliny citrónovej vo väčšine substrátov.

Počas fermentácie kaši s nižšou počiatočnou inokuláciou došlo k nárastu koncentrácie kyseliny mliečnej z počiatocných 49,89 až 75,52 mg/kg (v dvoch vzorkách bola kyselina mliečna pod medzou detekcie) na konečných 286,39 až 647,35 mg/kg. Rovnako ako v prípade titračnej kyslosti, aj tu došlo k poklesu kyseliny mliečnej vo vzorke jačmennej múky svetlej v druhej polovici fermentačného pokusu. Zároveň bola v tejto vzorke zaznamenaná najnižšia produkcia kyseliny mliečnej. Najvýraznejšia produkcia kyseliny mliečnej bola stanovená vo vzorke ovsenej múky celozrnnej.

Vo vyššie inokulovaných cereálnych kašiach došlo k nárastu kyseliny mliečnej z počiatocných 58,68 až 100,41 mg/kg na konečných 315,67 až 862,61 mg/kg. V kaši zo zŕn prosa bola koncentrácia kyseliny mliečnej pod medzou detekcie počas celej doby fermentačného pokusu. Najnižšia produkcia kyseliny mliečnej bola zaznamenaná opäť vo vzorke jačmennej múky svetlej, najvyššia v ražnej múke.

potravinárstvo

Tab. 1 Sledovanie zmien hodnôt titračnej kyslosti a produkcia organických kyselín (mlečnej a octovej) v cereálnych kašiach počas fermentácie s *Lb. rhamnosus* GG pri teplote 37 °C počas 48 hodín pri dvoch veľkostiach počiatočnej inokulácie.

Substrát	Titračná kyslosť [mg.kg ⁻¹]		
	0 hod	24 hod	48 hod
Počiatočná inokulácia 5 log KTJ/g			
RM	255,7±27,7 ^{a,x}	325,7±25,6 ^{a,y}	499,3±27,9 ^{a,z}
RZ	469,6±0,0 ^{b,x}	1684,4±53,0 ^{f,z}	1032,5±27,5 ^{d,y}
JMS	551,9±25,8 ^{c,x}	780,1±0,0 ^{c,z}	611,6±25,8 ^{b,y}
JMC	726,3±48,4 ^{d,x}	942,8±27,7 ^{d,y}	1030,5±27,5 ^{d,z}
OMC	807,8±0,0 ^{e,x}	1157,4±96,5 ^{e,y}	1216,0±72,4 ^{e,y}
PZ	288,5±0,0 ^{a,x}	656,1±43,7 ^{b,y}	761,7±47,6 ^{c,z}
Počiatočná inokulácia 6 log KTJ/g			
RM	336,9±48,1 ^{a,x}	367,8±0,0 ^{a,x}	1133,9±25,5 ^{c,y}
RZ	378,1±47,3 ^{a,x}	877,6±46,2 ^{c,y}	835,0±27,3 ^{b,y}
JMS	497,8±27,8 ^{b,x}	760,1±28,0 ^{b,y}	737,6±25,6 ^{a,y}
JMC	761,3±95,2 ^{c,x}	1151,9±28,1 ^{d,y}	1261,4±46,7 ^{d,z}
OMC	917,0±0,0 ^{d,x}	1207,0±0,0 ^{d,y}	1229,2±27,6 ^{d,y}
PZ	386,6±48,3 ^{a,x}	897,5±47,2 ^{c,y}	873,3±0,0 ^{b,y}
Substrát	Kyselina mliečna [mg.kg ⁻¹]		
	0 hod	24 hod	48 hod
Počiatočná inokulácia 5 log KTJ/g			
RM	ND	232,20±12,23 ^{a,x}	375,71±5,53 ^{b,y}
RZ	49,89±4,39 ^{a,x}	426,23±1,27 ^{b,y}	522,15±2,20 ^{c,z}
JMS	75,52±1,27 ^{b,x}	475,29±12,10 ^{c,z}	286,39±34,05 ^{a,y}
JMC	58,68±7,92 ^{a,x}	470,16±7,71 ^{c,y}	503,84±14,95 ^{c,z}
OMC	68,20±14,95 ^{b,x}	538,26±8,32 ^{d,y}	647,35±5,81 ^{d,z}
PZ	ND	418,91±4,39 ^{c,y}	343,50±11,27 ^{a,x}
Počiatočná inokulácia 6 log KTJ/g			
RM	73,32±3,36 ^{b,x}	257,10±16,63 ^{a,y}	862,61±11,41 ^{d,z}
RZ	77,09±1,32 ^{b,x}	699,85±5,75 ^{d,z}	369,80±7,35 ^{a,y}
JMS	100,41±4,39 ^{c,x}	503,48±1,55 ^{c,z}	315,67±25,33 ^{a,y}
JMC	63,37±1,32 ^{a,x}	697,57±16,54 ^{d,z}	567,99±2,29 ^{c,y}
OMC	58,68±3,80 ^{a,x}	388,89±3,36 ^{b,y}	495,79±22,93 ^{b,z}
PZ	ND	ND	ND
Substrát	Kyselina octová [mg.kg ⁻¹]		
	0 hod	24 hod	48 hod
Počiatočná inokulácia 5 log KTJ/g			
RM	ND	181,07±22,50 ^{c,x}	506,12±16,49 ^{c,y}
RZ	93,51±4,16 ^{b,x}	206,26±2,75 ^{c,y}	578,69±5,50 ^{d,z}
JMS	102,51±2,75 ^{b,x}	134,89±1,04 ^{a,y}	217,05±17,01 ^{b,z}
JMC	101,91±7,49 ^{b,x}	158,88±6,49 ^{b,y}	166,08±15,58 ^{a,y}
OMC	133,09±15,51 ^{c,x}	138,49±9,06 ^{a,x}	156,48±10,99 ^{a,x}
PZ	69,52±13,74 ^{a,x}	103,70±19,4 ^{a,x}	170,87±18,20 ^{a,y}
Počiatočná inokulácia 6 log KTJ/g			
RM	35,34±1,04 ^{a,x}	132,49±2,75 ^{b,y}	119,90±9,23 ^{b,y}
RZ	107,56±6,91 ^{c,x}	164,65±1,59 ^{c,y}	183,68±4,76 ^{c,z}
JMS	79,12±7,27 ^{b,x}	142,69±2,54 ^{b,y}	316,61±22,78 ^{d,z}
JMC	ND	118,13±0,92 ^{a,x}	149,32±2,42 ^{b,y}
OMC	124,10±5,50 ^{d,y}	176,27±35,36 ^{c,y}	82,71±11,98 ^{a,x}
PZ	ND	ND	ND

* RM – ražná múka, RZ – raž zrná, JMS – jačmenná múka svetlá, JMC – jačmenná múka celozrnná, OMC – ovsená múka celozrnná, PZ – proso zrná. Výsledky predstavujú stredné hodnoty ± smerodajná odchýlka.

^{a-b} Stredné hodnoty v stĺpcoch s rozdielnym horným indexom sú signifikatne odlišné.

^{x-y} Stredné hodnoty v riadkoch s rozdielnym horným indexom sú signifikatne odlišné.

Pozitívny vplyv veľkosti počiatkovej inokulácie na produkciu kyseliny mliečnej bol zaznamenaný v kašiach pripravených z ražnej múky, jačmennej múky svetlej a celozrnnnej a ovsenej múky celozrnnnej.

Metabolickou aktivitou *Lb. reuteri* SD 2112, *Lb. acidophilus* LA5, *Lb. acidophilus* NCDO 1748 a *Lb. rhamnosus* GG v sladovo-jačmennej kaši došlo k produkcii kyseliny mliečnej v rozmedzí od 1300 do 4000 mg.kg⁻¹, v závislosti od použitého kmeňa, pričom v prípade *Lb. rhamnosus* GG bola najvyššia (Helland et al. 2004b). Na druhej strane, fermentáciou jačmeňa s *Lb. plantarum* a *Lb. acidophilus* pri príprave nápoja nebola prekročená koncentrácia 100 mg/l kyseliny mliečnej po 24 hodinovom procese (Rathore et al. 2012).

Keďže *Lb. rhamnosus* GG patrí medzi fakultatívne heterofermentatívne kmene, okrem kyseliny mliečnej jeho metabolickou aktivitou dochádza aj k produkcii iných organických kyselín. Koncentrácia ním vytvorenej kyseliny octovej bola v porovnaní s kyselinou mliečnou podobná alebo nižšia, okrem vzorky ražnej múky s nižšou počiatkovou inokuláciou.

V kašiach s nižšou počiatkovou inokuláciou došlo k nárastu koncentrácie kyseliny octovej z počiatkových 69,52 až 133,09 mg.kg⁻¹ (v ražnej múke bola pod medzou detekcie) na konečných 156,48 až 506,12 mg/kg. Najnižšia produkcia kyseliny octovej bola v kaši pripravenej z ovsenej múky celozrnnnej, najvyššia v kašiach z ražnej múky a zrn raže.

V kašiach s vyššou počiatkovou inokuláciou bola zaznamenaná produkcia kyseliny octovej z pôvodných 35,34 až 124,10 mg/kg na konečných 82,71 až 316,61 mg/kg. V kaši zo zrn prosa bola koncentrácia kyseliny octovej pod medzou detekcie v priebehu fermentačného pokusu. V tejto vzorke pravdepodobne dochádzalo k výraznejšej produkcii iných organických kyselín na úkor kyseliny mliečnej a octovej. Vo všetkých vzorkách okrem jačmennej múky svetlej bola produkcia kyseliny octovej vyššia pri nižšej počiatkovej inokulácii.

ZÁVER

Na základe uvedených výsledkov možno konštatovať, že probiotický kmeň *Lb. rhamnosus* GG bol schopný rásť a metabolizovať v kašiach z vybraných cereálií, pričom jeho metabolická aktivita bola ovplyvnená druhom vzorky a veľkosťou počiatkovej inokulácie. Vo všetkých vzorkách pri oboch veľkostiach počiatkovej inokulácie sme dosiahli počty poriadkovo 7 log KTJ/g na konci fermentačného pokusu, čo je dôležité z legislatívneho hľadiska. Počas experimentov nedochádzalo k výraznej produkcii organických kyselín, čo môže byť výhodné najmä z hľadiska senzorickej kvality potenciálnych výrobkov. Na druhej strane bude potrebné proces fermentácie optimalizovať v zmysle ochrany pred rozvojom nežiaducej mikroflóry a overiť stabilitu takto fermentovaných substrátov.

LITERATÚRA

Arora, S., Jood, S., Khetarpaul, N. 2010. Effect of germination and probiotic fermentation on nutrient composition of barley based food mixtures. *Food Chemistry*, vol. 119, 2010, no. 2, p. 779-784.

Bekes, F., Wrigley, C. 2004. Cereals/Protein Chemistry. *Encyclopedia of Grain Science*. Elsevier Academic Press, Oxford, 2004, vol. 1, p. 254-262, ISBN: 0-12-765490-9

Caplice, E., Fitzgerald, G. F. 1999. Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. *International Journal of Food Microbiology*, vol. 50, 1999, no. 1-2, p. 131-149. PMID:10488849

Corsetti, A., Settanni, L. 2007. *Lactobacilli* in sourdough fermentation. *Food Research International*, vol. 40, 2007, no. 5, p. 539-558.

Helland, M. H., Wicklund, T., Narvhus, J. A. 2004b. Growth and metabolism of selected strains of probiotic bacteria, in maize porridge with added malted barley. *International Journal of Food Microbiology*, vol. 91, 2004, p. 305-313. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2003.07.007>, PMID:14984778

Helland, M. H., Wicklund, T., Narvhus, J. A. 2004a. Growth and metabolism of selected strains of probiotic bacteria in milk- and water-based cereals puddings. *International Dairy Journal*, vol. 14, 2004, no. 11, p. 957- 965. <http://dx.doi.org/10.1002/9780470277515>

Hutkins, R. W. 2006. *Microbiology and Technology of Fermented Foods*, Blackwell Publishing, Oxford, 2006, 473p. ISBN:0-8138-0018-8.

Charalampopoulos, D., Wang, R., Pandiella, S. S., Webb, C. 2002. Application of cereals and cereal components in functional foods: a review. *International Journal of Food Microbiology*, vol. 79, 2002, no. 1-2, p. 131- 141. PMID:12382693.

Chibbar, R. N., Ganeshan, S., Båga, M., Khandelwal, R. L. 2004. Carbohydrate metabolism. *Encyclopedia of Grain Science*. Elsevier Academic Press, Oxford, 2004, vol.1, p. 168-179, ISBN: 0-12-765490-9. <http://dx.doi.org/10.1016/B0-12-765490-9/00029-X>

Katina, K., Liukkonen, K. H., Kaukovirtanorja, A., Adlercreutz, H., Heinonen, S. M., Lampi, A. M., Pihlava, J. M., Poutanen, K. 2007. Fermentation-induced changes in the nutritional value of native or germinated rye. *Journal of Cereal Science*, vol. 46, 2007, no. 3, p. 348-355.

Leroy, F., De Vuyst, L. 2004. Lactic acid bacteria as starter cultures for the food fermentation industry. *Trends in Food Science & Technology*, vol. 15, 2004, no. 4, p. 67-78.

Messens, W., De Vuyst, L. 2002. Inhibitory substances produced by *Lactobacilli* isolated from sourdoughs-a review. *International Journal of Food Microbiology*, vol. 72, 2002, no. 1-2, p. 31-43. PMID:11843411

Narvhus, J. A., Sørhaug, T. 2006. *Bakery and cereal products. Food chemistry and food processing*. 1.ed. Oxford: BLACKWELL Publishing Ltd, 2006, p. 615-639. ISBN-13: 978-0-8138-0378-4.

Pelikánová, J., Liptáková, D., Valík, E., Stančková, K. 2011. Evaluation of the growth of selected *Lactobacilli* in pseudocereal substrate. *Potravinárstvo*, vol. 4, 2011, p. 53-57. <http://dx.doi.org/10.5219/169>

Poutanen, K., Flander, L., Katina, K. 2009. Sourdough and cereal fermentation in a nutritional perspective. *Food Microbiology*, vol. 26, 2009, no. 7, p. 693-699. PMID:19747602.

Rathore, S., Salmerón, I., Pandiella, S. S. 2012. Production of potentially probiotic beverages using single and mixed cereal substrates fermented with lactic acid bacteria cultures. *Food Microbiology*, vol. 30, 2012, p. 239-244. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2011.09.001>, PMID:22265307

Rivera-Espinoza, Y., Gallardo-Navarro, Y. 2010. Non-dairy probiotic products. *Food Microbiology*, vol. 27, 2010, no. 1, p. 1-11. PMID:19913684

Serna Saldívar, S. O., Caballero, B. 2003. Cereals/Dietary Importance. *Encyclopedia of Food Science and Nutrition*. Academic Press, 2003, vol. 3, p. 1027-1033. ISBN: 978-0-12-227055-0.

STN ISO 15214 *Microbiology of food and animal feeding stuffs Horizontal method for enumeration of mesophilic lactic acid bacteria Colony-count technique Bratislava: Slovak institute of technical normalization, 2002.*

STN ISO 56 0512 *Test methods of grain mill products Bratislava: Slovak institute of technical normalization, 1993.*

Taylor, J. R. N. 2003. Fermented foods/Beverages from Sorghum and Millet. *Encyclopedia of Food Science and Nutrition*. Academic Press, 2003, vol. 2, p. 2352-2359. ISBN: 978-0-12-227055-0.

Valerio, F., De Bellis, P., Lonigro, S. L., Visconti, A., Lavernicocca, P. 2008. Use of *Lactobacillus plantarum* fermentation products in breadmaking to prevent *Bacillus subtilis* rosy spoilage. *International Journal of Food Microbiology*, vol. 122, 2008, no. 3, p. 328-332. [PMid:18261817](https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.05.017)

Acknowledgment:

The work was supported by The Agency of the Ministry of Education, Science, Research and Sport of the Slovak Republic for the Structural Funds of EU, OP R&D of ERDF in the frame of the Project "Evaluation of natural substances and their selection for prevention and treatment of lifestyle diseases (ITMS 26240220040) and the VEGA project 1/0495/13.

Contact address:

Monika Kocková, 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: monika.kockova@stuba.sk

Ľubomír 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@s

IMPORTANCE OF PREBIOTIC AND PROBIOTIC: THE ROLE OF GALACTOOLIGOSACCHARIDES AS PREBIOTIC ADDITIVES: A REVIEW

Monika Vidová, Helena Hronská, Silvia Tokošová, Michal Rosenberg

ABSTRACT

In today's well-resistant pathogens and excessive use of antibiotics which weaken and undermine the immune system the importance of pre- and probiotics is more desired. Probiotics - lactic acid bacteria - our intestinal symbiotes, has significant affect on our intestinal tract and brings us to number of positive physiological effects – inhibit the development of pathogenic microflora and seriously stimulate the immune system, which subsequently leads to secondary health benefits - efficient use of energy from food, better resorption of minerals and vitamins by intestinal epithelium, suppression of diseases and inflammatory processes in the human intestine and many others. This article discusses the impact of prebiotics (essential substrate for probiotic bacteria), but also natural occurrence and importance of prebiotics. Galactooligosaccharides (GOS) as prebiotic are the most suitable and therefore their commercial application is discussed.

Keywords: pre- and probiotics; functional foods; galacto-oligosaccharides; β health benefits

ÚVOD

Výživa, ako jeden z faktorov vonkajšieho prostredia ovplyvňujúcich zdravotný stav človeka sa dá pomerne ľahko ovplyvniť u jednotlivca aj u celých populácií, v negatívnom aj pozitívnom zmysle. V rozvinutých krajinách v súvislosti s relatívne vysokým počtom civilizačných ochorení je venovaná veľká pozornosť práve výžive. Popri potravinách obsahujúcich základné živiny ako sú tuky, cukry, bielkoviny, či minerálne látky sa v poslednom období kladie vyšší dôraz na funkčné potraviny a to nielen v kruhu odborníkov, ale aj u laickej verejnosti, ktorá sa pod vplyvom osvetly snaží žiť zdravšie. Funkčné potraviny môžeme definovať ako potraviny, ktoré okrem klasických zložiek obsahujú aj zdraviu prospešnú zložku (niekedy sa preto nazývajú aj „obohatené potraviny“). Aditívami do funkčných potravín sú najmä esenciálne zložky – ako stopové prvky, vitamíny a v posledných rokoch sa kladie dôraz aj na prídavok pro- a prebiotík. Koncept pro-/prebiotík je považovaná za potenciálne najvýznamnejší pokrok v oblasti výživy a podpory črevnej mikroflóry za posledné storočie. Ide o názor, že zložením potravy človeka je možné cielene a selektívne ovplyvňovať zloženie črevnej mikroflóry a tým aj zdravotný stav organizmu.

1. PROBIOTIKUM VERSUS PREBIOTIKUM

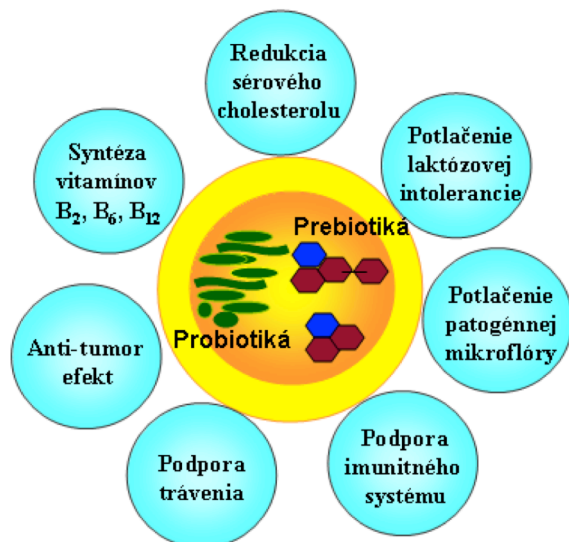
Probiotiká sú živé nepatogénne mikroorganizmy, ktoré kolonizujú tráviaci systém človeka i zvierat a v adekvátnom množstve pozitívne prospievajú k zdraviu a fyziológii hostiteľa. Pojem „probiotiká“ prvýkrát zaviedol Vergin (1954), keď porovnával dobrý účinok testovaných kultúr so škodlivým účinkom antibiotík a iných

antimikrobiálnych látok na črevnú mikroflóru. Základ slova pochádza z gréckeho „pro bios“, čiže „pre život“. Najrozšírenejšiu skupinu probiotických mikroorganizmov tvoria bifidobaktérie a baktérie mliečneho kvasenia, ako napr. *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus casei*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium lactis*, *Bifidobacterium adolescentis*, ale aj *Enterococcus faecalis*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Propionibacterium freudenreichii* a mnoho ďalších (Toma and Pokrotnieks, 2006).

Koncept probiotík a ich pozitívneho účinku povstal na prelome 20-teho storočia z hypotézy, ktorú prvýkrát predložil držiteľ Nobelovej ceny, ruský vedec Elie Metchnikoff. Predložil cenný prínos potravín obsahujúcich živé mikroby (jogurty, kyslomliečne nápoje, kvasená kapusta,...) na ľudské zdravie, pričom tieto pozitívne účinky boli podložené dlhodobým pozorovaním profesionálnych lekárov. Odvtedy naberá presadzovanie a komercializácia probiotík na obrátkach (Saini et al., 2010).

Čo sú prebiotiká? I keď slovné sú veľmi príbuzné s probiotikami a mohlo by sa zdať, že ide o preklep či synonymický význam slova, nie je tomu tak. Prebiotikami označujeme nestráviteľné časti potravín sacharidickej povahy, ktoré sa správajú ako nerozpustná vláknina. Sú to napríklad rôzne druhy oligosacharidov (*xylo-*, *chyto-*, *sójové oligosacharidy*) a galaktosacharidov či inulín, ktoré sú v hornej časti gastrointestinálneho traktu a tenkého čreva nestráviteľné. Je to spôsobené substrátovou špecifitou ľudských gastrointestinálnych enzýmov. Prebiotiká prechádzajú v nezmenenej podobe až do hrubého čreva, kde sú utilizované práve mikroorganizmami črevnej

mikroflóry, stávajú sa potravou pre „dobré“ črevné baktérie a podporujú ich rast, osídľovanie a udržateľnosť v tráviacom trakte. Z pomedzi prebiotík získali ústrednú pozornosť galaktooligosacharidy a oligosacharidy, ktoré sa označujú ako bifidogénne látky (bifidofaktory), s odkazom na ich schopnosti selektívne podporovať rast *Bifidobacterium spp.* (*B. longum*, *B. breve*, *B. pseudolongum*, *B. infantis*, *B. lactis*) a *Lactobacillus spp.* (*L. acidophilus*, *L. casei*, *L. reuteri*, *L. plantarum* ...) (Manucci, 2009).



Obrázok 1 Pozitívne účinky prebiotík a probiotík na ľudské zdravie. Obrázok spracovaný na základe publikácie: (Park and Oh, 2010, Torres et al., 2010).

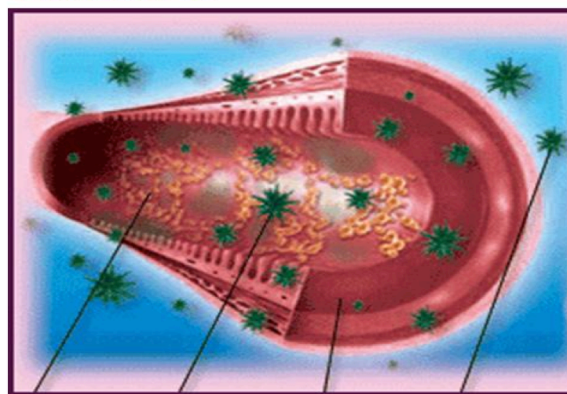
Prebiotiká sú substrátovou základňou pre črevnú mikroflóru, ktorú u dospelého jedinca tvorí približne biliarda mikroorganizmov. Ide o komplex spoločenstva baktérií, eukaryotických mikroorganizmov, archaea, vírusov, bakteriofágov, ktoré spoločne vykazujú obrovskú metabolickú aktivitu zhodnú s aktivitou pečene. Baktérie tvoria hlavnú časť z týchto mikroorganizmov. Kolonizácia gastrointestinálneho traktu mikrobiálnou flórou nastáva ihneď po narodení a trvá po celý život. Zloženie črevnej mikroflóry je všeobecne tvorené viac ako 500 pretrvávajúcimi a prechodnými druhmi baktérií, hoci len 30 alebo 40 z nich prevažuje (Gibson and Rastall, 2006).

Črevná mikroflóra napomáha tráveniu a získavaniu energie z potravy, ktorá sa inak nestrávi (Galbavý et al., 2008). Tenké črevo predstavuje prechodnú oblasť medzi riedko kolonizovaným žalúdkom a bohatou bakteriálnou flórou v hrubom čreve. Mikróby hrubého čreva sú v hornej časti najmä fakultatívne anaeróby a v spodnej časti prevažujú striktné anaeróby, ako napríklad *Bifidobacterium*, *Eubacterium*, *Bacteroides*, *Peptococcus*, *Clostridium*, *Fusobacterium* (Steer et al., 2000).

Keďže v čreve prebieha boj o nutričné zložky a produkciu antimikrobiálnych látok, zaistenie dostatočného množstva bifidobaktérií a mliečnych baktérií má zásadný význam pre vyváženú črevnú mikroflóru. Tak ako dozrieva črevná mikroflóra, paralelne dozrieva aj imunitný systém a spolu tvoria komplex, ktorý neustále kooperuje. Až 80 % imunitného systému je prepojeného na intestinálny trakt (Park and Oh, 2010).

V hrubom čreve sa fermentujú zložky potravy, ktoré neboli rozložené v tenkom čreve. To môžu byť už spomenuté uhľovodíky (vláknina, oligosacharidy, odolný škrob a pod.). Treba mať na pamäti, že do hrubého čreva prechádzajú aj zvyšky bielkovinovej povahy, ktoré môžu byť ďalej rozkladané patogénnou mikroflórou na toxické látky, dusíkaté zlúčeniny (amíny), fenolové látky, kyseliny s rozvetvenými reťazcami a iné. Ide o proteolytické mikróby (*E. coli*, *Clostridium*, *Klebsiella*, *Shigella*, *Salmonella*, *Campylobacter*, *Vibrio* a *Listeria*). Výsledkom ich pre množenia a činnosti je plynatosť, zápalové procesy v čreve a môže sa rozvinúť syndróm dráždivého čreva. Aj v dôsledku tohto je potrebné stimulovať vývoj a kolonizáciu práve probiotických kultúr, aby tieto proteolytické mikróby a ich aktivita boli potlačené.

Prierez črevom



-  **Probiotické baktérie** (*Lactobacillus sp.*, *Bifidobacterium sp.*, *Propionibacterium sp.*, ...)
-  **Patogénne baktérie** (*E. coli*, *Clostridium*)

Obrázok 2 Osídľovanie intestinálneho traktu črevnou mikroflórou, spracované autorom článku.

1.1 RÔZNE DRUHY PREBIOTÍK

Galaktooligosacharidy (GOS) patria spolu s fruktooligosacharidmi (FOS), laktulózou, derivátmi rafinózy, maltooligosacharidmi; xylo- a chito-oligosacharidmi a inulínom do skupiny oligosacharidov. Oligosacharidy sú definované ako glykozidy s rôznym stupňom polymerizácie, ktoré môžu byť syntetizované chemicky alebo enzymaticky. Nestráviteľné oligosacharidy slúžia ako substráty pre probiotické baktérie a keďže podporujú ich rast, označujú sa ako prebiotiká. Sú nestráviteľné enzýmami tenkého čreva, čo je spôsobené substrátovou špecificitou ľudských gastrointestinálnych enzýmov. Tieto enzýmy sú zväčša špecifické pre α -glykozidové väzby, zatiaľ čo glykozidové väzby v oligosacharidoch majú β -konfiguráciu. V tenkom čreve síce existuje niekoľko β -galaktozidáz, ktoré sú schopné rozkladať GOS, ale ich aktivita je zvyčajne veľmi slabá (Manucci, 2009).

Všeobecný vzorec galaktooligosacharidov je D-glukóza- $[\beta$ -D-galaktóza] $_n$, kde n vyjadruje počet galaktózových jednotiek a mení sa v rozsahu 2-20 jednotiek. Najčastejšie však bývajú zmesou tetrasacharidov (Gal-Gal-Gal-Glc) a trisacharidov (Gal-Gal-Glc), pričom glukóza je vždy

terminálnou sacharidickou jednotkou. Pre FOS platí podobný všeobecný vzorec s tým rozdielom, že základným stavebným monosacharidom je fruktóza.

GOS majú synonymické označenie oligogalaktosyllaktóza, oligogalaktóza, oligolaktóza alebo transgalaktooligosacharidy (TOS). Patria do skupiny prebiotík, ktoré priaznivo ovplyvňujú hostiteľa tým, že stimulujú rast zdraviu prospešných baktérií, čo má za následok rad zdravotných výhod spojených priamo s baktériami alebo nepriamo vďaka organickým kyselinám produkovaným počas kvasenia. Organické kyseliny znižujú pH hodnotu v čreve, tým inhibujú rast patogénnych baktérií (*Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*) a zároveň stimulujú funkcie imunitného systému hostiteľa. Napomáhajú taktiež pri väzbe a resorpcii dôležitých živín a minerálov a podieľajú sa na syntéze určitých vitamínov (Torres et al., 2010).

1.2 PRÍRODNÝ VÝSKYT PREBIOTÍK

Oligosacharidy sa prirodzene vyskytujú v materskom mlieku (až 130 druhov, z čoho 90 % tvoria GOS a zvyšných 10 % FOS) v relatívne vysokých koncentráciách (5-12 g.l⁻¹). Sú súčasťou rôznych druhov zeleniny a často sú zložkami glykoproteínov a glykolipidov, preto sa využívajú aj ako chemické markery. Niektoré prírodné oligosacharidy, ako deriváty rafinózy, slúžia ako zásobáreň uhlíkovodíkov v rastlinách, maltodextríny sa vyskytujú v zrnách, ryži alebo paradajkách. Prebiotické FOS a GOS sa prirodzene vyskytujú v obilných zrnách, cibuli, póre, cesnaku, špargli, banánoch, hrozienkach, čakankovom korení, sójových bôboch a v ďalších konzumných rastlinách (Dreamfieldsfoods, 2012).

2. FYZIOLOGICKÉ ÚČINKY PRO A PREBIOTÍK NA ĽUDSKÝ ORGANIZMUS

Bez prítomnosti prebiotík v strave by nemal význam ani príjem a užívanie vysokých dávok komerčných probiotík. Tieto by sa totiž nemohli v dostatočnej miere rozvinúť a uchýtiť na črevný epitel a kolonizovať tráviaci trakt a tak by sme márne očakávali nástup ich sekundárnych priaznivých účinkov. Najviac komerčne využívanými sú priemyselne vyrábané prebiotiká – galaktooligosacharidy, ktoré sa najviac svojou štruktúrou približujú prebiotikám, bežne sa vyskytujúcim v prírode. Ich zdravotné benefity možno popísať v dvoch možných mechanizmoch – prvým krokom je podpora selektívnej proliferácie a uchytienia probiotických baktérií na črevný epitel (obzvlášť druhy *Bifidobacterium spp.* a *Lactobacillus spp.*), pričom sa znižuje priestor pre kolonizáciu patogénov a tým redukujej exo- a endogénne intestinálne infekcie. Druhým, následným a významným krokom je, že metabolickými aktivitami baktérií sa spúšťa kaskáda syntézy priaznivých látok a enzýmov, pričom dochádza k ovplyvňovaniu metabolických procesov a k prevencii nástupu patologických procesov v organizme. Následne sú opísané zdravotné benefity probiotík a prebiotík pre ľudské zdravie.

Syntéza biologicky aktívnych látok (vitamíny, minerálne látky, organické kyseliny a iné)

V procese fermentácie prebiotických uhlíkovodíkov v hrubom čreve dochádza k tvorbe nižších organických a

mastných kyselín - octová, propiónová, maslová (butyrát); produkujú sa esenciálne vitamíny najmä zo skupiny B, tvorí sa pyruvát, etanol, jantarát - ktoré sú rýchlo absorbované črevnou sliznicou a sú distribuované cievnym a lymfatickým systémom, vstupujú do buniek a prispievajú k energetickým požiadavkám hostiteľa. Vznikajúci acetát sa metabolizuje prevažne v svalových bunkách, obličkách, srdci a mozgu. Propionát je využívaný v pečeni a je zároveň prekursorom pre potlačenie syntézy cholesterolu. Butyrát sa metabolizuje priamo v črevnom epiteli, kde slúži ako regulátor rastu a delenia buniek. Produkciu organických kyselín dochádza k zníženiu hodnoty pH prostredia a tým je podporený rast a bunková diferenciácia črevných epitelálnych buniek a opätovne je podporená mikroflóra. Svojimi fyzikálno-chemickými vlastnosťami - významne zvyšujú absorpciu solí a minerálov (vápnik, horčík, železo). Možno upriamiť pozornosť na to, že vitamíny a minerály sa absorbujú v ich aktívnej forme, čím sú ďalej fyziologicky využité a inkorporované do potrebných štruktúr tela. Týmto probiotiká priamo ovplyvňujú aj vývoj a pokračujúce modulácie imunitného systému, s ktorým spolu zabíjajú chorobné vírusy a baktérie. Treba spomenúť, že pri fermentácii v čreve vznikajú aj konečné formy rozkladu látok ako sú jednoduché plyny: H₂, CO₂, H₂S a CH₄.

Imunitný systém

Až 80% imunitného systému je prepojeného na intestinálny trakt. U detí s nízkou hladinou bifidobaktérií a vysokou hladinou klostridií v hrubom čreve je pravdepodobnejší výskyt alergií, ako u detí s vyváženou črevnou mikroflórou. Recipročne povedané, gastrointestinálna disbióza má mnohostranný vplyv vo vývoji alergických a autoimunitných ochorení. Je predložených mnoho laboratórnych a dietologických štúdií, ktoré poukazujú na opodstatnenosť aplikácie pro / prebiotík a enzýmov v prevencii a liečení sprostredkovanej imunitnej poruchy a podpory imunitného systému (Park and Oh, 2010).

V posledných 60-tich rokoch lekári zaznamenávajú enormný nárast autoimunitných ochorení, pričom povaha niektorých je doteraz nejasná. Profesor medicíny Gerard Mullin z USA pozoroval, že autoimunita sa vyvíja v dôsledku krížovej reaktivity vlastných a cudzích antigénov. Ak dôjde k zlomu medzi týmito interakciami a vlastné antigény zaostávajú, vzniká autoimunitná porucha. Probiotikám pridelil 4 úlohy v prevencii pred výskytom autoimunitných ochorení. Mikroflóra moduluje imunitný systém najmä produkciou organických kyselín, ktoré ozdravujú črevný epitel, zvyšujú absorpciu minerálov v aktívnej forme, v syntéze a sekrécii antimikrobiálnych peptidov a hlavne v priebežnom stimulovaní Toll-receptorov, ktoré sú lokalizované na zdravých T-lymfocytoch. Tieto blokujú špecifické translokácie do bunkového jadra a tým zastavujú transkripciu a sekréciu pro-zápalových cytokínov, čo je užitočné v prípade precitlivosti, alergiách a zápalových reakciách. Existuje však mechanizmus, v ktorom dochádza k sekrécii týchto pro-zápalových cytokínov, avšak tieto mobilizujú bunky imunitného systému k eliminácii rakovinových buniek, čo je nápomocné a žiadané pri výskyte tumorových zmien. Profesor Mullin a jeho vedecký tím predložil výskum, kde poukazuje, že objavenými cieľmi probiotickej aktivity je aj

regulácia mitochondriálneho stresu a regulácia endoplazmatického retikula v bunke (**Gibson and Rastall, 2006; Freelibary, 2012**). Vedci na Univerzite veterinárnej medicíny v Košiciach pozorovali u laboratórných prasiat, že u skupiny prasiat, ktorým dávkovali prebiotiká nastalo zvýšenie imunoglobulínov v krvnom sére (IgA, IgM, IgG) a tiež T-buniek, ktoré exprimujú molekuly CD4 a CD8. Tieto molekuly sú dôležité v imunitnej odpovedi organizmu (**Herich and Levkut, 2002**). Obdobné výsledky stimulu prebiotík na zložky imunitného systému získal aj vedecký tím doktora Roya Fullera z Anglicka. Pozorovali, že pri aplikácii probiotík u testovaných laboratórných zvierat sa zvýšila v krvnom sére hladina imunoglobulínov (najmä IgG, IgM), nešpecifických antivirov a interferónov (**Perdigón et al., 2001**).

Probiotiká svojou činnosťou podporujú vývoj tzv. dendritických buniek. Dendritické bunky sú špeciálne bunky, ktoré sa nachádzajú pozdĺž celého tráviaceho traktu a majú na svojom povrchu antigény. Dendritické bunky neustále „kontrolujú“ cudzie antigény prítomné v čreve a odovzdávajú ich T-bunkám, čo následne vyúsťuje k aktivácii a diferenciacii T-buniek. Dendritické bunky sú schopné pri rozoznaní „cudzích“ receptorov/antigénov diskriminovať patogénne mikróby. Tým je postarané o dostatočne rýchly a silný príjem signálu od dendritických buniek o prítomnosti cudzorodých zložiek a je zabezpečená aj adekvátna imunitná odpoveď (**Saini et al., 2010**).

Osteoporóza

Výživa a rozmanitosť stravy – ako nutričné faktory vplyvajú na vývoj a udržiavanie štruktúry kostí v priebehu celého života. V dôsledku toho hrá výživa dôležitú úlohu v patofyziologickom procese vývoja osteoporózy. Štúdie na laboratórných zvieratách preukázali, že oligofruktóza a inulín sa považujú za najlepšie prebiotiká so schopnosťou potlačiť osteoporózu. Súvisí to s tým, že rozvetvené FOS a inulín s dlhými reťazcami vystupujú ako pomaly „spaľované palivo“, pre črevnú mikroflóru, čo s pravdepodobnosťou napomáha aj dlhodobejšej absorpcii vápnika z potravy a čo je dôležité - jeho vyviazani v aktívnej forme! Týmto spôsobom sa zvyšuje dostupnosť vápnika, ktorý je následne efektívne využitý a inkorporovaný do procesu mineralizácie kostí. Rovnaká štúdia bola prevedená aj u dospievajúcich dievčat. U testovanej skupiny dievčat, ktorej podávali dávku inulínu obohatenú o oligofruktózu (8 g/denne) po dobu 8 týždňov, bol pozorovaný nárast obsahu kostných minerálov a zvýšená hustota kostí. Je nutné poznamenať, že na osteoporózu vplyvajú aj iné faktory ako: genetický predpoklad a mineralizácia v procese dospievania a po menopauze. V prípade, že nie je v týchto kritických obdobiach zabezpečený dostatočný prísun vápnika a štruktúra kosti je už narušená, použitie pre- a probiotík je iba nápomocné (**Bosscher et al., 2006**).

Ochorenia tráviaceho traktu a tumorové zmeny epitelu

Spotrebiteľmi obľúbené vyprážené či trvanlivé mäsové výrobky a pražené slané pochutiny, popri príjemnej chuti na jazyku spôsobujú katastrofu v našich útrobach. Nielenže sú bohaté na škodlivé tuky a rôzne druhy konzervačných soliacich zmesí, ale ich trávením sa

prechodne podporuje rozvoj patogénnych baktérií, uvoľňujú sa škodlivé ba až toxické látky pre náš organizmus. Atakujú črevný epitel a vyvolávajú rôzne zápalové črevné ochorenia (variabilné hnačky, zápal hrubého čreva, Crohnova choroba). V súvislosti s ochoreniami tráviaceho traktu treba spomenúť, že vnútorný ekosystém výrazne narúša a deštruuje aj časté užívanie širokospektrálnych antibiotík a taktiež prísun veľkého množstva potravy bielkovinovej povahy. Nestrávená časť bielkovín je potom zužitkovaná proteolytickými mikroorganizmami, tranzitnými baktériami (prijímanými v strave; ich zloženie sa môže v závislosti od potravy v tele meniť), ktoré produkujú toxické látky dusikatej povahy (rôzne amíny). V horšom prípade dlhá expozícia vedie k rozvoju tumorových zmien najmä v dolných častiach hrubého čreva. Navodenie opätovnej dobrej vitality črevnej mikroflóry sa postará o zrýchlený metabolizmus, kedy sa tieto jedovaté látky jednak dlho nezdržia v našich útrobach alebo ich svojou činnosťou deaktivujú a rozložia na neškodné látky, ktoré sú vylúčené v procese vyprázdňovania z tela (**Ma et al., 2010; Gibson et al., 2005; Nutritionalmedcal, 2012**).

Laktózová maldigestia a intolerancia

Ochorenia laktózová maldigestia (porucha trávenia laktózy, ktorá sa natrávi iba čiastočne) a laktózová intolerancia (neznášanlivosť laktózy) vyjadrujú najobvyklejšie neznášanlivosti potravín u ľudí súvisiace s nedostatkom potrebného enzýmu: β -galaktozidázy. Laktóza sa pomocou β -galaktozidázy štiepi na glukózu a galaktózu. Glukóza prechádza priamo do krvi a vstupuje do buniek. Pri uvedených patologických stavoch, tráviaci systém produkuje enzým s nízkou aktivitou (laktózová maldigestia), resp. ho neprodukuje vôbec (laktózová intolerancia). Nerozštiepená časť laktózy sa dostane až do hrubého čreva, kde je fermentovaná rôznymi neželanými baktériami na vodík, metán, CO₂, čo spôsobuje nepríjemné problémy ako plynatosť, nadúvanie, kŕče a hnačky. Významné zlepšenie stavu sa pozoruje pri konzumácii fermentovaných výrobkov, v ktorých došlo vďaka fermentácii k rozloženiu laktózy a ktoré obsahujú baktérie mliečneho kvasenia (**Wallace et al., 2011**).

Metabolizmus cukrov a lipidov

Prebiotikum ovplyvňuje nielen rozmnožovanie probiotických kultúr, ale je zdrojom substancií vstupujúcich do metabolizmu v čreve. Kaskáda následných reakcií ich metabolizmom a prenosom látok krvou sa prejaví aj v iných orgánoch a takto vplyva na metabolizmus lipidov a sacharidov. Prebiotiká teda môžu slúžiť ako prevencia v nástupe ochorení.

Diabetes. Vedci pozorovali prepojenie medzi metabolickými ochoreniami, ako je diabetes, a zložením a aktivitou bakteriálnej populácie v črevách. U ľudí s cukrovkou bola pozorovaná vyššia hladina betaproteobaktérií v porovnaní so zdravými jedincami. Vzájomná bilancia a pomer črevných baktérií je totiž závislý aj od hladín cukru v krvi a v tkanivách. Prebiotiká sú nestráviteľné a preto nemôžu vplyvať na koncentráciu glukózy v krvi. Vedci sa domnievajú, že aplikácia prebiotík môže priaznivo ovplyvniť bilanciu mikroflóry, ktorá vplyva na metabolizmus sacharidov a môžu byť jedným z faktorov zabránenia nástupu cukrovky, resp.

stratégiou kontroly už prepuknutej choroby (Livestrong, 2012).

Redukcia sérového cholesterolu

Hodnotenie efektu probiotík a prebiotík na hladinu sérového cholesterolu sa zdôrazňuje už niekoľko rokov. V prvom kroku klinických štúdií sa používajú zvieracie modely, ktoré majú podobnú zažívaciu anatómiu a fyziológiu, nutričné požiadavky a metabolické procesy ako ľudia. To sú najmä myši, potkany, morčatá, škrečky a prasce. Tieto štúdie poukazujú, že vhodne zvolené probiotiká a prebiotiká, resp. ich kombinácie majú hypocholesterolický efekt a vplyvajú na metabolizmus žľčových kyselín, na pomer LDL/HDL cholesterolu, na distribúciu plazmových lipoproteínov a reguláciu pečňových cholesterolových enzýmov. Napr. kmeň *L. plantarum* PH04 bol po dobu 14 dní podávaný laboratórnym myšiam a testy preukázali 10% zníženie sérového cholesterolu a triglyceridov v porovnaní s kontrolnou skupinou. Pri inej štúdií na potkanoch boli pozorované podobné výsledky poklesu sledovaného celkového cholesterolu. V tomto prípade sa potkanom aplikovali jogurtové preparáty obohatené najmä o *Bifidobacterium longum* Bb-46. Veľmi dobré výsledky sa dostavili po vhodnom symbiotickom namiešaní prebiotík s probiotikami (*L. acidophilus* ATCC 4962, fruktooligosacharidov, manitolu a inulínu), ktoré u hypercholesterolických prasiatok priniesli sľubný hypocholesterolický efekt.

Na vysvetlenie hypocholesterolického efektu existuje niekoľko možností a závisí to od špecifických vlastností probiotických kmeňov. Sprostredkovane, účinkom vznikajúcej kyseliny propiónovej (vzniká činnosťou probiotických mikroorganizmov v čreve) je v pečeni z cholesterolu tvorená žľčová kyselina, ktorá je utilizovaná pri trávení tukov. Niektoré probiotiká sú schopné priamo na svojom povrchu viazať cholesterol. Napr. to bolo dokázané u *Lactobacillus bulgaricus*. Hladiny cholesterolu tiež môžu byť znižované v procese jeho inkorporácie do vlastných membránových štruktúr pri raste a diferenciacii. Inkorporovaním cholesterolu do membrán sa zlepšujú ich vlastnosti a bunky probiotík sú následne odolnejšie voči lýze a poškodeniu. Toto pozorovanie bolo dokázané inkorporovaním fluorescenčných markerov do cholesterolu, ktorý bol podávaný laboratórnym zvieratám. Ďalším zo spôsobov znižovania hladín cholesterolu je, že tento môže byť priamo v čreve probiotikami metabolizovaný na koprostanol, ktorý je následne vylučovaný stolicou. Tento spôsob eliminácie bol overený *in vitro* štúdiou s použitím špeciálnych fluorescenčných prób u kmeňov *L. acidophilus*, *L. bulgaricus* a *L. casei* ATCC 393. Vo všeobecnosti vedci zaznamenali najlepšie výsledky s ohľadom na pokles celkového cholesterolu, jeho LDL formy a triacylglycerolov pri použití vhodných kombinácií probiotických kultúr s prebiotikami (Ooi and Liang, 2010).

Kardiovaskulárny systém

Koronárne ochorenie srdca je choroba zapríčinená zužovaním koronárnych ciev, ktoré vyživujú srdce. Je to najrozšírenejší prípad ochorenia kardiovaskulárneho systému, ktorý neliečený končí smrťou a v rozvinutých krajinách sa výrazne podieľa na mortalite obyvateľstva.

Rizikové faktory pre rozvoj tohto ochorenia sú známe: vysoký krvný tlak a cholesterol, fajčenie, obezita, fyzická pasivita, diabetes a stres. Tieto koronárne cievy sú tiež poškodzované, čo častokrát ani netušíme, v priebehu prekonávania zranení a infekcií – najmä streptokokových. V tele vznikne „domnienka“, že tepny sú poranené, telo vyšle mylný signál a zaplaví postihnuté miesta rojom bielych krviniek. Ako súčasť ďalšieho liečebného vývoja, biele krvinky (symbol zápalového miesta) vyťahujú z krvného riečiska cholesterol, ktorý používajú ako lep na „zalátanie“ poškodených miest a obnovu buniek. Ak tento slepý a umelý zápal pretrváva dostatočne dlho, cholesterol sa začne nadmerne hromadiť v cievach, tie sa začnú uzatvárať a v podstate zdravý človek je razom kandidátom na cievnu príhodu.

Experimentálne dáta potvrdzujú hypotézu, že probiotiká inhibujú hepatálnu lipogénu u potkanov a následne indukujú významný hypotriglyceridimický efekt, tzn. znižujú sa škodlivé lipidy. Predpokladaný mechanizmus zahŕňa vplyv tvorby karboxylových kyselín a nenasýtených mastných kyselín v črevách a ich následného metabolizmu v tele, čo má za následok zníženie glykémie a inzulínovej rezistencie. Nedávno bola preukázaná metabolická linka medzi inzulínovou rezistenciou a hypertriglyceridémiou. Pričom je tu povedomie, že práve hypertriglyceridémia je jedným z rizikových faktorov pre spustenie aterogenézy a vývoja aterosklerotickej kardiovaskulárnej choroby. Taktiež podpora tvorby T-buniek a dendritických buniek posilňuje imunitný systém, ktorý môže rozoznať poplašné zápalové procesy v tele a zamedziť neopodstatnenému hromadeniu cholesterolu v cievach (Saini et al., 2010).

O tom, že črevná mikroflóra je osobitá a premenlivá u každého jednotlivca, niet pochýb. Zaujímavé však je, aký markantný vplyv má na metabolizmus lipidov. Zvlášť na lipid – fosfatidylcholín. Fosfatidylcholín je súčasťou lecitínu a jeho rozkladom vzniká cholín. Tieto lipidy sú zodpovedné za tvorbu mastného plaku v tepnách. Nachádzajú sa aj v mnohých komerčných trvanlivých pečivách a doplnkoch stravy. Vedci pozorovali, že u testovaných myší, ktorým bolo adresne navodené rôzne zloženie mikroflóry, pozorovali rôzne spektrum lipidov v krvnom sére. U myší s bohatou črevnou mikroflórou, ktoré dostávali relatívne vysoké dávky nasýtených lipidov v strave, napriek predpokladu prepuknutia určitého druhu kardiovaskulárneho ochorenia, nezaznamenali žiadny rozvoj ochorenia. V tejto oblasti bol uskutočnený aj testovací prieskum a výsledky boli uverejnené v prestížnom časopise Nature. Špecialisti testovali širokú vzorku ľudí, takmer 2000 pacientov, ktorým podávali stravu bohatú na živočíšne lipidy, ktoré obsahujú značné množstvá práve fosfatidylcholínu (vajčička, pečeň, rôzne druhy mäsa, kôrovce, syry) a sledovali aké lipidy sa uvoľňujú do krvného riečiska. Výsledky boli u každého pacienta odlišné, čo poukazuje na to, že nielen genetický predpoklad ale aj zloženie črevnej mikroflóry má dôležitý vplyv na metabolizmus tukov. Preukazuje sa, že práve mikroflóra čрева a jej zloženie je akýmsi filtrom pre našu najväčšiu environmentálnu expozíciu – pre našu potravu. V rámci tejto publikácie boli uverejnené aj výsledky práce ďalšieho tímu vedcov pod vedením doktora Stanleyho Hanzena z Výskumného ústavu bunkovej biológie na klinike v Clevelande (štát Ohio, USA). Zistili, že cholín

bol v posledných rokoch pridávaný do multivitamínov pre deti. Tento fakt je veľmi zarážajúci, pretože aj napriek tomu, že cholín je v malých dávkach esenciálny pre naše telo, jeho nadmerné množstvá môžu byť mikroflórou transformované do negatívne pôsobiacich vedľajších produktov a spôsobovať ochorenia ciev (Wang et al., 2011).

3. OBMEDZENIA POUŽÍVANIA PRO A PREBIOTÍK

U klasických prírodných zdrojov prebiotického vlákna a pri fermentovaných potravinách, ktoré sa používajú už stáročia a obsahujú prirodzené probiotiká ako sú: jogurty, kefir, kyslá kapusta, uhorky či pivo, nie je potrebná diskusia na túto tému. No komerčný marketingový tlak a výbuch okolo nových druhov pro- a prebiotík je v duchu ich priaznivých účinkov veľmi veľký a je ťažké oddeliť fakty od fikcií a prepokladov.

Nové prebiotiká nepredstavujú výrazné riziká, nakoľko prebiotiká by mali byť nestráviteľné ľudským telom a pri ich nevyužití črevnou mikroflórou sú vylúčené v procese vyprázdňovania.

S ohľadom na najviac používané prebiotiká v Európskej únii (EÚ) – galaktooligosacharidy, národné centrum pre doplnkovú a alternatívnu medicínu EÚ a tiež európska inštitúcia pre bezpečnosť potravín EFSA (European Food Safety Authority) uznali GOS ako aditívne látky s prebiotickým účinkom (povolené množstvá sú uvedené na stránke), no varujú, že pre určité skupiny obyvateľstva, ako sú deti, starší a ľudia s poruchou imunitného systému – neboli tieto látky a ich účinok dostatočne dlho a systematicky preskúmané a preto ich neuznali ako liečivá, čo je vyšší stupeň posudzovania bezpečnosti látok. Odporúčajú, aby každá zvýšená konzumácia prebiotík ale i probiotík bola diskutovaná s ošetroujúcim lekárom (Clementel A., 2012).

Americká správa liečiv a potravín (FDA – Food and Drug Administration) registruje všetky potravinárske aditívne látky, ktoré majú dlhú históriu bezpečného používania (pred r. 1958) alebo sú o bezpečnosti doložené podstatné vedecké dôkazy. V takomto prípade sú látky považované za bezpečné a označujú sa skratkou „GRAS“ (Generally Recognized As Safe - všeobecne rozpoznávané ako bezpečné), (FDA, 2012).

Pri predkladaní nových probiotík sa objavujú zásadné obavy s ohľadom na bezpečnosť a toleranciu a vyžadujú sa komplexné, dlhodobé štúdie na obyvateľstve. Existujú totiž hypotézy, že niektoré probiotiká môžu mať svoje obmedzenia a v niektorých prípadoch až negatívne vplyvy na zdravie. Tak ako môžu pozitívne modulovať imunitný systém, bol postulovaný názor, že v závislosti od dávky a od podávania probiotík (orálne, resp. cez rodiča) môžu i škodiť. Peptidoglykány a rôzne polysacharidy, ktoré sú lokalizované na bunkovej stene a sú zodpovedné za interakciu s imunitným systémom, môžu u precitlivenejších ľudí vyvolať nepriaznivé reakcie ako sú horúčky, artritídu, lézie pečene a žlčových ciest ako aj autoimúne ochorenia.

Taktiež existujú obavy, či medzi nadmerne požívanými probiotickými kmeňmi a prirodzene sa vyskytujúcimi mikróbami v čreve nemôže dochádzať ku genetickým interakciám. Transdukcia, konjugácia a transformácia boli identifikované ako tri najviac pravdepodobné formy, ako

by sa mohla vymieňať genetická informácia v črevnej mikrobiálnej komunite a mohlo by dochádzať k prešmykovaniu informácií a vlastností u kmeňov, čo by tiež mohlo viesť k neprirodzeným a nežiaducim efektom. Zasahovanie aktivity probiotík do metabolizmu žlčových kyselín vyvoláva tiež otázky. Akumulovaná dekonjugovaná žlčová kyselina môže byť črevnou mikroflórou následne transformovaná do sekundárnej škodlivej formy žlčovej kyseliny. Hromadenie tejto potenciálne cytotoxickej sekundárnej žlčovej kyseliny v enterohepatickej cirkulácii môže zvyšovať riziko vývoja gastrointestinálnych ochorení ako cholestázu a kolorektálny karcinóm (Ooi and Liong, 2010).

Každý nový probiotický kmeň či prebiotikum musí prejsť komplexným výskumom a pri preukazovaní ich bezpečnosti existujú tri úrovne štúdií: 1) *in vitro* štúdie na zvieratách, 2) klinické štúdie na ľuďoch - pričom sa merajú mnohé fyziologické parametre, 3) história bezpečného používania.

Samotné preukazovanie bezpečnosti je mimoriadne náročné a dôsledné. Výberových kritérií, ktoré sa sledujú pre prijatie nových probiotík, je neúrekom. Hlavné sú: rezistencia kmeňa voči všetkým tráviacim šŕavám, dosiahnutie požadovaného miesta v zažívacom trakte, rezistencia na antibiotiká, udržanie životaschopnosti, príľnavosť a miera kolonizácie v čreve, normalizácia a stimulácia prospešnej črevnej mikroflóry, prechod látok do lymfatického systému, produkcia antimikrobiálnych látok, imunitná modulácia, konkurenčné vylúčenie iných látok, sleduje sa vylučovanie v stolici. Kmeň musí byť samozrejme presne popísaný (rod, druh, kmeň) a charakterizovaný a musí sa zdokonaľovať minimálne potrebná a dostatočná dávka probiotika (FDA, 2012).

Aj s ohľadom na zložitosť procedúry prijatia nových pro- a probiotík a pod komerčným tlakom výrobcov a farmaceutických spoločností, je tendencia vypracovať alternatívne pravidlá systematického hodnotenia a prijímania týchto látok, ktoré by prekonali náročnosť a nedostatky súčasných modelových systémov. Alternatívnymi analýzami ako napr. DNA analýzou by bolo možné posúdiť prítomnosť a prežitie probiotického kmeňa v stolici. Tým by sa prekonalo analyzovanie stolice mikroskopickým a kultivačným hodnotením na agarových platniach. Identifikáciu by tiež uľahčili: ELISA analýzy s použitím monoklonálnych protilátok či použitie genetického markera u daného kmeňa (Gibson and Rastall, 2006).

4. PRIEMYSELNÁ APLIKÁCIA PREBIOTÍK - GALAKTOOLIGOSACHARIDOV

Priemyselne vyrábané galaktooligosacharidy (GOS) enzymatickou cestou sú svojou štruktúrou a vlastnosťami veľmi príbuzné tým, ktoré sú obsiahnuté prirodzene v ľudskom mlieku. Popri ich zdravotných benefitoch a s ohľadom na priaznivé fyzikálno-chemické vlastnosti: nízka sladivosť (významné je, že v priebehu metabolizmu nezvyšujú hladinu glukózy v krvi a sú teda vhodné i pre diabetikov), dobrá rozpustnosť vo vode, sirupová konzistencia, pH a tepelná stabilita; majú zároveň potenciál zlepšiť kvalitu potravín (lepšie sensorické vlastnosti, plná chuť, vláčnosť, jemnosť).

GOS sa využívajú v potravinárskom, farmaceutickom (zložka liečiv, alternatíva pri antibiotickej liečbe) i

kozmetickom priemysle. Sú ideálnou prísadou do produktov zameraných na špecifické skupiny ako sú dojčatá, deti, ženy a starší ľudia. Možno upriamiť pozornosť na také produkty ako sú sušené mliečne výrobky pre novorodencov a dojčatá, mliečne výrobky, nápoje, nutričné drinky, pekárenské výrobky a iné. Úspešne boli aplikované aj do nepotravinárskych výrobkov, napr. do krmív pre domáce i hospodárske zvieratá a ryby. S ohľadom na odporúčané množstvo použitých GOS, dávka 5 g/denne by mala byť dostatočná pre navodenie pozitívneho efektu na črevnú mikroflóru (vo výnimočných prípadoch do 8 g/denne). Možný vedľajší efekt prijímaných prebiotík je napríklad črevný diskomfort spôsobený tvorbou plynov (Toma and Pokrotnieks, 2006).

Dojčenská výživa

Dôvod pre dopĺňanie dojčenských mliečnych výživ o prebiotické zložky je získať taký bifidogénny efekt (a z toho vyplývajúce výhody), aké majú deti, ktoré sú kojené materským mliekom. Výhodné sa ukázalo práve obohacovanie dojčenských výživ o GOS, keďže materské mlieko ich prirodzene obsahuje. Už prídavky malých množstiev (0,24 g/100ml) zvyšujú frekvenciu stolice a stimulujú intestinálnu mikroflóru tak ako u detí, ktoré sú živene materským mliekom (Sangwan et al., 2011).

Mliečne výrobky

Bežnou sa stala i aplikácia GOS do mliečnych výrobkov ako sú jogurty, dezerty, maslá a kyslo-mliečne nápoje. V bielych jogurtoch môžu byť GOS pridané pred fermentáciou a vďaka svojim vlastnostiam môžu byť použité aj po fermentačnom procese, pretože jednak GOS zvyšujú sladivosť u týchto výrobkov a taktiež priaznivo pôsobia na konzistenciu, ktorá je potom jemnejšia a krémovjšia. Netreba sa obávať, že GOS budú rozložené použitými jogurtovými kultúrami. Za podmienok prípravy a skladovania nedochádza k ich využitiu, tento anaeróbny proces nastáva až v brušných útrobach (Sangwan et al., 2011).

Nápoje

Ovocné džúsy a sladené nápoje sú ďalšou kapitolou uplatnenia GOS, ktoré sa môžu bez obáv použiť s ostatnými zložkami nápojov. Vďaka ich sladivosti sa pridávajú ako sirupová zložka. Atribútom ich použitia do nápojov je najmä ich dobrá rozpustnosť, stálosť a odolnosť voči kyslejšiemu pH (ktoré môžu zanechať použité antioxidantné zložky - kyselina askorbová či citrónová), pričom krásne odolávajú i vyšším teplotám a dlhým dobám skladovania a nijako nenarúšajú homogenitu a vlastnosti nápojov (Sangwan et al., 2011).

Pekárenské výrobky

Vývoj pekárenských a cukrárenských diel, u ktorých spotrebiteľ dnešných dní vyžaduje zvýšený podiel vlákniny sú GOS opäť ako stvorené na obohacovanie týchto výrobkov. Ich prednosť: znížená sladivosť a nízky obsah kalórií so schopnosťou udržať vysokú vláknosť a vlhkosť pekárenských výrobkov ich predurčuje na aplikáciu v tejto oblasti (Sangwan et al., 2011).

Krmivová zložka pre domáce a hospodárske zvieratá

Aplikácia prebiotík a probiotík do krmív pre zvieratá sa datuje od 70-tych rokov minulého storočia (najmä v USA). Má preventívne účinky a hospodár týmto spôsobom môže ovplyvňovať „welfare“ zvierat a nárast hmotnosti, pretože rozmachom črevnej mikroflóry sa

zvyšuje resorbcia minerálnych látok a vitamínov a tým sa následne zlepšuje aj vzhľad srsti a stav kože. Môže predchádzať vzniku chorôb a znižovať nutnosť použitia antibiotík, stimuluje sa imunitný systém, potláčajú sa zápalové procesy a tvorba plynov v tráviacom trakte a s ním spojený čelustný (ústny) i fekálny zápach, u dojníc sa môže prechodne zvýšiť produkcia mlieka a u sliepok znáška vajčiek.

V oblasti probiotík, je zaujímavé, ako sa zvieratá dostávajú k potrebným baktériám a imunizujú sa. Napr. mladé kurčatá krátko po vyliahnutí príjmu dávku stolice od dospelaj zdravej sliepky. Mladá viac náchylné na kolonizáciu baktériami rodu *Salmonella* sa po podaní takejto „fekálnej“ dávky od zdravého dospelého jedinca stanú rezistentné na tieto patogény. Tento spôsob bol otestovaný aj na poštových holuboch, pričom fekálie zo zdravých jedincov, ktorým boli podávané probiotiká boli použité ako terapeutický medikament pre choré holuby (Pigeonmania, 2012). Tento spôsob „imunizácie“ zvierat a prípravy špecifických „fekálnych“ liekov je patentovaný a vedený na patentovom úrade (Patentgenius, 2012).

V súčasnosti na trhu existujú komerčné preparáty probiotík obsahujúce *Bacillus sp.*, kvasinky (*Saccharomyces cerevisiae*, *S. boulardii*), vláknité huby (*Aspergillus oryzae*). Tieto preparáty sú prefabrikované vo forme tabliet, kapsúl, práškov, pást či sprejov a stačí sa na základe ceny či druhu zveriať iba rozhodnúť pre určitú variantu.

ZÁVER

S ohľadom na výsledky rozsiahlych vedeckých a medicínskych pozorovaní je evidentné, že zdravotné benefity prinášajú tak probiotiká ako aj prebiotiká. Dobrá vitalita a viabilita probiotík výrazne napomáha nášmu organizmu. Ukazuje sa výhodné použitie kombinácie probiotík s vhodnými prebiotikami a týmto spôsobom adresnejšie vplývať na jednotlivé fyziologické pochody v tele a zmierňovať patologické stavy.

LITERATÚRA

Bosscher, D., Van Loo, J., Franck A. 2006. Inulin and oligofructose as functional ingredients to improve bone mineralization. *Int. Dairy J.*, vol. 16, p. 1092-1097. <http://dx.doi.org/10.1016/j.idairyj.2005.10.028>

Clementel A. 2012. Probiotics and Prebiotics: An Update from the World Gastrointestinal Organization (WGO). *Eur. J. Food Res. Rev.*, vol. 2, no. 1, p. 24-28.

Dreamfieldsfoods, 2012. Diet information [online] s.a. [cit.20.04.2012] Retrieved from the web: <http://www.dreamfieldsfoods.com/diet-information.html#term0002>.

FDA, 2012. Guidelines for the evaluation of probiotics in food [online] s.a. [cit.29.06.2012] Retrieved from the web:

http://www.fda.gov/ohrms/dockets/dockets/95s0316/95s-0316-rpt0282-Tab-03-Ref-19-Joint-FAOWHO-vol219.pdf?utm_campaign=Google2&utm_source=fdaSearch&utm_medium=website&utm_term=probiotic&utm_content=8.

FreeLibrary, 2011. Townsed Leeter (January 1, 2011): Symposium highlights immune function: probiotics, prebiotics, and enzymes. Retrieved from the web: <http://www.thefreelibrary.com/Symposium+highlights+Immune+Function%3A+probiotics,+prebiotics,+and...-a0246017454>.

Galbavý, Š., Bobek, P., Szifrusz, A. 2008. Pleuran, prebiotiká a ovplyvnenie civilizačných chorôb. Experimentálne štúdie. KT Komárno, 151 p. ISBN 8080566210.

Gibson, G. R., Rastal, R. A. 2006. Prebiotics: Development & Application. John Wiley & Sons Ltd, England. <http://dx.doi.org/10.1002/9780470023150>

Gibson, G. R., McCartney, A. L., Rastall, R. A. 2005. Prebiotics and resistance to gastrointestinal infections. *Br. J. Nutr.*, vol. 93, p. 31-34.

<http://dx.doi.org/10.1079/BJN20041343>

Herich, R., Levlit, M. 2002. Lactic acid bacteria, probiotics and immune system. *Vet. Med. – Czech*, vol. 47, p.169–180.

Livestrong, 2012. Probiotics for diabetics [online] s.a. [cit.21.06.2012] Retrieved from the web: <http://www.livestrong.com/article/492618-probiotics-for-diabetics/>.

Ma, E. L., Choi, Y. J., Choi, J., Pothoulakis, C., Rhee, S. H., Im, E. 2010. The anticancer effect of probiotic *Bacillus polyfermenticus* on human colon cancer cells is mediated through ErbB2 and ErbB3 inhibition. *Int. J. Cancer* vol. 127, no. 4, p. 780-790. <http://dx.doi.org/10.1002/ijc.25011> PMID:19876926

Mannucci, F. 2009. Enzymatic synthesis of galactooligosaccharides from whey permeate. Dublin Institute of Technology.

Nutriciamedical, 2012. Prebiotická vláknina [online] s.a. [cit.08.04.2012] Retrieved from the web: http://www.nutriciamedical.cz.prebioticka_vlaknina.

Ooi, L.-G., Loing, M.-T. 2010. Cholesterol-lowering effects of probiotics and prebiotics: A review of in vivo and in vitro findings. *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 11, p. 2499-2522. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms11062499> PMID:20640165

Park, A. R., Oh, D.K. 2010. Galacto-oligosaccharide production using microbial β -galactosidase: current state and perspectives. *App. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 85, p. 1279-1286. <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-009-2356-2> PMID:19943044

Patentgenius, 2012 Patent 5604127 [online] s.a. [cit.02.07.2012] Retrieved from the web: <http://www.patentgenius.com/patent/5604127.html>.

Pigeonmania, 2012. Probiotics for racing pigeons [online] s.a. [cit.02.07.2012] Available at: Retrieved from the web: <http://www.pigeonmania.com/probiotics-for-racing-pigeons/>.

Perdigón, G., Fuller, R., Raya, R. 2001. Lactic acid bacteria and their effect on the immune system. *Curr. Issues Intest. Microbiol.*, vol. 2, p. 27-42. PMID:11709854

Sagwan, V., Tomar, S. K., Singh, R. B., Singh, A. K., Babar, A. 2011. Galactooligosaccharides: Novel Components of Designer Foods. *J. Food Sci.* vol 76, no. 4, p. 103-111. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1750-3841.2011.02131.x> PMID:22417365

Saini, R., Saini, S., Sharma, S. 2010. Potential of probiotics in controlling cardiovascular diseases. *J. Cardiovasc. Dis. Res.*, vol. 1, p. 213-214. <http://dx.doi.org/10.4103/0975-3583.74267> PMID:21264188

Steer, T., Carpenter, H., Tuohy, K., Gibson, G. R. 2000. Perspectives on the role of the human gut microbiota and its modulation by pro- and prebiotics. *Nutr. Res. Rev.* vol. 13, p. 229-254. <http://dx.doi.org/10.1079/095442200108729089> PMID:19087441

Toma, M. M., Pokrotniek, S. J. 2006. Probiotics as functional food: Microbiological and medical aspects. *Acta Universitatis Latviensis*, vol. 710, p. 117-129.

Tores, D. P. M., Conclaves, M. P. F., Teixeira, J. A., Rodrigues, L. R. 2010. Galacto-oligosaccharides: production,

properties, applications and significance as prebiotics. *Compr. Rev. Food Sci. F.*, vol. 9, p. 438-454. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1541-4337.2010.00119.x>

Wallace, T. C., Guarner, F., Madsen, K., Cabana, M. D., Gibson, G., Hentges, E., Ssanders, M. E. 2011. Human gut microbiota and its relationship to health and disease. *Nutr. Rev.*, vol. 69, p. 392-403. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1753-4887.2011.00402.x> PMID:21729093

Wang, Z., Klipfell, E., Bennett, B. J., Koeth, R., Levison, B. S., GuGar, B., Feldstein, A. E., Britt, E. B., Fu, X., Chung, Y.-M., Wu, Y., Schauer, P., Smith, J. D., Allayee, H., Wilson, Tang, W. H., DiDonato, J. A., Lusis, A. J., Hanzen, S. L. 2011. Gut flora metabolism of phosphatidylcholine promotes cardiovascular disease. *Nature*, vol. 472, p. 7341-7357. <http://dx.doi.org/10.1038/nature09922> PMID:21475195

Podporujeme výskumné aktivity na Slovensku/
Projekt je spolufinancovaný zo zdrojov EÚ



Acknowledgments:

This study was supported by the Agency of the Ministry of Education, Science, Research and Sport of the Slovak Republic for the Structural Funds of EU. Grant number: ITMS 26240220057.

Contact address:

Ing. Monika Vidová, PhD., Institute of Biotechnology and Food Science, Faculty of Chemical and Food Technology, Slovak University of Technology, Radlinského 9, 812 37 Bratislava Slovakia, Email: monika.vidova@stuba.sk

Ing. Helena Hronská, PhD., Institute of Biotechnology and Food Science, Faculty of Chemical and Food Technology, Slovak University of Technology, Radlinského 9, 812 37 Bratislava Slovakia, Email: helena.hronska@stuba.sk

Ing. Silvia Tokošová, Institute of Biotechnology and Food Science, Faculty of Chemical and Food Technology, Slovak University of Technology, Radlinského 9, 812 37 Bratislava Slovakia, Email: silvia.tokosova@stuba.sk

prof. Ing. Michal Rosenberg, PhD., Institute of Biotechnology and Food Science, Faculty of Chemical and Food Technology, Slovak University of Technology, Radlinského 9, 812 37 Bratislava Slovakia, Email: michal.rosenberg@stuba.sk

MORPHOLOGICAL, BIOCHEMICAL AND SENSORY CHARACTERISTICS OF BLACK MULBERRY FRUITS (*Morus nigra* L.)

Ján Brindza, Lucia Kucelová, Andrej Sinica, Beáta Stehlíková, Marcela Čuláková

ABSTRACT

This work aimed at the morphological, biochemical, technological and sensorial determination of black mulberry (*Morus nigra* L. – MN) fruitage and their utilization in the food production branches. For the experimental purposes were selected 50 genotypes of this population grown in the Pukanec surroundings. The medium fruitage weight determined in the selected collection ranged from 7.26 g (MN-1) to 1.42 g (MN-14), fruitage length in a range of 13.51 mm (MN-14) to 29.20 mm (MN-12) and the medium fruitage width 11.88 mm (MN-14) – 21.12 mm (MN-2). The variability of the evaluated traits varried from low to high degree. Juice yield from matured fruitage achieved 62.40 %. From black mulberry fruitages 16 food products were prepared – juice mixed with cream, yoghurt and/or curd (in several proportions) and 3 confectionery products. Sensorial analyses showed significant differences among tested products. In the group of confectionery products was generally preferred the cream-mulberry cake. High values of antioxidative activity has been measured in the chocolate cake with a mulberry jam (36.90 – 28.43 %), followed by the cream-mulberry cake (29.78 – 12.71 %) and the fresh mulberry juice (30.97 – 20.17 %). The antioxidation activities exerted generally higher values with the samples tested in water, when compared with those prepared in ethanol extract. Based on the gained results 4 genotypes were selected and recommended for the use in practice, as these provided relative high values of tested traits.

Keywords: *Morus nigra* L.; fruits, morphological traits; antioxidation activity; food products; sensorial analysis

ÚVOD

Moruša čierna (*Morus nigra* L.) patrí do čeľade *Moraceae* a rodu *Morus* (Hojjatpanah et al., 2011). Prirodzene rastie v oblasti Stredomoria na Strednom východe (Ercisli et al., 2010). V minulosti ako ešte aj v súčasnosti sa rôzne druhy moruše využívali na produkciu listov pre hodvábnictvo najmä vo Východnej, Strednej a Južnej Ázii (Kafkas et al., 2008). Stromy moruše dorastajú do výšky 8 – 12 metrov. Vytvárajú veľmi husté, guľovité koruny o priemere 10 i viac metrov (Benčať, 1999). Samčie a samičie súkvetia kvitnú od mája do júna. Moruša čierna vytvára súplodie kôstkovité dlhé až 40 mm a hrubé 25 mm. Koyuncu et al. (2004) zistili priemernú hmotnosť súplodia v rozsahu 3,74 – 5,67 g, šírku plodov 15,73 – 17,42 mm a dĺžku plodov 21,66 – 27,04 mm. Súplodia dozrievajú v podmienkach Slovenska od augusta do septembra. Čerstvé zrelé súplodia sa vyznačujú sviežou vôňou. Sú sladko kyslé a unikátnej – pikantnej chuti (Abdalla, 2006). Vyznačujú sa relatívne vysokou výživovou hodnotou (Ercisli et al., 2010). Imran et al. (2010) stanovili v čerstvom súplodí obsah proteínov $0,96 \pm 0,16 \text{ g} \cdot 100\text{g}^{-1}$ sušiny, celkový obsah sacharidov $13,83 \pm 1,20 \text{ g} \cdot 100\text{g}^{-1}$ sušiny, obsah lipidov $0,55 \pm 0,06 \text{ g} \cdot 100\text{g}^{-1}$ a obsah vlákniny $11,75 \pm 1,21 \text{ g} \cdot 100\text{g}^{-1}$ sušiny. Kalorická hodnota po prepočítaní na sušinu predstavuje $64,11 \pm 2,45 \text{ kcal} \cdot 100\text{g}^{-1}$. Hussain (1985) stanovil v súplodí $0,04 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$ tiamínu, $0,08 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$ riboflavínu a $30 \text{ g} \cdot 100\text{g}^{-1}$ vitamínu C. Holéciová et al. (2006) stanovila v čerstvých súplodiach moruše čiernej obsah vitamínu C v rozsahu 2,26 – 18,9 $\text{mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$, sacharidov od 4,3 – 19,7 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, organických kyselín od 0,79 – 1,73 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, farbív 2,1 – 6,3 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ a pH 3,2 – 4,02.

Imran et al. (2010) stanovili v súplodí *morus nigra* 7 minerálnych látok. Priemerne množstvo draslíka predstavovalo $1270 \pm 9,36 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$, vápnika $470 \pm 6,95 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$, sodíka $272 \pm 5,32 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$, horčíka $240 \pm 3,51$

$\text{mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$, železa $77,6 \pm 1,98 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$, zinku $59,20 \pm 2,25 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$ a niklu $1,60 \pm 0,11 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$. Z vitamínov boli stanovené riboflavín, niacín a vitamín C. Priemerný obsah riboflavínu predstavoval $0,040 \pm 0,000 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$ čerstvej hmotnosti, niacínu $1,60 \pm 0,10 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$ čerstvej hmotnosti a vitamínu C $15,37 \pm 0,89 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$ čerstvej hmotnosti. Celkový obsah fenolov predstavoval $880 \pm 7,20 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$ čerstvej hmotnosti a obsah alkaloidov $630 \pm 5,93 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$ čerstvej hmotnosti.

Súplodie je zdrojom fenolických látok, vrátane flavonoidov, antokyánov a karotenoidov, z vitamínov sú to predovšetkým riboflavín, niacín, vitamín C. Obsahujú esenciálne mastné kyseliny (Ercisli, Orhan, 2007), z ktorých najväčšie zastúpenie majú kyselina linolová, palmitová a olejová. Z minerálnych látok sú to predovšetkým dusík, fosfor, draslík, vápnik, horčík, sodík, železo, meď, mangán a zinok (Ercisli, Orhan, 2006).

V potravinárskom priemysle sa využíva najmä súplodie, ale aj listy. Slúžia na výrobu džemov, štiav, sirupov, vína, na zaváranie a tiež sa vypaľuje (Kresánek, Krejča, 1977).

Moruše majú dlhú históriu liečebného použitia v čínskej medicíne, pričom sa využívajú všetky časti rastliny (Bown, 2003). Výťažky z rastliny majú antibakteriálne a fungicídne vlastnosti (Duke, Ayensu, 1985). Moruša čierna sa využívala v ľudovej medicíne v Turecku na liečbu horúčky, ochranu pečene pred poškodením, posilnenie kĺbov, uľahčovanie vyprázdňovania moču a znižovanie krvného tlaku (Ercisli et al., 2010).

Súplodiu sa pripisujú veľmi dobré tráviace, narkotické a antitoxické vlastnosti (Kresánek, Krejča, 1977). V tradičnej medicíne sa používa na rôzne liečebné účely, napr. na liečenie astmy, bronchitídy, kašľa, prechladnutia, zápchy, epilepsie, bolesti hlavy, hyperglykémie, hypertenzii, závratov, nervového napätia a na hojenie rán (Mucimapura et al., 2010). Ďalej sa používa na liečbu

dny, znižuje obsah kyseliny močovej. Bobule majú aktívny cholesterolu a triglyceridov. Vďaka obsahu proanthokyanínov a antokyánov sa moruša využíva na liečbu rakoviny a zlepšovanie stavu po ischemickej mŕtvici (**Abdalla, 2006**). Ovocie má tonický vplyv na obličkovú energiu (**Duke, Ayensu, 1985; Bown, 2003**). Používa sa pri liečbe inkontinencie, tinitusu, predčasnóm šedivení vlasov a zápche u starších ľudí (**Bown, 2003**). Ďalej sa používa na odčervenie, ako liek na úplavicu, proti bolesti zubov, ako prehľadadlo a dávidlo. Fenoly majú široké spektrum biochemických aktivít, pôsobia ako antioxidanty, antimutagénne a antikarcinogénne látky, majú tiež schopnosť meniť génové expzie (**Ercisli, Orhan, 2007**).

Listy obsahujú veľa uhličitanu vápenatého, adenínu, glukózy, minerálnych solí a trieslovín. Majú

vplyv na znižovanie sérovej hladiny antibakteriálne účinky. Používajú sa pri prechladnutí na tlmenie horúčky, podporujú potenie a uľahčujú vykašliavanie. Ďalej pri bolestiach hlavy a hrdla a na stimuláciu tvorby inzulínu vo forme odvaru a výluhu (**Benčať, 1999**), pri uštipnutí hadom a ako protilátka pri otrave prilbicou modrou (*Aconitum napellus*) (**Odyová, 1993**). Časté využitie listov je v homeopatii – vo forme roztieravého prípravku, ktorý sa ordinuje ako alopatický prípravok (**Krejča, Korbel, 1977**).

Výhonky majú antireumatický účinok, používajú sa ako analgetikum a na zníženie krvného tlaku (**Odyová, 1993**).

Kôra sa používa pri bolestiach zubov, v ľudovej medicíne sa odvar z kôry používa proti hlístam (**Odyová, 1993**).

MATERIÁL A METODIKA

Objektom experimentálneho štúdia sa stala moruša čierna (*Morus nigra* L.). Pre štúdium problematiky sme využili 50 genotypov – stromov vybraných v rámci prieskumu v obci Pukanec. V experimentoch ich označujeme podľa začiatkových písmen latinského názvu druhu ako MN 1-50 (*Morus nigra* L.). Obec Pukanec je lokalizovaná na úpätí juhovýchodných svahov Štiavnických vrchov, v severnej časti Bátovskej kotliny, v strednej nadmorskej výške. Poloha a juhovýchodná orientácia svahov okolitých vrchov spôsobuje, že Pukanec má podnebie teplé, miene vlhké, s miernou zimou. Charakterizujú ho 50 letných dní (nad 25 °C) a priemerná ročná teplota okolo 9 °C. Pod -20 °C klesne teplota približne raz za tridsať rokov. Letné maximum sa často približia hodnotám 34 – 35 °C (**Bahna, 2010**).

Pre určenie hospodárskej hodnoty vybraných genotypov sme z každého z nich odobrali náhodne 0,5 kg súplodí v plnej zrelosti. Pre morfometrickú analýzu súplodí sme použili 30 náhodne vybraných súplodí z každého genotypu. Na súplodiach sme hodnotili individuálnu hmotnosť (g), dĺžku a šírku súplodí (mm).

Ostatné experimentálne práce sme z technických, organizačných a finančných dôvodov realizovali z reprezentatívnej vzorky vytvorenej zmiešaním súplodí zo všetkých genotypov.

Separáciu šťavy od semien sme zabezpečili nerezovým odšťavovačom Culter JE 8011. Odšťavovač pracuje na princípe odstredivej sily s redukovateľnými otáčkami od 6000 – 1600 otáčok za minútu. Morušové plody sme odšťavovali pri 6000 otáčkach za minútu.

Pre experimentálne účely sme pripravili 16 potravinových výrobkov s použitím celých čerstvých alebo konzervovaných súplodí v nasledovných variantoch:

a) Varianty s tvarohom tučným hrúdkovitý (**TV**) a morušovou šťavou (**MŠ**)

TV75MŠ25 – tvaroh zmiešaný so šťavou moruše čiernej v pomere 75 : 25

TV50MŠ50 – tvaroh zmiešaný so šťavou moruše čiernej v pomere 50 : 50

TV25MŠ75 – tvaroh zmiešaný so šťavou moruše čiernej v pomere 25 : 75

b) Varianty so sladkou smotanou (**SS**) a morušovou šťavou (**MŠ**)

SS75MŠ25 – smotana zmiešaná so šťavou moruše čiernej v pomere 75 : 25

SS50MŠ50 – smotana zmiešaná so šťavou moruše čiernej v pomere 50 : 50

SS25MŠ75 – smotana zmiešaná so šťavou moruše čiernej v pomere 25 : 75

c) Varianty s jogurtom bielym (**JB**) a morušovou šťavou (**MŠ**)

JB75MŠ25 – jogurt zmiešaný so šťavou moruše čiernej v pomere 75 : 25

JB50MŠ50 – jogurt zmiešaný so šťavou moruše čiernej v pomere 50 : 50

JB25MŠ75 – jogurt zmiešaný so šťavou moruše čiernej v pomere 25 : 75

d) Varianty s jogurtom bielym (**JB**) a súplodím moruše čiernej (**MP**)

JB75MP25 – jogurt zmiešaný so súplodím moruše čiernej v pomere 75 : 25

JB50MP50 – jogurt zmiešaný so súplodím moruše čiernej v pomere 50 : 50

JB25MP75 – jogurt zmiešaný so súplodím moruše čiernej v pomere 25 : 75

e) Cukrárenské výrobky so súplodím moruše čiernej

A – Koláč s kúskami konzervovanej moruše čiernej – podľa tradičných receptov

B – Tvarohový závin so súplodím moruše čiernej

C – Čokoládový koláč s lekvárom moruše čiernej

D – Smotanovo morušový koláč

Senzorického hodnotenia plodov moruší na mliečnych médiách sa zúčastnilo 10 zaškolených a skúsených hodnotiteľov. Venovali sme sa dôkladnému výberu a otestovaniu panela podľa **Maľa et al. (2009)**, **Vietoris et al. (2008)** a **Václavová et al. (2009)**. Hodnotenie vzoriek sa vykonalo v senzorickom laboratóriu Inštitútu biodiverzity a biologickej bezpečnosti pri Slovenskej poľnohospodárskej v Nitre. Pred samotným hodnotením sa vykonal screening schopnosti hodnotiteľov a vzorky boli podávané náhodne pomocou latinských štvorcov. Pre analýzu sa použil modifikovaný bodový test s kombinovanými hedonicko-intenzitnými škálami. Hodnotili sa nasledovné deskriptory: vizuálna preferencia farby, intenzita pachu, preferencia pachu, sladká chuť, horká chuť, kyslá chuť, trpká chuť, interakcia s médiom, dominancia chuti moruše a celkový pocit pri prehĺtaní. Výsledky sa spracovali pomocou analýzy hlavných komponentov (PCA) a sú prezentované graficky. Charakter škál nedovoľoval využiť pri podrobnej analýze jednotlivých deskriptorov parametrické štatistické metódy

a preto skúmanie jednotlivých senzoricých znakov podliehalo štatistickému post procesu pomocou Friedmanovho testu.

V čerstvých súplodiach a hore uvedených pripravených potravinových výrobkoch sme stanovili aj antiradikálovú aktivitu na základe eliminácie radikálu DPPH, ktorá sa prejavuje znížením absorpcie pri 515 nm podľa metodiky **Sanchesa et al. 1998**.

Účinnosť extraktov ako lapačov radikálov sme vypočítali podľa matematického vzťahu:

$$\text{inhibícia DPPH} = (\text{AC} - \text{AAt}) = \text{AC} / 100 (\%)$$

kde inhibícia DPPH_ radikálov je vyjadrená v percentách;

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Na odobratých súplodiach z 50 genotypov sme hodnotili hmotnosť, výšku a šírku súplodí (Tabuľka 1). Experimentálne údaje dokumentujú pomerne výrazné rozdiely medzi genotypmi v daných znakov. Priemernú hmotnosť súplodí sme určili v rozsahu od 7,26 g (MN-1) do 1,42 g (MN-14). Hodnoty variačných koeficientov poukazujú na stredný (10, 55 – MN-17) až veľmi vysoký stupeň (36,22 – MN-8) variability hodnoteného znaku. Tento ukazovateľ nie je celkom hodnoverný, pretože sme v experimentoch hodnotili len 10 náhodne vybraných súplodí z celého stromu. Variabilita veľkosti súplodí je značne závislá od genotypov ale aj od podmienok dozrievania. **Ivanička (1991)** uvádza priemernú hmotnosť na súplodiach v rozsahu 4 – 6 g. **Holeciová (2004)** uvádza vo svojom štúdiu 20 genotypov priemernú hmotnosť súplodí 2,96 g. **Holeciová et al. (2006)** určili na súplodiach hmotnosť od 0,50 g do 4,23 g.

Priemernú dĺžku súplodí sme určili v rozsahu od 13,51 mm (MN-14) do 29,20 mm (MN-12). Hodnoty variačných koeficientov sme určili v rozsahu od nízkeho stupňa 5,76 % (MN-17) do vysokého stupňa variability 25,67 % (MN-45). Tento ukazovateľ nie je celkom hodnoverný, pretože sme v experimentoch hodnotili len 10 náhodne vybraných súplodí z celého stromu. **Benčať (2004)** určil vo svojich

AC – absorpcia roztoku DPPH; AAt – absorpcia na prítomnosti antioxidantu 33.

Pre každý hodnotený znak sme prezentovali základnú opisnú charakteristiku. Stupeň variability každého znaku sme charakterizovali variačným koeficientom. Výpočet najmenších preukazných rozdielov (LSD podľa Tukey-a) pre testovanie preukaznosti rozdielov medzi genotypmi sme zabezpečili analýzou rozptylu pomocou voľne dostupného softwaru (**Armitage, 1971**). Uvedený softwar sme využili aj na výpočet Pearsonových korelačných koeficientov (<http://department.obg.cuhk.edu.hk/ResearchSupport/OWAV.asp>).

experimentoch dĺžku súplodí pri 3 genotypoch v rozpätí od 14 mm do 35 mm pri priemernej dĺžke 24,20 mm. **Holeciová (2004)** určila pri štúdiu 20 testovaných genotypov moruše čiernej priemernú dĺžku na súplodiach 22,70 mm. **Holeciová et al. (2006)** určili na súplodiach dĺžku od 10,74 mm do 27,22 mm.

Priemernú šírku súplodí sme určili v rozsahu od 11,88 mm (MN-14) do 21,12 mm (MN-2). Hodnoty variačných koeficientov sme určili v rozsahu od nízkeho stupňa 3,59 % (MN-27) do vysokého stupňa variability 24,39 % (MN-8). Čo poukazuje na vysoký stupeň variability v danom znaku. Tento ukazovateľ nie je celkom hodnoverný, pretože sme v experimentoch hodnotili len 10 náhodne vybraných súplodí z celého stromu. **Benčať (2004)** určil vo svojich experimentoch šírku súplodí pri 3 genotypoch v rozpätí od 13 mm do 22 mm pri priemernej šírke 16 mm. **Holeciová (2004)** určila pri štúdiu 20 testovaných genotypov moruše čiernej priemernú šírku na súplodiach 14,47 mm. **Holeciová et al. (2006)** určili na súplodiach šírku od 9,16 mm do 16,30 mm. Zo vzájomného porovnávania vyplýva vysoký stupeň zhody nami zistenými a autormi uvádzanými údajmi, aj napriek tomu, že každý autor študoval danú problematiku na inom súbore genotypov.

Tabuľka 1 Variabilita vybraných znakov na súplodiach hodnotených genotypov moruše čiernej (*Morus nigra* L.)

Genotypy s minimálnymi hodnotami (g)						Genotypy s maximálnymi hodnoty (g)					
Genotyp	n	min	max	x	V%	Genotyp	n	min	max	x	V%
Hmotnosť súplodí (mg)											
MN-14	10	0,95	2,35	1,42	29,23	MN-1	10	4,17	10,69	7,26	34,22
MN-31	10	2,09	3,93	3,11	17,78	MN-2	10	4,48	9,12	6,91	22,69
MN-6	10	2,44	4,58	3,37	25,57	MN-26	10	2,79	8,17	6,50	25,24
MN-17	10	2,98	3,99	3,37	10,55	MN-10	10	5,13	7,98	6,45	14,31
MN-44	10	2,05	4,52	3,41	22,49	MN-12	10	4,28	7,41	6,37	17,66
Výška súplodí (mm)											
MN-14	10	11,00	16,29	13,51	12,11	MN-12	10	23,63	33,51	29,20	13,22
MN-31	10	15,68	22,73	19,30	10,14	MN-1	10	20,84	38,66	29,00	20,84
MN-17	10	18,27	21,48	20,19	5,76	MN-36	10	22,13	33,91	28,82	10,48
MN-28	10	14,05	27,30	20,29	22,08	MN-7	10	18,74	36,73	28,44	21,36
MN-45	10	13,45	29,05	20,72	25,67	MN-26	10	17,25	32,96	27,94	15,12
Šírka súplodí (mm)											
MN-14	10	9,55	13,71	11,88	11,05	MN-2	10	17,14	30,15	21,12	19,36
MN-31	10	12,83	17,10	14,74	10,01	MN-1	10	15,19	22,03	19,32	10,94
MN-28	10	10,38	19,26	14,94	19,69	MN-36	10	17,64	20,24	18,78	4,23
MN-23	10	13,21	19,05	15,12	11,92	MN-7	10	16,47	21,41	18,76	9,02
MN-21	10	13,24	17,88	15,21	9,67	MN-32	10	16,67	21,01	18,66	7,53

Vysvetlivky: n – počet meraní, min – minimálna nameraná hodnota, max – maximálna nameraná hodnota, x – aritmetický priemer, v% – variačný koeficient

potravinárstvo

Tabuľka 2 Analýza rozptylu znakov súplodí hodnotených genotypov moruše čiernej (*Morus nigra* L.)

Faktory	f	S	MS	F	Preukaznosť	Preukazný rozdiel*
Hmotnosť súplodí (mg)						
Medzi súbormi	9	123,92	13,77	7,35	0,000	0,05
V rámci súborov	90	168,50	1,87			0,01
Total	99	292,42				
Výška súplodí (mm)						
Medzi súbormi	9	645,43	71,71	4,55	0,0001	0,05
V rámci súborov	90	1 418,74	15,76			0,01
Total	99	2 064,17				
Šírka súplodí (mm)						
Medzi súbormi	9	145,39	16,15	7,95	0,000	0,05
V rámci súborov	90	182,79	2,03			0,01
Total	99	328,18				

Vysvetlivky: f - počet stupňov voľnosti; S - súčet štvorcov; MS - priemerný štvorec; F - hodnota testu Fischera; P - štatistická preukaznosť hodnoty Fischera; LSD - najmenšie preukazné rozdiely pre rôzne stupne pravdepodobnosti - preukazný rozdiel

Výsledky zo štúdia lineárnej závislosti medzi hodnotenými znakmi sú uvedené v tabuľke 3. Z prezentovaných údajov vyplýva, že medzi hmotnosťou a dĺžkou súplodí sme zistili veľmi silnú pozitívnu mieru závislosti, čo dokumentuje hodnota korelačného koeficienta $r = 0,88$. Medzi hmotnosťou a šírkou súplodí sme zistili veľmi silnú pozitívnu mieru závislosti, čo

dokumentuje hodnota korelačného koeficienta $r = 0,81$. Medzi dĺžkou a šírkou súplodí sme zistili taktiež veľmi silnú pozitívnu mieru závislosti, čo dokumentuje hodnota korelačného koeficienta $r = 0,84$. Výsledky zo štatistickej analýzy súčasne dokazujú, že prezentované výsledky sú štatisticky signifikantné (Tabuľka 3).

Tabuľka 3 Korelačne koeficienty lineárnej korelačnej analýzy medzi hmotnosťou, dĺžkou a šírkou na súplodiach moruše čiernej (*Morus nigra* L.)

r	s_r	Konfidenčný interval $r_{95\%}$	r^2	t	Hodnovernosť
Hmotnosť súplodí (g) – dĺžka súplodí (mm)					
0,888	1,369	0,810 <= r <= 0,935	0,7890	13,3971	0,0000
Hmotnosť súplodí (g) – šírka súplodí (mm)					
0,817	0,844	0,697 <= r <= 0,892	0,6681	9,8288	0,0000
Dĺžka súplodí (mm) – šírka súplodí (mm)					
0,842	0,789	0,7373 <= r <= 0,9081	0,7102	10,8447	0,0000

Vysvetlivky: r - korelačný koeficient lineárnej závislosti; s_r - stredná chyba korelačného koeficienta; r^2 - koeficient; konfidenčný interval pre korelačný koeficient pri 95% nej pravdepodobnosti; t - hodnota testu podľa Studenta

Biochemická charakteristika

Antioxidačnú aktivitu sme stanovili v čerstvej ako aj pasterizovanej šťave pri 60 °C zo súplodí a to vo vodnom ako aj etanolovom extrakte (Tabuľka 4). Z prezentovaných výsledkov jednoznačne vyplýva, že vo vodnom extrakte sme v oboch variantoch stanovili štatisticky preukazne vyššiu antioxidačnú aktivitu ako v etanolovom extrakte, čo dokumentujú aj výsledky z tabuľky 5. Prezentované výsledky súčasne dokumentujú, že pasterizáciou prírodnej

šťavy dochádza k štatisticky preukaznému zníženiu antioxidačnej aktivity a to ako vo vodnom tak aj v etanolovom extrakte. Vo všetkých hodnoteniach sme určili pomerne nízky stupeň variability daného znaku v hodnotených vzorkách, čo dokumentujú hodnoty variačných koeficientov (Tabuľka 4) ako aj výsledky z analýzy rozptylu uvedené v tabuľke 5.

Tabuľka 4 Antioxidačná aktivita šťavy zo súplodí moruše čiernej (*Morus nigra* L.) stanovenej podľa metódy DPPH

Hodnotený extrakt z potravinových výrobkov	n	min	max	x	s_x	v%
Morušová šťava čerstvá-vodný extrakt	5	29,63	32,12	30,97	1,11	3,58
Morušová šťava čerstvá-etanolový extrakt	5	17,38	22,67	20,17	2,18	10,79
Morušová šťava varená pri 60°C-vodný extrakt	5	25,68	28,90	27,01	1,22	4,52
Morušová šťava varená pri 60°C-etanolový extrakt	5	13,14	15,41	14,20	1,02	7,20

Vysvetlivky: n - počet meraní, min - minimálna nameraná hodnota, max - maximálna nameraná hodnota, x - aritmetický priemer, s_x - stredná chyba priemeru, v% - variačný koeficient

potravinárstvo

Tabuľka 5 Analýza rozptylu antioxidačnej aktivity šťavy zo súplodí moruše čiernej (*Morus nigra* L.) stanovenej podľa metódy DPPH

Faktory	f	S	MS	F	Preukaznosť	Preukazný rozdiel*
Antioxidačná aktivita – Účinok vplyvu 0,9604						
Medzi súbormi	3	825,09	275,03	129,22	0,000	0,05
V rámci súborov	16	34,05	2,12			0,01
Celkom	19	859,14				

Vysvetlivky: f - počet stupňov voľnosti; S – súčet štvorcov; MS - priemerný štvorec; F – hodnota testu Fischera; P – štatistická preukaznosť hodnoty Fischera; LSD – najmenšie preukazné rozdiely pre rôzne stupne pravdepodobnosti – preukazný rozdiel

V tabuľke 6 uvádzame stanovené hodnoty antioxidačnej aktivity potravinových výrobkov zo súplodí moruše čiernej (*Morus nigra*). Vo všeobecnosti sme určili vyššie hodnoty antioxidačnej aktivity pri koláči s morušovým lekvárom (AA 28,43 – 36,90 %). Výsledky jednoznačne dokumentujú, že vo vodnom extrakte sme určili štatisticky preukazne vyššie hodnoty antioxidačnej aktivity ako v etanolových extraktoch. Uvedenú situáciu možno vysvetliť koncentráciou komponentov podmieňujúcich antioxidačnú aktivitu varením lekváru a odparovaním

vody. Antioxidačná aktivita pri koláči so smotanou (Tabuľka 6 a 7) sa pohybovala v rozsahu 12,71 – 29,78 %. V tomto prípade sme určili najväčší rozdiel medzi antioxidačnou aktivitou stanovenou vo vodnom a etanolovom extrakte a t.j. vyše 16 %. Najnižšie hodnoty antioxidačnej aktivity (9,88 – 11,36 %) sme určili v koláči zo súplodí zavárannej moruše čiernej s použitím súplodí konzervovaných vo forme kompótov (Tabuľka 6 a 7). Medzi vodným a etanolovým extraktom sme neurčili štatisticky preukazný rozdiel (Tabuľka 7).

Tabuľka 6 Antioxidačná aktivita hodnotených potravinových výrobkov zo súplodí moruše čiernej (*Morus nigra* L.) stanovenej podľa metódy DPPH

Extrakt z potravinových produktov	n	min	max	x	V%
A-Vodný extrakt z koláča s konzervovanými plodmi	5	8,47	13,83	11,36	17,60
A-Etanolový extrakt z koláča s konzervovanými plodmi	5	9,12	10,86	9,88	7,12
C-Vodný extrakt z čokoládového koláča s lekvárom	5	35,61	39,36	36,90	3,99
C-Etanolový extrakt z čokoládového koláča s lekvárom	5	25,25	30,52	28,43	7,41
D-Vodný extrakt z koláča so smotanou	5	28,76	32,81	29,78	5,78
D-Etanolový extrakt z koláča so smotanou	5	11,07	15,59	12,71	15,84

Vysvetlivky: n – počet meraní, min – minimálna nameraná hodnota, max – maximálna nameraná hodnota, x – aritmetický priemer, v% – variačný koeficient

Tabuľka 7 Analýza rozptylu antioxidačnej aktivity hodnotených potravinových výrobkov zo súplodí moruše čiernej (*Morus nigra* L.) stanovenej podľa metódy DPPH

Faktory	f	S	MS	F	Preukaznosť	Preukazný rozdiel*
Antioxidačná aktivita – Účinok vplyvu 0,9788						
Medzi súbormi	5	3344,25	668,85	221,69	0,000	0,05
V rámci súborov	24	72,40	3,01			0,01
Celkom	24	72,40				

Vysvetlivky: f - počet stupňov voľnosti; S – súčet štvorcov; MS - priemerný štvorec; F – hodnota testu Fischera; P – štatistická preukaznosť hodnoty Fischera; LSD – najmenšie preukazné rozdiely pre rôzne stupne pravdepodobnosti – preukazný rozdiel

V tabuľke 8 uvádzame porovnanie antioxidačnej aktivity čerstvej šťavy moruše čiernej s antioxidačnou aktivitou plodov z iných druhov podľa literárnych údajov. Z prezentácie vyplýva, že v plodoch z voľne rastúcich druhov sa stanovuje spravidla vyššia antioxidačná aktivita v porovnaní s plodmi zušľachtených druhov. Je to zdôvodniteľné, pretože samotná antioxidačná aktivita je podmienená predovšetkým rôznymi látkami, pri ktorých sa potvrdil antioxidačný účinok. Do tejto skupiny patria hlavne tokoteroly (alfa, beta, gama, delta), karotenoidy

(alfa, beta, gama-karotén, lykopen, luteín, kantaxantín, zeaxantín, violaxantín), kyselina askorobová, polyfenoly (flavony, flavonoidy, antokyaníny a iné), estery kyseliny galovej a ďalšie zlúčeniny čo dokumentujú viacerí autori (Hussain, 1985; Holéciová et al., 2006; Imran et al., 2010; Ercisli, Orhan, 2007; Ercisli, Orhan, 2006). Tieto látky sa z rastlín izolujú vo forme koncentrátov viacerých látok. Na stanovenie antioxidačnej schopnosti sú vypracované viaceré metódy (Keresteš et al., 2011).

Tabuľka 8 Antioxidačná aktivita stanovená v plodoch z vybraných druhov v porovnaní so súplodím moruše čiernej

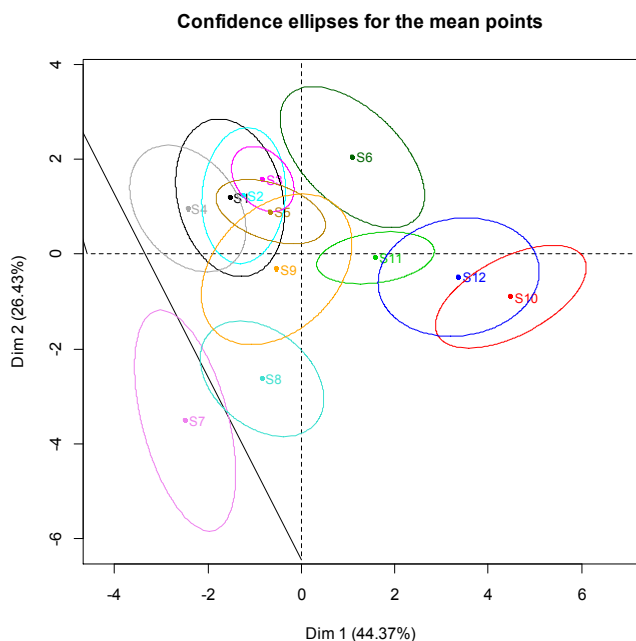
Druhy	Antioxidačná aktivita ($\mu\text{moTE/ml}$)	Autori
Moruša čierna – čerstvá šťava	20,17 – 30,97	experimenty
Ríbezľa čierna	30,15	Jakobek et.al., 2007
Malina červená	8,20	Jakobek et.al., 2007
Černica	8,75	Jakobek et.al., 2007
Jahoda	4,39	Jakobek et.al., 2007
Arónia	72,44	Jakobek et.al., 2007
Baza čierna	62,14	Jakobek et.al., 2007
Zelené jablko	92,19	Tzanakis et al.2006
Červené jablko	6,25	Tzanakis et al.2006
Granátové jablko - dužina	46,88	Tzanakis et al.2006
Granátové jablko - oplodie	42,19	Tzanakis et al.2006
Nedozretý pomaranč – dužina	27,34	Tzanakis et al.2006
Nedozretý pomaranč – oplodie	40,63	Tzanakis et al.2006
Dozretý pomaranč – dužina	34,38	Tzanakis et al.2006
Dozretý pomaranč – oplodie	43,75	Tzanakis et al.2006

Senzorická analýza moruše čiernej na médiu

Výsledky zo senzorickej analýzy sme spracovali postupom, ktorý odporúčajú **Vietoris et al. (2008)**, **Vietoris et Horčin (2007)**.

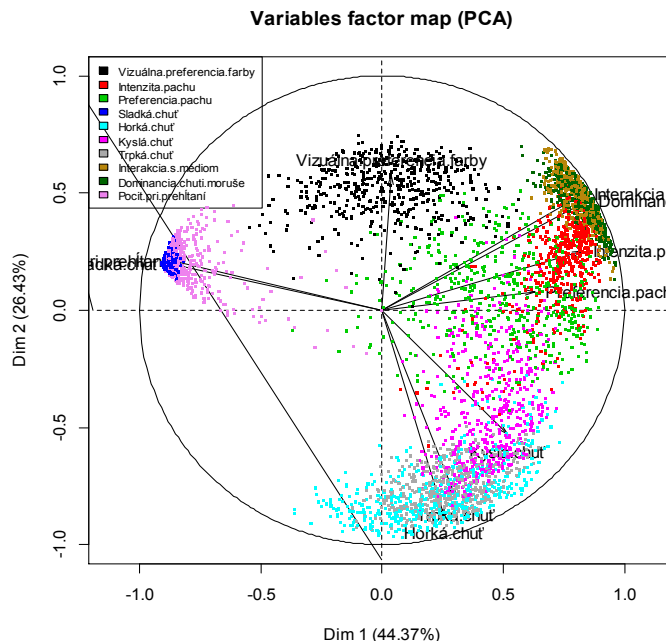
Aplikáciou metódy hlavných komponentov sme z experimentálnych údajov získaných zo senzorickej analýzy potravinových produktov z plodov moruše čiernej v kombinácii s mliečnymi nosičmi určili, že správanie sa substrátu na médiu je preukazne podobné (konfidenčné elipsy sa prekrývajú). Zhhluk S1 (TV75 – MŠ25), S2 (TV50 – MŠ50), S3 (TV25 – MŠ75), S4 (JB75 – MŠ25) a S5 (JB50 – MŠ50) je charakterizovaný sladkou chuťou a nepríjemnými pocitmi pri prehltní (Obrázok 1). Ďalším

významným zhhlukom sú vzorky S10 (JB25 – 75MP), S11 (JB75 – 25MP), S12 (JB50 – MP50) s miernou podobnosťou S9 (SS25 – MŠ75). Sú to vzorky celých plodov moruše čiernej na jogurtovom médiu. Komisiou sú charakterizované ako silne kyslé a všeobecne skôr prevláda chuť média nad chuťou moruší. Za najintenzívnejšie vzorky s morušovou chuťou boli označené vzorky S7 (SS75 – MŠ25) a S8 (SS50 – MŠ50) a čiastočne S4 (JB75 – MŠ25) a S9 (SS25 – MŠ75) na smotanovom a jedna na jogurtovom médiu. Celkové výsledky z uvedeného hodnotenia sú prezentované na obrázku 1.



Obrázok 1 Podobnosť a pozície jednotlivých produktov pripravených z plodov moruše čiernej na jogurtovom a tvarohovom nosiči a ich konfidenčné elipsy (R Development Core Team, 2010)

Činnosť skupiny hodnotiteľov demonštruje obrázok 2. Panel hodnotil takmer identicky deskriptory sladká chuť a pocit pri prehltní. Panel rovnako vysoko preukazne identicky hodnotil aj atribúty interakcia s médiom, intenzita pachu a dominancia chuti moruše. Najväčšie



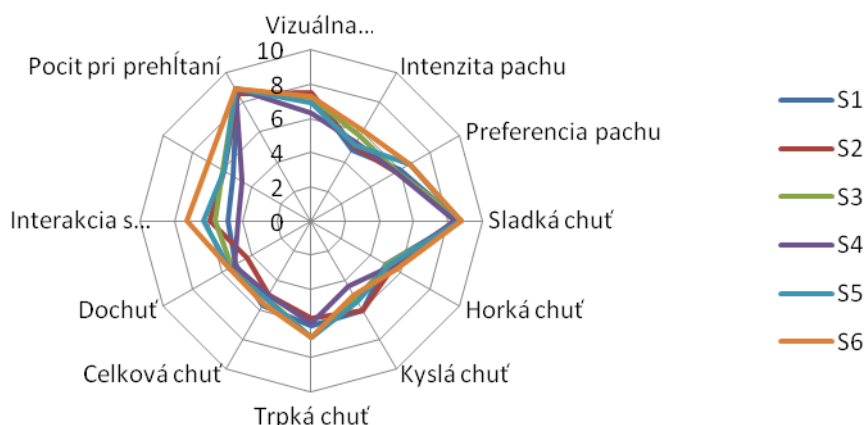
Obrázok 2 Rozptyl hodnôt panela počas hodnotenia potravinových produktov pripravených z plodov moruše čiernej na jogurtovom a tvarohovom nosiči (R Development Core Team, 2010)

problémy spôsobili panelu deskriptory kyslá chuť a vizuálna preferencia farby. Môže to byť spôsobené tým, že nie každý vnímal farebnú interakciu s tromi druhmi média identicky a senzoricke hodnotenie moruší na mliečnom nosiči sa realizovalo vôbec po prvý krát.

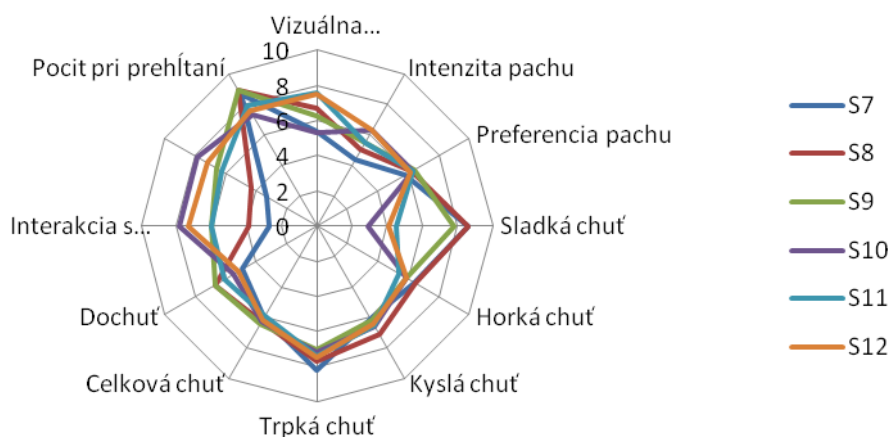
Pre analýzu jednotlivých hodnotených znakov bola zvolená neparametrická dvojfaktorová obdoba analýzy rozptylu – Friedmanov test. Obidva grafy na obrázku 3 [S1 (TV75 – MŠ25), S2 (TV50 – MŠ50), S3 (TV25 – MŠ75), S4 (JB75 – MŠ25), S5 (JB50 – MŠ50), S6 (JB25 – MŠ75)] a obrázku 4 [(S7 (SS75 – MŠ25), S8 (SS50 – MŠ50), S9 (SS25 – MŠ75), S10 (JB25 – 75MP), S11 (JB75 – 25MP), S12 (JB50 – MP50)] korešpondujú a boli rozdelené pre lepšiu prehľadnosť. Na hladine významnosti 0,05 senzorická komisia potvrdila, že existuje preukazne vnímateľný rozdiel medzi vzorkami S1 – S12 vo väčšine atribútov. Bodový systém bol zostavený tak, že vo všetkých atribútoch sa vyššie hodnoty javia ako lepšie,

preto nie je problém z obrázkov 3 a 4 zistiť komisiu najlepšie hodnotenú vzorku. Použitie médium v niektorých prípadoch kompletne ovplyvnilo chuťový profil pozorovanej vzorky a napriek tomu, že bodový test metodicky dokáže určiť víťaza hodnotenia (vzorky s najväčším počtom dosiahnutých bodov), interpretácia výsledkov sa javí ako obtiažna a charakter testu presnejšie demonštrujú obrázky 1 a 2.

Problematika vývoja nových výrobkov sa javí ako perspektívna a do budúcnosti by bolo vhodné nasadiť senzorické metodiky známe z posledných rokov (Napping, Preferenčné mapovanie, alebo len nedávno v slovenských pomeroch prvý krát použitá Penalty analýza).



Obrázok 3 Profilogram jednotlivých deskriptorov pre produkty S1-S6 (R Development Core Team, 2010)

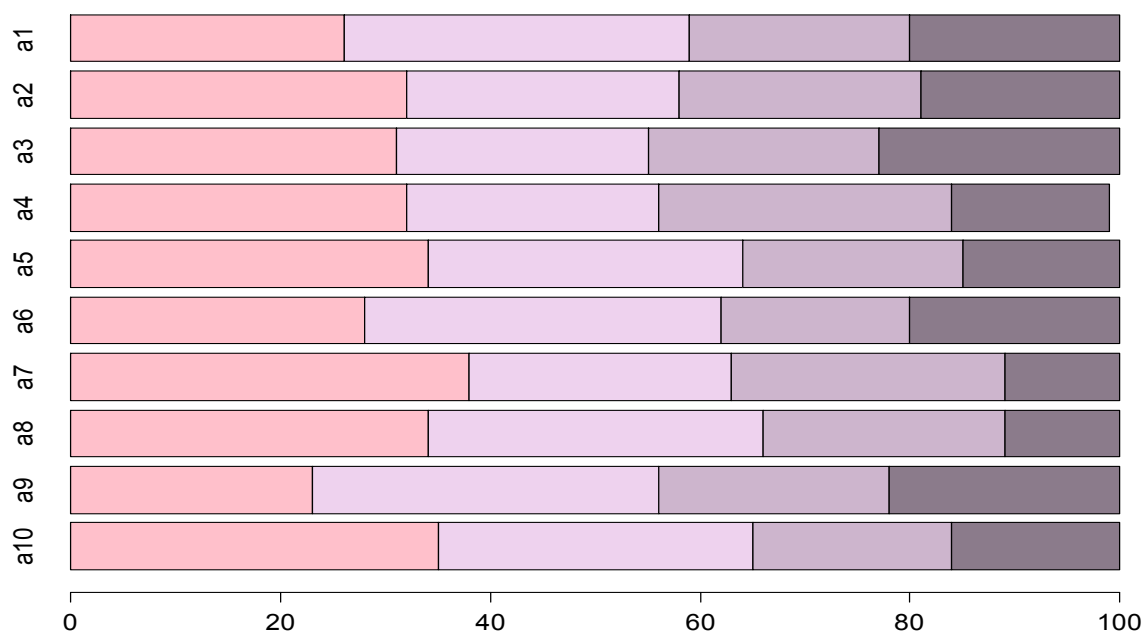


Obrázok 4 Profilogram jednotlivých deskriptorov pre potravinové produkty pripravené z plodov moruše čiernej na jogurtovom a tvarohovom nosiči (R Development Core Team, 2010)

Senzorická analýza koláčov z moruše čiernej

V danej skupine sme určili vizuálnu atraktivitu potravinových produktov $F = 6,36$, čo predstavuje prijatie nulovej hypotézy. Na základe uvedeného môžeme konštatovať, že vizuálne považovali hodnotitelia koláče za takmer rovnaké. K rovnakému zisteniu sme dospeli aj v prípade deskriptorov vizuálna atraktivita plnky (5,4); pach (3); chuť po morušiach (6,54) a drobivosť (5,16). Naopak na hladine významnosti $\alpha=0,05$ hodnotitelia zistili preukazný rozdiel v preferenciách týchto sledovaných znakov žuteľnosť (9,84); celková chuť (13,32); celkový

dojem (14,52); prehĺtavosť (19,8) a šťavnatosť, kde hodnota Friedmanovho F dosiahla hodnotu 21,96. Práve v atribútoch kde senzorická komisia zistila rozdiely dominoval smotanovo morušový výrobok (D). Je to preukazne vidieť aj na obrázku 5, kde súčty poradí predstavujú invertovaný ukazovateľ a čím menšie farebné pole výrobok tvorí, tým lepšie sa umiestnil v hodnotení poradí. V celkovom zhodnotení možno konštatovať, že výrobky sa umiestnili v poradí (Da, Cab, Bb, Ac) pričom uvádzame aj ich skupinové indexy.



Obrázok 5 Vizualizácia súčtov poradí pre jednotlivé deskriptory (a1-a10). Rozdielne farebne ohraničené plochy predstavujú výrobky (A,B,C,D)

ZÁVER

Moruša čierna patrí medzi nedocenené druhy na Slovensku, čo dokumentujú dosiahnuté výsledky a poznatky v predloženej práci ako aj rozsiahle literárne údaje. Plody moruše čiernej sú veľmi cenné pre svoju výživnú, energetickú, senzorickú ako aj terapeutickú hodnotu a preto sú vhodným produktom pre priamy konzum ako aj v rôznom spracovaní. Medzi hodnotenými genotypmi moruše čiernej sme určili významné rozdiely vo veľkosti súplodí. Čerstvé plody ako aj v rôznom spracovaní vykazujú pomerne vysoký stupeň antioxidačnej

aktivity. Vo všeobecnosti sme určili vyššiu antioxidačnú aktivitu vo vodných extraktoch v porovnaní s etanolovými extraktmi v hodnotených potravinových výrobkoch. Využívanie plodov ako aj iných potravinových produktov vytvorených z plodov ovplyvňujú aj mnohé senzorické znaky, čo ocenili mnohí hodnotitelia v 16 hodnotených výrobkoch. Z uvedeného dôvodu je opodstatnené rozširovanie daného druhu aj v podmienkach Slovenska pre praktické využitie aj v agropotravinárstve a pre zvyšovanie zdravia obyvateľstva.

LITERATÚRA

Armitage, P. 1971. *Statistical Methods. Medical Research* (1971). Blackwell Scientific Publications. Oxford. pp.189-207.

Abdalla, E. S. 2006. The Biological Benefits of Blackmulberry (*Morus nigra*) Intake on Diabetic and non Diabetic Subjects. *Research Journal of Agriculture and Biological Sciences*, vol. 2, no. 6, p. 349-357.

Bahna, D. 2010. *Priroda Pukanca*, [online]. [cit, 2010-20-04]. Dostupné na internete: <http://www.pukanec.sk/priroda_uvod.php>

BENČAĽ, F. 1999. Moruša čierna a jej význam v CHKO Štiavnické vrchy. *Zborník referátov zo seminára k 20. výročiu vyhlásenia CHKO Štiavnické vrchy*. Banská Štiavnica: Správa CHKO Štiavnické vrchy, p. 95-105.

Bown, D. 2003. *Encyclopaedia of Herbs and their Uses*. London : Dorling Kindersley Limited, 448 p. ISBN 1405300590.

Dharmananda, S. 2003. *Fruit As Medicine Morus Fruit (Mulberry)*. Portland, Oregon: Institute for Traditional Medicine, p. 6.

Duke, J. A., Ayensu, E. S. 1985. *Medicinal Plants of China*. Michigan : Reference Pubns, 704 p. ISBN 0-917256-20-4.

Elmac, Y., Altuq, I. 2002. Flavour evaluation of three black mulberry (*Morus nigra*) cultivars using GC/MS, chemical and sensory data. *J. Sci.Food and Agri.* 82(6):632-635. <http://dx.doi.org/10.1002/jsfa.1085>

Ercisli, S., Orhan E. 2006. Chemical composition of white (*Morus alba*), red (*Morus rubra*) and black (*Morus nigra*) mulberry fruits. *Am. J. Clin. Nutr.* 84: 551-5.

Ercisli, S., Orhan, E. 2007. Chemical composition of white (*Morus alba*), red (*Morus rubra*) and black (*Morus nigra*) mulberry fruits. *Food Chemistry*, vol. 103, no. 4, p. 1380-1384. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.10.054>

Ercisli, S., Tosun, M., Duralija, B., Voča, S., Sengul, M., Turan, M. 2010. Phytochemical Content of Some Black (*Morus nigra* L.) and Purple (*Morus rubra* L.) Mulberry Genotypes. *Food Technol. Biotechnol.*, vol. 48, no. 1, p. 102-106.

Hojjatpanah, G., Fazaeli, M., Emam-djomeh, Z. 2011. Effects of heating method and conditions on the quality attributes of black mulberry (*Morus nigra*) juice concentrate. *Int. J. Food Sci. Technol.*, 46: 956-962. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2621.2011.02573.x>

Holeciová, J., Brindza, J., Stehlíková, B. 2004. Variabilita niektorých znakov plodov a listov moruše čiernej (*Morus nigra* L.) na Slovensku. *Zborník abstraktov – Nové poznatky z genetiky a šľachtenia poľnohospodárskych rastlín*. VÚRV, Piešťany, str.193-196, ISBN 80-88790-34-4.

Holeciová, J. 2006. Tradičné poznatky o využívaní moruše čiernej vo svete a na Slovensku. *Tradičné agrosystémy 06 : abstrakty referátov 2, vedeckého seminára Komplexné využitie rastlinných surovín konaných v rámci iniciatívy*

- organizácie SAVE k Dňu agrobiodiverzity 4.-6. septembra, Nitra : SPU, s. 11, ISBN 80-80669-745-0.
- Hussain, T. 1985. Food composition tables for Pakistan. Govt. Of Pakistan, Ministry of Planning and Development, Islamabad. p. 67.
- Imran, M., Khan, H., Shah, M., Khan, R., Khan, F. 2010. Chemical composition and antioxidant activity of certain *Morus* species. *Journal of Zhejiang University-Science B (Biomedicine & Biotechnology)*, vol. 11, no. 12, p. 973-980. PMID:21121077
- Ivanička, J. 1987. In Vitro Micropropagation of Mulberry, *Morus nigra*. *Scientia Horticulturae*, vol. 32, 1987, no. 1-2, p. 33-39.
- Jakobek, et al. 2007. Anthocyanin content and antioxidant activity of various red fruit juices. *Deutsche Lebensmittel Rundschau B [online]*. vol. 103, no. 2 [cit.2012-04-10]. Dostupné na internete: <http://bib.irb.hr/datoteka/210741.Jakobek_et_al_DLR_1032_2007.58-64.PDF>
- Kafkas, S., Özgen, M., Doğan, Y., Özcan, B., Ercişli, S., Serçe, S. 2008. Molecular Characterization of Mulberry Accessions in Turkey by AFLP Markers. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, vol. 133, no. 4, p. 593-597.
- Keresteš, J. et al. 2011. *Výživa lidí*. 2. vyd. Bratislava : CAD PRESS, 1037 s. ISBN-978-80-88969-57-0.
- Koyuncu, F., M. A. Koyuncu, F. Yidrm and E. Vural. 2004. Evaluation of black mulberry (*Morus nigra* L.) genotypes from lakes region, Turkey. *European J. Hort. Sci.* 69(3):125-131.
- Krejča, J., Korbel, L. 1977. *Velká kniha živočichov*. Bratislava : Příroda, p. 347.
- Kresánek, J., Krejča, J. 1977. *Atlas léčivých rostlin a lesných plodov*. Martin : Osveta, p. 386-387.
- Maľa, P., Václavová, A., Baranová, M., Vietoris, V. 2009. Objectivity of percepts of sensory analysis. *Folia veterinaria*, vol. 53, 2009, no. 2, pp. 72-76. ISSN 0015-5748.
- Mucimapura, S., Wattanathorn, J., Thongrong, S., Chaisiwamongkol, K., Sripanidkulchai, B. 2010. *Morus alba* Enhanced Functional Recovery After Sciatic Nerve Crush Injury. *American Journal of Agricultural and Biological Sciences*, vol. 5, 2010, no. 3, p. 294-300.
- Odyová, P. 1993. *Velký atlas léčivých rostlin*. Martin: Osveta, 1993.
- Ottman, Y. 1987. Rediscovering the Realm of Fruiting Mulberry Varieties. *Journal of the American Pomological Society*, vol. 41, no. 1, p. 4-7.
- Přibilová, E. 1988. *Květena České socialistické republiky*. Praha : Academia, p. 33-39.
- Sanches, M., Larrauri, C., Saura, A., Calixto, F. 1998. A procedure to measure the antioxidant efficiency of polyphenols. *J. Sci. Food Agric.*, vol. 76, pp. 270-276. [http://dx.doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0010\(199802\)76:2<270::AID-JSFA945>3.0.CO;2-9](http://dx.doi.org/10.1002/(SICI)1097-0010(199802)76:2<270::AID-JSFA945>3.0.CO;2-9)
- Tzanakis, et al. 2006. Phenols and antioxidant activity of apple, quince, pomegranate bitter orange and almond-leaved pear methanolic extracts. *Journal of Science & Technology [online]*, vol. 53, no. 3 [cit. 2012-04-07]. Dostupné na internete: <http://e-jst.teiath.gr/issue_3_2006/katzogiannos_3.pdf>.
- Usmanghani, K., Saeed, A., Alam, T. 1997. Indusynic Medicine, Department of Pharmacognosy. Pakistan: University of Karachi, p. 601.
- Václavová, A., Vietoris, V., Zajác, P., Čapla, J., Golian, J., Maľa, P. 2009. Využitie alternatívnych postupov pri testovaní hodnotiteľov v senzorickej analýze : Alternative methods for testing evaluators in sensory analyse. *Potravinárstvo*, vol. 3, no. 4, pp. 79-81. ISSN 1338-0230.
- Vietoris, V., Horčín, V. 2007. Úloha štatistiky v senzorickej analýze. *Kvalita a bezpečnosť potravín 2007* : zborník prednášok k III. medzinárodnej konferencii, 25.-26. september, Štrbské Pleso. Žilina : MASM, 2007.
- Vietoris, V., Horčín, V., Václavová, A., Pavelková, A. 2008. *Sensory analysis of food*. 1. vyd. Nitra : Slovak University of Agriculture, 75 p. ISBN 978-80-552-0119-1.
- Vietoris, V., Zajác, P., Čapla, J., Václavová, A. 2008. Inovatívne prístupy k prezentácii výsledkov senzorickej analýzy. *Kvalita a bezpečnosť potravín*: IV. medzinárodná konferencia, 23.-24. september 2008, Štrbské Pleso. Žilina : MASM, 2008. pp. 18-19. ISBN 978-80-85348-79-8.

Acknowledgments:

This work was supported by grant ITMS 26220220115.

Contact address:

doc. Ing. Ján Brindza, CSc. Institute of Biological Conservation and biosafety, Faculty of Agrobiolgy and Food Resources, Slovak University of Agriculture in Nitra, Trieda Andreja Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovak Republic. Tel.: +421 376 414 787, E-mail: Jan.Brindza@uniag.sk

Ing. Lucia Kucelová. Institute of Biological Conservation and biosafety, Faculty of Agrobiolgy and Food Resources, Slovak University of Agriculture in Nitra, Trieda Andreja Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovak republic. Tel.: +421376414787, E-mail: lucia.kucelova@uniag.sk

Ing. Andrej Sinica. Institute of Biological Conservation and biosafety, Faculty of Agrobiolgy and Food Resources, Slovak University of Agriculture in Nitra,

Trieda Andreja Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovak republic. Tel.: +421376414787, E-mail: andrej.sinica@uniag.sk

prof. RNDr. Beáta Stehlíková., CSc. Institute of Biological Conservation and biosafety, Faculty of Agrobiolgy and Food Resources, Slovak University of Agriculture in Nitra, Trieda Andreja Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovak republic. Tel.: +421376414787, E-mail: stehlikovab@gmail.com

Ing. Marcela Čuláková. Institute of Biological Conservation and biosafety, Faculty of Agrobiolgy and Food Resources, Slovak University of Agriculture in Nitra, Trieda Andreja Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovak republic. Tel.: +421376414787, E-mail: marcela.culakova@uniag.sk

MICROWAVE MILK PASTEURIZATION WITHOUT FOOD SAFETY RISK

Péter Korzenszky, Péter Sembery, Gábor Géczy

ABSTRACT

According to nutrition science, milk and milk products are essential food for humans. The primary processing of milk includes its storage, separation, homogenization and the pasteurization process as well. The latter is a kind of heat treatment, which has been used to extend the storage life of food since the late 18th century. Although heat treatment of milk can be achieved through the use of microwave technology, the inhomogeneity of electromagnetic fields leads to an uneven distribution of temperature in the food products, therefore precluding their use in industry. The pasteurization operation is very often Critical Control Point (CCP) according to food safety systems.

In recent years our research team has developed continuously operating heat treatment pilot-plant equipment, capable of measuring and contrasting the effects of different heat treatment methods, such as thermostat-controlled water baths and microwave energy, on liquid food products. We examined and compared protein, fat and bacterial content in samples of fresh cow milk with heat-treated cow milk samples. In addition, storage experiments were carried out under a microscope and recordings made of fat globules. Our results so far show that the microwave heat treatment is equivalent to the convection manner pasteurization technology, as we found no difference between the heat-treated products.

Keywords: primary processing; microwave; heat treatment; milk; Critical Control Point (CCP)

INTRODUCTION

The basic material determines the quality of the food largely. This is especially true for food of animal origin where the quality of raw material function of the animal nutrition, health, human treatment and the technology. Therefore, the raw material quality and properties vary widely, which complicates subsequent food processing. The foregoing may be especially true in a dairy plant where the quality of milk after milking, or a few individuals may be affected. For this reason, it is understandable that the so-called primary processing role is increasing, resulting in a deterioration in the quality of raw materials largely determine.

The pasteurization is a possibility for the primary processing of dairy technology, which means heat treatment under 100 °C. It aims to reduce the number of microorganisms to a level that does not cause a health risk and also to extend product shelf life. The microbial spoilage of milk by the greater heat-treated to destroy. The heat treatment operation can be carried out in various ways depending on applied temperature degrees and duration. In the pasteurization technology use difference temperature because the heat treatment has advantage – the germ of destruction – and disadvantage – such as denaturation of proteins – properties for the milk. The heat treatment is considered two way as a larger proportion in milk total bacterial count want to destroy it, but we want to preserve nutritional value and the nature of milk. (KvVM, 2005). This effort has a number of technical solutions for the mechanical device, the method has contributed to warming. Most often, indirectly, through heat conduction and convection of heat exchangers for heating. However the heat treatment of milk can be performed with a microwave method.

The inhomogeneous electromagnetic field caused by uneven temperature distribution in the product, which can be a food safety risk during the primary processing of dairy technology (Fig 1.).

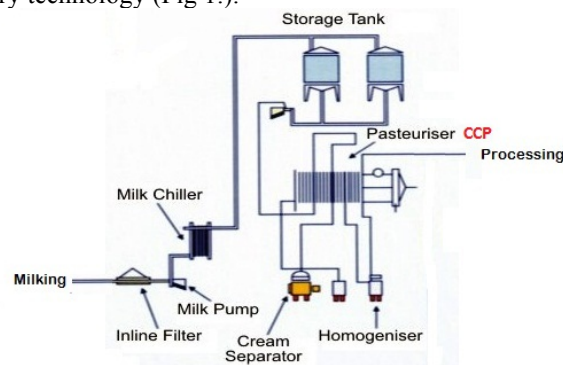


Fig. 1. Primary processing of milk

The research of the microwave heat treatments share the researchers for two part. It is clear, the speciality of the application of microwave energy to heating purposes is the fact that heat dissipates inside the food product therefore the heating process is faster. The advantage of faster heating is that the treatment causes less damage in the nutritive value of the product which results in higher quality. Villamiel et al (1996) found that both goat's milk and cow's milk, the microwave heat treatment is effective and suitable technology for the pasteurization of milk. Sierra and Vidal-Valverde (2000, 2001) research in milk B1, B2 and B6 vitamins studied continuously operating microwave and conventional (tube heat exchanger) heating methods. It was found that 3.4 % and 0.5 % fat milk at 90 °C with a heat treatment method did not cause vitamin loss.

Watanabe et al (1998) and Sieber et al (1996), microwave treatment combinations used it was found that the A and B12 higher degree of degradation brought about, in other respects but they also demonstrate the microwave benefits of heat treatment to apply. The University of Kaposvár from the hungarian microwave research teams, continuous-mode microwave procedures have been developed and founded that the loss of vitamin C is greater degree (Albert et al., 2008). The Mosonmagyaróvár research workplace make equal warming in the microwave cavity and they found difference enzymes activity and the size of milk fat ball compared a conventional pasteurisation technology (Neményi, et al, 2006; Lakatos et al., 2010). The references examples are shows that the safe industrial application of the microwave heating in the food technology demand many investigation.

But there are some examples from other areas of life as well for microwave treatments. Kowalski et al. (2012) studied the microwave impact for honey quality, Kurják et al. (2012), and Beke et al. (2012) examined the apple, potato and onion samples possibilities of microwave drying, or Beszédes et al. (2011, 2012) said the possibility of the use of microwave energy in sugar beet processing and food industrial sewage sludge treatment.

MATERIAL AND METHODOLOGY

At the Faculty of Mechanical Engineering of Szent István University, a continuous operation microwave appliance was developed by the modification of a household microwave oven.



Fig. 2. Microwave appliance with spiral insets

The liquid foodstuffs (milk, beer, liquid egg, fruit juices) flown in the glass spiral in the microwave appliance (Fig. 2.) can be heated to the desired temperature depending on the length of the glass spiral and the volume flow rate of the feeding pump. The temperature can easily be checked both in front of and behind the microwave electromagnetic field, the process is well-controlled (Géczi, Sembery 2010).

To ensure the comparability of the heat treatments, a method with equal duration and temperature was developed. The spiral installed in the microwave appliance was placed in a water bath thermostat. By the adjustment of the water bath's temperature, a treatment temperature identical to that of the microwave method was achieved with constant volume flow rate and thus in equal treatment time. The procedure enables the comparison of products treated under similar conditions but with different heating methods. The milk samples were obtained from the dairy farm in Egyházasdengeleg. Milk was cooled down to 4 °C right after milking without any additional treatments. During transportation, the temperature of milk did not increase above 8 °C. The test liquids were heated up to the same temperature in continuous operation with a water bath thermostat (TH) or a microwave appliance (MH). Liquid flown through the grass spirals without heating was used as a control (WH) (Fig. 3.).

For the statistical comparison 16-16 pieces of the liquids heated by the two different methods and from the untreated control the were analyzed. The heating temperature was $73.5 \pm 0,2$ °C. The raised temperature was not held, the samples cooled in a natural way to the storage temperature of 8-10 °C. The samples obtained this way were provided with a code and handed over to independent laboratories for examination. The milk samples were examined in the laboratory of Livestock Performance Testing Ltd. in Gödöllő. The samples were examined in blind tests where the person carrying out the examinations obtained coded and mixed samples. The person performing the preparation and heat treatments did not take part in the examinations.

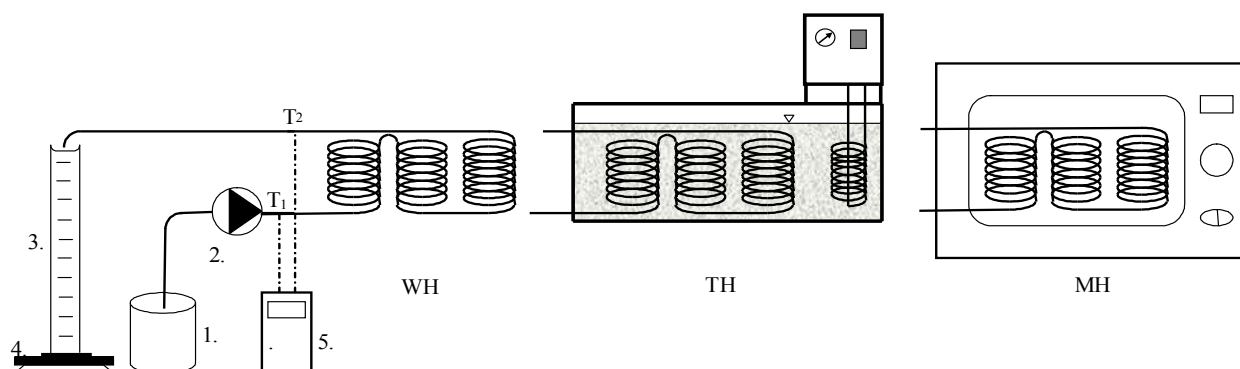


Fig. 3. Methods of sample groups treating

Legend for figures 2: 1-Test liquid container, 2-STENNER 85M5 feeding pump, 3-Sampler container, 4- Denver XP-3000 scales, 5-ALMEMO 2590-9 thermometer, MH (method) - Whirlpool AT 314 microwave appliance with spiral insets, TH (method) - T-PHYWE water bath thermostat with spiral insets, WH (method) - glass spiral.

RESULT AND DISCUSSION

The samples of without heating is well-separated from the heat-treated samples, however, we found no significant difference between the heating methods by the total bacterial count. The Fig. 4. can be shown the diagram, where the difference observed in the untreated (WH) and heat-treated sample (MH, TH), but no visible difference between the heat-treatment methods.

In the Table 1. are presented the statistical results where the initial total bacterial count was $126.500 \pm 6,500$ CFU/cm³ and the warming temperature was 73.5 ± 0.2 °C. The heat treatment decreased the total bacterial count 76.4 % in average, for the milk protein and fat content the heating was not affected. The effects of various heating methods was statistically verified by Student's t-test. Null

hypothesis, we assume that the sample group averaging 95 % confidence level by selecting the same. A two-sample t-test for the applicability of the conditional approval of variances by F-test were checked. Based on the results of the Table 1. the microwave heating equal as the water bath thermostat heating for the decreasing of total bacterial count. A two-sample t-test shows no significant difference between the two sample groups by $p = 0.05$ significance level.

Our results so far show that the microwave heat treatment and the convection manner equivalent for pasteurization. Accordingly, the microwave heat treatment method suitable for primary processing of freshly milked milk.

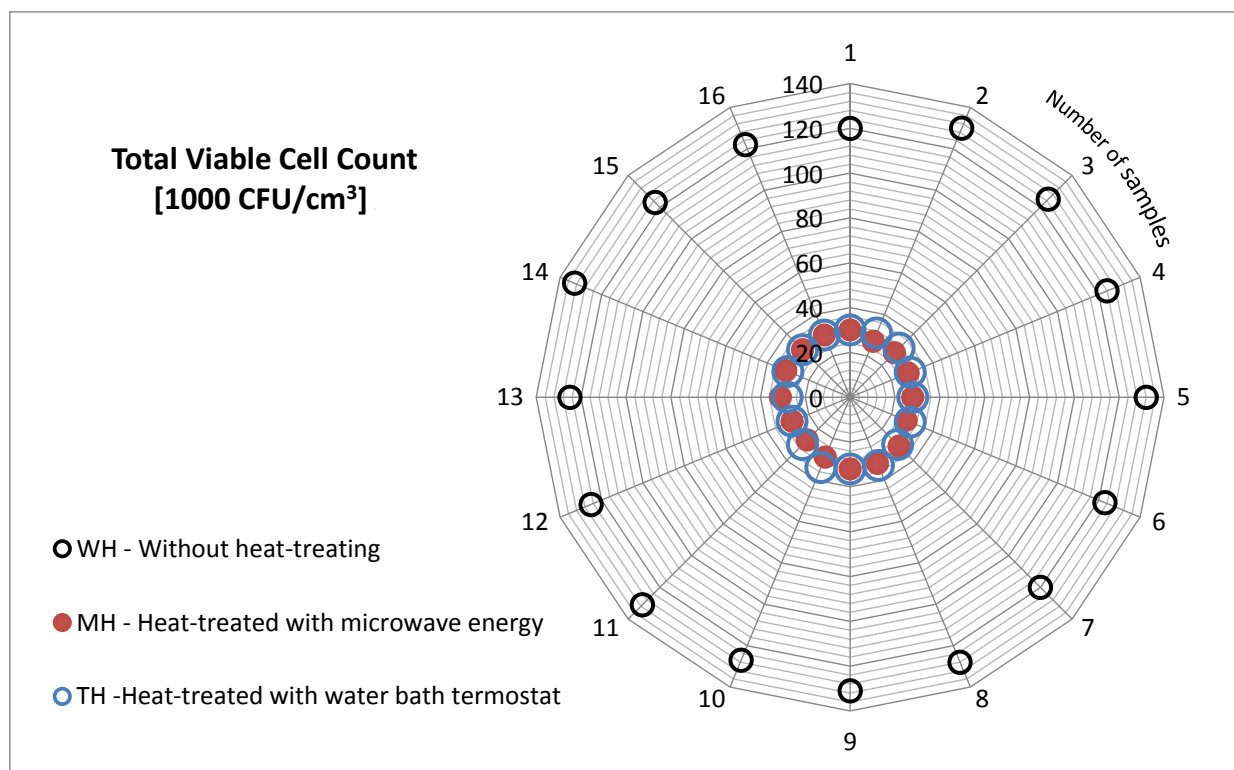


Fig. 4. Total viable cell count of milk samples as a function of treating methods

Table 1. Statistical analysis of changes in total viable cell count

WH 126.500 ± 6.500 CFU/cm ³ Statistical sample of 16 pieces	Total viable cell count [CFU/cm ³]	
Heat-treating methods $T = 73.5 \pm 0.2^\circ\text{C}$	TH	MH
Number of samples	16	16
Expected value	30.187	29.312
Variance	2.962	3.162
t_{sz} value	1.4142	
t_p value	2.0422	
Result ($p=0,05$)	$ t_{sz} < t_p$	

REFERENCES

- Albert, Cs., Lányi, Sz., Csapóné, Kiss Zs., Salamon, Sz., Csapó J. 2008. A mikrohullámú pasztörözés hatása a tej összetételére II. The effect of microwave pasteurization of milk composition II. *Acta Agraria Kaposváriensis.*, vol 12., no.3., p. 25-36
- Beke, J., Kurják, Z., Bessenyei K. 2012: Konvekciós szárítási modellek alkalmazási lehetőségei a mikrohullámú szárítási folyamatokban. Convection drying applications of microwave drying process. *Mezőgazdasági Technika Liii*, vol. 7, p. 30-32.
- Beszédes, S., László, Zs., Szabó, G., Hodúr, C. 2011. Effects of microwave pretreatments on the anaerobic digestion of food industrial sewage sludge. *Environmental Progress & Sustainable Energy*, vol. 30, no. 3, p. 486-492.
- Beszédes, S., Tachon A., Lemmer, B., Ábel, M., Szabó, G., Hodúr, C. 2012. Bio-fuels from cellulose by Microwave Irradiation. *Annals Of Faculty Of Engineering Hunedoara / International Journal Of Engineering*, vol. 10, no. 2, p. 43-48.
- Géczi, G., Sembery, P. 2010 Homogeneous Heating in the Inhomogeneous Electric Field. *Bulletin of Szent István University*. 2009, p. 309-317.
- Kowalski, S., Lukaszewicz, M., Bednarz, S., Panuś, M. 2012. Diastase number changes during thermal and microwave processing of honey. *Czech J. Food Sci.*, vol. 30, p. 21–26.
- Kurják, Z., Barhács, A., Beke, J. 2012. Energetic Analysis of Drying Biological Materials with High Moisture Content by Using Microwave Energy. *Drying Technology*, vol. 30, no. 3, p. 312-319. <http://dx.doi.org/10.1080/07373937.2011.639473>
- KvVM 2005: Útmutató az elérhető legjobb technika meghatározásához a tejfeldolgozás terén, in english: A guide to the best available technology to determine milk processing p. 100., Retrieved from the web: http://www.ippe.hu/pdf/tej_utmutato.pdf
- Lakatos, E., Kovács, A. J., Végváry, Gy., Neményi, M. 2010. Mikrohullámú sugárzás hatása a fogyasztói tejben lévő lipáz és xantin-oxidáz enzimek működésére. In english: The effect of microwave radiation for the enzymes operation of lipases and xanthine oxidase of drinking milk. *Magyar Állatorvosok lapja*, vol. 132., p. 728-734.
- Neményi, M., Lakatos, E., Kovács, A. J. 2006. Examination of milk fat globule changes in microwave field. *Journal of Food Physics*, vol. 17-18, p. 29-42.
- Sieber, R., Eberhard, P., Fuchs, D., Gallmann, P. U., Strahm, W. 1996. Effect of microwave heating on vitamins A, E, B1, B2 and B6 in milk. *Journal of Dairy Research*, vol. 63., p. 169-172. <http://dx.doi.org/10.1017/S0022029900031642> PMID:8655740
- Sierra, I., Vidal-Valverde, C. 2000. Influence of heating conditions in continuous-flow microwave or tubular heat exchange systems on the vitamin B1 and B2 content of milk. *INRA, EDP Sciences, Journal Lait*, vol. 80, no. 6., p. 601-608.
- Sierra, I., Vidal-Valverde, C. 2001: Vitamin B1 and B6 retention in milk after continuous flow microwave and conventional heating at high temperatures. *Journal of Food Protection*, vol. 64, no. 6., p. 890-894. PMID:11403146
- Villamiel, M., López-Fandino, R., Corzo, N., Martínez-Castro, I., Olano, A. 1996. Effects of continuous flow microwave treatment on chemical and microbiological characteristics of milk. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und Forschung*, vol. 202, no. 1., p. 15-18. <http://dx.doi.org/10.1007/BF01229677> PMID:8717091
- Watanabe, F., Abe, K., Fujita, T., Goto, M., Hiemori, M., Nakano, Y. 1998: Effects of Microwave Heating on the Loss of Vitamin B12 in Foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 46., p. 206-210. <http://dx.doi.org/10.1021/jf970670x> PMID:10554220

Acknowledgments:

This work was financially supported by TÁMOP 4.2.1.B-11/2/KMR-2011-0003 project.

Contact address:

Péter Korzenszky, Szent István University, Faculty of Mechanical Engineering, Institute of Process Engineering, Department of Metrology, Páter K. u. 1. Gödöllő, Hungary, E-mail: korzenszky.peter@gek.szie.hu.

Péter Sembery, Szent István University, Faculty of Mechanical Engineering, Institute of Process Engineering, Department of Metrology, Páter K. u. 1. Gödöllő, Hungary, E-mail: sembery.peter@gek.szie.hu.

Gábor Géczi, Szent István University, Faculty of Mechanical Engineering, Department of Environmental Engineering, Institute of Environmental Systems E-mail: geczi.gabor@gek.szie.hu.

MEASUREMENT OF THE RESIDUAL GASES O₂ AND CO₂ IN MEAT PRODUCTS PACKED IN MODIFIED ATMOSPHERE

Jozef Čapla, Peter Zajác, Jozef Čurlej, Vladimír Vietoris, Ľubomír Lopašovský

ABSTRACT

Nowadays, consumers have increased demand for quality and food safety and also rising demand for natural foods without chemical additives. There are many ways to preserve freshness of these products, one of them is modified atmosphere packaging, which can mean elimination and/or replacement surrounding the product before closing it in package with a mixture of gases other than the original ambient air atmosphere. For replacement of atmosphere are generally used three types of gases such as carbon dioxide, oxygen and nitrogen. This type of packaging is often used for meat and meat products, which belongs to foods that are under normal conditions perishable and for increasing the shelf life of meat products are also used various other preservation methods or their combinations. Packaging of meat and meat products in modified atmosphere is usually made with a high content of carbon dioxide, which has good bacteriostatic and fungistatic effect and is also an effective mean for increasing the shelf life of packaged products during storage and sale.

Keywords: meat products; modified atmosphere

ÚVOD

Mullan a McDowell (2011) uvádzajú, že snaha obchodníkov o predĺženie trvanlivosti potravín bola dôležitou súčasťou ich života už stáročia.

Brosche (2005) uvádza, že rozmanitosť potravín balených do ochrannej atmosféry je dnes veľmi veľká. Jednotlivé zloženie ochrannej atmosféry (MAP) sa líši podľa druhu výrobku a závislosti od doby trvanlivosti. Podstatnú úlohu tu zohráva optimalizácia špecifického zloženia plynu pre daný produkt. Balenie potravín v modifikovanej atmosfére patrí v súčasnosti k bežne používaným postupom, ktoré chránia skladované potraviny pred nežiadúcimi vplyvmi, napr. oxidačno-redukčnými reakciami, ale i pred zmenami vlhkosti a nežiadúcimi mikrobiálnymi procesmi. Aj keď modifikovaná atmosféra sama o sebe nemôže významnejšie predĺžiť skladovateľnosť neúdržných potravín, je aplikovaná ako doplnok ďalších metód konzervovania potravín. Najvýznamnejšiu skupinu produktov balených v modifikovanej atmosfére predstavujú chladené potraviny (Esmer et al., 2010). V záujme súladu označovania prídavných látok v medzinárodnom meradle vypracovala komisia Codex Alimentarius FAO/WHO tzv. medzinárodný číselník potravinárskych aditívnych látok (kódy INS) ako možnú alternatívu k uvádzaniu dlhých názvov či chemických vzorcov látok pri označovaní na obaloch potravín. Tento systém prevzala aj EÚ. Kódy E látok povolených na používanie v štátoch EÚ sú totožné s príslušnými kódmi INS. Aj baliace plyny používané v potravinárstve majú pridelený príslušný E kód, ako napr. kyslík - E948, oxid uhličitý - E290 a dusík E941 (Szemes et al., 2004).

Tieto najbežnejšie plyny sú prítomné aj vo vzduchu, ktorý je pri balení MAP z pôvodného balíčka odstránený a nahradený plynom, ktorého pomer týchto látok je odlišný v porovnaní s pôvodným zložením vzduchu. Klasický vzduch, ktorý nás obklopuje je zložený z približne 0,03 % oxidu uhličitého, 78 % dusíka a 21 % kyslíka (Nollet a Toldrá, 2006).

Modifikovaná atmosféra je väčšinou jedno až trojzložková zmes plynov, najčastejšie O₂, CO₂ a N₂ (Švejnoha, 2009). V závislosti od potraviny a požadovaného účinku sa do obalu „nafúknu“ príslušné zmesi plynov (Robertson, 2005). Pozitívne účinky vyvolané balením výrobku v MAP by sa mohli podstatne znížiť skladovaní pri nevyhovujúcich teplotách. Skladovanie pri teplotách vyšších ako je odporúčané vedie nielen k mikrobiálnemu rastu, ale urýchľujú sa aj chemické reakcie v balení, atmosfére v balení MAP sa mení, čo môže skrátiť odhadovaný dátum spotreby (Koutsoumanis et al., 2006).

MATERIÁL A METÓDY

Meranie obsahu zvyškových plynov O₂ a CO₂ v mäsových výrobkoch balených v modifikovanej atmosfére bolo sledované v závislosti od teploty a času uskladnenia. Vzorky mäsových výrobkov boli zakúpené v obchodnej sieti. Na analýzu bolo použitých 50 kusov balených výrobkov. Jednotlivé balenia boli zakúpené od piatich rôznych výrobcov, pričom od každého výrobcu boli vybrané na analýzu 2 druhy výrobkov po 5 kusov. Vzorky boli podrobené analýze v nasledovných intervaloch: v deň zakúpenia, v polovici sledovaného obdobia, pred koncom dátumu spotreby. Výrobky boli uskladňované pri teplote 4 °C, čo bola odporúčaná skladovacia hodnota (interval)

určená výrobcom a súbežne pri 7 °C, čo je teplota vyššia ako udáva výrobca. Táto hodnota bola zvolená na základe výsledkov úradných kontrol potravín, kde sa uvádza, že je častokrát zistený porušený chladiarenský reťazec u obchodníkov práve o hodnotu 2 až 3 °C.

Sledovaný ukazovateľ bol:

vplyv doby skladovania na koncentráciu O₂ a CO₂ v porovnaní s pôvodnou atmosférou použitou pri balení mäsových výrobkov výrobcom,

Tab. 1 Základná charakteristika vzoriek použitých na analýzu

Výrobca	Druh mäsového výrobku	Zmes plynov v balení deklarovaná výrobcom
Výrobca A	1. Morčacia šunka 2. Čaba saláma	80 % N ₂ a 20 % CO ₂
Výrobca B	1. Dusená šunka 2. Pražská šunka	80 % N ₂ a 20 % CO ₂
Výrobca C	1. Vysočina saláma 2. Saláma šunková	70 % N ₂ a 30 % CO ₂
Výrobca D	1. Šunka dusená hydínová 2. Morčacia šunka	70 % N ₂ a 30 % CO ₂
Výrobca E	1. Saláma MIX 2. Saláma s chili	70 % N ₂ a 30 % CO ₂

Rozbor zloženia plynov v balení MAP sa vykonával prístrojom CheckPoint II, jedná sa o prenosný analyzátor zvyškového plynu O₂/CO₂ v obaloch s modifikovanou atmosférou.



Obr. 1 Prenosný analyzátor zvyškového plynu O₂/CO₂ v obaloch s modifikovanou atmosférou

Check Point II. sa skladá z dvoch senzorov:

- O₂ senzor je založený na elektrochemickej (EC) reakcii a ako taký má určité obmedzenie

v porovnaní so zirkoniovým O₂ senzorom, pokiaľ ide o dobu odozvy a krížovú citlivosť pre plyn CO₂. Následkom tejto skutočnosti poskytuje CheckPoint II pokročilé funkcie zrýchlenia v softvare umožňujúcich skrátenie doby merania na 6 sekúnd. Pre zariadenie so zabudovanými CO₂ senzormi taktiež začleňuje korekciu pre zníženie účinkov krížovej citlivosti k CO₂.

- CO₂ senzor je „bezrozptylový, infračerveného“ typu (NDIR). Pretože tento typ senzoru má veľkú závislosť od teploty plynu, software CheckPoint II poskytuje pokročilú kompenzáciu teploty, ktorá je výrobcom nakalibrovaná pre každé zariadenie zvlášť.

Obidva senzory sú teplotne i tlakovo kompenzované v software, avšak teplotná kompenzácia vyžaduje po určitú dobu vnútornú stabilizáciu.

V súvislosti so špecifikáciami má O₂ senzor dobu odozvy (T95) 6 sekúnd. To znamená, že pri nepretržitom meraní v oblastiach s veľkým rozdielom v koncentrácii O₂, zariadenie dosiahne v priebehu prvého merania (6 sekúnd) minimálne 95 % „skutočnej“ hodnoty.

V dôsledku kríženej citlivosti O₂ senzoru k CO₂ sa pre získanie presnejších výsledkov musí manuálne nahradiť snímanou hodnotou pomocou príslušného korekčného faktoru.

Matematicko-štatistické vyhodnotenie výsledkov

Štatistické vyhodnotenie výsledkov sme uskutočnili pomocou programu *Tanagra 1.4.43*. Na základe parametrov, ktoré vyplývajú z našich výsledkov, sme zvolili neparametrický štatistický Kruskal-Wallisov test.

Kruskal-Wallisov test

- je neparametrická metóda, ktorá je alternatívou jednosmernej ANOVA metódy,
- je rozšírením Mann-Whitneyho testu na tri alebo viac vzoriek (v prípade dvoch vzoriek sú ekvivalentné) a predstavuje neparametrickú alternatívu jednofaktorovej analýzy rozptylu,
- cieľom testu je odhaliť, či vo vzorke zistené rozdiely mediánov jednotlivých skupín (podľa úrovne faktora) sú štatisticky významné (medzi premennými je vzťah) alebo môžu byť iba náhodné (medzi premennými nie je vzťah).

Testuje sa nulová štatistická hypotéza o rovnosti všetkých mediánov.

- Ak je *P*-hodnota nižšia ako zvolená hladina významnosti (tradične 5 % = 0,05), nulová hypotéza sa zamietne. Znamená to, že rozdiel medzi aspoň jednou dvojicou mediánov vypočítaných zo vzorky je príliš veľký na to, aby mohol byť iba dôsledkom náhodného výberu, je teda štatisticky významný – medzi premennými je vzťah.
- Ak je *P*-hodnota rovná alebo vyššia ako zvolená hladina významnosti, nulovú hypotézu nemožno zamietnuť. Znamená to, že rozdiel medzi každou dvojicou mediánov vypočítaných zo vzorky môže byť iba dôsledkom náhodného výberu, nie je teda štatisticky významný – medzi premennými nie je vzťah.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Po uskutočnení analýzy za modelových podmienok sme jednotlivé údaje zaznamenali, následne sme štatisticky vyjadrili aritmetický priemer a smerodajnú odchýlku z jednotlivých meraní.

Meraním obsahu zvyškových plynov O₂ a CO₂ v mäsových výrobkoch balených v modifikovanej atmosfére od výrobcov A, B, C, D a E v závislosti od teploty a času uskladnenia sme dospeli k záveru, že koncentrácie plynov O₂ a CO₂ v balení mäsových výrobkov v deň nákupu u všetkých výrobkoch koncentrácia CO₂ výrazne poklesla v porovnaní s pôvodným množstvom použitým pri balení, ktoré výrobca deklaroval. Pri porovnaní jednotlivých výrobkov v priebehu analýzy počas skladovania sme následne zaznamenali pri všetkých výrobkoch zvýšený výskyt koncentrácie CO₂. Na konci sledovaného obdobia u niektorých výrobkov dokonca tieto koncentrácie CO₂ prevyšovali pôvodnú koncentráciu udávanú výrobcom, ako napr. Dusená šunka a Pražská šunka od výrobcu B, Saláma šunková od výrobcu C. Pri týchto výrobkoch sme zaznamenali tiež zmenu senzorických vlastností, obal bol výrazne vydutý, konzistencia výrobkov bola vodnatá, obal zarosený a po otvorení obalu sme zaznamenali výrazný zápach. Koncentrácia O₂ počas sledovaného obdobia u výrobkoch nebola vo vyšších koncentráciách zaznamenaná, len v max. koncentrácii 0,2 %, aj to iba pri niektorých výrobkoch. Počas sledovaného obdobia sme u analyzovaných výrobkoch nespozorovali zmenu v pevnosti výrobkov, ako uvádzajú niektorí autori

a taktiež nebol zaznamenaný výrazný rozdiel medzi skladovaním výrobkov u 4 °C a 7 °C. Garcia et al. (2004) nezistili žiadne výrazné rozdiely vo farbe, textúre, senzorických a mikrobiálnych vlastnostiach medzi balením vo vákuu, 100 % N₂ alebo 20 % N₂ a 80 % CO₂ pri balenej suchej nakladanej šunke skladovanej v chlade. Rubio et al. (2006) uvádzajú, že podobné výsledky boli pozorované pri suchom konzervovanom hovädzom mäse "Cecina de Leon", ktoré bolo balené vo vákuu a pri 80 % CO₂ a 20 % N₂. Ale pri balení s použitím zmesi baliacich plynov pod 20 % CO₂ a 80 % N₂ bolo pri niektorých výrobkoch spozorované zhoršenie senzorických vlastností výrobkov.

Esturk a Ayhan (2009) uvádzajú, že spozorovali menšie rozdiely v pevnosti plátok salámy počas ich skladovania. Salámové pláty balené v atmosfére s použitím kompozície zmesi plynov 100 % N₂ alebo 50 % N₂ a 50 % CO₂ boli pevnejšie po 10 dňoch skladovania v porovnaní so vzorkami salámy balenými s použitím plynovej kompozície 21 % O₂ a 79 % N₂. Počas sledovaného obdobia sme v našich vzorkách nespozorovali zmenu v pevnosti výrobkov, taktiež nebol zaznamenaný výrazný rozdiel medzi skladovaním výrobkov u 4 °C a 7 °C.

Po štatistickom vyhodnotení získaných dát, sme dospeli k záveru, že medzi výrobcami A, B, C, D a E je štatisticky preukázateľný signifikantný rozdiel. Rozdiel pri skladovaní pri 4 a 7 °C bol štatisticky preukázateľný iba v prípade morčacej šunky od výrobcu D. U ostatných výrobkov je vplyv skladovania za rôznych podmienok štatistiky nepreukázateľný.

Tab. 2 Výsledky meraní CO₂ za rôznych podmienok skladovania

Výrobca	Druh mäsového výrobku	Koncentrácia CO ₂ (%) v balení deklarovaná výrobcom	Priemerná koncentrácia CO ₂ (%) zaznamenaná počas merania				
			1.meranie x ± sd	2. meranie x ± sd		3.meranie x ± sd	
				4 °C	7 °C	4 °C	7 °C
A	1. Morčacia šunka	20	7,66 ± 0,054772	8,42 ± 0,13038	7,2 ± 0,1	11,92 ± 0,16432	8,54 ± 0,08944
	2. ČABA saláma	20	16,54 ± 0,089443	14,54 ± 0,08944	14,8 ± 0,07071	14,84 ± 0,05477	11,06 ± 1,82839
B	1. Dusená šunka	20	11,8 ± 0,2	17,64 ± 0,74699	14,62 ± 0,04472	36,62 ± 0,16432	28,82 ± 0,08367
	2. Pražská šunka	20	10,02 ± 0,148324	16,54 ± 0,05477	14,02 ± 0,05477	51,26 ± 0,20736	19,16 ± 0,27019
C	1. Vysočina saláma	30	16,22 ± 0,04472	25,44 ± 0,53198	23,42 ± 1,60219	26,28 ± 0,29496	25,62 ± 0,10954
	2. Saláma šunková	30	10,46 ± 0,69138	11,14 ± 0,18166	4,46 ± 1,60094	13,52 ± 0,21679	36,86 ± 0,15166
D	1. Šunka dusená hydínová	30	15,18 ± 0,14832	24,2 ± 0,29155	23,28 ± 0,16432	24,3 ± 0,18708	22,08 ± 0,10955
	2. Morčacia šunka	30	16,72 ± 0,130384	23,98 ± 0,10955	23,86 ± 0,23022	24,12 ± 0,14832	21,28 ± 1,62080
E	1. Saláma MIX	30	14,92 ± 0,192354	17,46 ± 0,19494	13,96 ± 0,23022	14,0 ± 0,07071	15,62 ± 0,13038
	2. Saláma s chili	30	24,1 ± 0,17321	22,5 ± 0,1	20,68 ± 0,52631	22,86 ± 0,21909	28,5 ± 0,14142

x – aritmetický priemer, sd – smerodajná odchýlka

Tab. 3 Výsledky štatistického porovnania jednotlivých výrobcov

Porovnanie výrobcov		Štatistiké porovnanie jednotlivých meraní (P-hodnota)		
		1. meranie	2. meranie	3. meranie
A	B	0,000006	0,000003	0,000003
A	C	0,000006	0,000003	0,000004
A	D	0,000011	0,000004	0,000004
A	E	0,000006	0,000003	0,000003
B	C	0,000017	0,000003	0,000003
B	D	0,000006	0,000005	0,000004
B	E	0,000006	0,000004	0,000003
C	D	0,000006	0,000028	0,000004
C	E	0,000006	0,000003	0,000003
D	E	0,000010	0,000004	0,000004

ZÁVER

V súvislosti so zvyšujúcimi sa požiadavkami spotrebiteľov na bezpečnosť a kvalitu potravín a tiež na zachovanie čerstvosti potraviny sa dostávajú do popredia nové spôsoby balenia potravín. Takýmto spôsobom je aj balenie v modifikovanej atmosfére, čo znamená odstránenie a/alebo nahradenie atmosféry obklopujúcej produkt pred uzavretím. Všeobecne sa dnes na nahradenie atmosféry používajú tri typy plynov, ako oxid uhličitý, kyslík a dusík. Na základe získaných poznatkov získaných o problematike balenia potravín do modifikovanej atmosféry vyplývajú informácie, ktoré možno využiť na zlepšenie vlastností balených výrobkov do MAP, zlepšenie výberu obalových materiálov a určenie vhodnej kompozície zmesi plynov pre mäsové výrobky.

Balenie mäsových výrobkov do modifikovanej atmosféry by sme doporučili inovovať doplnením s využitím ďalších systémov balenia ako použitím:

- indikátorov zloženia atmosféry,
- indikátorov teploty,
- a absorbérmi kyslíka.

LITERATÚRA

Brosche, J. 2005. Sledovanie kvality výrobkov balených do ochrannej atmosféry. *Bezpečnosť a kontrola potravín - Zborník prác z medzinárodnej vedeckej konferencie*. SPU : Nitra, p. 17-22, ISBN 80-8069-503-2.

Esmer, O. K., Irkin, R., Degirmencioglu, N., Degirmencioglu, A. 2010. The effects of modified atmosphere gas composition on microbiological criteria, color and oxidation values of minced beef meat. *Meat Science*, vol. 88, no. 2011, p. 221-226. <http://dx.doi.org/10.1016/j.meatsci.2010.12.021> PMID:21269781

Esturk, O., Ayhan, Z. 2009. Effect of modified atmosphere packaging and storage time on physical and sensory properties of sliced salami. *Journal of Food Processing and Preservation*, vol. 33, no. 1, p. 114-125. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1745-4549.2008.00317.x>

Garcia-Esteban, M., Ansorena, D., Astiasaran, I. 2004. Comparison of modified atmosphere packaging and vacuum packaging for long period storage of dry-cured ham: Effects on color, texture and microbiological quality. *Meat Sci.* vol.

67, no.1, p. 57-63. <http://dx.doi.org/10.1016/j.meatsci.2003.09.005> PMID:22061116

Koutsoumanis, K. A., Stamatiou, A. P., Skandamis, P., Nychas, G. J. E. 2006. Development of a microbial model for the combined effect of temperature and pH on spoilage of ground meat, and validation of the model under dynamic temperature conditions. *Applied and Environmental Microbiology*. vol. 72, no.1, p. 124-134. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.72.1.124-134.2006> PMID:16391034

Mullan, M., McDowell, D. 2011. Modified Atmosphere Packaging, *In Food and Beverage Packaging Technology*, Second Edition. Wiley-Blackwell : Oxford, UK, p. 44, ISBN 978-1-4051-8910-1. <http://dx.doi.org/10.1002/9781444392180.ch10>

Nollet, L. M. L., Toldrá, F. 2006. Modified atmosphere packaging. *Advanced Technologies for Meat Processing*, p. 424, ISBN 157444587.

Robertson, G. L. 2005. Food Packaging – Principle and Practice. Taylor and Francis Ltd, p. 313-331. PMID:16482707

Rubio, B., Martinez, B., Gonzalez-Fernandez, C., Garciaachan, M. D., Rovira, J., Jaime, I. 2006. Influence of storage period and packaging method on sliced dry cured beef “Cecina de Leon”: Effects on microbiological, physicochemical and sensory quality. *Meat Sci.* vol.74, no.4, p. 710-717. <http://dx.doi.org/10.1016/j.meatsci.2006.06.002>

Szemes, V., Kováč, M., Šinková, T. 2004. Označovanie prídavných látok v potravinách. *Význame sa v E-čkach*. 1. vyd. Bratislava: PROMP, p. 40-63. ISBN 80-968366-8-4.

Švejnoha, J. 2009. Balím, balíš, balíme. *Potravinárska revue*, no. 6., p. 26. <http://dx.doi.org/10.1016/j.meatsci.2003.09.005> PMID:22061116

Contact address:

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: jozef.capla@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. Jozef Čurlej, 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: jojonr@zoznam.sk

Ing. Lubomír 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. 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

HOP PELLETS AS AN INTERESTING SOURCE OF ANTIOXIDANT ACTIVE COMPOUNDS

Andrea Holubková, Silvia Mošovská, Barbora Baloghová, Ernest Šturdík

ABSTRACT

Hop is a plant used by humankind for thousands of years. This plant is one of the main and indispensable raw materials for the beer production. It is used for various dishes preparation in the cuisine. Hop is also used to inhibit bacterial contamination. The hop extracts are used for its sedative, antiseptic and antioxidant properties in medicine, as a part of many phytopharmaceuticals. The present paper have focused on the extraction of polyphenolic compounds from 4 samples of hop pellets varieties of Aurora, Saaz, Lublin and Saphir, on the analyzing of bioactive substances (polyphenolics and flavonoids) in prepared extracts and on the determination of antioxidant activity. The highest content of polyphenolic substances was determined in the sample Lublin (153.06 mg gallic acid (GAE)/g) and Saaz (151.87 mg GAE/g). The amount of flavonoids in the samples was descending order Saaz > Saphir > Aurora > Lublin. Hops, as plant, is known by high content of antioxidant active substances. Antioxidant activity was determined using three independent spectrophotometric methods, radical scavenging assays using 2,2'-azino-bis-3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid (ABTS) and 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical and ferric reducing antioxidant power (FRAP). The sample Aurora showed the highest ability to scavenge of ABTS radical cation. Antioxidant activity continued to decline in a row Saphir > Lublin > Saaz. The same trend was also observed by using the FRAP assay. The most effective DPPH radical scavenging activity had the sample Saaz a Saphir ($p > 0.05$).

Keywords: hop; extraction; polyphenols; flavonoids; antioxidant activity

ÚVOD

Za pôvodcu mnohých civilizačno-degeneratívnych ochorení ako je napr. rakovina, ateroskleróza, ateros cerebrovaskulárne ochorenia, diabetes, reumatoidná artritída, neurodegeneratívne ochorenia a ďalšie sa považuje oxidačný stres (Fang et al., 2002; Pšenáková et al., 2010).

Pod pojmom oxidačný stres sa rozumie porušenie rovnováhy oxidant-antioxidant, ktoré je spôsobené relatívnym alebo absolútnym nedostatkom antioxidantov v organizme a nadbytkom voľných radikálov (Avignon et al., 2012). Oxidačný stres spôsobuje chronické poškodenie buniek, fyziologické disfunkcie a patologické zmeny, ktoré v organizme môžu vyústiť do vyššie spomínaných ochorení a v najhoršom prípade vedú až k smrti. Oxidačný stres spôsobuje oxidačné zmeny v molekulách DNA, bielkovín, proteínov a sacharidov (Avignon et al., 2012; Slavin, 2000).

V súvislosti s oxidačným stresom je potrebné zadefinovať taktiež pojem antioxidant a voľný radikál. Voľné radikály, označované aj ako reaktívne formy kyslíka (ROS), sú definované ako molekuly, ktoré majú vo svojej valenčnej vrstve nespárený elektrón, preto sú veľmi reaktívne a krátkožijúce intermediáty. Pôsobia ako iniciátory oxidačných reťazových reakcií (Palmieri a Sblendorio, 2007). Prehľad jednotlivých ROS spolu s ich

prirodzenými ochrannými antioxidantnými mechanikami je zhrnutý v Tab. 1. Z chemického hľadiska sa za antioxidant môže považovať každá látka, ktorá zabráni oxidácii inej zlúčeniny reaktívnym metabolitom (oxidantom) tým, že sa sama prednostne oxiduje. Chráni organizmus pred účinkom voľných radikálov (Gulcin a Hujut, 2010).

Z biologického hľadiska je antioxidant taká zlúčenina, ktorá v malej koncentrácii v reakcii s reaktívnym metabolitom tvorí relatívne stabilné a netoxické produkty. Tým zabráni oxidácii cieľovej molekuly. Produkt reakcie oxidanta a antioxidanta by nemal spúšťať ďalšie radikálové reakcie, pri ktorých by sa tvorili nové voľné radikály a oxidované substráty (Mohammad et al., 2009; Ďuračková, 1998).

V súčasnosti sa pozornosť upriamuje najmä na prírodné antioxidanty ktoré sa do ľudského organizmu dostávajú prostredníctvom potravy, konkrétne ovocia, zeleniny, čajov prípadne rôznym rastlinných extraktov (Holst a Williamson, 2008). Do tejto skupiny patria kyselina askorbová, tokoferoly, karotenoidy a široké spektrum fytochemikálií, ako sú polyfenolové látky (flavonoidy a fenolové kyseliny) (Avignon et al., 2012).

Chmeľ (*Humulus lupulus*) je významným prírodným zdrojom antioxidantov. Je to dvojdomá rastlina (Obr. 1). Botanicky sa zaraďuje do čeľade konopovitých.

Tabuľka 1 Prehľad reaktívnych kyslíkových foriem a ich prirodzených antioxidantov (Houston, 2005)

Reaktívne formy kyslíka (ROS)	Antioxidačný ochranný mechanizmus
<i>Voľné radikály:</i>	<i>Enzymatické antioxidanty</i>
O ₂ ⁻	SOD-superoxiddismutáza
OH.	SOD
ROO.	2 O ₂ ⁻ + 2H ⁺ → H ₂ O ₂ + O ₂
RO.	KAT-kataláza
RS.	KAT
NO.	2 H ₂ O ₂ → O ₂ + H ₂ O
NO ₂ .	GTP-glutation peroxidáza
ONOO ⁻	GTP
CCl ₃ .	2GSHH ₂ O ₂ → GSSG + H ₂ O GSSG + NADPH + H ⁺ → 2GSH + NADP ⁺
	GR
	GR-glutation reduktáza
<i>Neradikálové ROS:</i>	<i>Neenzýmové antioxidanty</i>
H ₂ O ₂	Vitamin A
HOCl	Vitamin C
ONOO ⁻	Vitamin E
¹ O ₂	β-karotén, koenzým Q, flavonoidy

schopnosť pozitívnej regulácie krvného tlaku a hladiny glukózy v krvi (Pšenáková 2010; Piendl a Biendl, 2000).

Na potravinárske, resp. pivovarnícke účely sa používajú iba samičie rastliny, pričom sa využívajú chmeľové hlávky. Jednotlivé odrody chmeľu sa líšia kvalitatívnymi vlastnosťami. Najdôležitejšími zložkami chmeľu sú chmeľové živice, polyfenolové látky a silice (Tab. 2), ktoré sú rozhodujúce pre kvalitu chmeľu a jeho ďalšie technologické spracovanie. Všetky odrody sú však známe z hľadiska vysokého obsahu chmeľových živíc, z ktorých významné sú predovšetkým α- a β-horké kyseliny. α-horké kyseliny sa skladajú z troch hlavných zložiek – humulon, adhumulon a kohumulon. Analógmi β-horkých kyselín sú lupulon, adlupulon a kolupulon. V jednotlivých odrodách je podiel α- a β-horkých kyselín rôzny a sú značné aj rozdiely v obsahu a zložení silíc a polyfenolov (Zanoli a Zavatti, 2008).

Tabuľka 2 Priemerné chemické zloženie sušených chmeľových hlávok (Kosař a Procházka, 2000)

Látka	Obsah (%)
Voda	8-12
Celkové živice	15-20
Polyfenolové látky	2-6
Silice	0,2-2,5
Lipidy a vosky	1-3
Dusíkaté látky	12-15
Sacharidové látky	40-50
Minerálne látky	6-8



Obrázok 1 Chmeľ otáčavý (*Humulus lupulus*)

Biologicky aktívne zlúčeniny chmeľu vykazujú širokú škálu pozitívnych účinkov, ku ktorým možno zaradiť: antimutagénne, antikarcinogénne, antimikrobiálne, protizápalové a antitrombotické vlastnosti. Majú taktiež

Chmeľove silice sú zmesou organických látok prevažne terpenického charakteru. Rozlišuje sa uhľovodíková frakcia prevažujúca v čerstvom chmeľi, kyslíková frakcia vznikajúca počas zrenia, spracovania a skladovania chmeľu a frakcia sírnych zlúčenín prítomná len v nepatrnom množstve. V uhľovodíkovej frakcii prevažujú terpenické uhľovodíky myrcen, humulen, karyofylen a niektorých odrôd aj farnasen. Prchavé zložky uhľovodíkovej frakcie silíc sú pôvodcom chmeľovej arómy (Kosař a Procházka, 2000).

Polyfenolové látky chmeľu zahŕňajú bohatú zmes s prevažným podielom flavonových glykozidov (kempferol, kvercetín, rutín), antokyanogénov, katechínov a voľných fenolových kyselín. Zo skupiny fenolových kyselín chmeľ obsahuje najmä deriváty kyseliny hydroxybenzoovej, prevažne kyselinu kávovú, ferulovú, kumarovú, škoricovú, vanilovú, chlorogenovú a gentisovú. Tieto prispievajú ku tvorbe farby piva (Gerhäuser, 2005).

Chmeľ je veľmi významným zdrojom prenylflavonoidov. Xantohumol je štrukturálne jednoduchý prenylovaný chalkón, ktorý sa vyskytuje iba v rastline chmeľu. Na xantohumol a aj ďalšie prenylované flavonoidy sa upriamuje pozornosť v oblasti medicíny a zdravotníctva (Stevens a Page, 2004). Výsledky mnohých in vitro štúdií poukazujú na významné biologické účinky týchto látok: inhibíciu rastu karcinogénnych buniek prsníka, inhibíciu cytochrómom P450 sprostredkovanej aktivácie prokarcinogénov, indukciu činnosti karcinogén-detoxifikačných enzýmov, antimikrobiálnu aktivitu. Ďalším významným prenylflavonoidom vyskytujúcim sa

v chmeli je 8-prenylaringenin, ktorý predstavuje doposiaľ najsilnejší izolovaný fytoestrogén (He et al., 2005).

Chmeľ sa kvôli predĺženiu a zjednodušeniu skladovateľnosti upravuje rôznymi mechanickými postupmi. Najrozšírenejšími produktmi tejto skupiny sú granulované prípravky vyrobené zo sušeného hlávkového chmeľu tzv. chmeľové pelety. Chmeľové pelety typu 90 a 45 predstavujú najväčší podiel chmeľových výrobkov. Chmeľové pelety tohto typu sa vyrábajú z predsušeného rozomletého hlávkového chmeľu tlakovou granuláciou pri zvýšenej teplote. Typ 45 znamená že zo 100 kg chmeľu sa vyrobí 45 kg granulí. Ďalej sú známe aj chmeľové produkty vyrobené inými fyzikálnymi úpravami. Do tejto skupiny sa zaraďujú etanolové extrakty, CO₂ extrakty, preparáty z chmeľových silíc. Existuje aj 3. skupina, a to produkty z chmeľu vyrobené chemickými úpravami – izoextrakty, izopelety a redukované izo- α -horké kyseliny (Prugar, 2008).

MATERIÁL A METÓDY

Na analýzy boli použité extrakty z granulovaných chmeľov vo forme chmeľových peliet Typ 45 odrôd (rok zberu chmeľu 2010) *Aurora*, *Saaz*, *Lublin* a *Saphir*. Vzorky chmeľových peliet boli získané z významného slovenského pivovaru.

Príprava extraktov z chmeľových peliet

Prvým dôležitým krokom pri príprave extraktov bolo odstránenie éterického podielu z chmeľových peliet. Ku 150 g peliet sme pridali 1 l destilovanej vody a obsah banky sme destilovali s vodnou parou. Vydestilovali sme 500 ml destilátu, ktorý sme následne vysolili s NaCl a kontinuálne extrahovali n-hexánom. Po extrakcii sme organickú fázu zahustili na rotačnej vákuovej odparke a uskladnili v chladničke.

Zvyšok po destilácii chmeľových peliet s vodnou parou sme spracovávali ďalej. Ku 100 g zelenej hmoty (destilačného zvyšku) sme pridali 400 ml 80 %-ného acetónu a extrahovali pod refluxom v dvoch stupňoch. Obidva stupne extrakcie sme následne zahustili na rotačnej vákuovej odparke. Na odstránenie zvyškového podielu éterického oleja z extraktu sa tento v ďalšom stupni destiloval s vodnou parou. Destilačný zvyšok sme kontinuálne preextrahovali etylacetátom a vodnú fázu sme zahustili do sucha. Posledným krokom bola kryštalizácia z metanolu. Pre nasledujúce analýzy boli kryštalické produkty rozpustené vo vode.

Stanovenie množstva celkových fenolov

Bolo uskutočnené spektrofotometrickou metódou pomocou Folin-Ciocalteuovho činidla (Yu a Haley, 2004). K 0,1 ml extraktu sme napipetovali 0,5 ml Folin-Ciocalteuovho činidla. Po troch minútach bolo pridaných 1,5 ml 20 %-ného uhlíčanu sodného a roztok bol doplnený destilovanou vodou na 10 ml. Presne po 2 hodinách sme zmerali absorbanciu pri 765 nm. Výsledok bol vyjadrený v mg kyseliny gálovej (GAE)/g vzorky.

Stanovenie flavonoidov

Množstvo flavonoidov bolo stanovené podľa práce Krefte et al. (2002) metódou využívajúcou AlCl₃. K 0,5 ml

extraktu sme napipetovali 1,5 ml vody a 0,2 ml 5 %-tného roztoku AlCl₃. Presne po 30 min bola zmeraná absorbancia pri 420 nm. Množstvo flavonoidov sme vyjadřili ako mg rutínu/g vzorky.

Meranie antioxidačnej aktivity DPPH testom

Pri realizácii DPPH testu sme postupovali podľa Yen a Chen (1995) s miernou modifikáciou. Na stanovenie bolo napipetovaných 0,25 ml extraktu, 1,5 ml vody a 0,5 ml DPPH radikálu a po 10 minútach sme zmerali absorbanciu pri 517 nm. Výsledná antioxidačná aktivita bola vyjadřená hodnotou IC 50 (mg/ml), čo je koncentrácia spôsobujúca 50 %-tnú inhibíciu radikálov prítomných v reakčnej zmesi.

Meranie antioxidačnej aktivity ABTS testom

Antioxidačná aktivita stanovená ABTS testom bola realizovaná podľa Re et al. (1999). K 2 ml ABTS⁺ sme pridali 0,05 ml extraktu a merali celé spektra v rozsahu od 400 do 1100 nm v priebehu 10 minút v minútových intervaloch. Pre výpočet poklesu absorbancie sme vybrali hodnotu absorbancie v desiatej minúte (730 nm). Výsledok bol vyjadřený ako v prípade DPPH testu hodnotou IC 50.

Meranie antioxidačnej aktivity FRAP testom

Pri meraní antioxidačnej aktivity touto metódou sme postupovali podľa práce Niemeyer a Metzler (2003). K 0,06 ml vzorky bolo pridaných 0,18 ml vody a 1,8 ml FRAP reagentu. Po 30 minútach sme zmerali absorbanciu pri 595 nm. Antioxidačná aktivita bola vyjadřená ako v predchádzajúcich dvoch prípadoch.

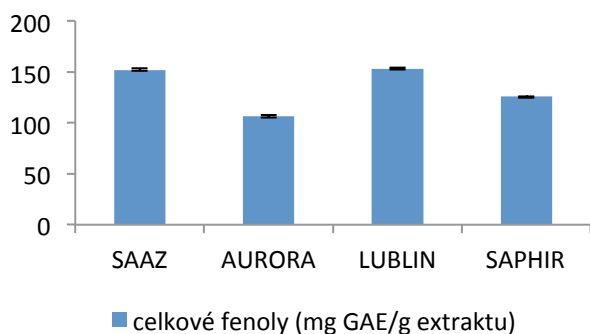
VÝSLEDKY A DISKUSIA

Polyfenoly sú významnou skupinou biologicky aktívnych látok rastlinného materiálu. Preukazujú antioxidačné, antimutagénne, antivirové a protizápalové vlastnosti (Vollmannová et al., 2006). Ďalej sa vyznačujú širokou škálou zdraviu prospešných vlastností. V posledných rokoch sa upriamuje pozornosť na ich protektívne účinky v rámci kardiovaskulárnych ochorení, niektorých typov rakoviny, stimulácie imunitného systému, modulácie detoxifikačných enzýmov, zmien v metabolizme cholesterolu a steroidných hormónov, znižovania krvného tlaku a zlepšovania endotelových vaskulárnych funkcií (Robles-Sardin et al., 2011).

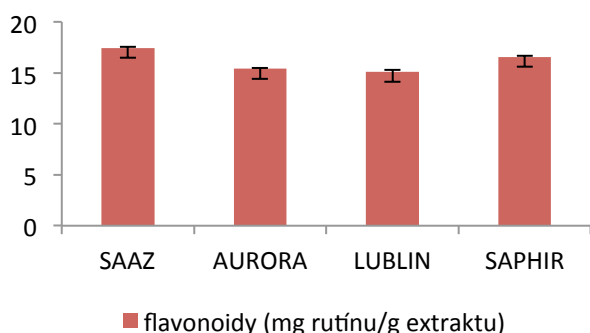
Množstvo celkových fenolov v nami sledovaných extraktoch získaných z chmeľových peliet bolo stanovené spektrofotometrickou metódou pomocou Folin-Ciocalteuovho činidla. Výsledok bol prepočítaný na štandard – kyselinu galovú a vztiahnutý na g suchej vzorky. Najvyšší obsah fenolov (Obr. 2) bol stanovený vo vzorke *Lublin*, v množstve 153,06 mg GAE/g, a *Saaz* 151,87 mg GAE/g ($P > 0,05$). Ďalej klesal obsah celkových fenolov v poradi *Saphir* > *Aurora*.

Jednou z hlavných skupín polyfenolických látok sú flavonoidy, ktoré sme stanovili metódou s AlCl₃. Výsledok bol vztiahnutý na štandard – rutín a prepočítaný na g suchej vzorky. Ich množstvo klesalo v rade *Saaz* (17,46 mg rutínu/g) > *Saphir* (16,58 mg rutínu/g) > *Aurora* (15,41 mg rutínu/g) ~ *Lublin* (15,13 mg rutínu/g).

Porovnanie množstva flavonoidov v jednotlivých vzorkách je znázornené na Obr.3.



Obrázok 2 Porovnanie celkového obsahu fenolov vo vzorkách štyroch typov chmeľových peliet



Obrázok 3 Porovnanie celkového obsahu flavonoidov vo vzorkách chmeľových peliet

Antioxidačné vlastnosti jednotlivých extraktov sme sledovali troma nezávislými spektrofotometrickými metódami, ABTS, DPPH a FRAP testom.

ABTS (ABTS - 2,2-azinobis-3-etylénbenzotiazolín-6-sulfónová kyselina) test je spektrofotometrická metóda, ktorá je založená na reakcii ABTS⁺ s antioxidantami nachádzajúcimi sa vo vzorke. Antioxidačnú aktivitu sme sledovali ako pokles absorpcie reakčnej zmesi pri 730 nm. Zmenu absorpcie získanú z rozdielu absorpcií pre ABTS⁺ bez a s prídavkom antioxidantu sme prepočítali na hodnotu IC 50 v mg.ml⁻¹. Najvyššiu schopnosť zhášať ABTS⁺ preukázala vzorka Aurora, pričom antioxidačná aktivita ďalej klesala v poradí Saphir > Lublin > Saaz. Výsledky merania antioxidačnej aktivity sú sumarizované v Tab.3.

Tabuľka 3 Antioxidačná aktivita sledovaných extraktov stanovená troma nezávislými spektrofotometrickými metódami (ABTS, DPPH a FRAP test) vyjadrená hodnotami IC 50

	IC 50 mg.ml ⁻¹		
	ABTS test	DPPH test	FRAP test
<i>Saphir</i>	0,85	1,16	0,78
<i>Aurora</i>	0,99	1,00	0,84
<i>Lublin</i>	0,53	0,74	0,68
<i>Saaz</i>	0,50	1,24	0,62

Ďalšou spektrofotometrickou metódou použitou na stanovenie antioxidačnej aktivity bol FRAP test, ktorý je založený na princípe redoxnej reakcie a spočíva v schopnosti antioxidantov redukovať Fe³⁺ (TPZ-Fe³⁺-2,4,6-tri(2-pyridyl-1,3,5-triazín) na Fe²⁺ (TPZ-Fe²⁺-2,4,6-tri(2-pyridyl-1,3,5-triazín) (Niemeyer a Metzler, 2003). Namerané výsledky ukázali rovnaký trend ako bol pozorovaný pri ABTS metóde.

DPPH test je spektrofotometrická metóda založená na schopnosti voľného radikálu 1,1-difenyl-2-pikrylhydrazylu (DPPH) reagovať s antioxidantami, ktoré sú donormi vodíka. Pri reakcii radikálu s antioxidantom dochádza k redukcii radikálu na DPPH-H, čo je sprevádzané odfarbením reakčnej zmesi a teda znížením absorpcie (Yen a Chen, 1995). Pokles hodnoty absorpcie sme merali po desiatich minútach v dvoch paralelných meraniach a výsledok bol vyjadrený hodnotami IC 50. Najúčinnějšími vzorkami boli extrakty Saaz a Saphir, medzi ktorými nebol zistený štatisticky významný rozdiel (P > 0,05). Antioxidačný potenciál ďalej klesal v poradí Aurora > Lublin.

ZÁVER

Z pohľadu technologicky významných látok chmeľ obsahuje chmeľové živice, silice a polyfenoly. V posledných rokoch na chmeľ upriamuje pozornosť aj farmaceutický priemysel. Dôvodom je vysoký obsah bioaktívnych látok, ktoré sa vyznačujú protizápalovými, antibakteriálnymi, chemoprotektívnymi účinkami a ďalšími pozitívnymi vlastnosťami. Jedná sa najmä o prenylflavonoidy, xantohumul ale aj α-horké kyseliny. Vďaka týmto látkam je chmeľ súčasťou mnohých fytofarmakologických prípravkov.

Taktiež naše analýzy poukázali na značný obsah polyfenolových látok, flavonoidov v extraktoch získaných z chmeľových peliet a ich antioxidačný potenciál. Výsledky naznačili, že chmeľové pelety by mohli byť zaujímavým potenciálnym zdrojom zlúčenín s biologickou aktivitou. Avšak je potreba ďalšieho testovania, čo bude predmetom nasledujúcej práce.

LITERATÚRA

- Avignone, A., Hokayem, M., Bisbal, C., Lambert, K. 2012. Dietary antioxidants: Do they have a role to play in the ongoing fight against abnormal glucose metabolism?. *Nutrition*, vol. 28, no. 7-8, p. 715-721. <http://dx.doi.org/10.1016/j.nut.2012.01.001> PMID:22571840
- Ďuračková, Z. 1998. Voľné radikály a antioxidanty v medicíne I. 1th ed. Bratislava. Slovak Academic Press, 285 p., ISBN 80-88908-11-6
- Fang, Y. Z., Yang, S., Wu, G. 2002. Free Radicals, Antioxidants, and Nutrition. *Nutrition*, vol. 18, no. 10, p. 872-879. [http://dx.doi.org/10.1016/S0899-9007\(02\)00916-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0899-9007(02)00916-4) PMID:12361782
- Gerhäuser, C. 2005. Beer constituents as potential cancer chemopreventive agents. *European Journal of Cancer*, vol. 41, no. 13, p. 1941-1954. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejca.2005.04.012> PMID:15953717
- Gulcin, I., Hujut, Z., Elmastas, M., Aboul-Enein H. Y. 2010. Radical scavenging and antioxidant activity of tannic

- acid. *Arabian Journal of Chemistry*, vol. 3, no. 1, p. 43-53. <http://dx.doi.org/10.1016/j.arabjc.2009.12.008>
- He, G., Xiong, H., Chen, Q., Ruan, H., Wang, Z., Traoré, L. 2005. Optimization of conditions for supercritical fluid extraction of flavonoids from hops (*Humulus lupulus* L.). *Journal of Zhejiang University Science*, vol. 6, no. 10, p. 999-1004. <http://dx.doi.org/10.1631/jzus.2005.B0999> PMID:16187413
- Holst, B., Williamson, G. 2008. Nutrients and phytochemicals: from bioavailability to bioefficacy beyond antioxidants. *Current Opinion in Biotechnology*, vol. 19, no. 2, p. 73-82 <http://dx.doi.org/10.1016/j.copbio.2008.03.003> PMID:18406129
- Houston, M. C. 2005. Nutraceuticals, Vitamins, Antioxidants, and Minerals in the Prevention and Treatment of Hypertension. *Nutraceuticals and Hypertension*, vol. 47, no. 6, p. 396-449.
- Kosař, K., Procházka, S. 2000. Technologie výroby sladu a piva. 1. vyd. Praha: Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, 398 p. ISBN 80-902658-6-3.
- Kreft, S., Štrukelj, B., Gaberščik, A., Kreft, I. 2002. Rutin in buckwheat herbs grown at different UV-B radiation levels: comparison of two UV spectrophotometric and an HPLC method. *Journal of Experimental Botany*, vol. 53, no. 375, p. 1801-1804. <http://dx.doi.org/10.1093/jxb/erf032> PMID:12147730
- Mohammad, M., Dar, A., Soomro, T. M., Tarig, M., Latif, M. 2009. Antioxidants / antioxidative agents and superoxide: An electrochemical monitoring device. *International Journal of Genetics and Molecular Biology*, vol. 1, no. 6, p. 105-114.
- Niemeyer, H. B., Metzler, M. 2003. Differences in the antioxidant activity of plant and mammalian lignans. *Journal of Food Engineering*, vol. 56, no. 2, p. 255-256. [http://dx.doi.org/10.1016/S0260-8774\(02\)00263-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0260-8774(02)00263-7)
- Palmieri, B., Sblendorio, V. 2007. Oxidative stress tests: overview on reliability and use Part II. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, vol. 11, no. 6, p. 383-399.
- Piendl, A., Biendl, M. 2000. Physiological significance of polyphenols and hop bitters in beer. *Brauwelt International*, vol. 18, no.4, p. 310-317.
- Prugar, J. 2008. Kvalita rastlinných produktu na Prahu 3. tisíciletí. Výskumný ústav pivovarský a sladařský, Praha, ISBN 978-80-86576-28-2.
- Pšenáková, I., Hetešová, L., Nemeček, P., Faragó, J., Kraic, J. 2010. Genotype and seasonal variation in antioxidant activity of hop extracts. *Agriculture*, vol. 56, no. 4, p. 106-113.
- Re, R., Pellegriny, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Evans, C. R. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 26, no. 9, p. 1231-1237. [http://dx.doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00315-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3)
- Robles-Sardin, A., Verónica, A., Aguilar, G. A. G., Rosa, L. A. 2011. Flavonoids and Their Relation to Human Health. Rosa L. A. et al. *Fruit and Vegetable Phytochemicals*. Blackwell Publishing, 1.ed, p. 155-175, ISBN-13: 978-0-8138-0320-3
- Slavin, J. L. 2000. Whole grains, refined grains and fortified refined grains: What's the difference? *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, vol. 9, no. S1, p. 23-27. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1440-6047.2000.00171.x>
- Stevens, J. F., Page, J. E., 2004. Xanthohumol and related prenylflavonoids from hops and beer: to your good health. In *Phytochemistry*, vol. 65, no. 10, p. 1317-1330. <http://dx.doi.org/10.1016/j.phytochem.2004.04.025> PMID:15231405
- Vollmannová, A., Tomáš, J., Tóth, T. 2006. Bioflavonoidy v strukovinách, ich komponentná skladba a metódy stanovenia. *Výživa a technologická kvalita rastlinných produktov a ich potravinárske využitie*, vyd.1, Slovenské poľnohospodárska univerzita v Nitre, p. 41-48, ISBN 80-8069-780-9.
- Yen, G. CH., Chen, H. Y. 1995. Antioxidant activity of various tea extracts in relation to their mutagenicity. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, vol 43, no. 1, p. 27-32. <http://dx.doi.org/10.1021/jf00049a007>
- Yu, L., Haley, S., Perret, J., Harris, M. 2004. Comparison of wheat flours grown at different locations for their antioxidant properties. *Food Chemistry*, vol. 86, no. 1, p. 11-16. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2003.08.037>
- Zanoli, P., Zavatti, M. 2008. Pharmacognostic and pharmacological profile of *Humulus lupulus* L. *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 116, no. 3, p. 383-396. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2008.01.011> PMID:18308492

Acknowledgments:

The work was financially supported by the Agency of the Ministry of Education, Science, Research and Sport of the Slovak Republic for the Structural Funds of EU, within the frame of the Project „Evaluation of natural substances and their selection for prevention and treatment of lifestyle diseases” (ITMS 26240220040).

Contact address:

Andrea Holubková, Slovak University of Technology, Faculty of Chemical and Food Technology, Department of Nutrition and Food assesment, Radlinského 9, 812 37 Bratislava E-mail: andrea.holubkova@stuba.sk.

Silvia Mošovská, Slovak University of Technology, Faculty of Chemical and Food Technology, Department of Nutrition and Food assesment, Radlinského 9, 812 37 Bratislava E-mail:silvia.mosovska@stuba.sk.

Ernest Šturdík, Slovak University of Technology, Faculty of Chemical and Food Technology, Department of Nutrition and Food assesment, Radlinského 9, 812 37 Bratislava E-mail:ernest.sturdik@stuba.sk.

Barbora Baloghová, Slovak University of Technology, Faculty of Chemical and Food Technology, Department of Nutrition and Food assesment, Radlinského 9, 812 37 Bratislava E-mail: xbaloghovab@is.stuba.sk

EXPOSURE AND RISK ASSESSMENT OF STAPHYLOCOCCUS AUREUS IN FOOD CHAIN IN SLOVAKIA

Eubomír Valík, Alžbeta Medved'ová

ABSTRACT

Foods can be contaminated by *S. aureus* usually as a result of unhygienic behaviour of staff or improperly conducted technological procedures. Compared to saprophytic bacteria, *S. aureus* does not possess significant competitive properties; however its epidemiological potential consists in multiplication to density higher than 10^6 cfu/g and formation of heat-resistant enterotoxins by which it causes food poisoning. Based on the data in 2001, the risk was characterized as follows: *S. aureus* is almost ubiquitous in ewes' milk. It is likely that it can increase its numbers by more than 3 log cfu/g and exceed the densities from 10^5 - 10^6 cfu/g for a short period, particularly at farm conditions. It is unlikely that it can succeed in competition with active lactic acid bacteria when they are present in higher numbers in ewes' milk. While exposure of *S. aureus* through consumption of lump ewes' cheese made from raw milk is high, its consequences are mild and severity may be assessed as negligible. The overall risk is considered as low. A kind of confirmation provides the official incidence of staphylococcal poisoning which is 0.02 per 100,000 populations (lower than the EU average of 0.06/100,000).

Keywords: *S. aureus*; exposure assessment; risk characterization

ÚVOD

Podľa údajov Európskeho úradu pre bezpečnosť potravín (EFSA a ECDPC, 2012) o ochoreniach z kontaminovaných potravín za rok 2010 Slovenská republika zaujala v kategórii najčastejšie sa vyskytujúcich ochorení (salmonelóza, kamylobakteriáza) jedno z popredných miest. Problematický bol negatívny trend v incidencii kamylobakteriáz (v chorobnosti udávanej ako počet prípadov/100 000 obyvateľov) prejavujúci sa od roku 2008. Chorobnosti na kamylobakteriázy a salmonelózy na Slovensku boli vyššie, ako priemer EÚ.

Vzhľadom na zvyšujúci sa dopyt obyvateľov po minimálne opracovaných potravinách, na snahu po domácky vyrábať viaceré potraviny z tepelne neopracovaných surovín, na aktivity potravinársky nevzdelaných pracovníkov v potravinovom reťazci, prípadne neodborníkov s pochybnými úmyslami, je nevyhnutné aplikovať princípy analýzy rizika. Aby sme ich potenciál mohli využiť, je úplne prirodzené a legitímne zaoberať sa vedeckým hodnotením rizika, mikrobiologické hodnotenie rizika nevynechávajúc.

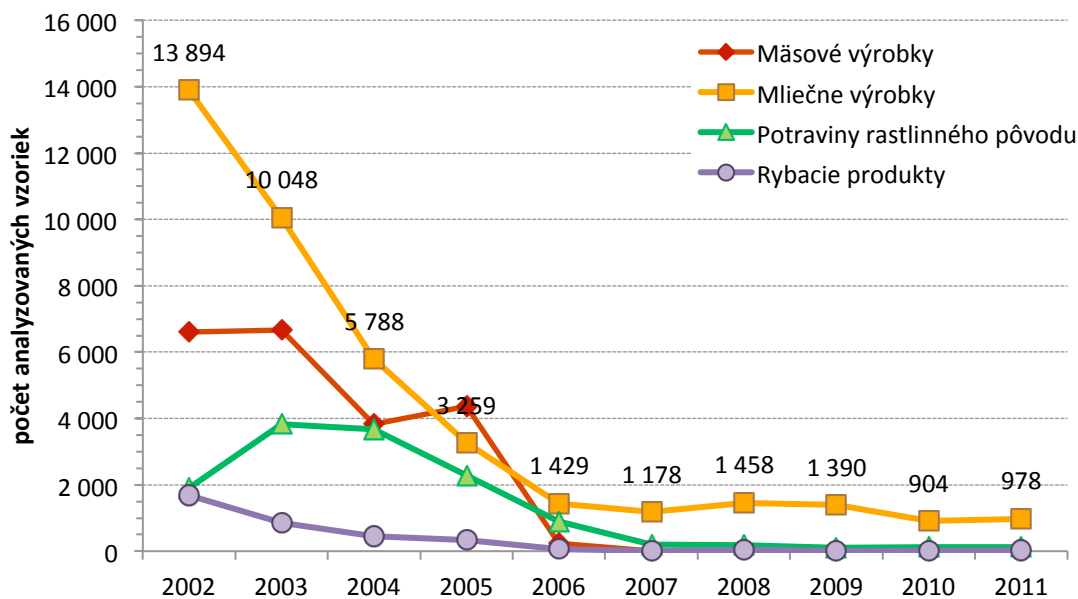
Jedným z hlavných mikrobiologických agens vyskytujúcich sa najmä v hotových jedlách a v potravinách živočíšneho pôvodu je aj *Staphylococcus aureus*. Výber tohto mikrobiologického agens ovplyvnila skutočnosť, že jeho správanie najmä v ovčom hrudkovom syre a v bryndzi z prediktívneho pohľadu máme na FCHPT STU spracované (Medved'ová a Valík, 2012).

Staphylococcus aureus sa prirodzene vyskytuje na pokožke a slizniciach človeka a nachádza aj vo viacerých surovinách živočíšneho pôvodu. Hotové jedlá a potraviny sa môžu týmto organizmom kontaminovať obyčajne v dôsledku nehygienického správania sa personálu alebo nesprávne vykonávaných technologických postupov výroby. V porovnaní s bežnými saprofytickými

baktériami sa nevyznačuje kompetitívnymi vlastnosťami. Napriek tomu jeho epidemiologický potenciál spočíva v pomnožení sa na denzity vyššie ako 10^6 KTJ/g a v tvorbe termostabilných enterotoxínov, prostredníctvom ktorých vyvoláva otravy (intoxikácie). Z tohto dôvodu je potrebné predísť rozmnožovaniu *S. aureus* v potravinách, predovšetkým v surových, ale aj v tepelne opracovaných s vysokým stupňom manuálnej manipulácie (Valík a Prachar, 2009).

Rast a rozmnožovanie *S. aureus*

Hoci *S. aureus* patrí medzi mezofilné baktérie, rastie v intervale 6,5 až 48 °C, s optimálnou teplotou 35-37 °C. Tieto kardinálne teploty boli v zásade potvrdené aj u našich izolátov *S. aureus* izolovaných z ovčieho hrudkového syra, pričom ich optimálna teplota sa pohybovala medzi 39 až 41 °C (Medved'ová at al., 2009). Oblasť teplôt, v ktorej *S. aureus* tvorí toxíny, je ohraničená 10 °C a 46 °C, s optimálnou oblasťou medzi 40-45 °C (Balaban a Rasooly, 2000). *S. aureus* je halotolerantný až mierne halofilný, osmotolerantný. Dobré sa rozmnožuje v potravinách s vysokým obsahom soli (7-10 %) a cukru (30-40%), až do hodnôt $a_w = 0,86 - 0,85$ (takmer 20 % NaCl, 50-60 % sacharózy). Tieto nízke minimálne hodnoty poukazujú na skutočnosť, že *S. aureus* rastie lepšie za aeróbnych podmienok, nakoľko za anaeróbných podmienok vyžaduje pre rast už ľahšie prístupnú vodu, a teda vyššiu hodnotu $a_w \geq 0,92$. Aktivita vody ovplyvňuje aj tvorbu stafylokokových enterotoxínov (SE). Optimálne hodnoty pre ich tvorbu sú obyčajne vyššie ako 0,90. Z práce Notermansa a Heuvelmana (1983) vyplynulo, napríklad, že tvorba SEA (stafylokokový enterotoxín A) a SED (stafylokokový enterotoxín D) bola zistená za podmienok dovoľujúcich rast *S. aureus*. SEB bol však produkovaný pri všetkých teplotách rastu len po $a_w 0,96$.



Obrázok 1 Počty analyzovaných vzoriek potravín na ukazovateľ *S. aureus* v období r. 2002-2011.

Pri a_w 0,93 nebol už vytvorený ani pri optimálnej teplote. Podobne aj tvorba SEC je určovaná spoločne teplotou a aktivitou vody. V potravinách so zníženou aktivitou vody pri aeróbnom raste je tvorba toxínov možná pri hodnotách a_w 0,89-0,86; jej optimum je pri hodnotách a_w 0,99 a vyšších (a_w 0,995). Za aeróbných podmienok je tvorba toxínov intenzívnejšia ako za anaeróbných; jej optimum je pri 5 až 20 % O_2 ; $E_h > 200$ mV. *S. aureus* dokáže rásť a rozmnožovať sa v rozmedzí pH 4,2 až 9,3 a optimum 7,0 až 7,5 (Valík a Prachar, 2009). Minimálna hodnota pH sa v literatúre uvádza medzi 4,0 až 4,5 (Jay at al., 2005; Notermans a van Hoeijová, 2008). Prirôdzená táto hodnota závisí od samotnej kyseliny, ktorou je nastavená, jej disociačnej konštanty, resp. pH hodnoty, ako aj od skutočnosti, či ostatné faktory prostredia sú optimálne. 0,1 % koncentrácia kyseliny octovej s hodnotou pH 5,1 už, napríklad, rast *S. aureus* inhibuje. Minimálne pH pre tvorbu toxínov je asi 4,8 a optimálne pri hodnote pH 6-7 (typ A pH 5,3-6,8). Aj v prípade pH je tvorba SEB viac ovplyvnená ako SEA.

Chorobnosť v Európskej únii a na Slovensku

Otravy stafylokokovými enterotoxínmi v Európskej únii v r. 2010 nahlásilo 14 štátov. Vyskytlo sa celkom 274 skupinových ochorení s celkovým počtom prípadov 2 796. Potvrdených bolo 941 otráv (takmer 14 %) a z nich bolo 189 ľudí hospitalizovaných (20 %). Úmrtia neboli zaznamenané (EFSA a ECDPC, 2012). Priemerná chorobnosť na stafylokokovú enterotoxikózu činila v Európskej únii 0,06/ 100 000 obyvateľov; na Slovensku bola nižšia 0,02/ 100 000 obyvateľov. Na Slovensku sa v r. 2011 zaznamenala jedna epidémia stafylokokovej enterotoxikózy, pričom ochorelo 9 ľudí. Zdrojom SEC bol ovčí syr. (MPRV SR, 2012).

Najrozsiahlejšia hromadná otrava zapríčinená toxínmi *S. aureus* bola v Japonsku v r. 2000. Celkovo bolo postihnutých 14 555 ľudí, z ktorých takmer 200 bolo prijatých do nemocničného ošetrovania. Zdrojom stafylokokových enterotoxínov bolo kontaminované

odstredené mlieko obsahujúce ≤ 38 μg SEA. Príčinou kontaminácie a rastu *S. aureus* v mlieku bolo znečistené potrubie, niektoré až 3 týždne, a nesprávna manipulácia s vráteným mliekom, ktoré bolo zmiešané so surovým mliekom a balené po pasterizácii. Odhadlo sa, že priemerná dávka skonzumovaného toxínu bola 20-100 ng/osobu (Notermans a van Hoeijová, 2008).

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Predmetná štúdia bola vypracovaná na základe mandátu udeleného expertmi Národnej odbornej vedeckej skupiny (NOVS) pre Biologické riziká Komisie pre bezpečnosť potravín a výživu MPRV SR. Údaje za r. 2011 poskytli Štátna veterinárna a potravinová správa (ŠVPS SR), Úrad verejného zdravotníctva (ÚVZ SR), Štátny veterinárny a potravinový ústav v Dolnom Kubíne (ŠVPÚ DK) a Výskumný ústav potravinársky v Bratislave (VÚP BA).

Zhodnotenie výskytu koagulázopozitívnych stafylokokov (KPS - predpokladaného počtu *S. aureus*; údaje ŠVPS SR)

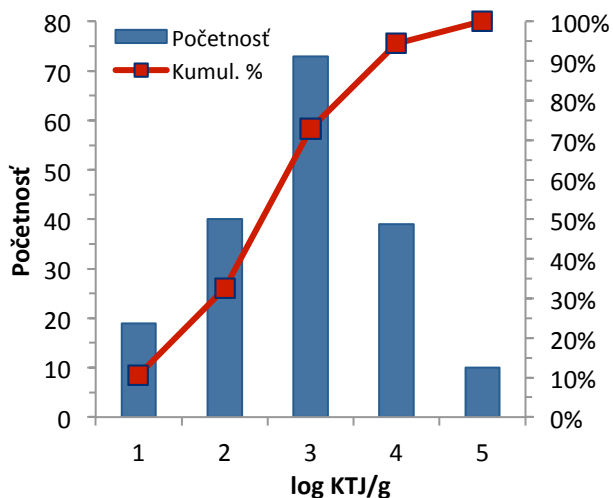
ŠVPS SR poskytla sumárne údaje o počte analyzovaných a pozitívnych vzoriek potravín na ukazovateľ „predpokladaný počet“ *S. aureus* od r. 2002, ktoré odhalili určité problémy úradnej kontroly potravín. Z porovnania poskytnutých údajov o počtoch vyšetrených vzoriek potravín v jednotlivých rokoch je možné jednoznačne identifikovať negatívny trend smerom k súčasnosti (Obr. 1). Zatiaľ čo v r. 2002 sa na ukazovateľ *S. aureus* vyšetrilo takmer 14 000 vzoriek mliečnych výrobkov, v r. 2011 sa ich počet zredukoval na menej ako 1000 (t.j. len na 7 %). Nebolo tiež možné prehliadnuť ešte dramatickejší pokles počtu analyzovaných mäsových výrobkov. Ak ich počet, napríklad v r. 2002 a 2003 bol približne 6 600, tak potom v r. 2011 sa analyzovalo len 6 vzoriek, čo bolo viac ako 1000× menej. Veľmi málo mäsových výrobkov bolo analyzovaných nielen v r. 2011, ale aj v priebehu posledných 5 rokov. Na celom území Slovenska sa na obsah *S. aureus* vyšetrilo v priemere len 20 vzoriek za rok.

Podobne môžeme konštatovať, že na celom Slovensku sa za posledných 6 rokov analyzovalo na *S. aureus* len 152 vzoriek rybacích produktov, čo v priemere znamená približne 25 vzoriek/1 rok.

Z údajov za r. 2011 vyplynulo, že *S. aureus* bol zistený len v mliečnych výrobkoch v 7 % z celkového počtu 978 analyzovaných vzoriek. V mäsových a rybacích výrobkoch (n = 6 a 22, v poradí) a ani v potravinách rastlinného pôvodu (n = 125) nebol zistený. Percentuálne zastúpenie vzoriek mlieka a mliečnych výrobkov obsahujúcich koagulázopozitívne stafylokoky (KPS, predpokladaný počet *S. aureus*) bolo možné zistiť aj zo surveillancie zoonotických ochorení za r. 2011 (MPRV SR, 2012). Údaje o počte analyzovaných vzoriek sa síce líšili, ale podiel pozitívnych bol podobný, 6,8 %.

Obsah KPS v potravinách – údaje poskytnuté ÚVZ SR

Vyššie počty analyzovaných vzoriek potravín, vody a prostredia vykázali pracoviská Úradu verejného zdravotníctva SR, celkom 49 908, pričom počet vzoriek analyzovaných potravín, okrem vody, ale vrátane materského mlieka činil 14 331. Na základe týchto analýz, zistili prítomnosť KPS celkom v 181 prípadoch (1,3 %). *S. aureus* sa najčastejšie vyskytoval v skupine mlieko a mliečne výrobky (21,5 %) a nasledovali skupiny: materské mlieko (11,1 %), mäso a výrobky z neho (3,7 %), hotové pokrmy (0,9 %), mrazené krémy a zmrzliny (0,7 %), resp. cukrárske výrobky (0,6 %). Najvyšší podiel pozitívnych vzoriek v skupine mliečnych výrobkov je možné s najväčšou pravdepodobnosťou odôvodniť vyššou cieľovou analýzou zameranou na surové mlieka (kravského, či ovčieho alebo kozieho) a syry z neho vyrobené. Vyššie zastúpenie KPS v materskom mlieku sa dalo tiež očakávať, nakoľko i materské mlieko je surové. Nálezy zistené v ostatných prípadoch zrejme odrážajú stupeň manuálnej výroby, a tým aj možnej kontaminácie vyplývajúcej z kontaktu personálu s výrobkom. Distribúcia počtov KPS v analyzovaných vzorkách potravín je znázornená na Obr. 2. Má charakter normálneho rozdelenia s priemernou aj najčastejšie sa vyskytujúcimi hodnotami 10^3 KTJ/g al. ml. (73 % vzoriek vykazovalo počty KPS nižšie ako 1000 KTJ/g al. ml).



Obrázok 2 Rozdelenie pravdepodobných počtov *S. aureus* stanovených v potravinách s pozitívnym nálezom (ÚVZ, n=181).

Overovanie tvorby toxínov vybraných izolátov KPS

Skutočnosť, že približne 22 % izolátov *S. aureus* z ovčieho mlieka tvorí enterotoxíny (Holečková at al., 2002 a 2004; Vasil' at al., 2005 a 2007), potvrdili aj údaje Ing. Sirotnej (ÚVZ SR v Bratislave; Tab. 1). V skupine analyzovaných vzoriek „syry a bryndza“ bolo v r. 2011 23,6 % z izolátov KPS (13 z 55), ktoré tvorili SE. Zaujímavé bolo tiež zistenie/potvrdenie, že percentuálny podiel KPS tvoriacich toxíny bol vyšší v skupinách potravín, pri príprave ktorých sa predpokladá vyšší podiel manuálnej manipulácie (cukrárske výrobky, lahôdkárske výrobky, hotové pokrmy) a prípadne nedostatočné chladenie niektorej zo zložiek. Táto dedukcia - manuálne kroky pri príprave, resp. nedostatočné chladenie, však pravdepodobne nekorešponduje s relatívne vysokým 47 % podielom izolátov KPS tvoriacich toxíny v zmrzlínach, ktoré sa v súčasnosti vyrábajú z hotových sušených zmesí a priamy kontakt personálu so zmrzlinou je nepravdepodobný. Preto z uvedeného vyplýva potreba zistiť, či sú zdrojom KPS zmrzlinové zmesi, personál; alebo sa pri príprave zmrzlin používajú aj vajčička?

Najvyšší podiel KPS tvoriacich toxíny bol zaznamenaný v materskom mlieku, čo nepriamo naznačuje, že hlavným rezervoárom takýchto izolátov je človek. Túto skutočnosť potvrdzujú aj štúdie Kérouantona at al. (2007) a Normanna at al. (2005), ktorí uviedli, že 65 % až 84 % vyšetrovaných izolátov *S. aureus* malo humánny pôvod.

Tabuľka 1 Podiely izolátov KPS tvoriacich SE (ÚVZ SR)

Skupina výrobkov	Počet KPS		
	potvrdených	tvoriacich SE	% tvoriacich SE
Hotové pokrmy	259	108	41,7
Cukrárske výrobky	92	44	47,8
Lahôdkárske výrobky	111	43	38,7
Syry a bryndza	55	13	23,6
Zmrzlina	74	35	47,3
Mäso a mäsové výrobky	2	0	-
Cestoviny	32	7	21,9
Materské mlieko	79	52	65,8

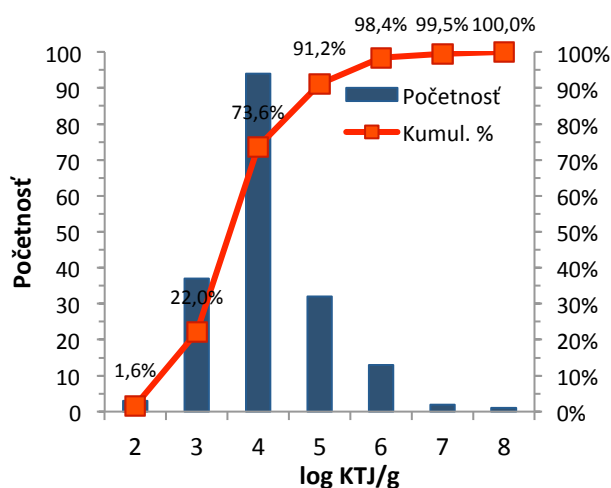
Zhodnotenie obsahu *S. aureus* v potravinách na základe údajov poskytnutých ŠVPÚ v Dolnom Kubíne a VÚP v Bratislave

ŠVPÚ DK a VÚP BA poskytli pre účely tejto štúdie spolu 961 výsledkov stanovenia koagulázopozitívnych stafylokokov (predpokladaných počtov *S. aureus*) v potravinách (ŠVPÚ DK 923 údajov, VÚP BA 38).

Väčšinu analyzovaných potravín tvorilo mlieko a mliečne výrobky (n = 831), ďalej boli zastúpené polotovary a lahôdkárske výrobky (n=21), hotové jedlá (n = 19) a iné. *S. aureus* nebol stanovený celkovo v 660 prípadoch, čo činilo celkom 71,5 %, z toho v skupine mlieko a mliečne výrobky bolo 70,5 % vzoriek negatívnych. Tiež nebol zistený vo vzorkách polotovarov, lahôdkárskych výrobkov a hotových pokrmov. Údaje z VÚP BA za roky 2010 a 2011 v počte n = 38 sa týkali skupiny syrov vyrobených z ovčieho mlieka. Podiel vzoriek, v ktorých sa *S. aureus*

nestanovil, činil napríklad 37,5 % v r. 2010 a v r. 2011 34,2 %.

Selekciou pozitívnych nálezov *S. aureus* v skupine mliečnych výrobkov sa ich spektrum výrazne zredukovalo na ovčie syry (n = 182). Takto bolo možné spojiť databázu SVPÚ DK a VÚP BA a vykonať základné štatistické vyhodnotenie. Predpokladá sa, že spojená databáza výsledkov mikrobiologických analýz lepšie charakterizuje reálny stav, napriek tomu, že takýmto výberom neboli do štatistickej analýzy zahrnuté negatívne nálezy v ovčích syroch. Je nepravdepodobné, že by sa v takýchto výrobkoch zo surového ovčieho mlieka koagulázopozitívne stafylokoky nenachádzali. Z údajov vyplynulo, že obsah *S. aureus* v syroch vyrobených zo surového ovčieho mlieka sa pohyboval v rozmedí 1,96 až 7,34 log KTJ/g a s 95 % pravdepodobnosťou omylu okolo priemernej hodnoty 3,65±0,91 log KTJ/g. Stafylokokové enterotoxíny neboli dokázané. Distribúcia hodnôt zahrnutých do analýzy je graficky znázornená na Obr. 3.



Obrázok 3 Rozdelenie počtov *S. aureus* v syroch vyrobených zo surového ovčieho mlieka, (n = 182).

Z histogramu znázorneného na Obr. 3 vyplynulo, že 91,2 % vzoriek obsahovalo počty *S. aureus* nižšie ako 10^5 KTJ/g a 98,4 % vzoriek počty nižšie ako 10^6 KTJ/g. Ak tieto údaje spojíme so skutočnosťou, že stafylokokové enterotoxíny vo vyšetrovaných vzorkách neboli dokázané, predkladajú sa nám tu indície, že konzumenti sú pri konzumácii ovčích syrov vystavovaní samotnému agens, *S. aureus*, síce veľmi často, ale obsahom vyšším ako 10^6 KTJ/g menej často a napokon zriedkavo v takej koncentrácii toxínov, ktorá by mohla spôsobiť intoxikáciu. Druhé tvrdenie je však potrebné podložiť vyšším počtom analýz na dôkaz stafylokokových enterotoxínov. Nakoľko štatisticky evidovaná chorobnosť krátkotrvajúcich intoxikácií, ku ktorým patria aj otravy SE, všeobecne podhodnocuje skutočnosť, aj z tohto dôvodu odporúčame v rámci úradnej kontroly zvýšiť frekvenciu mikrobiologických analýz v jednotlivých skupinách potravín.

ZÁVER

Charakterizácia rizika

Na základe údajov získaných z terénnych laboratórnych analýz, vlastností *S. aureus*, ako aj z charakteru ochorenia

vyvolaného stafylokokovými enterotoxínmi, ktoré sa môžu v potravinách vytvoriť v dôsledku rozmnožovania sa *S. aureus* vymykajúceho sa spod kontroly, môžeme riziko z konzumácie považovať za nízke. *S. aureus* sa však bežne nachádza v surovom mlieku, vrátane ovčieho, z ktorého sa vyrábajú často konzumované nezrejúce alebo len krátkozrejúce syry. Z hľadiska charakterizácie rizika je pravdepodobné, že počas kysnutia mlieka a mladého syra dokáže *S. aureus*, zvlášť v salašných podmienkach, zvýšiť svoje počty o viac ako 3 log KTJ/g a dosiahnuť, resp. na krátky čas prekročiť denzity 10^5 – 10^6 KTJ/g. Je nepravdepodobné, že *S. aureus* dokáže uspieť v kompetícii s aktívnymi baktériami mliečného kysnutia, ak sa tieto nachádzajú v ovčom mlieku vo vyšších počtoch. Hoci expozícia *S. aureus* prostredníctvom konzumácie ovčieho hrudkového syra a bryndze vyrobených zo surového mlieka je vysoká, jej následky sú mierne a závažnosť nebezpečenstva *S. aureus* hodnotíme ako nepatrnú. Celkové riziko považujeme za nízke, čo potvrdzuje aj chorobnosť, ktorá pri stafylokokových enterotoxikózach na Slovensku je 0,02/100 000 obyvateľov (nižšia ako priemer EÚ 0,06/100 000).

LITERATÚRA

- Anonymous. 2012. *Správa o zoonózach a pôvodcoch zoonóz v Slovenskej republike za r. 2011. Staphylococcus aureus* (koagulázopozitívne stafylokoky a ich toxíny). Bratislava: MPRV SR, p. 84-87.
- Balaban, N., Rasooly, A. 2000. Staphylococcal enterotoxins. *International Journal of Food Microbiology*, vol. 61, no. 1, p. 1-10. [http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1605\(00\)00377-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1605(00)00377-9)
- Holečková, B., Holoda, E., Fotta, M., Kalináčová, V., Gondol, J., Grolmus, J. 2002. Occurrence of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in food. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, vol. 9, p. 179-182. [PMid:12498587](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12498587/)
- Holečková, B., Kalináčová, V., Gondol, J., Fotta, M., Holoda, E., Beličková, E. 2004. Production of enterotoxins by *Staphylococcus aureus* isolated from sheep milk. *The Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy*, vol. 48, p. 41-45.
- Jay, J. M., Loessner, M. J., Golden, D. A. 2005. *Modern Food Microbiology*, 7 th. Ed. New York: Springer, p. 709 ISBN 0-387-23180-3.
- EFSA, ECDC 2012. Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2010. *EFSA Journal*, vol. 10 no. 3, 442 p. Retrieved from the web: <http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/2597.pdf>
- Kérouanton, A., Hennekinne, J. A., Letertre, C., Petit, L., Chesneau, O., Brisabois, A., DeBuyser, M.L. 2007. Characterization of *Staphylococcus aureus* strains associated with food poisoning outbreaks in France. *International Journal of Food Microbiology*, vol. 115, p. 36-375. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.10.050> [PMid:17306397](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17306397/)
- Medved'ová, A., Valík, E., Sirotná, Z., Liptáková, D. 2009. Growth Characterization of *Staphylococcus aureus* in Milk: a Quantitative Approach. *Czech Journal of Food Science*, vol. 27, no. 6, p. 443-453.
- Medved'ová, A., Valík, E. 2012. *Structure and Function of Food Engineering. Staphylococcus aureus: Characterisation and Quantitative Growth Description in Milk and Artisanal Raw Milk Cheese Production*, Ayman Amer Eissa, p. 71-102. ISBN: 978-953-51-0695-1.

Normanno, G., Firinu, A., Virgilio, S., Mula, G., Dambrosio, A., Poggiu, A., Decastelli, L., Mioni, R., Scuota, S., Bolzoni, G., Di Giannatale, E., Salinetti, A. P., La Salandra, G., Bartoli, M., Zuccon, F., Pirino, T., Sias, S., Parisi, A., Quaglia, N. C., Celano, G. V. 2005. Coagulase-positive Staphylococci and *Staphylococcus aureus* in food products marketed in Italy. *International Journal of Food Microbiology*, vol. 98, no. 1, p. 73-79. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.05.008>
PMid:15617802

Notermans, S., Heuvelman, C. J. 1983. Combined effect of water activity, pH and sub-optimal temperature on growth and enterotoxin production of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Food Science*, vol. 48, no. 6, p. 1832-1835. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2621.1983.tb05096.x>

Notermans, S., van Hoeij, K. 2008. *The Food Safety File*. Woerden: Food Doctors VOF. ISBN/EAN: 978-90-79327-02-7.

Valík, E., Prachar, V. 2009. *Pôvodcovia ochorení z požívatin a minimalizácia ich rizika*. Bratislava: Nakladateľstvo STU, p. 167, ISBN 978-80-227-3200-0.

Vasiľ, M., Fotta, M., Elečko, J. 2007. Produkcia enterotoxínov druhom rodu *Staphylococcus* sp. izolovaných z ovčieho mlieka. *Slovak Journal of Animal Science*, vol. 40, no. 1, p. 52-56.

Vasiľ, M., Fotta, M., Elečko, J. 2005. Výskyt a druhová špecifikácia *Staphylococcus* sp. izolovaných z prvovýroby ovčieho mlieka. *Mliekarstvo*, vol. 36, no. 3, p. 25-27.

Acknowledgments:

The authors thank the State Veterinary and Food Authority in Bratislava, namely, M. Bedriová, DVM, L. Cabanova, DVM, PhD. from the State Veterinary and Food Institute in Dolný Kubín, Z. Sirotná, MSc., MPH from the Public Health Institute of SR in Bratislava and J. Koreňová, MSc. from the Food Research Institute in Bratislava for providing the data.

The work was supported by the National Contact Point for Scientific and Technical Cooperation with EFSA, Ministry of Agriculture and Rural Development of the Slovak Republic and by the project APVV-0590-10.

Contact address:

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

Alžbeta Medved'ová, Slovak University of Technology, Faculty of Chemical and Food Technology, Department of Nutrition and Food Safety Assessment, Radlinského 9, 812 37 Bratislava Slovakia, E-mail: alzbeta.medvedova@stuba.sk.

MODELLING OF *BACILLUS CEREUS* DISTRIBUTION IN PASTEURIZED MILK AT THE TIME OF CONSUMPTION

Pavel Ačai, Lubomír Valík, Denisa Liptáková, Jana Minarovičová

ABSTRACT

Modelling of *Bacillus cereus* distribution, using data from pasteurized milk produced in Slovakia, at the time of consumption was performed in this study. The Modular Process Risk Model (MPRM) methodology was applied to over all the consecutive steps in the food chain. The main factors involved in the risk of being exposed to unacceptable levels of *B. cereus* (model output) were the initial density of *B. cereus* after milk pasteurization, storage temperatures and times (model input). Monte Carlo simulations were used for probability calculation of *B. cereus* density. By applying the sensitivity analysis influence of the input factors and their threshold values on the final count of *B. cereus* were determined. The results of the general case exposure assessment indicated that almost 14 % of Tetra Top cartons can contain $> 10^4$ cfu/ml of *B. cereus* at the temperature distribution taken into account and time of pasteurized milk consumption.

Keywords: pasteurized milk; *B. cereus*; predictive models; exposure assessment; Monte Carlo simulations.

ÚVOD

Mikrobiologické hodnotenie rizika, ako neoddeliteľná súčasť analýzy rizika, sa začalo výraznejšie presadzovať pri posudzovaní bezpečnosti potravín a ochrany spotrebiteľa od polovice deväťdesiatych rokov minulého storočia. Kľúčovými zložkami hodnotenia rizika sú: (1) identifikácia nebezpečenstva, (2) hodnotenie expozície, (3) charakterizácia nebezpečenstva (hodnotenie dávka-odozva), (4) charakterizácia rizika **ILSI Europe, (2012)**.

Zatiaľ čo kvalitatívne hodnotenie rizika sa zaoberá opisným spracovaním informácií na odhad stupňa (veľkosti) rizika a vplyvu faktorov na riziko, kvantitatívne hodnotenie rizika pracuje s číselnými údajmi **Fazil (2005)**. Vhodné techniky kvantitatívneho hodnotenia rizika sú vo všeobecnosti založené na simuláciách Monte Carlo. Výsledkom sú distribúcie pravdepodobnosti žiadaného výstupu, ktoré poskytujú informácie nielen o najpravdepodobnejších hodnotách výstupnej premennej (stredná hodnota, medián), ale tiež o jej extrémnych hodnotách, vyplývajúce z kombinácií z rozdelenia pravdepodobnosti vstupných parametrov **Lindqvist et al., (2002)**. Hlavným cieľom modelovania mikrobiologických aspektov bezpečnosti potravín je odhad možnej prítomnosti alebo rastu a rozmnožovania sa nežiaduceho mikroorganizmu v potravinách pomocou prediktívnych primárnych a sekundárnych modelov. Tie sú následne použité na zistenie rozdelenia počtu mikroorganizmov v jedle v čase jeho konzumácie, aby bolo potom možné, prostredníctvom modelov dávky a odozvy, zistiť pravdepodobnosť rizika nákazy/ochorenia konzumenta. Najvšeobecnejší prístup si vyžaduje aplikáciu modelov reprezentujúcich rozličné spôsoby a scenáre, ktoré môžu nastať, keď potravinársky produkt putuje od výrobcu/farmára k spotrebiteľovi. Keďže počet takýchto možných spôsobov a scenárov je takmer nekonečný, komplikované modely je potrebné zjednodušiť do tej

miery, aby ešte primerane reprezentovali realitu **Vose (2008)**.

B. cereus patrí k najdôležitejším spórotvorným mikroorganizmom, ak sa berie do úvahy posúdenie kvality a bezpečnosti pasterizovaného mlieka. Je schopný prežiť aj pasterizačný proces a pri vyšších počtoch ($>10^5$ KT/ml) je schopný produkovať enterotoxíny, ktoré môžu spôsobiť otravu, ktorej príznaky zahŕňujú nevoľnosť, hnačky, zvracanie **Granum et al. (1995)**. Optimálna teplota pre rast *B. cereus* je od 28 °C do 35 °C, minimálna teplota je 4 °C a maximálna teplota 55 °C. Interval hodnôt pH vhodných pre rast mikroorganizmu je od 4,9 do 9,3, a je schopný tolerovať koncentráciu solí až 7,5% **Lampel et al. (2012)**. Vo všeobecnosti, už mlieko obsahujúce viac ako 10^4 KTJ *B. cereus*/ml sa nepovažuje za bezpečné pre spotrebiteľa. Ako podklady pre hodnotenie expozície *B. cereus* pri konzumácii pasterizovaného mlieka sa použili údaje o teplotách a časoch jeho skladovania, podmienkach dopravy z dostupných literárnych zdrojov **Notermans et al. (1997)**, **FDA (1999)**, **Pokrievka (2001)**, **Nauta et al. (2003)**, **Valík et al. (2003)**.

MATERIÁL A METÓDY

Cesta pasterizovaného mlieka od výrobcu ku konzumentovi

Na kvantitatívne hodnotenie expozície *B. cereus* v pasterizovanom mlieku v čase konzumácie sa aplikoval Modulárny procesný model rizika (MPMR) **Nauta (2005)**, **Nauta et al. (2003)**, **Lindqvist et al. (2002)**, **Mataragas et al. (2010)**, ktorý pozostáva zo štyroch postupných krokov cesty mlieka od výrobcu až po konzumenta: 1. transport mlieka od výrobcu k predajcovi (maloobchod), 2. skladovanie u predajcu, 3. transport mlieka spotrebiteľom z obchodu domov, 4. skladovanie mlieka v domácnosti.

Distribúcia teplôt a časov skladovania/dopravy mlieka

Dátum spotreby pasterizovaného mlieka v jednolitrových obaloch Tetra Top bol deklarovaný do siedmich dní od výroby. Predpokladá sa, že pasterizované mlieko sa dostane pri doprave od výrobcu do obchodu do jedného dňa pri teplote 5 °C za prísne kontrolovaných podmienok. Na získanie distribúcie časov skladovania v obchode sa použilo uniformné rozdelenie **Nauta et al. (2003)** a hustota rozdelenia teplôt skladovania sa vypočítala na základe údajov **FDA (1999)**. Pretože podmienky dopravy mlieka spotrebiteľom z obchodu domov nie sú vo všeobecnosti známe, použili sme analogický prístup na získanie distribúcií teplôt a časov ako v článku **Nauta et al. (2003)**. Hustoty rozdelení časov v chladničkách domácnosti boli prevzaté od **Notermans et al. (1997)** a teplôt **Pokrievka (2001)**.

Matematický model

Cieľom matematického modelovania bolo hodnotenie expozície mikroorganizmov *B. cereus* (log KTJ/ml) v pasterizovanom mlieku v čase jeho spotreby na základe simulácii Monte Carlo.

Na výpočet distribúcie mikroorganizmov bol použitý primárny prediktívny model pre rast *B. cereus* v pasterizovanom mlieku **Zwietering et al. (1996)**, **Notermans et al. (1998)**, **Nauta (2000)** v nasledujúcom tvare:

$$\log(N) = \log(N_0) + kt \quad (1)$$

kde N je koncentrácia mikroorganizmov (KTJ/ml) v čase t , N_0 je začiatková koncentrácia mikroorganizmov (KTJ/ml), k je rastová rýchlosť (log KTJ/h), t je čas skladovania (h). Najskôr sa na odhad rastovej rýchlosti a dĺžky lag fázy, λ , z experimentálnych rastových čiar **Valík et al. (2003)**, použila **Baranyiho a Robertsova rovnica (1994)**. V druhom kroku sa prostredníctvom sekundárnych modelov získala závislosť dĺžky lag fázy od teploty z modifikovanej Arrheniovej rovnice **Davey (1989)**

$$\lambda = a_T + \frac{b_T}{T} \quad (2)$$

kde λ je dĺžka lag fázy (h), $a_T = -45,667$ h a $b_T = 1035,3$ h°C sú parametrami rovnice **Valík et al. (2003)** a T je teplota (°C), a z odmocninového modelu **Ratkowského Ratkowsky et al. (1982)** vzťah na výpočet rastovej rýchlosti od teploty

$$\sqrt{k} = b(T - T_{min}) + q \quad (3)$$

kde parameter $b = 0,026$ °C⁻¹h^{-0,5} je smernica a $q = -0,1032$ h^{-0,5} (°C⁻¹h^{-0,5}) úsek na osi y **Valík et al. (2003)**, $T_{min} = 4$ °C **Blackburn a McClure (2009)** je teoretická minimálna teplota, pri ktorej je *B. cereus* schopný rásť.

Vložením rovnice (3) do rovnice (1) pre uvažované fázy cesty pasterizovaného mlieka od výrobcu až po konzumenta dostaneme:

$$\log(N_i) = \log(N_{0,i}) + [b^2(T - T_{min})^2 + 2bq(T - T_{min}) + q^2]t_i \quad (4)$$

Zavedením substitúcie

$$c_i = [b^2(T - T_{min})^2 + 2bq(T - T_{min}) + q^2]t_i \quad (5)$$

kde $N_{0,i}$ je začiatkový počet mikroorganizmov (KTJ/ml), c_i rastový parameter (KTJ/ml), t_i je reálny čas rastu *B. cereus* (d) v danej etape cesty mlieka od výrobcu po konzumenta, označenej príslušným indexom $i = 1, 2, 3, 4$, môže byť rovnica (4) prepísaná do zjednodušenej formy:

$$\log(N_i) = \log(N_{0,i}) + c_i \quad (6)$$

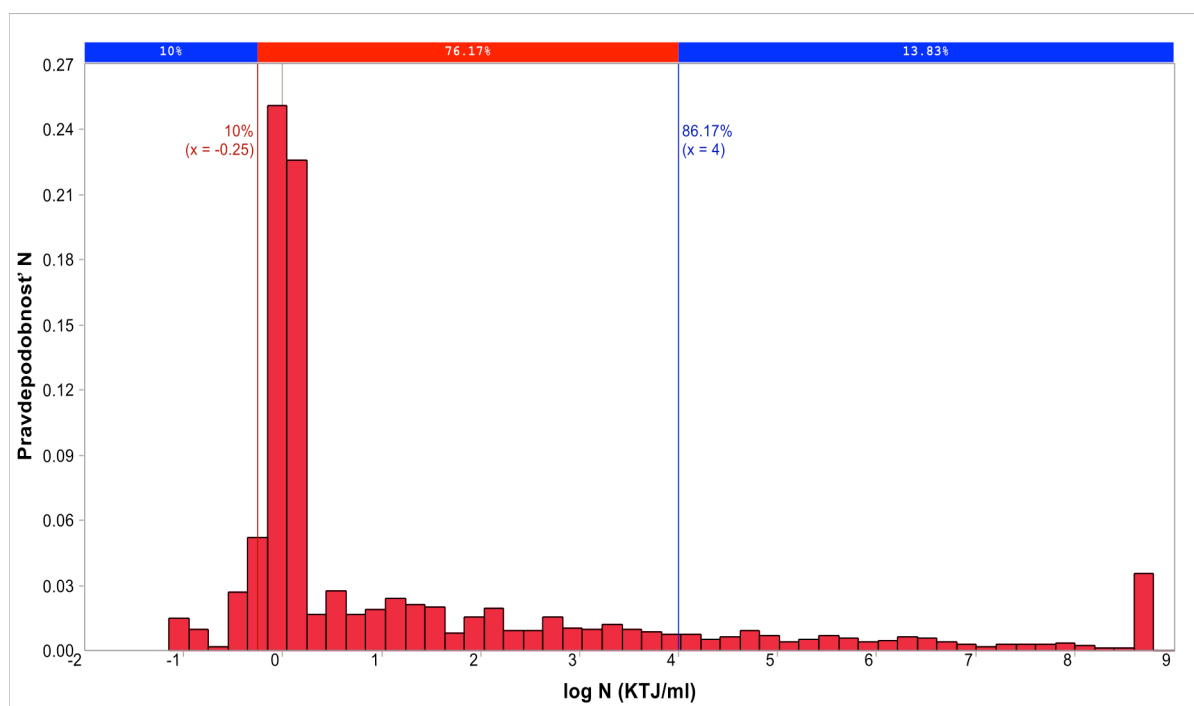
Na zistenie rozdelenia pravdepodobnosti *B. cereus* (log KTJ/ml) v pasterizovanom mlieku v čase spotreby (výstup modelu) sa použil Model Risk software **www.vosesoftware.com**. Jeho súčasťou je aj citlivostná analýza, umožňujúca posúdiť nielen vplyv vstupných faktorov modelu na výstup v podobe Spearmanových korelačných koeficientov, ale aj ich hraničné číselné hodnoty (threshold values), ktorých zvýšenie spôsobí výraznejší nelineárny nárast počtu *B. cereus*.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Rozdelenie pravdepodobnosti *B. cereus* (log KTJ/ml) v pasterizovanom mlieku v čase spotreby (log $N_4 = \log N$), pomocou rovníc (1-6), je znázornený na Obr. 1.

Výsledky modelovania naznačili, že pri distribúcii teplôt, ktoré sa použili pri hodnotení expozície, by asi 14 % z objemu pasterizovaného mlieka obsahovalo viac ako 10⁴ KTJ/ml *B. cereus* v čase konzumácie mlieka spotrebiteľom.

Použitie približnej (crude) citlivostnej analýzy (Tornado chart) **www.vosesoftware.com** v simulačných výpočtoch nám umožnilo zistiť, ktorý zo vstupných faktorov, či počiatková koncentrácia mikroorganizmu, teplota alebo doba skladovania, vyjadrených prostredníctvom hustoty rozdelenia pravdepodobnosti, má najväčší vplyv na neurčitosť rozdelenia pravdepodobnosti *B. cereus* v čase konzumácie pasterizovaného mlieka. Hodnoty Spearmanových korelačných koeficientov pre čas skladovania v domácnosti (0,467), teploty skladovania v obchode (0,413), začiatkový počet *B. cereus* po pasterizácii (0,336) a teploty skladovania mlieka v chladničkách domácností (0,201), poukázali, že práve tieto majú najvýznamnejší vplyv na simulačný výstup. Hodnoty zvyšných vstupujúcich faktorov (čas skladovania v obchode, doprava od výrobcu do obchodu a z obchodu do domácnosti) boli menšie ako 0,1, a preto ich nebolo nutné vziať do úvahy pri následnej identifikácii medzných hodnôt (threshold values) vstupujúcich faktorov **Mataragas et al. (2010)**, ktorých zvýšenie malo spôsobiť výraznejší, nelineárny nárast počtu *B. cereus*. Z pokročilejšej citlivostnej analýzy (Spider chart) **www.vosesoftware.com** vyplynulo, že hraničné hodnoty uvažovaných vstupných parametrov sú: čas skladovania v chladničkách domácností 6 dní (čas dopravy od výrobcu do obchodu nie je započítaný), teplota skladovania v obchode 6,8 °C, počiatkový počet *B. cereus* po pasterizácii 1 KTJ/ml, teplota uchovávaní mlieka v chladničkách domácností 7,8 °C.



Obrázok 1 Rozdelenie pravdepodobnosti *B. cereus* v pasterizovanom mlieku v čase jeho spotreby.

Napriek tomu, že vyššie počty *B. cereus* môžu spôsobiť ochorenie, neexistujúci vzťah dávka-odozva pre jeho toxíny, nám neumožnila riziko charakterizovať, teda odhadnúť jeho pravdepodobnosť. O to viac je v súčasnosti potrebné verifikovať maximálne akceptovateľné počty *B. cereus* v pasterizovanom mlieku v čase jeho spotreby. Je to spoločná zodpovednosť výrobcu, predajcu aj spotrebiteľa, a to najmä v letných mesiacoch.

Predložený článok demonštruje možnosť modelovania expozície *B. cereus* v pasterizovanom mlieku pri jeho ceste od výrobcu cez obchod k spotrebiteľovi, prepojením prediktívnych mikrobiálnych modelov a dostupných údajov o teplotách a časoch skladovania. Aj keď kvôli niektorým predpokladom a neurčitostiam týkajúcich sa vstupujúcich faktorov použitých pri odhade počtu *B. cereus* v pasterizovanom mlieku môžu byť určité výhrady k predloženému matematickému modelu, je užitočným nástrojom pre kvantitatívne hodnotenie expozície *B. cereus* a rozhodnutia zainteresovaných, najmä výrobcu a obchodu.

LITERATÚRA

Anonymous: 1999 U. S. Food Temperature Evaluation Design and Summary Pages. Audits International/FDA, p.13.

Baranyi, J., Roberts, T.A. 1994: A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. *Int. J. Food Microbiol.* vol. 23. p. 277-294, [http://dx.doi.org/10.1016/0168-1605\(94\)90157-0](http://dx.doi.org/10.1016/0168-1605(94)90157-0)

Blackburn, C. W., McClure, P. J. 2009. *Foodborne pathogens: Hazards, risk analysis and control*, 2 nd. Edition, CRC Press. p. 844-888. ISBN: 143980768X

Davey, K. R. 1989. A predictive model for combined temperature and water activity on microbial growth during growth phase. *J. Appl. Bacteriol.* vol. 67, p. 483-488. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.1989.tb02519.x> PMID:2592289

Fazil, A. M. 2005. A primer on risk assessment modelling: focus on seafood products. *FAO Fisheries Technical Paper*, 462:56.

Granum, P. E., Thomas, J. M., Alouf, J. E. 1995. A survey of bacterial toxins involved in food poisoning: a suggestion for bacterial food poisoning toxin nomenclature. *Int. J. Food Microbiol.*, vol. 28, no. 2, p. 129-144. [http://dx.doi.org/10.1016/0168-1605\(95\)00052-6](http://dx.doi.org/10.1016/0168-1605(95)00052-6)

ILSI (International Life Science Institute) 2012. *Tools for microbiological risk assessment*. ILSI Europe a.i.s.b.l. ISBN 9789078637349. Retrieved from the web: <http://orbit.dtu.dk/files/43551223/MRA%20Tools.pdf>

Lampel, K. A., Al-Khalidi, S., Cahill, S. M., 2012. *Bad Bug Book. Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins Handbook*, 2 nd. Edition., Silver Spring: Food and Drug Administration (FDA). Retrieved from the web: <http://www.fda.gov/downloads/Food/FoodSafety/FoodborneIllness/FoodborneIllnessFoodbornePathogensNaturalToxins/BadBugBook/UCM297627.pdf>

Lindquist, R., Sylvén, S., Vägsholm, I. 2002. Quantitative microbial risk assessment exemplified by *Staphylococcus aureus* in unripened cheese made from raw milk. *Int. J. Food Microbiol.*, vol. 78, no. 1-2, p. 155-170. [http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1605\(02\)00237-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1605(02)00237-4)

Nauta, M. J. 2000 Separation of uncertainty and variability in quantitative microbial risk assessment models. *Int. J. Food Microbiol.*, vol. 57, no. 1-2, p. 9-18. [http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1605\(00\)00225-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1605(00)00225-7)

Nauta, M. J., Litman, S., Barker, G. S., Carlin, F. 2003. A retail and consumer phase model for exposure assessment of *Bacillus cereus*. *Int. J. Food Microbiol.*, vol. 83, no. 2, p. 205-218. [http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1605\(02\)00374-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1605(02)00374-4)

Nauta, M. J. 2005. Microbial risk assessment models for portioning and mixing during food handling. *Int. J. Food Microbiol.*, vol. 100, no. 1-3, p. 311-322. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.10.027> PMID:15854714

Notermans, S., Dufrenne, J., Teunis, P., Beumer, R., te Gipfel, M., Peeters Weem, P. 1997. A risk assessment study

of *Bacillus cereus* present in pasteurized milk. *Food Microbiol.*, vol. 14, no. 2, p. 143-151.

Notermans, S., Nauta, M. J., Jansen, J., Jouve, J. L., Mead, G. C. 1998. A risk assessment approach to evaluating food safety based on product surveillance. *Food Control*, vol. 9, no. 4, p. 217-223. [http://dx.doi.org/10.1016/S0956-7135\(97\)00086-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0956-7135(97)00086-8)

Mataragas, M., Zwietering, M. H., Skandamis, P. N., Drosinos, E. H. 2010. Quantitative microbial risk assessment as a tool to obtain useful information for risk managers - Specific application to *Listeria monocytogenes* and ready-to-eat meat products. *Int. J. Food Microbiol.* vol. 141, p. S170-S179. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.01.005> PMID:20116877

Pokrievka, M. 2001. Distribution of temperatures in domestic refrigerators. Bratislava: FCHPT STU.

Ratkowsky, D. A., Olley, J., McMeekin, T. A. and Ball A. 1982. Relationship between temperature and growth rate of bacterial cultures. *J. Bacteriol.*, vol. 149, p. 1-5. PMID:7054139

Valík, E., Görner, F. and Lauková, D. 2003. Growth dynamics of *Bacillus cereus* and shelf-life of pasteurized milk. *Czech J. Food Sci.*, vol. 21, no. 6, p. 195-202.

Vose, D. 2008. *Risk Analysis: A Quantitative Guide*. 3rd ed. John Wiley & Sons, Ltd., ISBN 978-0-470-51284-5

Risk analysis modeling for Excel. Retrieved from the web: <http://www.vosesoftware.com/>

Zwietering, M. H., Notermans, S. and de Wit, J. 1996. The application of predictive microbiology to estimate the number of *Bacillus cereus* in pasteurized milk at the point of consumption. *Int. J. Food Microbiol.* vol. 30, no. 2, p. 55-70. [http://dx.doi.org/10.1016/0168-1605\(96\)00991-9](http://dx.doi.org/10.1016/0168-1605(96)00991-9)

Acknowledgments:

The work was supported by the National Contact Point for Scientific and Technical Cooperation with EFSA, Ministry of Agriculture and Rural Development of the Slovak Republic and by the project APVV-0590-10.

Contact address:

Pavel Ačai, Slovak University of Technology, Faculty of Chemical and Food Technology, Institute of Chemical and Environmental Engineering, Radlinského 9, 812 37 Bratislava Slovakia, E-mail: pavel.acai@stuba.sk.

Ľubomír Valík, Slovak University of Technology, Faculty of Chemical and Food Technology, Institute of Biochemistry, Microbiology and Health Protection, Radlinského 9, 812 37 Bratislava Slovakia, E-mail: lubomir.valik@stuba.sk.

Denisa Liptáková, Slovak University of Technology, Faculty of Chemical and Food Technology, Institute of Biochemistry, Microbiology and Health Protection, Radlinského 9, 812 37 Bratislava Slovakia, E-mail: denisa.laukova@stuba.sk.

Jana Minarovičová, Institute of Food Research, Priemyselná 4, 824 75 Bratislava Slovakia, E-mail: minarovicova@vup.sk.



COMPARISON OF TEXTURAL ATTRIBUTES OF SELECTED MEAT SAUSAGES USING INSTRUMENTAL ANALYSIS

Jozef Čurlej, Peter Zajác, Jozef Čapla, Vladimír Vietoris, Ľubomír Lopašovský

ABSTRACT

The aim of the study was to compare textural attributes of selected meat sausages using instrumental analysis. For this purpose, seven different meat sausage samples were treated by instrumental analysis, by the use of Warner-Bratzler probe, to find differences for two selected textural parameter firmness and work of shear. As expected, various values of mentioned attributes were obtained for different samples tested in fresh stage and after storage under controlled conditions (48 hrs., 30 °C temp., and 60 % R.H.) before and after cooking. For statistical evaluation of results, paired T test was used, statistically significant differences were taken at $p < 0.05$.

Keywords: Sausage; Texture; HDP/WBV set

ÚVOD

Potraviny, ponúkané v súčasnosti musia spĺňať rad požiadaviek, aby boli akceptované spotrebiteľom. Okrem chuti, vône, farby musí byť potravina nositeľom adekvátnych texturálnych parametrov. Z tohto hľadiska textúra je významným atribútom pre stanovenie kvality potravín (Hyldig a Nielsen, 2001).

Texturálne vlastnosti spravidla rozdeľujeme do troch základných skupín. Pevnosť, pružnosť, poddajnosť, tvárnosť, krehkosť a pod. vlastnosti výrobku označujeme ako mechanické parametre. Vlhkosť (obsah vody v potravine), obsah tuku, ako aj spôsob, akým sa tieto zložky uvoľňujú, vplyva na celkový pocit z potraviny prítomnej v ústnej dutine. Uvedené vlastnosti sa označujú ako povrchové. Treťou skupinou sú geometrické vlastnosti, ako napríklad zrnitosť či usporiadanie častíc. Tieto parametre ovplyvňujú vnímanie rozmeru, tvaru a orientácie častíc vo výrobku (Kohyama et al., 2009; Varela et al., 2008).

Na posúdenie hodnoty, či kvality výrobkov existuje viacero metód. Medzi najbežnejšie metódy aplikované v praxi radíme senzorické posudzovanie, teda hodnotenie atribútov výrobkov pomocou zmyslových orgánov hodnotiteľov. Súčasťou takýchto analýz bývajú metódy poradové, rozlišovacie, pomerové, hodnotenie porovnaním so štandardom, metódy slovného popisu, a pod. Relatívne novým trendom, ktorý sa v súčasnej dobe čoraz častejšie stáva akýmsi štandardom dopĺňujúcim spomínané senzorické testy je využitie inštrumentálnych analýz. Ich nespornou prednosťou je predovšetkým opakovateľnosť a presnosť pri hodnotení. Zariadenia určené na analýzu textúry, takzvané textúrometre, umožňujú posudzovanú vzorku stlačiť, pritiahnuť, prepichnúť, rozpučiť, pretočiť a rozdrviť spôsobom imitujúcim podmienky reálneho správania sa spotrebiteľa pri manipulácii, príprave či konzumácii výrobku. Na základe požiadaviek nielen potravinárskeho priemyslu bolo za týmto účelom navrhnutých a vyvinutých viacero sond (tzv. próby) umožňujúcich stanovenie niekoľkých základných

parametrov, napr. pomocou aplikácie tzv. Kramerovho či Warner-Bratzlerovho testu ((Bratzler, 1932; Warner, 1928; Nollet a Toldra, 2008).

Hlavným zameraním experimentálnej štúdie bolo porovnanie vybraných vlastností niekoľkých druhov komerčne dostupných mäsových klobás, pre identifikáciu texturálnych odlišností porovnávaných výrobkov. Do hodnotenia textúry sme zahrnuli 7 odlišných druhov klobás, ktoré sme pred analýzou rôzne upravili. Hodnotili sme pevnosť a prácu u klobás bez akejkoľvek následnej úpravy. Ďalej, takto získané výsledky sme porovnávali s hodnotami nameranými u varených klobás. Pre identifikáciu texturálnych zmien vznikajúcich v dôsledku nevhodných podmienok skladovania, podrobili sme týchto 7 výrobkov modifikovaným podmienkam (skladované 48 hodín pri teplote 30 °C a 60 % R.V.). Aj v tomto prípade sme testovali texturálne atribúty pred a po uvarení výrobkov. Získané výsledky sme podrobili párovému T testu pre identifikáciu potenciálnych rozdielov.

MATERIÁL A METÓDY

Príprava vzoriek

Za účelom porovnania vybraných texturálnych parametrov bolo použitých sedem druhov klobás zakúpených v obchodných reťazcoch: Bravčová, Debrecínska, Domáca, Egerská, Ipeľská, Laborecká a Sviatočná klobása. Pred podrobením výrobkov stanoveným analýzám, v rámci doby spotreby, uvádzanej predávajúcím prostredníctvom informácie na etikete, vzorky boli uchovávané v chladničke pri teplote 6 °C.

Vybrané texturálne atribúty sme hodnotili u výrobkov podľa stanovených metód:

1. Bez úpravy: vzorky boli analyzované bezprostredne po ohriatí na teplotu prostredia 25 °C.
2. Varené: vzorky boli varené pri teplote vody 100 °C počas 15 minút, analyzované boli bezprostredne po ochladení na teplotu prostredia 25 °C.
3. Vzorky skladované v modifikovaných podmienkach prostredia: Skladované 48 hodín pri teplote 30 °C a 60 %

R.V. Analyzované bezprostredne po ohriatí na teplotu prostredia 25 °C.

4. Vzorok skladovaný v modifikovaných podmienkach prostredia: Skladovaný 48 hodín pri teplote 30 °C a 60 % R.V. Následne, vzorky boli varené pri teplote vody 100 °C počas 15 minút, analyzované boli bezprostredne po ochladení na teplotu prostredia 25 °C.

Analýza stanovených texturálnych atribútov

Pristrojové vybavenie

Stanovenie vybraných texturálnych parametrov bolo vykonávané pomocou prístroja TA XT2 plus (Stable Micro Systems) za použitia HDP/WBV setu.

Nastavenie parametrov textúrometra v programe Exponent (Stable Micro Systems):

- kapacita tenzometra 5 kg,
- pohyb ramena textúrometra pred testom 7 mm.s⁻¹,
- prienik sondy do vzorky 6 mm.s⁻¹,
- rýchlosť pohybu sondy po ukončení merania 10,0 mm.s⁻¹,
- hĺbka prieniku sondy do vzorky 30 mm,

Analýza vzoriek

Vzorok boli umiestnené do centrálnej polohy podstavca textúrometra. Meranie textúry v rámci rovnakej vzorky klobás bolo opakované 8x, pre identifikáciu možných rozdielov v textúre, pri tej istej vzorke. Pri hodnotení texturálnych rozdielov v rámci rovnakej vzorky a pri porovnávaní jednotlivých vzoriek medzi sebou, analyzovali sme nasledovné vybrané parametre: pevnosť (tuhosť) vzorky a práca, ktorú musí vykonať textúrometer pri prieniku sondy do vzorky.

Spracovanie údajov

Hodnotené parametre práca a tuhosť meraných vzoriek boli priebežne zaznamenávané počas výkonu analýz, na konci všetkých meraní vzoriek, získané údaje boli vyhodnotené pomocou funkcie makro programom Exponent pre získanie priemerných hodnôt, smerodajnej odchýlky a koeficientu variability. Pri hodnotení rozdielov medzi získanými údajmi, vychádzali sme z výsledkov štatistického programu Tanagra (Ricco Rakotomalala), hodnotením údajov párovým T testom. Rozdiely medzi vzorkami boli považované za štatisticky signifikantné pri p < 0,05.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Výsledky sú uvedené v tabuľke 1 - 7.

Tab. 1 Hodnoty tuhosti a práce u vzoriek Bravčovej klobásy

Vzorka	Tuhosť (kg)	K.V. (%)	Práca (kg.s ⁻¹)	K.V. (%)
Neuvarená	3,618	26,43	6,892	21,99
Uvarená	1,665	19,99	3,540	14,95
Neuvarená skladovaná	4,791	8,75	10,432	11,05
Skladovaná uvarená	3,886	11,22	7,729	11,64

* K.V. – koeficient variability

Tab. 2 Hodnoty tuhosti a práce u vzoriek Debrecínskej klobásy

Vzorka	Tuhosť (kg)	K.V. (%)	Práca (kg.s ⁻¹)	K.V. (%)
Neuvarená	5,542	10,27	8,653	7,99
Uvarená	2,320	10,83	4,795	14,10
Neuvarená skladovaná	5,605	15,18	11,482	21,73
Skladovaná uvarená	4,038	38,88	9,154	34,46

Tab.3 Hodnoty tuhosti a práce u vzoriek Domácej klobásy

Vzorka	Tuhosť (kg)	K.V. (%)	Práca (kg.s ⁻¹)	K.V. (%)
Neuvarená	4,57	23	8,385	12,02
Uvarená	4,156	21,85	7,176	18,20
Neuvarená skladovaná	5,226	8,18	11,912	12,92
Skladovaná uvarená	4,936	8,84	9,463	13,59

Tab. 4 Hodnoty tuhosti a práce u vzoriek Egerskej klobásy

Vzorka	Tuhosť (kg)	K.V. (%)	Práca (kg.s ⁻¹)	K.V. (%)
Neuvarená	5,026	14,11	10,913	22,42
Uvarená	4,325	6,31	8,214	7,16
Neuvarená skladovaná	-	-	-	-
Skladovaná uvarená	4,760	21,53	10,858	23,34

Tab. 5 Hodnoty tuhosti a práce u vzoriek Ipeľskej klobásy

Vzorka	Tuhosť (kg)	K.V. (%)	Práca (kg.s ⁻¹)	K.V. (%)
Neuvarená	3,8445	35,377	6,573	26,99
Uvarená	2,716	15,181	5,643	8,27
Neuvarená skladovaná	5,126	11,052	9,985	16,63
Skladovaná uvarená	4,561	19,975	9,488	18,49

Tab. 6 Hodnoty tuhosti a práce u vzoriek Laboreckej klobásy

Vzorka	Tuhosť (kg)	K.V. (%)	Práca (kg.s ⁻¹)	K.V. (%)
Neuvarená	3,093	20,46	6,384	24,96
Uvarená	3,884	10,71	7,577	12,55
Neuvarená skladovaná	5,05	15,62	10,361	13,24
Skladovaná uvarená	3,841	26,51	8,969	17,57

Tab. 7 Hodnoty tuhosti a práce u vzoriek Sviatočnej klobásy

Vzorka	Tuhosť (kg)	K.V. (%)	Práca (kg.s ⁻¹)	K.V. (%)
Neuvarená	4,479	37,33	8,633	34,24
Uvarená	2,763	14,66	5,62	17,53
Neuvarená skladovaná	4,307	24,10	8,990	31,66
Skladovaná uvarená	4,645	21,43	9,609	14,49

Po spracovaní výsledkov prostredníctvom softwaru Tanagra párovým T testom a pri porovnávaní získaných čísel usporiadaných vo forme matice, identifikované boli štatisticky preukazné rozdiely ($p < 0,05$) v nameraných parametroch hodnotiacich textúru so zameraním sa na tuhosť: medzi neuvarenou a uvarenou vzorkou bravčovej klobásy pred a aj po uvarení. U vzorky debrecínskej klobásy boli zaznamenané preukazné rozdiely medzi neuvarenou a uvarenou vzorkou a medzi uvarenou a skladovanou neuvarenou vzorkou. U ipeľskej klobásy sme zaznamenali preukazné rozdiely pri porovnávaní nameraných hodnôt uvarenej a skladovanej neuvarenej vzorky a medzi uvarenou a skladovanou uvarenou vzorkou. Pri vzorkách laboreckej klobásy boli zaznamenané preukazné rozdiely medzi neuvarenou a skladovanou neuvarenou vzorkou a medzi uvarenou a skladovanou uvarenou vzorkou. V prípade sviatočnej klobásy, preukazné rozdiely boli zaznamenané medzi uvarenou a skladovanou neuvarenou vzorkou, podobne medzi uvarenou a skladovanou uvarenou vzorkou.

Rovnakým spôsobom sme postupovali pri porovnávaní nameraných hodnôt práce, ktorú musel vykonať textúrometer pri analýze vzorky. Pri hodnotení tejto veličiny sme identifikovali preukazné rozdiely u bravčovej klobásy medzi neuvarenou a uvarenou, neuvarenou a skladovanou neuvarenou, uvarenou a skladovanou neuvarenou, uvarenou a skladovanou uvarenou vzorkou. U debrecínskej klobásy boli identifikované preukazné rozdiely medzi neuvarenou a uvarenou, uvarenou a skladovanou neuvarenou, uvarenou a skladovanou uvarenou vzorkou. Pri vzorkách domácej klobásy sme zaznamenali preukazné rozdiely medzi neuvarenou a skladovanou neuvarenou, uvarenou a skladovanou neuvarenou, uvarenou a skladovanou uvarenou, skladovanou neuvarenou a skladovanou uvarenou vzorkou. V prípade vzoriek ipeľskej klobásy boli zaznamenané preukazné rozdiely medzi neuvarenou a skladovanou neuvarenou vzorkou, uvarenou a skladovanou neuvarenou, uvarenou a skladovanou uvarenou, neuvarenou a skladovanou uvarenou vzorkou. U vzoriek laboreckej klobásy bol identifikovaný preukazný rozdiel medzi neuvarenou a skladovanou neuvarenou, uvarenou a skladovanou neuvarenou vzorkou. Pri hodnotení vzoriek sviatočnej klobásy boli zaznamenané preukazné rozdiely medzi uvarenou a skladovanou uvarenou vzorkou.

Textúra ako jeden z atribútov kvality významne vplyva na preferencie v predajnosti mäsa a mäsových výrobkov umiestnených na trh. Kvalitu výrobkov determinuje viacero faktorov akými sú: senzorické vlastnosti, chemické

zloženie, fyzikálne vlastnosti a iné (Probola a Zander, 2007). Pre stanovenie textúrnych vlastností bolo vyvinutých niekoľko metód, z ktorých v dnešnej dobe sú čoraz častejšie využívané inštrumentálne analýzy, vďaka ich nesporným výhodám (Herrero et al., 2008).

V práci sme sa zamerali na stanovenie tuhosti a práce, ktorú musel vykonať textúrometer pri analýzach vzoriek. Za týmto účelom sme zvolili použitie Warner-Bratzlerovej sondy. Pri hodnotení textúry siedmich druhov klobás s rozdielnym zložením a následnom spracovaní získaných výsledkov pomocou štatistickej metódy, bolo zistených viacero rozdielov u stanovených textúrnych parametrov.

Na základe údajov o zložení výrobkov a výsledkov možno konštatovať, že rozdielna tuhosť vzoriek bola do istej miery ovplyvnená odlišným podielom rôznych druhov mias v hodnotených výrobkoch. Proces varenia sa významným spôsobom podpísal na zmene textúrnych parametrov so zameraním na hodnotenie tuhosti, kedy v dôsledku tejto úpravy došlo k zmäknutiu analyzovaných vzoriek. Na druhej strane, proces skladovania vzoriek pri stanovených a kontrolovaných podmienkach sa podieľal na zvýšení tuhosti výrobkov, pravdepodobne kvôli čiastočnej dehydratácii vzoriek, podobné výsledky zaznamenali vo svojej práci Mor-Mur a Yuste (2003). Nárast v tuhosti mäsových výrobkov uvádzajú aj Benito et al. (2005) v procese zrenia, čo sa zrejme rovnako podpísalo na odlišnostiach textúrnych parametrov nami hodnotených vzoriek.

ZÁVER

Textúra patrí medzi dôležité vlastnosti, ovplyvňujúce celkové senzorické vnímanie výrobku. Hoci je výrobok bezpečný z hľadiska zloženia, pokiaľ nie je nositeľom primeraných senzorických vlastností na daný druh výrobku, spotrebiteľom bude len veľmi ťažko akceptovaný. Inštrumentálne hodnotenie textúrnych vlastností z tohto hľadiska ponúka istý priestor pre optimalizáciu výroby, identifikáciu vhodných podmienok skladovania, vrátane odporúčenia doby skladovateľnosti, či metódy úpravy mäkkých mäsových výrobkov pred konzumom.

LITERATÚRA

- Benito, M. J., Rodriguez, M., Cordoba, M. G., Andrade, M. J., Corboda, J. J. 2005. Effect of the fungal protease Epg 222 on proteolysis and texture in the dry fermented sausage "Salchichon." *Journal of the Science of Food and Agriculture. Sci Food Agric*, vol. 85, no. 2, p. 273-280.
- Bratzler, L. J. 1932. *Measuring the tenderness of meat by means of a mechanical shear*. Master of Science Thesis. Kansas State College (KA), USA.
- Herrero, A. M., De La Hoz, L., Ordóñez, J. A., Herranz, B., Romero De Ávila, M. D., Cambero, M. I. 2008. Tensile properties of cooked meat sausages and their correlation with texture profile analysis (TPA) parameters and physico-chemical characteristics. *Meat Science*, vol. 80, no. 3, p. 690-696. <http://dx.doi.org/10.1016/j.meatsci.2008.03.008> PMID:22063584
- Hyldig, G., Nielsen, D. 2001. A review of sensory and instrumental methods used to evaluate the texture of fish muscle. *Journal of Texture Studies*, vol. 32, p. 219-242. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1745-4603.2001.tb01045.x>
- Kohyama, K., Nagata, A., Tamaki, Y., Sakurai, N. 2009. Comparison of human-bite and instrument puncture tests of

cucumber texture. *Postharvest Biol. Technol.*, vol. 52, p. 243-

246. <http://dx.doi.org/10.1016/j.postharvbio.2008.12.001>

Mor-Mur, M., YUSTE, J. 2003. High pressure processing applied to cooked sausage manufacture: physical properties and sensory analysis. *Meat Science*, vol. 65, no. 3, p. 1187-1191. [http://dx.doi.org/10.1016/S0309-1740\(03\)00013-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0309-1740(03)00013-5)

Nollet, L. M. L., Toldra, F. 2008. *Handbook of Muscle Foods Analysis*. 1. vyd. Boca Ranton : Crc Press, 2008. 984 p. ISBN 1420045296.

Probola, G., Zander, L. 2007. Application of PCA method for characterisation of textural properties of selected ready-to-eat meat products. *Journal of Food Engineering*, vol. 83, no. 1, p. 93-98. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2007.02.052>

Varela, P., Salvador, A., Fiszman, S. 2008. On the assessment of fracture in brittle foods: The case of roasted almonds. *Food Res. Intern.*, vol. 41, p. 544-551. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2008.03.009>

Warner, K. F. 1928. Progress report of the mechanical test for tenderness of meat. *Proceedings of the American Society of Animal Production*, vol. 21, 114 p.

Contact address:

Ing. Jozef Čurlej, 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: jozef.curlej@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. 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: jozef.capla@uniag.sk

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

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

CONTRIBUTION OF TEMPORAL DOMINANCE OF SENSATIONS METHOD TO THE SENSORY DESCRIPTION OF TASTE PROPERTIES OF COMMERCIAL GREEN TEA BRANDS

Lenka Trembecká, Tomáš Fekete, Zuzana Beňová, Noémi Dubová

ABSTRACT

This paper aims to investigate the most dominant taste attributes of green tea samples in panelists perception over time. In order to assess the samples, a brand new method of sensory evaluation called „Temporal Dominance of Sensations“ was used. The five commercial green tea brands were evaluated by eight trained panelists (students). For each sample of green tea, curves of the dominance of each attribute over time were computed. The TDS curves provided information about the sequence of attributes that were dominant during degustation. This methodology was useful to characterize taste properties of green tea samples.

Keywords: temporal dominance of sensations (TDS); dominance rate; attribute; green tea

ÚVOD

Dočasná dominancia vnemov (TDS) je metóda umožňujúca časový sled dominantných zmyslových vnemov v priebehu degustácie vzorky a v súčasnosti sa stáva predmetom čoraz väčšieho záujmu v oblasti senzorickej analýzy potravín (Pineau et al., 2012). Podnetom pre vznik TDS sa stala metóda TI (Time-Intensity) (Meillon et al., 2009), ktorá spočíva v meraní intenzity vnímania daného atribútu v určitom časovom intervale (Pavelková et al., 2012). Ide o pomerne časovo náročnú metódu, ktorá je v určenom časovom intervale schopná vyhodnotiť iba jeden znak. Navyše, hodnotenie jediného atribútu môže viesť k tzv. halo-dampingovému efektu, čo znamená, že prvotný mylný dojem spôsobí celkové skreslené posudzovanie (Meillon et al., 2009).

S cieľom prekonať tieto nedostatky bola v roku 1999 v Európskom centre pre chuť a konzumentské správanie v Dijone vyvinutá TDS metóda, s následnou prezentáciou na niekoľkých kongresoch. Jej podstatnou výhodou v porovnaní s TI je hodnotenie niekoľkých atribútov v rovnakom čase (Pineau et al., 2009) a zdôraznenie interakcie medzi jednotlivými atribútmi (Le Révérend et al., 2008). Meillon et al. (2009) vo svojej štúdií, v ktorej sa venovali hodnoteniu červených vín, tiež poukazujú na výhody použitia TDS metódy, pomocou ktorej je možné hodnotiť až dvakrát viac atribútov ako pri klasických senzorickej metódach.

Táto metóda je vhodná na analýzu rôznych druhov potravín, umožňuje hodnotenie viacerých senzorickej vlastností, ako je chuť, aróma, či konzistencia, avšak vyžaduje určité znalosti potrebné na definíciu zoznamu adekvátnych atribútov na tento relatívne neobvyklý spôsob hodnotenia výrobku. Podmienky metódy TDS sa totiž pomerne odlišujú od štandardných senzorickej metód (Pineau et al., 2012). Na začiatku hodnotenia je

na monitore počítača členom senzorickej komisie predložený zoznam atribútov, ktorých dominanciu v danom okamihu posudzujú, a to dovtedy, kým vnímanie pretrváva. Ak hodnotiteľ usúdi, že dominanciu nadobúda iný atribút, označí ho kliknutím v zozname atribútov (Pineau et al., 2009). V priebehu hodnotenia sa členovia senzorickej komisie musia neustále rozhodovať medzi niekoľkými atribútmi, ktoré podmieňujú poradie dominantných vnemov, pričom sústredenie panelistov na subjektívne vnímanie je nutné počas trvania celého procesu. Definovanie zoznamu príslušných atribútov je preto relevantným faktorom, pretože určuje jednoznačné odpovede panelistov. Pri hodnotení sa odporúča použitie zoznamu obsahujúceho maximálne 10 znakov, pretože členovia komisie obvykle nie sú schopní použiť všetky uvedené atribúty (Pineau et al., 2012).

Okrem toho, panelisti majú tendenciu zvoliť si atribúty uvedené v hornej časti zoznamu častejšie, ako atribúty nachádzajúce sa na inej pozícii. Za účelom obmedzenia tohto negatívneho efektu je dôležité zostaviť vyrovnané poradie jednotlivých atribútov, prípadne môže byť ich pozícia vybilancovaná pre každého člena komisie, t. j. každý panelista má iné poradie atribútov (Pineau et al., 2012).

MATERIÁL A METÓDY

Cieľom práce bolo testovanie dočasnej dominancie vnemov zelených čajov v určitom časovom intervale pomocou metódy TDS. Tento potravinársky výrobok sme si zvolili z dôvodu mimoriadne variabilných senzorickej vlastností, z ktorých chuť predstavuje najsťnifikantnejšiu skupinu atribútov. Práve preto sme sa rozhodli pre posudzovanie dočasnej dominancie chuti. Po dôslednom uvážení sme vybrali tieto atribúty, ktorých dominancia by sa mohla pri hodnotených vzorkách prejaviť: sladká, kyslá,

horká, zvieravá a cudzia chuť. Na základe povahy hodnotených výrobkov bol zvolený primeraný časový interval 20 sekúnd.

Hodnotenie vzoriek zelených čajov sa uskutočnilo v popoludňajších hodinách v senzorickom laboratóriu na Katedre hygieny a bezpečnosti potravín FBP SPU Nitra.

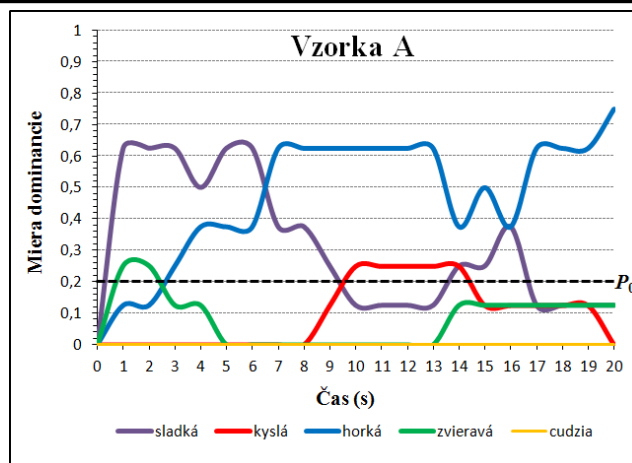
Senzorický panel pozostával z 8 členov (študenti SPU Nitra). Pred samotným hodnotením boli panelisti detailne oboznámení s TDS metódou, rovnako ako aj s priebehom hodnotenia. Celkovo bolo hodnotených 5 zelených čajov pochádzajúcich od rôznych výrobcov, ktoré sa navzájom líšili svojím zložením a cenou. Všetky čaje boli zakúpené v miestnych obchodných reťazcoch v Nitre.

Zelené čaje sme pripravili podľa odporúčaní jednotlivých výrobcov, ktoré boli uvedené na obale. Následne boli podávané panelistom monadicky pod kódovým označením vzorka A, B, C, D a E v bielych plastových pohároch s objemom 100 ml (objem vzoriek predstavoval cca 50 ml). Všetkým hodnotiteľom bola naraz podaná tá istá vzorka, z dôvodu zachovania optimálnej teploty čajov. K dispozícii bola pitná voda ako neutralizátor chuti.

Na získanie TDS dát sme použili softvér TI-TDS, ktorý bol vyvinutý **Victorisom (2010)**. Všetci hodnotitelia pracovali v rozhraní tohto softvéru, ktorý im bol počas zaškolenia o metóde predinštalovaný do osobných počítačov. Vlastné senzorické hodnotenie prebiehalo nasledovne: po podaní prvej vzorky (vzorka A) boli panelisti požiadaní, aby si ju vložili do úst a klikli na tlačidlo Start ($t = 0$ s). Potom v priebehu časového intervalu (1 - 20 sekúnd) zaznamenávali zmeny dominance jednotlivých atribútov, kliknutím na príslušný atribút v rozhraní programu. Tieto zmeny, ktoré v priebehu časového intervalu zaregistroval pri hodnotení prvej vzorky každý panelista, program uložil do osobitných výstupných súborov, v ktorých bola dočasná dominancia všetkých atribútov počas každej sekundy časového intervalu zapísaná vo forme binárneho kódu (0 - nedominoval, 1 - dominoval). Týmto spôsobom sme po ohodnotení prvej vzorky zeleného čaju získali od všetkých panelistov 8 datasetov. Rovnakým postupom boli ohodnotené aj zvyšné štyri vzorky. Dáta boli následne graficky spracované podľa metodiky **Pineaua et al. (2009)**, ktorý popísal postup konštrukcie TDS kriviek a spôsob ich interpretácie.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Na obrázkoch 1 - 5 sú zobrazené grafy TDS hodnotených zelených čajov. Os x v každom grafe reprezentuje časový interval (20 s) a os y predstavuje mieru dominance jednotlivých atribútov. Za významné považujeme miery dominance atribútov, ktorých hodnoty sa nachádzajú nad tzv. chance (náhodnou) hladinou (P_0). Tá bola vypočítaná ako $1/n$, kde n je počet atribútov. V tomto prípade, leží náhodná hladina na úrovni miery dominance 20 %, keďže sme sledovali dominanciu 5 atribútov. Miery dominance atribútov nachádzajúce sa pod úrovňou tejto hladiny znamenajú, že dominancia daných atribútov bola vnímaná náhodne (panelisti sa nestotožnili s vnímaním ich dominance). Naopak, so zvyšujúcimi sa hodnotami miery dominance jednotlivých atribútov stúpa jednotnosť senzorického panelu pri vnímaní dominance atribútov.



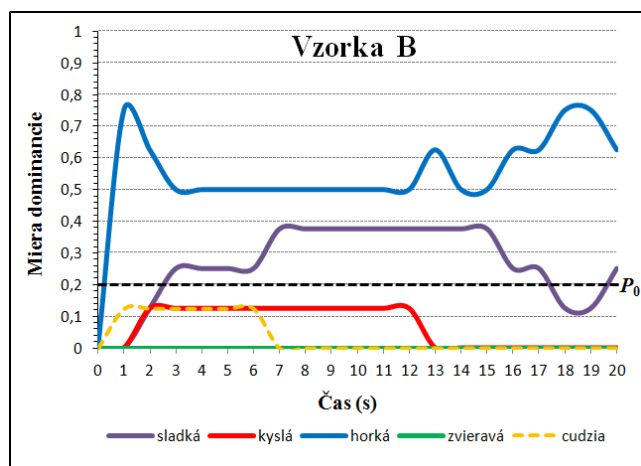
Obr. 1 Dočasná dominancia atribútov chuti - vzorka A

Z obr. 1 vyplýva, že 63 % hodnotiteľov vnímalo v 1. sekunde sladkú chuť vo vzorke A ako dominantnú, resp. v 1. sekunde dosahuje miera dominance sladkej chuti 63 %. Medzi 2. a 5. sekundou jej miera dominance klesla, ale v 6. sekunde sa opäť zvýšila na pôvodných 63 %. Od tohto okamihu miera dominance sladkej chuti v priebehu hodnotenia výrazne klesla a panelisti začali postupne zaznamenávať nástup dominance horkej chuti. Horká chuť bola v priebehu senzorického hodnotenia vzorky A najdlhšie dominujúcou chuťou (až 6 sekúnd). Od 7. až do 13. sekundy dominovala u 63 % panelistov. Až 75 % hodnotiteľov ju vnímalo ako dominantnú v 20. sekunde. Môžeme si všimnúť, že miera dominance zvieravej a kyslej chuti je nízka, ale významná. V 1. sekunde zaznamenalo 25 % panelistov dominanciu zvieravej chuti. To isté percento panelistov považovalo kyslú chuť za dominantnú v intervale 10. až 14. sekundy. Dominancia cudzej chuti sa v priebehu hodnotenia neprejavila.

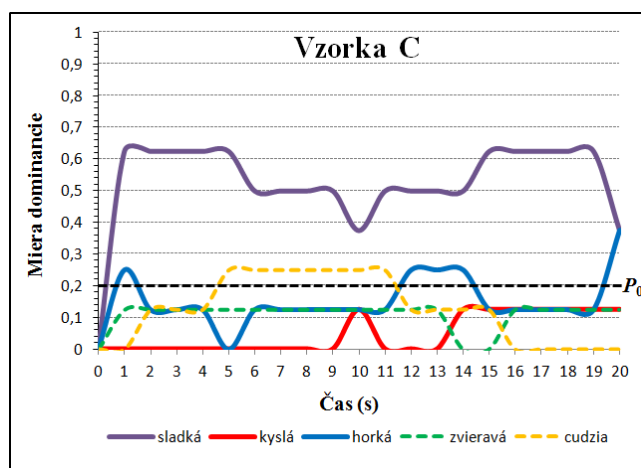
Vzorku A reprezentoval zelený čaj s arómou liči. Výrobca uvádza na obale čaju tvrdenie, podľa ktorého ovocná chuť liči dotvára chuť hotového nápoja. S týmto tvrdením môžeme súhlasiť, pretože podľa grafu sladká chuť na začiatku senzorického hodnotenia výrazne dominovala. Neskôr sa prejavila typická horká chuť zeleného čaju. Zo zisteného môžeme o vzorke A povedať, že na začiatku senzorického hodnotenia bola charakteristická najmä sladkou chuťou, ktorá bola sprevádzaná čiastočnou zvieravosťou, neskôr sa začala prejavovať horkosťou a v menšej miere kyslosťou.

Z grafu vzorky B (Obr. 2) vyplýva, že panelisti v priebehu hodnotenia zaznamenali dominanciu najmä sladkej a horkej chuti. Miera dominance týchto dvoch atribútov nadobúdala v priebehu hodnotenia takmer charakter nepriamej úmernosti. To znamená, že v 1. sekunde vnímalo 75 % panelistov horkú chuť ako dominantnú, no zároveň v tomto čase žiadny panelista nezaznamenal dominanciu sladkej chuti. Charakter nepriamej úmernosti v rámci dominance týchto atribútov je najlepšie postrehateľný v intervale 16. až 20. sekundy. V intervale medzi 18. a 19. sekundou, kedy miera dominance horkej chuti dosahuje opäť 75 %, miera dominance sladkej chuti klesla na minimum (13 %). Panelisti počas 20 sekúnd nezaznamenali zvieravú chuť. Cudzia a kyslá chuť bola registrovaná v prvej polovici

časového limitu, avšak miery dominancie nie sú markantné, pretože hodnoty ležia pod úrovňou P_0 hladiny.



Obr. 3 Dočasná dominancia atribútov chuti - vzorka B



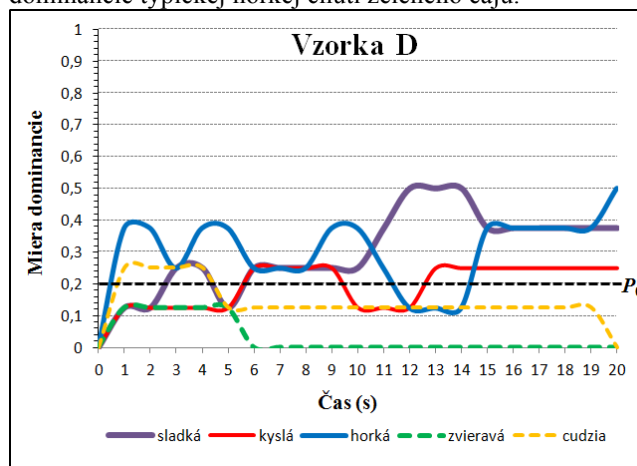
Obr. 3 Dočasná dominancia atribútov chuti - vzorka C

Vzorka B reprezentovala zelený čaj s lístkami jazmínu. Tieto čaje sú charakteristické harmonickou chuťou. Krivky grafu naznačujú, že vzorka B bola naozaj charakteristická prelínajúcou sa horkou a sladkou chuťou, pričom dominancia horkej chuti bola mierne vyššia.

Z obr. 3 môžeme usúdiť, že v priebehu celého sensorického hodnotenia vzorky C dominovala sladká chuť, ktorá dosiahla maximálnu hodnotu miery dominancie (63 %) v 1. až 5. sekunde, a tiež v 15. až 19. sekunde. Celkovo 25 % panelistov vnímalo horkú chuť ako dominantnú v 1. sekunde, a takisto neskôr v intervale 12. až 14. sekundy. Až u 38 % panelistov dominovala horká chuť v 20. sekunde. Rovnako 25 % panelistov zaznamenalo od 5. do 11. sekundy dominanciu cudzej chuti. Miery dominancie kyslej a zvieravej chuti nie sú výrazné.

Vzorka C reprezentovala sypaný zelený čaj s kúskami banánu, guávy, manga, melóna, vňaťou mučenky, kvetmi slnečnice a nevädze poľnej. Zloženie výrobku koreluje s TDS krivkami, a preto sa domnievame, že bohatá ovocná zložka čaju sa intenzívne podieľala na tvorbe sladkej chuti a bylinná zložka na tvorbe bylinnej chuti. Keďže panelisti nemali k dispozícii atribút bylinná chuť, jej dominanciu pravdepodobne označili v zozname atribútov ako chuť cudzia. Z grafu je zrejmé, že miera dominancie sladkej

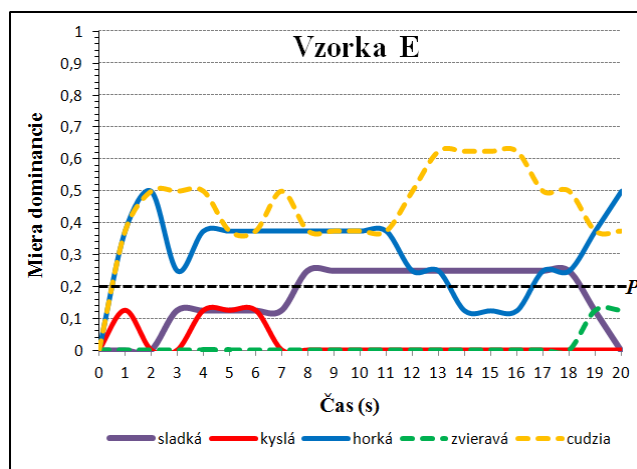
chuti dokonca prevyšovala počas celých 20 sekúnd mieru dominancie typickej horkej chuti zeleného čaju.



Obr. 4 Dočasná dominancia atribútov chuti - vzorka D

Na Obr. 4 vidíme, že miera dominancie jednotlivých atribútov hodnotenej vzorky D bola pomerne vyrovnaná. Mierne signifikantnejšie boli miery dominancie horkej a sladkej chuti. Miera dominancie horkej chuti od začiatku narastala a s postupom času mali hodnoty tendenciu pravidelne sa zvyšovať a znižovať. Maximum (50 %) dosiahla na konci časového intervalu. Dominanciu sladkej chuti zaznamenalo 50 % panelistov, a to počas 12. až 14. sekundy. Kyslá chuť dosiahla v priebehu hodnotenia maximálnu mieru dominancie 25 %. Cudzia chuť dominovala v prvých sekundách hodnotenia u 25 % panelistov. Miera dominancie zvieravej chuti nebola významná.

Vzorka D reprezentovala zelený čaj s prírodnou arómou bergamotu a maliny. Myslíme si, že chuť vzorky D zodpovedala zloženiu výrobku. Počas sensorického hodnotenia sa prejavovala typická horká chuť zeleného čaju, ktorá bola sprevádzaná mierne kyslou chuťou bergamotu a sladkou chuťou maliny. Dominanciu cudzej chuti si vysvetľujeme tak, že niektorí panelisti týmto spôsobom vyjadrili vnímanie dominancie ovocnej zložky.



Obr. 5 Dočasná dominancia atribútov chuti - vzorka E

Z Obr. 5 vyplýva, že v 2. sekunde bola horká aj cudzia chuť v prípade vzorky E dominantná pre 50 % panelistov. V priebehu hodnotenia miera dominancie horkej chuti klesala, v závere vystúpila opäť na maximum (50 %).

Miera dominancie cudzej chuti dosiahla maximálnu hodnotu (63 %) v intervale 13. až 16. sekundy. Najdlhšie vnímanou chuťou bola sladká chuť, 25 % panelistov ju zaznamenalo ako dominantnú od 8. do 18. sekundy. Dominancia kyslej a zvieravej chuti bola vnímaná len v prípade 13 % hodnotiteľov, preto nie je dôležitá.

Vzorka E predstavovala čistý zelený čaj. V porovnaní s predchádzajúcimi čajmi bol tento výrobok najlacnejší. Navyše, odporúčanie na prípravu bolo v porovnaní s odporúčaniami na obaloch iných čajov pomerne neobvyklé. Výrobca udáva optimálnu dobu lúhovania až 10 minút a odporúča čaj zaliať vriacou vodou. Tieto podmienky prípravy nie sú pre zelený čaj optimálne a môže sa to negatívne prejaviť získaním výluhu so zmenenými senzorickými vlastnosťami. Ako už bolo spomenuté, pri príprave všetkých vzoriek boli dodržané odporúčania výrobcov. Preto sa domnievame, že vysoká miera dominancie cudzej a horkej chuti bola spôsobená vylúhovaním veľkého množstva horkých látok a vysokou teplotou zalievacej vody.

Na základe týchto dosiahnutých výsledkov hodnotenia vzoriek je možné konštatovať, že TDS je vhodným nástrojom na posúdenie prejavu chuťových, ale aj ďalších charakteristík výrobku v čase.

Lenfant et al. (2009) uvádzajú, že pomocou TDS metódy je možné pre každú potravinu zostaviť chronologický sled vnímaných procesov, ktoré prebiehajú v ústach pri jej mechanickom spracovaní.

Saint-Eve et al. (2011) použili túto metódu na zdôraznenie interakcie textúry a intenzity arómy cukríkov, ale aj časového vývoja kvality arómy v priebehu a po degustácii.

Laguna et al. (2013) skúmali texturálne vlastnosti sušienok s rôznym podielom tuku a vlákniny. Ukázalo sa, že TDS metóda môže špecifickým spôsobom prispievať k lepšiemu posudzovaniu kvality reologických vlastností, a tým aj k zisteniu prijateľnosti výrobkov pre konzumentov.

Keďže táto metóda predstavuje pomerne nový spôsob senzorickeho profilovania a jej štatistická časť sa v súčasnosti ešte zdokonaľuje, výsledky TDS sú často porovnávané s výsledkami iných senzorickejch metód.

Le Révérend et al. (2008) vo svojej štúdií, zameranej na porovnanie TDS s metodikou TI, získali pri použití týchto metód podobné výsledky v súvislosti s hodnotením vzoriek, ako aj s priebehom vývoja jednotlivých znakov v čase. Zároveň však poukázali na to, že TDS prináša výsledky, ktoré umožňujú vzájomne porovnávať dominanciu atribútov počas hodnotenia, ako aj určiť poradie jednotlivých dominantných atribútov.

TDS sa často porovnáva aj s ďalšími profilovými metódami, ako je QDA - kvantitatívna deskriptívna analýza. Napríklad, **Labbe et al. (2009)** testovali *in vitro* gély s rôznou koncentráciou aromatických zložiek pomocou metodík TDS a QDA. Porovnaním týchto dvoch metód sa zaoberala aj štúdia **Alberta et al. (2012)**, v ktorej boli hodnotené senzorické vlastnosti rybieh prstov, pripravených rôznymi tepelnými úpravami. Napriek tomu, že TDS metóda sa používa predovšetkým na tekuté výrobky, aj v tomto prípade sa dosiahli priaznivé výsledky.

Podobne obe tieto metódy uplatnili **Dinnella et al. (2012)**, a to pri zisťovaní vhodnosti prídavku olivového

oleja do konzervovanej zeleniny, a tiež **Bruzzone et al. (2013)**, ktorí skúmali vplyv zloženia jogurtov na ich štruktúru.

Ng et al. (2012) použili tieto dve metódy pri posudzovaní vplyvu zloženia na vnímanie chuti a vône džusov z čiernych ríbezlí, pričom pri TDS aj QDA boli produkty hodnotené tým istým senzorickejch panelom. Dospeli k záveru, že súčasné použitie oboch metód umožňuje komplexné senzorickejch profilovanie výrobkov.

ZÁVER

Metóda dočasnej dominancie vnemov (TDS) slúži spolu so štandardnými metódami senzorickej analýzy ako doplnková metóda na dotvorenie komplexného profilu výrobkov. V našej práci sme získali iba čiastočný chuťový profil zelených čajov, keďže primárnym cieľom nebol rating a ranking výrobkov, ale sledovanie časovej dominancie jednotlivých chuťových atribútov a nepriamo aj korelácie medzi zložením a prejavom príslušných chutí. Na dosiahnutie reliabilných výsledkov TDS je potrebné viacnásobné opakovanie hodnotení a zdokonaľovanie zmyslového vnímania spôsobilých panelistov.

LITERATÚRA

Albert, A., Salvador, A., Schlich, P., Fiszman, S. 2012. Comparison Between Temporal Dominance of Sensations (Tds) And Key-Attribute Sensory Profiling for Evaluating Solid Food with Contrasting Textural Layers: Fish Sticks. *Food Quality And Preference*, vol. 24, no. 1, p. 111-118. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodqual.2011.10.003>

Bruzzone, F., Ares, G., Giménez, A. 2013. Temporal Aspects of Yoghurt Texture Perception. *International Dairy Journal*, vol. 29, no. 2, p. 124-134. <http://dx.doi.org/10.1016/j.idairyj.2012.10.012>

Dinnella, C., Masi, C., Zoboli, G., Monteleone, E. 2012. Sensory Functionality Of Extra-Virgin Olive Oil In Vegetable Foods Assessed by Temporal Dominance of Sensations And Descriptive Analysis. *Food Quality And Preference*, vol. 26, no. 2, p. 141-150. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodqual.2012.04.013>

Labbe, D., Schlich, P., Pineau, N., Gilbert, F., Martin, N. 2009. Temporal Dominance of Sensations and Sensory Profiling: A Comparative Study. *Food Quality And Preference*, vol. 20, no. 3, p. 216-221.

Laguna, L., Varela, P., Salvador, A., Fiszman, S. 2013. A New Sensory Tool to Analyse the Oral Trajectory of Biscuits With Different Fat And Fibre Contents. *Food Research International*, vol. 51, no. 2, p. 544-553. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2013.01.003>

Le Révérend, F. M., Hidrio, C., Fernandes, A., Aubry, V. 2008. Comparison Between Temporal Dominance of Sensations and Time Intensity Results. *Food Quality And Preference*, vol. 19, no. 2, p. 174-178. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodqual.2007.06.012>

Lenfant, F., Loret, C., Pineau, N., Hartmann, C., Martin, N. 2009. Perception of Oral Food Breakdown. The Concept of Sensory Trajectory. *Appetite*, vol. 52, no. 3, p. 659-667. [PMid:19501764](http://dx.doi.org/10.1016/j.appet.2009.04.006)

Meillon, S., Urbano, C., Schlich, P. 2009. Contribution Of The Temporal Dominance Of Sensations Method to the Sensory Description Of Subtle Differences Partially Dealcoholized Red Wines. *Food Quality And Preference*, vol. 20, no. 7, p. 490-499. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodqual.2009.04.006>

Ng, M., Lawlor, J. B., Chandra, S., Chaya, C., Hewson, L., Hort, J. 2012. Using Quantitative Descriptive Analysis And Temporal Dominance of Sensations Analysis as Complementary Methods For Profiling Commercial Blackcurrant Squashes. *Food Quality And Preference*, vol. 25, no. 2, p. 121-134. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodqual.2012.02.004>

Pavelková, A., Flimelová, E., Vietoris, V. 2012. Sensory Evaluation Of Fresh Cheese Taste With The Addition Of Oregano. *Potravinárstvo*, vol. 6, no. 1, p. 34-36.

Pineau, N., Goupil De Bouillé, A., Lepage, M., Lenfant, F., Schlich, P., Martin, N., Rytz, A. 2012. Temporal Dominance of Sensations: What is a Good Attribute List? *Food Quality And Preference*, vol. 26, no. 2, p. 159-165. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodqual.2012.04.004>

Pineau, N., Schlich, P., Cordelle, S., Mathonnière, C., Issanchou, S., Imbert, A., Rogeaux, M., Etiévant, P., Köster, E. 2009. Temporal Dominance of Sensations: Construction of the TDS Curves and Comparison With Time-Intensity. *Food Quality And Preference*, vol. 20, no. 6, p. 450-455. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodqual.2009.04.005>

Saint-Eve, A., Déléris, I., Panouillé, M., Dakowski, F., Cordelle, S., Schlich, P., Souchon, I. 2011. How Texture Influences Aroma and Taste Perception Over Time in Candies. *Chemosensory Perception*, vol. 4, no. 1-2, p. 32-41.

Vietoris, V. 2010. Software TI-TDS. Release 1.1. 2010.

Acknowledgments:

The authors are grateful to Ing. Vladimír Vietoris, PhD. for his technical assistance and to Ing. Peter Zajác, PhD. for publishing this paper.

Contact address:

Bc. Lenka Trembecká, 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: trelenka22@gmail.com

Bc. Tomáš Fekete, 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: tfekete111@gmail.com

Bc. Zuzana Beňová, 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: zuzanabenoval40290@gmail.com

Bc. Noémi Dubová, 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: nduba3@gmail.com

AETHEROLEUM AND FAT OXIDATION OF CHICKEN MEAT

Tkáčová Jana, Angelovičová Mária

ABSTRACT

The quality of meat changes during storage. The experiment was performed on the final fattening type of chickens COBB 500. Chickens were fed by feed mixture with aetheroleum. Premix of aetheroleum contained aetheroleum from *Origanum vulgare* L.) (30 g), *Thymus vulgaris* L. (10 g) and *Cinnamomum zeylanicum* (10 g). The carcass was stored at -18 °C in a freezer box. Acid number of fat in chicken meat was ranged from 4.74 to 14.57 mg KOH/g fat after 9 months and after 12 months was ranged from 5.75 to 9.11 mg KOH/g fat.

Keywords: broiler chicken; meat; fat; oxidation; acid number

ÚVOD

Hydinové mäso je z hľadiska dietetických vlastností a nutričnej hodnoty veľmi zaujímavé vzhľadom na vysoký obsah bielkovín, minerálnych látok a vitamínov a nízky podiel tukov. Mäso hrabavej hydiny obsahuje v priemere 19,7 - 22,3 % bielkovín, 1,4 - 22,16 % lipidov, 57 - 75,25 % vody, 1,00 - 1,07 % popolovín (Benková, 2009).

Zloženie mäsa kolíše v závislosti od druhu zvieratá, plemena, pohlavia, veku a výživy. Štruktúra a zloženie svaloviny závisí od spôsobu spracovania mäsa, ktoré ovplyvňujú biochemické, organoleptické a technologické vlastnosti mäsa (Pipek, 1998; Brezina et al., 2001; Benková, 2009).

Bielkoviny kuracieho mäsa obsahujú v porovnaní s bravčovým a hovädzím mäsom vysoký obsah esenciálnych aminokyselín, najmä arginín, leucín, izoleucín, metionín a valín. (Benková et al. 2005).

Biologická hodnota potravinových tukov sa posudzuje podľa ich stráviteľnosti, obsahu vitamínov rozpustných v tukoch, esenciálnych mastných kyselín, cholesterolu a podľa vzájomného pomeru jednotlivých druhov mastných kyselín. Kvalita a druh tuku ovplyvňuje vzhľad, chuť a hlavne energetickú a výživovú hodnotu potravín (Jurkovičová, 2008).

V mäse sú lipidy zastúpené hlavne ako estery mastných kyselín glycerolu. Hoci sú tuky pre vysoký obsah energie hodnotené negatívne, dodávajú mäsu jemnosť a krehkosť. Obsahujú lipofilné vitamíny, heterolipidy, hlavne fosfolipidy a esenciálne mastné kyseliny (Ingr et al., 1993; Pipek 1995).

Tuk má významnú úlohu pri tvorbe textúry mäsa a je zdrojom energie. Rovnako ovplyvňuje aj chutnosť mäsa (Pipek, 1991; Pipek, 1998).

Hydinový tuk obsahuje vyššie množstvo polynenasýtených mastných kyselín ako tuk iných jatočných zvierat. Práve polynenasýtené mastné kyseliny podliehajú najviac oxidačným zmenám, ktoré zhoršujú organoleptické vlastnosti a trvanlivosť potravín (Korimová et al., 2000; Turek et al., 2000; Bou et al., 2001).

Oxidácia tukov je jeden z hlavných problémov v mäsovom priemysle z dôvodu zníženia kvality chute a strate výživnej hodnoty (Ladikos a Lougovois, 1990; Ahn et al., 1992).

Oxidácia vedie k oxidačnému žltnutiu a zahŕňa pôsobenie kyslíka na glyceridy, kým hydrolyza vedie k hydrolytickému žltnutiu a zahŕňa hydrotermálnu alebo enzymatickú hydrolyzu na voľné mastné kyseliny a ďalšie produkty. Medzi faktory, ktoré ovplyvňujú vývoj zatuchnutosti, patrí napríklad miera nenasýtenosti olejov, teplo, prooxidanty, svetlo, niektoré enzýmy (lipoxygenáza), obsah vlhkosti a dostupnosť kyslíka (Özogul et al., 2010).

Sekundárne oxidačné produkty, ako napríklad aldehyd, ketón a ester, sú zodpovedné za zvýšené znehodnotenie a odchýlky od prirodzenej chute (Ladikos a Lougovois, 1990).

Počas mraziarenského skladovania surového mäsa za určitý čas dochádza k určitému dozrievaniu (Pipek, 1992).

Pri ďalšom skladovaní prechádza zrenie mäsa do hlbokaj autolyzy. Tento dej je nežiadúci. Vzniká rozklad bielkovín na oligopeptidy a aminokyseliny, mäso získava nepríjemnú chuť a nastáva hydrolyza tukov (Kadlec et al., 2002).

Pri hydrolyze tukov sa uvoľňujú mastné kyseliny (Velíšek, 2009).

Hlboká autolyza mäsa jatočných zvierat nie je žiadúca, ale nie je možné jej úplne zabránenie alebo zamedzenie mikrobiálnej proteolýzy. Hlboká autolyza katalyzovaná natívnymi enzýmami môže prebiehať a pokračovať v pomerne izolovanom stave (Steinhauser, 1995).

Zloženie mäsa môže byť modifikované diétou. U zvierat, ktoré boli kŕmené diétami bohatými na nenasýtené tuky, v ich mäse sa mení zloženie polynenasýtených mastných kyselín (PUFA) (Lin et al., 1989a; Ajuyah et al., 1993; Ahn et al., 1995; Mooney et al., 1998; Lo'pez Ferrer et al., 1999).

Rastlinné extrakty a silice pozitívne ovplyvňujú u zvierat príjem krmiva, prírastky živej hmotnosti, utilizáciu živín a zlepšujú mikrobiálnu fermentáciu v čreve (Docic a Biklei, 2003).

Medzi rastlinami existuje 64 čeľadí, ktoré obsahujú jeden alebo viac ako jeden druh silice (Mathe et al., 1996).

Antioxidačné účinky rastlinných výťažkov môžu byť použité na spomalenie alebo zabránenie tukovej oxidácie v potravinárskych výrobkoch (Rababah et al., 2004).

Cieľom predloženého článku bolo sledovať a vyhodnotiť výsledky tukovej oxidácie kuracieho mäsa po skrmovaní krmivom obohateného o zmes rastlinných silíc.

MATERIÁL A METÓDY

Na komerčnej hydinovej farme bol vykonaný skupinový krmný pokus. Hydinová farma je prispôbená pre výkrm 24000 kurčiat. Výkrm bol uskutočňovaný na hlbokjej podstielke. Pre krmný experiment bol použitý finálny hybrid kurčiat, ktorý je určený na produkciu mäsa - Cobb 500. Na začiatku haly bol vyčlenený priestor pre dve skupiny - kontrolná a pokusná. Na skupinový krmný pokus bolo použitých 200 jednodňových kurčiat - 100 kusov v kontrolnej skupine, ktoré boli krmným typom krmných zmesí a 100 kusov v pokusnej skupine, kde bol použitý rovnaký typ krmných zmesí s prídavkom kombinácie silíc 0,05 % na 100 kg kompletnej krmnej zmesi. Premix silíc obsahoval silice z pamajoránu obyčajného (*Origanum vulgare* L.) (30 g), z tymianu obyčajného (*Thymus vulgaris* L.) (10 g) a zo škoricovníka cejlónskeho (*Cinnamomum zeylanicum*) (10 g) (pomer 3:1:1). Silice boli najprv zhomogenizované v oleji a následne zapracované do kompletnej krmnej zmesi. Krmne zmesi boli skrmované v práškovej štruktúre. Príprava krmných zmesí bola v súlade so zákonom o krmných zmesiach č. 440/2006 Z.z. Kurčatá skrmovali krmnu zmes HYD-01 (štartérová) od 1. do 18. dňa veku, HYD-02 (rastová) od 19. do 31. dňa veku a HYD-03 (finálna) od 32. do 38. dňa veku *ad libitum*.

Jatočná rozrábka bola realizovaná na Katedre hodnotenia surovín živočíšneho pôvodu FBP SPU v Nitre. Jatočné telá hydiny boli zabalené do mikroténových obalov a následne uskladnené pri teplote -18 °C. Chemické analýzy boli vykonané po 9 mesiacoch a 12 mesiacoch uskladnenia. Chemické analýzy vzoriek boli vykonané na Katedre hygieny a bezpečnosti potravín FBP SPU v Nitre. Vzorka pre analýzu pozostávala z rovankého podielu prsnej a stehnovej svaloviny a približne z 1 cm² kože s podkožným tukom. Analýza tuku kurčacieho mäsa bola vykonaná podľa normy STN EN ISO 660.

Vzorky mäsa boli najprv vysušené, z ktorých bol následne vyextrahovaný tuk pomocou prístroja Det Gras N Selecta P. V tuku bolo stanovené číslo kyslosti.

Číslo kyslosti tuku bolo stanovené po rozpustení extraktu - tuku, v zmesi etanol - dietyléter v pomere 1:1 alkalimetrickou titráciou na fenolftaleín. Extrakčná banka s vyextrahovaným tukom bola mierne zahriatá a tuk rozpustený v 25 ml zmesi etanol - dietyléter. Obsah extrakčnej banky bol po pridaní niekoľkých kvapiek

Tabuľka 1 Číslo kyslosti tuku v mäse hydiny krmenej kombináciou silíc v závislosti od doby skladovania vyjadrené v mg KOH.g⁻¹ tuku

Doba skladovania	1. vzorka	2. vzorka	3. vzorka	4. vzorka	5. vzorka	6. vzorka
9 mesiacov	8,25	4,74	7,36	7,87	14,57	7,02
12 mesiacov	9,11	8,28	8,27	6,41	8,28	5,75

indikátora titrovaný odmerným roztokom hydroxidu draselného až do vzniku slabo ružového sfarbenia titrovaného roztoku. Číslo kyslosti tuku bolo vyjadrené ako mg KOH.g⁻¹.

Matematicko-štatistické vyhodnotenie výsledkov bolo vykonané v programovom systéme SAS (SAS,1985). Rozdiely boli testované pomocou párovacieho t-testu.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Číslo kyslosti tuku vyjadruje množstvo látok kyslej povahy, väčšinou voľných karboxylových kyselín v mg KOH, ktoré sú potrebné k neutralizácii jedným gramom extraktu, získaného extrakciou extrakčným činidlom.

Číslo kyslosti tukov v kurčacom mäse sa pohybovalo po 9 mesiacoch v rozpätí 4,74 až 14, 57 mg KOH.g⁻¹ tuku a po 12 mesiacoch v rozpätí 5,75 až 9,11 mg KOH.g⁻¹ tuku. Rozdiely medzi rôznou dobou skladovania neboli štatisticky potvrdené.

Tabuľka 2 Matematicko-štatistické vyhodnotenie čísla kyslosti tuku v závislosti od doby skladovania mäsa

Skupina	n	s	v _k	t-test
9 mesiacov	6	3,31	39,84	0,68*
12 mesiacov	6	1,30	16,92	

n - početnosť, s - smerodajná odchýlka, v_k - variačný koeficient, t-test *P≥0,05

Podľa Tkáčovej a Angelovičovej (2012) sa hodnoty čísla kyslosti pri použití 2 % lucernovej múčky v kompletnej krmnej zmesi po 12 mesiacoch uskladnenia pohybovali v približne rovnakom rozpätí 5,97 až 8,39 mg KOH.g⁻¹ tuku.

Antimikrobiálnymi účinkami rôznych druhov silíc sa vo svojich prácach zaoberali Dorman a Deans (2000), Kamel (2001), Botsoglou et al. (2002), Angelovičová (2008), Štofán et al. (2009).

Faktory, ako je teplo, kyslík, svetlo a niektoré kovové ióny, najmä ióny železa a medi, majú významnú úlohu pri vzniku oxidácie (Ozturk a Cakmakcib, 2006).

Pri oxidácii vznikajú reakcie uhlíkovodíkového reťazca, preto sú spoločné voľným masným kyselinám a ich esterom. Karboxyl voľných masných kyselín avšak urýchľuje rozklad hydroperoxidov a môže reagovať s niektorými oxidačnými produktmi (Velíšek, 2009).

Radikály reagujú s lipidmi a spôsobujú oxidačnú deštrukciu nenasýtených, teda polynenasýtených masných kyselín, známych ako lipoperoxidácia (Sakac a Sakac, 2000).

Začiatok lipoperoxidácie sa odvodzuje aj od voľných radikálov, ako oxid dusičitý (Kanner et al., 1987).

Rýchlosť oxidácie tukov v mäse tiež závisí od

prítomnosti prooxidantov a antioxidantov (Tichivangana a Morrissey, 1985; Ruiz et al., 1999).

ZÁVER

Priemerná hodnota čísla kyslosti tuku po 9 mesiacoch skladovania kurčacieho mäsa pri teplote -18 °C bola na úrovni 8,30 mg KOH.g⁻¹ a po 12 mesiacoch skladovania kurčacieho mäsa bola na úrovni 7,68 mg KOH.g⁻¹. Podobná hodnota čísla kyslosti po 12 mesiacoch bola potvrdená aj v experimente s použitím 2% lucernovej múčky (priemerná hodnota 7,06 mg KOH.g⁻¹). Z uvedeného vyplýva, že použitie premixu silíc v kŕmnej zmesi má podobnú protektívnu funkciu na oxidáciu tukov v mäse počas 12 mesiacov mraziarenského uskladnenia ako použitie 2% lucernovej múčky v kŕmnej zmesi.

LITERATÚRA

Ahn, D. U., Wolfe, F. H., Sim, J. S., Kim, D. H. 1992. Packaging cooked turkey meat patties while hot reduces lipid oxidation. *J. Food Sci.*, vol. 57, no. 5, p. 1075-1078. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2621.1992.tb11267.x>

Ahn, D. U., Ajuyah, A., Wolfe, F. H., Sim, J. S. 1993. Oxygen availability affects prooxidant catalyzed lipid oxidation of cooked turkey patties. *J. Food Sci.*, vol. 58, no. 2, p. 278-282. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2621.1993.tb04255.x>

Ajuyah, A. O., Ahn, D. U., Hardin, R. T., Sim, J. S. 1993. Dietary antioxidants and storage affect chemical characteristics of ω -3 fatty acid enriched broiler chicken meats. *J. Food Sci.*, vol. 58, no. 1, p. 43-46, 61. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2621.1993.tb03206.x>

Angelovičová, M., Ladyková, M., Liptaiová, D., Močár, K., Štofán, D. 2008. Riešenie náhrady kŕmnych antibiotík rastlinnými silicami pri výrobe kurčacieho mäsa IX. *potravinárska konferencia : otvorené fórum o stave bezpečnosti, kvality a kontroly potravín*. Bratislava 12. - 13. februára, p. 41-45.

Benková, J., Baumgartner, J., Hetényi, L. 2005. Hydinové mäso - významná zložka racionálne výživy obyvateľstva. In. *Realizácia komplexného programu ozdravenia výživy obyvateľstva SR - využitie nutričných poznatkov v primárnej a sekundárnej prevencii neinfekčných chorôb*: zborník č. 49, Nitra: SAPV, s. 31-32. ISBN 80-89162-18-5.

Benková, J. 2009. *Produkty hydiny a ich kvalita*. Nitra: VUŽV, 2009.

Botsoglou, N. A., Florou-Paner, P., Christaki, E., Fletouris, D. J., Spais, A. B. 2002. Effect of dietary oregano essential oil on performance of chickens and on ironinduced lipid oxidation of breast, thigh and abdominal fat tissues. *Br. Poult. Sci.*, vol. 43, no. 2, p. 223-230. <http://dx.doi.org/10.1080/00071660120121436> PMID:12047086

Bou, R., Guardiola, F., Grau, A., Grimpa, S., Manich, A., Barroeta, A., Codony, R. 2001. Influence of dietary fat source, α -tocopherol, and ascorbic acid supplementation on sensory quality of dark chicken meat. *Poultry Sci.* vol. 80, p. 800-807. PMID:11441849

Březina, P., Komar, A., Hrabě, J. 2001. *Technologie, zbožiznalství a hygiena potravin II. část - Technologie, zbožiznalství a hygiena potravin živočišného původu*. Vyškov: VVŠ VP, 181 s. ISBN 80-7231-079-8.

Docic, M., Bilkei, G. 2003. Differences in antibiotic in *Escherichia coli*, isolated from East-European swine hers with or without prophylactic use of antibiotics. *J. Vet.Med. B*

vol. 50, no. 1, p. 27-30. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1439-0450.2003.00609.x>

Dorman, H. J. D., Deans, S. G. 2000. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *J. Appl. Microbiol.*, vol. 88, no. 2, p. 308-316. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2672.2000.00969.x>

Ingr, I., Buryška, J., Simeonovova, J. 1993. *Hodnocení živočišných výrobků*. 1 vyd. Brno : VŠZ, 128 s. ISBN 80-7157-088-5.

Jurkovičová, J., Štefániková, Z., Ševčíková, E. 2008. Role of Fats. *Human Nutrition. Život. Prostr.* vol. 42, no. 4, p. 194-198.

Kadlec, P. et al. 2002. *Technologie potravin I*. Praha :VŠCHT, 300 s. ISBN 80-7080-509-9.

Kamel, C. 2001. Tracing modes of action and the roles of plant extracts in non-ruminants. Garnsworthy, P. C., Wieseman: *Recent advances in animal nutrition*. Nottingham : Nottingham University Press. p. 135-150. ISSN 0375-1589.

Kanner, J., German, J. B., Kinsella, J. E. 1987. Initiation of lipid peroxidation in biological systems. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* vol. 25, no. 4, p. 317-364. <http://dx.doi.org/10.1080/10408398709527457> PMID:3304843

Korimová, E., Máté, D., Turek, P. 2000. Vplyv prírodných antioxidantov na kvalitu trvanlivých tepelne neopracovaných mäsových výrobkov. *Czech J. Food Sci.* vol. 18, no. 4, p. 124-128.

Ladikos, D., Lougovois, V. 1990. Lipid oxidation in muscle foods: A review. *Food Chem.*, vol.35, no. 4, p. 295-314. [http://dx.doi.org/10.1016/0308-8146\(90\)90019-Z](http://dx.doi.org/10.1016/0308-8146(90)90019-Z)

Lin, C. F., Gray, J. I., Asghar, A., Buckley, D. J., Booren, A. M., Flegal, C. J. 1989. Effects of dietary oils and α -tocopherol supplementation on lipid composition and stability of broiler meat. *J. Food Sci.* vol. 54, no. 6, p. 1457-1460. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2621.1989.tb05134.x>

López-Ferrer, S., Baucells, M. D., Barroeta, A. C., Grashorn, M. A. 1999. Influence of vegetable oil sources on quality parameters of broiler meat. *Archiv für Geflügelkunde*, vol. 63, no.1, p. 29-35.

Mathe, A. 1996. Essential oils as phytogetic feed additives (PFA). *27th International Symposium on Essential Oils : Essential oil symposium Proceeding*. Vienna, Austria: University of Veterinary Medicine, p. 315-321. ISBN 0-931710-59-6.

Mooney, J. W., Hirschler, E. M., Kennedy, A. K., Sams, A. R., Van Elswyk, M. E. 1998. Lipid and flavor quality of stored breast meat from broilers fed marine algae. *J. Food Sci. Agric.* vol. 78, no. 1, p.134-140. [http://dx.doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0010\(199809\)78:1<134::AID-JSFA96>3.0.CO;2-0](http://dx.doi.org/10.1002/(SICI)1097-0010(199809)78:1<134::AID-JSFA96>3.0.CO;2-0)

Özogul, Y., Özogul, F., Özkutuk, S., Kuley, E. 2006. Hydrolysis and oxidation of European eel oil during frozen storage for 48 weeks. *Eur. Food Res. Tech. A*, vol. 224, no.1, p. 33-37. <http://dx.doi.org/10.1007/s00217-006-0285-1>

Ozturk, S., Cakmakcib, S. 2006. The effect of antioxidants on butter in relation to storage temperature and durativ *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* vol. 108, no. 11, p. 951-959. <http://dx.doi.org/10.1002/ejlt.200600089>

Pipek, P. 1995. *Technologie masa I*. 4. vyd. Praha : VŠCHT, 334 s. ISBN 80-7080-174-3.

Pipek, P. 1991. *Technologie masa I*. 2. vyd. Praha : VŠCHT, 172 s. ISBN 80-7080-106-9.

Pipek, P. 1992. *Technologie masa II*. 1. Praha : VŠCHT, 215 s. ISBN 80-7080-143-3.

Pipek, P. 1998. *Základy technologie masa*. 1. vyd. Vyškov : VVŠ VP, 112 s. ISBN 80-7231-010-0.

Rababah, T. M., Hettiarachchy, N. S., Horax, R. 2004. Total phenolics and antioxidant activities of fenugreek, green tea, black tea, grape seed, ginger, rosemary, gotu kola, and ginkgo extracts, vitamin E, and tert-butylhydroquinone. *J. Agric. Food Chem.* vol. 52, no. 16, p. 5183-5186. <http://dx.doi.org/10.1021/jf049645z> PMID:15291494

Ruiz, J. A., Perez-Vendrell, A. M., Esteve-García, A. E. 1999. Effect of β -carotene and vitamin E on oxidative stability in leg meat of broilers fed different supplemental fats. *J. Agric. Food Chem.* vol. 47, no.2, p. 448-454. <http://dx.doi.org/10.1021/jf980825g> PMID:10563915

Sakac, V., Sakac, M. 2000. Free oxygen radicals and kidney diseases - part I. *Med. Pregl.*, vol. 53, no. 9-10, p. 463-744.

SAS Institute. SAS Users' Guide: Statistics, 5th Ed.; Cary, NC, U.S.A., 1985.

Steinhauser, L. et al. 1995. *Hygiena a technologie masa*. 1. vyd. Brno: LAST, p. 664. ISBN 80-900260-4-4.

Štofán, D., Angelovičová, M., Kačániová, M., Nováková, I., Kňazovická, V., Liptaiová, D., Močár, K. 2009. Effect of probiotics and *Origami aetheroleum* on colonization of the gastrointestinal tract by microorganisms in broilers. *Acta fytotechnica et zootechnica*, mimoriadne číslo, Nitra, Slovaca Universitas Agriculturae Nitriae, s. 632-638.

Tichivangana, J. Z., Morrissey, P. A. 1985. Metmyoglobin and inorganic metals as pro-oxidants in raw and cooked muscle systems. *Meat Sci.* vol. 15, no. 2, p. 107-116. [http://dx.doi.org/10.1016/0309-1740\(85\)90051-8](http://dx.doi.org/10.1016/0309-1740(85)90051-8)

Tkáčová, J., Angelovičová, M. 2012. Assessment of Fat Quality During Storage Chicken Meat. *Potravinárstvo*, vol. 6, no. 2, p. 57-59, <http://dx.doi.org/10.5219/187>

Turek, P., Korimová, E., Nagy, J., Máté, D. 2000. Využitie prírodných antioxidantov v mäsovej výrobe. Zborník referátových a posterových príspevkov z konferencie „*Výživa - potraviny - legislatíva*”, Bratislava, 71-75 s. ISBN 80-227-1440-2.

Velíšek, J., Hajšlová, J. *Chemie potravín 1*. 3. vyd. Tábor : OSSIS, 2009. 602 s. ISBN 978-80-86659-15-2

Acknowledgments:

This work was supported by grant VEGA 1/0007/11.

Contact address:

Ing. Jana Tkáčová, Slovak University of Agriculture, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Department of Food Hygiene and Safety, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Tel.: +421/37/6415826, e-mail: tkacova.jt@gmail.com

prof. Ing. Mária Angelovičová, CSc., Slovak University of Agriculture, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Department of Food Hygiene and Safety, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovakia, Tel.: +421/37/6415805, e-mail: maria.angelovicova@uniag.sk

THE EFFECT OF THE PROBIOTICS *Bacillus subtilis* (PB6) ON THE SELECTED INDICATORS OF THE TABLE EGGS QUALITY, FAT AND CHOLESTEROL

Mária Angelovičová, Ebrahim Alfaig, Martin Král, Jana Tkáčová

ABSTRACT

The aim of this study was to determine the effect of dietary probiotics *Bacillus subtilis* (PB6) on egg weigh, egg mass weigh, egg fat content and cholesterol content in egg yolk in laying hens ISA Brown during two experiments. The probiotics were supplied to the laying hens for 42 days as preparation period before eggs samples collection. The eggs samples were collected during 6 days for the 1st and 2nd experiments after the hens reached the age of 34 and 61 weeks, respectively. A total of 36 ISA Brown laying hens were divided into 2 treatment groups. Control group laying hens were fed a basal diet with no probiotic added. In group *Bacillus subtilis*, the basal diet was supplemented with the bacteria *Bacillus subtilis* (PB6) at 1 g/kg, min. $2.3 \cdot 10^8$ cfu/g. Dietary treatments did not significantly affect the egg weigh, internal egg content weigh, cholesterol content expressed by g/100 g of egg yolk. *Bacillus subtilis* (PB6) supplementation significantly ($p < 0.05$) increased the fat content in the internal egg content and cholesterol content in egg yolk expressed as g/pc.

Keywords: *Bacillus subtilis*; krmivo; vajce; žltok; hmotnosť; tuk; cholesterol

ÚVOD

Doplňky do krmiva sú cieľené pre zvieratá určené na produkciu potravín. Jednou z možností je použitie probiotických doplnkov. V súčasnom období sú známe mnohé poznatky o ich účinkoch. Ich priame použitie do krmiva stimuluje chuťové vlastnosti krmiva (Nahashon et al., 1992; Nahashon et al., 1993), zlepšuje črevnú mikrobiálnu rovnováhu (Fuller, 1989), pomáha syntetizovať vitamíny (Coates a Fuller, 1977), stimuluje imunitný systém (Toms a Powrie, 2001), produkciu tráviacich enzýmov (Gilliland a Kim, 1984; Saarela et al., 2000), využívanie nestráviteľných sacharidov (Prins, 1977), podporuje produkciu kyseliny mliečnej a prchavých mastných kyselín (Bailey, 1987). Probiotické doplnky na báze účinnej látky v črevnom trakte produkujú toxické zlúčeniny ako prchavé mastné kyseliny, znižujú pH a uvoľňujú bakteriocíny (Rolf, 2000), aby mohli konkurovať iným mikroorganizmom v osídľovaní miesta (Dunham et al., 1993). Podobné stanovisko uvádzajú Kačániová et al. (2005). Podľa nich mechanizmus účinku probiotík spočíva v produkcii antibakteriálnych látok, čím inhibujú rast patogénov v kompetícii o adhezívne receptory na črevnom epiteli a v stimulácii imunity. Preto pri výbere probiotík zohráva významnú úlohu ich vysoká afinita k upevneniu na slizničnú stenu čreva a prispôbovanie sa imunitným reakciám (Patterson a Burkholder, 2003). Ďalej je to podpora tráviacich enzýmov, stimulácia syntézy vitamínov skupiny B a posilnenie rastu nepatogénnych, fakultatívnych, anaeróbných a gram-pozitívnych baktérií, pretože produkujú inhibičné látky, ako sú prchavé mastné kyseliny a peroxid vodíka, ktoré inhibujú rast škodlivých baktérií, a tým sa zvyšuje odolnosť hostiteľa voči črevným

patogénom (Fuller, 1989; Jin et al., 1996; Rolf, 2000; Sun, 2005). Vo vzťahu ku zdravotnej bezpečnosti probiotická suplementácia môže znížiť obsah cholesterolu v krvi a vajcovom žltku (Mohan et al., 1995; Abdulrahim et al., 1996; Haddadin et al., 1996; Jin et al., 1998). Priaznivo ovplyvňujú obsah cholesterolu v krvnom sére a celkové lipidy počas znáškového cyklu sliepok (Capcarová et al., 2010). Pozornosť sa venuje najmä baktériám mliečneho kvasenia, bifidobaktériám a bacilom. Laktacidoprodukčné baktérie majú špecifickú schopnosť prednostne kolonizovať určité oblasti gastrointestinálneho traktu hydiny. Bola preukázaná výrazná adhérenca týchto baktérií na výstelke hrvoľa, distálnej časti tenkého čreva a na cekálnej mukóze (Kačániová et al., 2011). V mnohých aktuálnych literárnych zdrojoch sa vyskytujú kontroverzné výsledky z výskumu používania probiotických doplnkov pri produkcii konzumných vajec. Preto je vhodné uviesť v metodike ich účinnú zložku, charakteristiku, formu použitia, dávku, aktivitu a iné. Dôvody nejednotných výsledkov variabilných účinkov probiotík u hydiny môžu byť pripisované zmenám črevnej mikroflóry a podmienkam chovného prostredia (Mahdavi et al., 2005), schopnosť alebo neschopnosť probiotík kolonizácie v tráviacom trakte a konkurenčne vylúčiť patogénne baktérie (Jin et al., 1997), ale aj intenzita stresu v chove (Lyon, 1987). Cieľom nášho článku je poskytnúť výsledky z experimentov, v ktorých bol použitý kŕmny probiotický doplnok na báze *Bacillus subtilis* (PB6) u znáškového typu sliepok ISA Brown, o jeho účinku na hmotnosť vajec, vnútorného obsahu vajec, žltka, obsah tuku vo vajcovom obsahu a obsah cholesterolu vo vajcovom žltku.

MATERIÁL A METÓDY**Predmet výskumu**

Pre splnenie stanoveného cieľa boli uskutočnené dva bilančné pokusy s nosivým typom sliepok ISA Brown v pokusnom zariadení Slovenskej poľnohospodárskej univerzity v Nitre, Fakulta biotechnológie a potravinárstva, Katedra hygieny a bezpečnosti potravín, č. SK P 10011. Bilančné pokusy v trvaní 6 dní nadväzovali na prípravné obdobie v trvaní 42 dní. Prvý bilančný pokus bol realizovaný počas prvej fázy znášky vo veku nosníc 34 týždňov s celkovým počtom zvierat 36 ks a druhý bilančný pokus bol počas druhej fázy znášky vo veku nosníc 61 týždňov s celkovým počtom zvierat 36 ks. Počas prípravného obdobia nosnice boli adaptované na experimentálne podmienky. Na kŕmenie bola použitá štandardná kŕmna zmes v práškovej forme, ktorá bola v pokusnej skupine označenej ako *Bacillus subtilis* obohatená probiotickým doplnkom na báze kmeňa baktérií *Bacillus subtilis* (PB6) v dávke 1 g.kg⁻¹, min. 2,3.10⁸ KTJ.g⁻¹. Baktérie *Bacillus subtilis* sú dobre adaptabilné, schopné rastu v rozličnom prostredí vrátane pôdy, koreňov rastlín a gastrointestinálneho traktu zvierat (Earl et al., 2007). Na porovnanie výsledkov bola vytvorená kontrolná skupina, v ktorej bola použitá štandardná kŕmna zmes bez probiotika. Pri realizácii pokusov boli uplatnené princípy welfare.

Odber vzoriek a analytický postup

Odber vajec na analýzu cholesterolu bol uskutočnený v prvý a posledný deň bilančného pokusu.

Hmotnosť vajec - váhy typu Kern-49N s presnosťou d=0,1 g.

Hmotnosť vajcového žltka - váhy typu Kern-49N s presnosťou d=0,1 g.

Sušina - vysušovanie vzorky za predpísaných podmienok v sušiarňi, typ J. R. Selecta s. a., pri teplote 105 °C.

vo vajcovom obsahu - vysušená vzorka vajcového obsahu s morským pieskom bola kvantitatívne premiestnená do extrakčného prístroja, typ DET-GRAS N, kde bola extrahovaná extrakčným činidlom petroléterom. Po extrakcii bola vzorka odparovaná na zvyšky petroléteru a sušená v sušiarňi pri teplote 100 °C.

Cholesterol vo vajcovom žltku - ručne oddelený vajcový žltok bol zhomogenizovaný v laboratórnom mixéri. Z homogenizovanej vzorky bolo navážené 5 g. Ku vzorke bolo pipetou pridané štvornásobné množstvo fyziologického roztoku 18,5 g NaCl (1 liter H₂O). Zmes bola dôkladne zhomogenizovaná. Obsah cholesterolu bol stanovený podľa Ingra a Simeonovej (1983).

Štatistická analýza

Prvotné údaje boli štatisticky spracované pomocou analýzy rozptylu (ANOVA) v programovom systéme SAS (SAS, 1985). Rozdiely boli testované pomocou F-testu a nasledného Scheffeho testu.

VÝSLEDKY A DISKUSIA**Hmotnosť vajec**

Na základe analýzy odvážených vajec sme zistili, že probiotikum na báze *Bacillus subtilis* (PB6) svojimi účinkami tendenčne zvýšilo ich hmotnosť v porovnaní s hmotnosťou vajec kontrolnej skupiny, pričom rozdiely neboli štatisticky významné (P>0,05). Podobné výsledky tendenčného zvýšenia hmotnosti vajec vplyvom probiotického doplnku zaznamenali Galazzi et al. (2008), Arpášová et al. (2012). Arpášová et al. (2012) do krmiva pre nosnice použili probiotický doplnok v dávke 0,5 g.kg⁻¹, ktorý obsahoval lyofilizované druhy baktérií *Lactis* LAT 182, *Lactobacillus acidophilus* LAT 180, *Lactobacillus bulgaricus* LAT 187, *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *Lactobacillus helveticus* LAT 179, *Enterococcus faecium* E-253, *Streptococcus thermophilus* LAT 205, KTJ LAB: min. 5.10⁹.g⁻¹. Na rozdiel od týchto výsledkov štatisticky významné zvýšenie hmotnosti vajec vplyvom laktobacilov v porovnaní s hmotnosťou vajec kontrolnej skupiny uvádzajú vo svojej štúdii Ramasamy et al. (2009).

Hmotnosť vnútorného vajcového obsahu

Vplyvom probiotického doplnku *Bacillus subtilis* (PB6) sa hmotnosť vnútorného vajcového obsahu tendenčne zvýšila v porovnaní s hmotnosťou vnútorného vajcového obsahu kontrolnej skupiny. Hodnota tohto ukazovateľa úzko súvisí s hmotnosťou vajca.

Obsah tuku vo vajcovom obsahu

Výsledky štatistického spracovania analýzovaných vzoriek obsahu tuku jednoznačne potvrdili štatisticky významne P<0,05 jeho zvýšenie vo vajcovom obsahu vplyvom probiotika na báze *Bacillus subtilis* (PB6). V literárnych zdrojoch je nedostatok poznatkov o vplyve probiotík na obsah celkového tuku vo vajci. Mikulski et al. (2012) skúmali vplyv probiotika na báze *Pediococcus acidilactici* MA 18/5M 100 mg.kg⁻¹ krmiva a po 12 týždňoch pridali do krmiva ďalších 50 mg.kg⁻¹, na obsah celkových polynenasýtených mastných kyselín vrátane kyseliny linolovej a linolénovej kyseliny. Zistili významné zvýšenie (o 6,5 %) v porovnaní s výsledkami skupiny, v ktorej bolo krmivo obohatené o probiotikum 100 mg.kg⁻¹, resp. kontrolnej skupiny bez probiotika.

Hmotnosť vajcového žltka

Naše výsledky hmotnosti vajcového žltka získané v bilančných pokusoch, v ktorých sme sledovali vplyv probiotického doplnku na báze *Bacillus subtilis* (PB6) potvrdili závery vplyvu probiotík na hmotnosť žltka autorov Asli et al. (2007), Yalcin et al. (2002), ktorí tiež nezistili štatisticky významné rozdiely medzi skupinou s probiotickým doplnkom a kontrolnou skupinou. Podobné výsledky hmotnosti vajcového žltka bez štatistického potvrdenia rozdielov medzi skupinami dosiahli vo svojich experimentoch aj Kurtoglu et al. (2004). Sledovali vplyv komerčných kŕmnych probiotík (BioPlus 2B) v dávkach 0,25, 0,5 a 0,75 g.kg⁻¹ po dobu 90 dní.

Tabuľka 1 Hmotnosť vajec, g

Vek nosníc, týždne	Skupina	n	\bar{x}	s	V_k
34	Kontrolná	31	59,33	4,71	7,94
	<i>Bacillus subtilis</i>	31	59,87	4,59	7,67
61	Kontrolná	20	66,26	5,70	8,60
	<i>Bacillus subtilis</i>	20	68,98	5,32	7,71
F-test	P>0,05				

Scheffeho test = P>0,05

Tabuľka 2 Hmotnosť vnútorného vajcového obsahu, g

Vek nosníc, týždne	Skupina	n	\bar{x}	s	V_k
34	Kontrolná	31	50,52	4,73	9,36
	<i>Bacillus subtilis</i>	31	52,22	4,61	8,83
61	Kontrolná	20	57,33	5,72	10,00
	<i>Bacillus subtilis</i>	20	60,66	5,34	8,80
F-test	P>0,05				

Scheffeho test = P>0,05

Tabuľka 3 Obsah cholesterolu vo vajcovom žĺtku

Vek nosníc, týždne	Skupina	n	Cholesterol g.100 g ⁻¹		Cholesterol g.ks ⁻¹	
			\bar{x}	Scheffeho test	\bar{x}	Scheffeho test
34	Kontrolná	31	1,48	P>0,05	0,220	P<0,05
	<i>Bacillus subtilis</i>	31	1,31		0,199	
61	Kontrolná	20	1,53	P>0,05	0,289	P<0,05
	<i>Bacillus subtilis</i>	20	1,41		0,269	
F-test	P>0,05				P<0,05	

Tabuľka 4 Obsah tuku vo vajcovom obsahu

Vek nosníc, týždne	Skupina	n	Tuk g.100 g ⁻¹			Tuk g.ks ⁻¹		
			\bar{x}	s	Scheffeho test	\bar{x}	s	Scheffeho test
34	Kontrolná	31	10,30	0,60	P<0,05	5,20	0,42	P<0,05
	<i>Bacillus subtilis</i>	31	10,80	0,62		5,64	0,36	
61	Kontrolná	20	10,55	0,21	P<0,05	6,40	0,61	P<0,05
	<i>Bacillus subtilis</i>	20	10,61	0,43		6,08	0,49	
F-test	P<0,05							

Tabuľka 5 Hmotnosť vajcového žĺtku, g

Vek nosníc, týždne	Skupina	n	\bar{x}	s	V_k
34	Kontrolná	31	14,85	2,07	13,94
	<i>Bacillus subtilis</i>	31	15,20	1,31	8,62
61	Kontrolná	20	18,86	2,01	10,66
	<i>Bacillus subtilis</i>	20	19,06	1,49	7,82
F-test	P>0,05				

Scheffeho test = P>0,05

Obsah cholesterolu vo vajcovom žĺtku

Z výsledkov analýzy obsahu cholesterolu vo vajcovom žĺtku vyplýva, že pri jeho vyjadrení v gramoch na 100 g sa vplyvom probiotického doplnku na báze *Bacillus subtilis* (PB6) tendenčne znížil a pri jeho vyjadrení v gramoch na kus sa štatisticky významne (P<0,05) znížil v porovnaní s kontrolnou skupinou. Štatisticky významné zníženie obsahu cholesterolu vo vajcovom žĺtku zaznamenali aj **Li et al. (2006)** vplyvom 0,5, 1,0 a 1,5 g.kg⁻¹ probiotika

na báze *Bacillus subtilis* v porovnaní s kontrolnou skupinou. Podobne štatisticky významné zníženie obsahu cholesterolu vo vajcovom žĺtku zistili vo svojich experimentoch tiež **Kurtoglu et al. (2004)**, a to vplyvom komerčných krmných probiotík (BioPlus 2B) v dávkach 0,25, 0,5 a 0,75 g.kg⁻¹ v porovnaní s kontrolnou skupinou. Bez ohľadu na dávku probiotika *Pediococcus acidilactici*, kmeň MA18/5M do krmiva pre nosnice Hy-Line Brown, a to 0,1 g.kg⁻¹, ktoré bolo skrmované prvých 12 týždňov

experimentu a ďalších 12 týždňov doplnené 0,05 g.kg⁻¹, zistili Mikulski et al. (2012) štatisticky významné zníženie obsahu cholesterolu vo vajcovom žltku o viac ako 10 %. Na zníženie obsahu cholesterolu vo vajcovom žltku vplyvom probiotických kŕmnych doplnkov existuje niekoľko vysvetlení. Je možné, že niektoré z organizmov prítomných v probiotickom doplnku by mohli využívať cholesterol prítomný v gastrointestinálnom trakte pre vlastný bunkový metabolizmus, čím sa zníži množstvo absorbovaného cholesterolu (Nelson a Gilliland, 1984; Gilliland et al., 1985).

Kalavathy et al. (2003) uvádzajú, že kmene laktacidoprodukčných baktérií sú schopné meniť enterohepatálny cyklus a znížiť obsah cholesterolu prostredníctvom asimilácie diétného cholesterolu v bakteriálnej bunke a činnosti žľočových kyselín a hydroláz v čreve. Podľa Fukushima a Nakano (1995) vplyvajú kŕmne probiotiká na zníženie obsahu cholesterolu schopnosťou inhibovať enzým hydroxy-metyl-glutaryl-koenzým A reduktázu. V dôsledku inhibície hydroxy-metyl-glutaryl-koenzým A reduktázy sa zníži produkcia mevalonátu, čím sa zníži tvorba a produkcia cholesterolu (Gajdoš et al., 2004).

ZÁVER

Racionálny prístup k používaniu kŕmnych probiotík v oblasti produkcie konzumných vajec ostáva naďalej otvorený pre ďalší výskum. Na základe literárnych poznatkov uvedených v článku vyplýva, že všetky vhodné probiotiká sa nevyznačujú rovnakými účinkami na hmotnosť vajec, hmotnosť žltka a obsah tuku, resp. cholesterolu vo vajcovom žltku. Výsledky mnohých experimentov v tomto smere však naznačili tendenciu pozitívneho vplyvu. Na základe výsledkov našich bilančných pokusov s kŕmnym probiotickým doplnkom na báze *Bacillus subtilis* (PB6) v dávke 1 g.kg⁻¹, min. 2,3.10⁸ KTJ.g⁻¹ možno konštatovať, že pri konzumných vajciach nosníc ISA Brown sa tendenčne zvýšila hmotnosť vajec, vajcového obsahu, vajcového žltka a štatisticky významne (P<0,05) sa zvýšil obsah tuku vo vajcovom obsahu a znížil obsah cholesterolu vyjadrený na kus vajcového žltka. Pri obsahu cholesterolu vo vajcovom žltku vyjadrenom na 100 g sa naznačila tendencia jeho zníženia vplyvom probiotika *Bacillus subtilis* (PB6). Nejednotnosť v dosahovaných výsledkoch vplyvom komerčných probiotických produktov, ako vyplýva z literárnych poznatkov, môže súvisieť s druhom probiotického produktu, dávkou a aktivitou. Na základe literárnych poznatkov možno konštatovať, že pri používaní probiotických produktov vo výskume produkcie konzumných vajec má byť charakterizované každé probiotikum podľa jeho vplyvu na fyziologický stav črevného traktu nosnice. Aj keď sa dosiahol určitý pokrok v oblasti výskumu probiotík pri produkcii konzumných vajec, ich pozitívny vplyv vo vzťahu ku kvalite a bezpečnosti vajec je chápané ako symbiotický vzťah medzi hosťiteľom (nosnicou) a črevnými mikroorganizmami. V tejto oblasti sú nedostatočné poznatky. Nejednotnosť vo výsledkoch vplyvu kŕmnych probiotík pravdepodobne súvisí s uvedeným vzťahom.

LITERATÚRA

- Abdulrahim, S. M., Haddadin, S. Y., Hashlamoun, E. A., Robinson, R. K. 1996. The influence of *Lactobacillus acidophilus* and bacitracin on layer performance of chickens and cholesterol content of plasma and egg yolk. *British Poultry Science*, vol. 37, p. 341-346. <http://dx.doi.org/10.1080/00071669608417865> PMID:8773843
- Arpášová, H., Kačániová, M., Haščik, P., Šidlová, V. 2012. Effect of selected feed additives on internal quality parameters of table eggs. *Potravinarstvo*, vol. 6, no. 4, p. 52-61. <http://dx.doi.org/10.5219/235>
- Aslı, M. M., Hosseini, S. A., Lotfollahian, H., Shariatmadari, F. 2007. Effect of probiotics, yeast, vitamin E and vitamin C supplements on performance and immune response of laying hen during high environmental temperature. *International Journal of Poultry Science*, vol. 6, no. 12, p. 895-900. <http://dx.doi.org/10.3923/ijps.2007.895.900>
- Bailey, J. S. 1987. Factors affecting microbial competitive exclusion in poultry overview-outstanding symposia in food science and technology. *Food Technology*, p. 88-92.
- Capcarová, M., Chmelničná, L., Kolesarová, A., Massanyi, P., Kovačík, J. 2010. Effect of *Enterococcus faecium* M 74 strain on selected blood and production parameters of laying hens. *British Poultry Science*, vol. 51, no. 5, p. 614-620. <http://dx.doi.org/10.1080/00071668.2010.513961>, PMID:21058064
- Coates, M. E., Fuller, R. 1977. The genotobiotic animal in the study of gut microbiology. In Clarke, R. T. J., Bauchop, T.: *Microbial Ecology of the Gut*. Academic Press : London, p. 311-346.
- Dunham, H. J., William, C., Edens, F. W., Casas, I. A., Dobrogosz, W. J. 1993. *Lactobacillus reuteri* immunomodulation of stressor associated disease in newly hatched chickens and turkeys. *Poultry Science*, vol. 72 (Suppl. 1), p. 103.
- Earl, A. M., Losick, R., Kolter, R. 2007. *Bacillus subtilis* genome diversity. *Journal of Bacteriology*, vol. 189, p. 1163-1170. <http://dx.doi.org/10.1128/JB.01343-06> PMID:17114265
- Fukushima, M., Nakano, M. 1995. The effect of a probiotic on faecal and liver lipid classes in rats. *British Journal Nutrition*, vol. 73, p. 701-710. <http://dx.doi.org/10.1079/BJN19950074> PMID:7626589
- Fuller, R. 1989. Probiotics in man and animals. A review. *Journal of Applied Bacteriology*, vol. 66, p. 365-378. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.1989.tb05105.x> PMID:2666378
- Gajdoš, M., Cibulová, E., Krivošíková, Z. 2004. Rosuvastatin: nový inhibitor 3-hydroxy-3-methylglutaryl koenzým A reduktázy. In *Via Practica*, vol. 1, p. 21-22.
- Gallazzi, D., Giardini, A., Mangiagalli, M. G., Marelli, S., Ferrazzi, V., Orsi, C., Cavalchini, L. G. 2008. Effects of *Lactobacillus addophilus* D2/CSL on laying hen performance. *Italian Journal of Animal Science*, vol. 7, 2008, no. 1, p. 27-37.
- Gilliland, S. E., Kim, S. H. 1984. Effect of viable starter culture bacteria in yogurt on lactose utilization in humans. *Journal of Dairy Science*, vol. 97, p. 1-6. [http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(84\)81260-6](http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(84)81260-6) PMID:6707296
- Gilliland, S. E., Nelson, C. R., Maxwell, C. 1985. Assimilation of cholesterol by *Lactobacillus acidophilus* bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 49, p. 377-381. PMID:3920964
- Haddadin, M. S. Y., Abdulrahim, S. M., Hashlamoun Nahashon, E. A. R. S. N., Nakaue, H. S., Mirosh, I. W.,

- Robinson, R. K. 1996. The effects of *Lactobacillus acidophilus* on the production and chemical composition of hen's eggs. *Poultry Science*, vol. 75, p. 491-494. <http://dx.doi.org/10.3382/ps.0750491> PMID:8786938
- Ingr, I., Simeonová, J. 1983. Rýchle stanovení cholesterolu ve vaječném žloutku Bio-la-testem. *Veterinary Medicine - Czech*, vol. 28, p. 97-104. PMID:6405530
- Jin, L. Z., Ho, Y. W., Abdullah, N., Jalaludin, S. 1996. Influence of dried *Bacillus subtilis* and lactobacilli cultures on intestinal microflora and performance in broilers. *Asian-australas. Journal Animal Science*, vol. 9, p. 397-404.
- Jin, L. Z., Ho, Y. W., Abdullah, N., Jalaludin, S. 1997. Effect of adherent *Lactobacillus* culture on growth, weight of organs and intestinal microflora and volatile fatty acids in broilers. *Animal Feed Science Technology*, vol. 70, p. 197-209. [http://dx.doi.org/10.1016/S0377-8401\(97\)00080-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0377-8401(97)00080-1)
- Jin, L. Z., Ho, Y. W., Abdullah, N., Jalaludin, S. 1998. Growth performance, intestinal microbial populations and serum cholesterol of broilers diets containing *Lactobacillus* cultures. *Poultry Science*, vol. 77, p. 1259-1265. PMID:9733111
- Kačániová, M., Bobček, R., Kmeť, V., Angelovičová, M. 2005. *Krmné doplnky ako náhrada antibiotík a ďalšie aplikácie*. Nitra : SPU, 2005, 78 p. ISBN 80-8069-589-X.
- Kačániová, M., Nováková, I., Haščík, P. 2011. *Význam probiotík a ich význam na mikróflóru gastrointestinálneho traktu hydiny*. Nitra : SPU, 181 p. ISBN 978-80-552-0655-4.
- Kalavathy, R., Abdullah, N., Jalaludin, S. Ho, Y. W. 2003. Effects of *Lactobacillus* cultures on growth performance, abdominal fat deposition, serum lipids and weight of organs of broiler chickens. *British Poultry Science*, vol. 44, p. 139-144. <http://dx.doi.org/10.1080/0007166031000085445>, PMID:12737236
- Kurtoglu, V., Kurtoglu, F., Seker, E., Coskun, B., Balevi, T., Polat, E. S. 2004. Effect of probiotic supplementation on laying hen diets on yield performance and serum and egg yolk cholesterol. *Food Additives and Contaminants*, vol. 21, no. 9, p. 817-823. <http://dx.doi.org/10.1080/02652030310001639530> PMID:15666974
- Li, L., Xu, C. L., Ji, C., Ma, Q., Hao, K., Jin, Z. Y., Li, K. 2006. Effects of a dried *Bacillus subtilis* culture on egg quality. *Poultry Science*, vol. 85 no. 2, p. 364-368. PMID:16523640
- Lyon, T. P. 1987. Probiotics: an alternative to antibiotics. *Pig News Information*, vol. 8, no. 2, p. 157-164.
- Mahdavi, A. H., Rahmani, H. R., Pourreza, J. 2005. Effect of probiotic supplements on egg quality and laying hens performance. *International Journal Poultry Science*, vol. 4, no. 4, p. 488-492.
- Mohan, B., Kadirvel, R., Bhaskaran, M., Natarajan, A. 1995. A Effect of probiotic supplementation on serum/yolk cholesterol and on egg shell thickness in layers. *British Poultry Science*, vol. 36, p. 799-803. <http://dx.doi.org/10.1080/00071669508417824> PMID:8746981
- Mikulski, D., Jankowski, J., Naczmanski, J., Mikulska, M., Demey, V. 2012. Effects of dietary probiotic (*Pediococcus acidilactici*) supplementation on performance, nutrient digestibility, egg traits, egg yolk cholesterol, and fatty acid profile in laying hens. *Poultry Science*, vol. 91, no. 10 2691-2700. <http://dx.doi.org/10.3382/ps.2012-02370> PMID:22991559
- Nahashon, S. N., Nakaue, H. S., Mirosh, L. W. 1992. Effect of direct-fed microbials on nutrient retention and production parameters of laying pullets. *Poultry Science*, vol. 71 (suppl. 1), p. 111.
- Nahashon, S. N., Nakaue, H. S., Mirosh, L. W. 1993. Effect of direct fed microbials on nutrient retention and productive parameters of Single Comb White Leghorn pullets. *Poultry Science*, vol. 72 (Suppl. 1), p. 87.
- Nelson, C. R., Gilliland, S. E. 1984. Cholesterol uptake by *Lactobacillus acidophilus*. *Journal Dairy Science*, vol. 67 (Suppl. 1): p. 50.
- Patterson, J. A., Burkholder, K. 2003. Application of prebiotics and probiotics in poultry production. *Poultry Science*, vol. 82, no. 4, p. 627-631. PMID:12710484
- Prins, R. A. 1977. Biochemical activities of gut microorganisms. In Clarke, R. T. J., Hauchop, T.: *Microbial ecology of the gut*. Academic press : London, p. 73-183.
- Ramasamy, K., Abdullah, N., Jalaludin, S., Wong, M., Ho, Y. W. 2009. Effects of *Lactobacillus* cultures on performance of laying hens, and total cholesterol, lipid and fatty acid composition of egg yolk. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, vol. 89, 2009, no. 3, p. 482-486. <http://dx.doi.org/10.1002/jsfa.3477>
- Rolf, R. D. 2000. The role of probiotic cultures in the control of gastrointestinal health. *Journal of Nutrition*, vol. 130, p. 396S-402S. PMID:10721914
- Saarela, M., Mogensen, G., Fonden, R., Matto, J., Mattila-sandholm, T. 2000. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. *Journal of Biotechnology*, vol. 84, p. 197-215. [http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1656\(00\)00375-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1656(00)00375-8)
- SAS Institute. SAS User's Guide: Statistics, 5th Edn.; SAS : Cary, NC, USA, 1985.
- Sun, X. 2005. *Broiler performance and intestinal alterations when fed drug-free diets* : Thesis. Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg, Virginia.
- Toms, C., Powrie, F. 2001. Control of intestinal inflammation by regulatory T cells. *Microbes and Infection*, vol. 3, p. 929-935. [http://dx.doi.org/10.1016/S1286-4579\(01\)01454-X](http://dx.doi.org/10.1016/S1286-4579(01)01454-X)
- Yalcin, S., Guclu, B. K., Oguz, F. K. 2002. The usage of enzyme, probiotic and antibiotic in laying hen rations. *Ankara Universitesi Veteriner Fakultesi Dergisi*, vol. 49, 2002, no. 2., p. 135-141.

Acknowledgments:

This study was supported by VEGA 1/0007/11.

Contact address:

Mária Angelovičová, Slovak University of Agriculture, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Department of Hygiene and Food Safety, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra Slovakia, E-mail: maria.angelovicova@uniag.sk.

Ebrahim Alfaig, Slovak University of Agriculture, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Department of Hygiene and Food Safety, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra Slovakia, E-mail: ibrelfaig@gmail.com.

Martin Král, Slovak University of Agriculture, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Department of Hygiene and Food Safety, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra Slovakia, E-mail: martinxkral@gmail.com.

Jana Tkáčová, Slovak University of Agriculture, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Department of Hygiene and Food Safety, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra Slovakia, E-mail: tkacova.jt@gmail.com.

SAFETY AND FORTIFICATION WITH FOLIC ACID IN NEONATAL PERIOD

Tatiana Žikavská, Ingrid Brucknerová

ABSTRACT

Folic acid, the essential vitamin, and its active forms are substantial parts of many biochemical processes in the human body. In the period of rapid growth of organism or in cell growth, body's demands for folate increase. Its impact in neonatal period varies even in premature newborns. Fortification with folic acid and its substitution in the treatment of anaemia are the important parts in the comprehensive care in premature newborns. To determine optimal dose in this group of patients is difficult. The determination of red blood cell folate concentration levels is the most accurate indicator of long-term folate level status in the body. Unmetabolised folic acid in circulation of newborns could have potentially adverse effects. Toxicity of folic acid is not a concern as folate is water-soluble and easily excreted by kidneys when in excess but on the other side growing organism of preterm newborn and disruption of metabolic balance could be potential risks.

Keywords: folic acid; newborn; fortification; milk formula; anaemia

ÚVOD

Kyselina listová predstavuje nevyhnutnú súčasť dôležitých biochemických procesov v ľudskom organizme. Najdôležitejšie z nich sú biosyntéza nukleotidov, metionínu a metylačné reakcie v bunke (Beaudin a Stover, 2007).

Počas tehotenstva zabezpečuje prísun kyseliny listovej a železa optimálny vývoj dieťaťa (Peña-Rosas et al., 2012). Jej denný príjem minimálne 0,4 mg pred a počas tehotenstva jednoznačne znížilo výskyt defektov neurálnej rúry, rázštepov podnebia (Canfield et al., 2005; Wilcox et al., 2007), ale aj iných izolovaných štrukturálnych defektov (Bánhidý et al., 2011). Podľa Daryho už pri perorálnej dávke 0,1 mg kyseliny listovej signifikantne klesá výskyt defektov neurálnej rúry (Dary, 2009). V dôsledku prenatálnej suplementácie kyselinou listovou, ktorá je súčasťou adekvátnej výživy, sa znižuje riziko nízkej pôrodnej hmotnosti u novorodenca (Takimoto et al., 2011; Peña-Rosas et al., 2012).

Význam kyseliny listovej bol potvrdený aj v prevencii nádorových a srdcovocievnych ochorení. Viacerí autori publikovali súvislosť príjmu kyseliny listovej s výskytom kolorektálneho karcinómu. Predpokladá sa ovplyvnenie DNA metylácie, ktorá je dôležitá pre kontrolu riadenia expresie génov. Výsledky štúdií na zvieraciach modeloch a rozsiahlych epidemiologických štúdiách sú však protichodné (Jackson et al., 2006).

V prípade hyperhomocysteinémie sa predpokladá pozitívny vplyv suplementácie folátmi s redukciou poškodenia mozgu predčasne narodeného novorodenca (Jyothi et al., 2007).

Novorodenci predstavujú špecifickú skupinu detí. Po narodení stúpajú požiadavky organizmu na jednotlivé stavebné látky vzhľadom na rýchly telesný rast. Počas tehotenstva a v novorodeneckom veku je nevyhnutná

optimálna výživa s prísunom mikronutrientov pri prevencii výskytu anémií a infekcií (Couto et al., 2007).

MATERIÁL A METÓDY

Sledovaný súbor tvorili predčasne narodení novorodenci (pred ukončeným 37. gestačným týždňom; n=6) hospitalizovaní na Oddelení patologických novorodencov I. detskej kliniky Lekárskej fakulty Univerzity Komenského v Bratislave. V súbore pacientov boli stanovené koncentrácie folátov v erytrocytoch v 1. týždni a v 4. týždni života dieťaťa.

Koncentrácie folátov v erytrocytoch boli stanovené imunochemickou metódou. Na analýzu folátov v erytrocytoch bolo potrebné vytvorenie hemolyzátu (100 µl periférnej krvi a 3 ml 0,2 % roztoku kyseliny askorbovej). Ďalším krokom bola inkubácia hemolyzátu, ktorá prebiehala po dobu 90 minút pri teplote 20-25°C. Hemolyzát bol následne umiestnený do vzorkovej oblasti analyzátoru *cobas e 411* s využitím komerčných setov Folate III (Roche Slovensko). Analýza folátov v erytrocytoch prebiehala elektrochemiluminiscenčne.

Práca analyzuje jednotlivé rizikové faktory ovplyvňujúce koncentráciu folátov v erytrocytoch (gestačný vek, strava, pridružené komplikácie a liečba) v sledovanej skupine novorodencov.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Súbor pacientov tvorili predčasne narodení novorodenci (n=6), ktorí boli narodení pred ukončeným 37. gestačným týždňom tehotenstva. Stanovené koncentrácie folátov v erytrocytoch prehľadne uvádza tabuľka 1. Priemerné hodnoty pre túto skupinu pacientov nie sú jednoznačne definované. U pacientov 1, 4, 5, 6 boli stanovené v 4. týždni života niekoľko násobne vyššie koncentrácie folátov v erytrocytoch oproti východnej hodnote.

Tab. 1 Koncentrácie folátov v erythrocytoch v sledovanom súbore

Koncentrácie folátov v erythrocytoch v sledovanom súbore						
pacient	pohlavie	gestačný týždeň	pôrodná hmotnosť (gram)	Apgar skóre (body)	RBC Folát v 1. týždni života (ng/ml)	RBC Folát v 4. týždni života (ng/ml)
1	♂	33	1260	9/10	806,16	2190
2	♀	34	1330	9/10	622	1419,61
3	♀	31	1490	10/8	1418,2	1908,2
4	♂	30	1200	3/6	4360,8	2449,6
5	♂	27	900	5/8	1214,04	5516,67
6	♂	28	1330	6/7	1306,5	2335,1

Vysvetlivky: RBC Folát - koncentrácia folátov v erythrocytoch

Je potrebné uviesť, že u všetkých nedonosených novorodencov, v čase 2. odberu bola prítomná anémia nedonoseného dieťaťa. U pacientov 5 a 6 bolo pri celkovom zhoršení stavu, prehĺbení anémie a súčasnej celkovej infekcii organizmu nevyhnutné podanie erythrocytárnej masy. Ďalšie pridružené komplikácie (anémia, IUGR - intrauterinná rastová retardácia, RDS - syndróm dychovej tiesne, CTP - centrálna tonusová porucha, IVH - intraventrikulárna hemorágia, ROP - retinopatia nedonoseného dieťaťa, sepsa) sú uvedené v tabuľke 2. Druh stravy dieťaťa (MM - materské mlieko, BMF - fortifikátor materského mlieka, Nenatal, Beba HA) je súčasťou tabuľky 2.

Za najpresnejší ukazovateľ saturácie organizmu folátmi je považovaná koncentrácia folátov v erythrocytoch (Hlúbik a Opltová, 2004).

Jednoznačný benefit fortifikácie a suplementácie kyselinou listovou bol celosvetovo publikovaný. V

skupine nedonosených novorodencov zohráva kyselina listová nielen preventívnu úlohu vzniku anémie, ale je aj súčasťou komplexnej liečby v tejto špecifickej skupine populácie.

V postnatálnom období obohacovanie umelých formlí a materského mlieka fortifikátormi s obsahom kyseliny listovej sa zdá byť postačujúce v prevencii deficitu folátov u nedonosených detí (Joythi et al., 2007). Deficit folátov v erythrocytoch vzniká pri poklese pod 140 ng/ml (Institute of Medicine, 1998). V nami sledovanom súbore nebol zistený deficit folátov v erythrocytoch v 1. týždni života v porovnaní s hodnotou, ktorú uvádza Institute of Medicine, 1998. Z našich doterajších analýz boli zistené koncentrácie folátov v erythrocytoch v 1. deň života v skupine nedonosených novorodencov (n=18) v rozpätí 790,25 - 1752,96 ng/ml (Žikavská et al., 2011). V našom súbore pacientov nachádzame v čase 2. odberu anémiu nedonoseného dieťaťa napriek vysokým hodnotám

Tab. 2 Komplikácie prematurity v sledovanom súbore pacientov a druh stravy

Komplikácie prematurity a druh stravy pacientov								
pacient	anémia	IUGR	RDS	CTP	IVH	sepsa	ROP	strava
1	áno	áno	nie	nie	nie	nie	nie	MM+BMF
2	áno	áno	nie	hypertonus	nie	nie	nie	Beba HA
3	áno	nie	áno	nie	áno	nie	áno	Nenatal, MM
4	áno	nie	áno	hypotonus	áno	áno	áno	MM+BMF
5	áno	nie	nie	nie	nie	áno	áno	Nenatal
6	áno	nie	nie	áno	áno	áno	nie	MM

Vysvetlivky: IUGR - intrauterinná rastová retardácia, RDS - syndróm dychovej tiesne, CTP - centrálna tonusová porucha, IVH - intraventrikulárna hemorágia, ROP - retinopatia nedonoseného dieťaťa;

MM - materské mlieko, BMF - fortifikátor materského mlieka, Beba HA - hypoalergénna formula Beba

koncentrácie folátov v erythrocytoch, čo je ukazovateľom dlhodobého stavu folátov v organizme.

Témou pre diskusiu ostáva horná tolerovateľná hranica perorálneho príjmu po narodení. Napriek dobrej rozpustnosti tohto vitamínu vo vode, pri skrátenej životnosti erythrocytov u predčasne narodených novorodencov (Hlúbik a Opltová, 2004) a možných epigenetických zmenách (Crider et al., 2011) je potrebný monitoring nezmetabolizovanej kyseliny listovej v organizme.

Riziko vedľajších účinkov pri nadmernom a dlhodobom podávaní kyseliny listovej sa ukazuje pre potenciálne rôznorodé účinky z hľadiska biologických, enviromentálnych a rasových rozdielov (Wehby et al., 2007). Pri akútnom nadmernom príjme folátov boli u potkanov opísané poruchy spätnej resorbcie z čreva, čo ovplyvňuje jeho využitie pre organizmus (Dev et al., 2010).

Horná hranica bezpečného denného príjmu kyseliny listovej u novorodenca nie je definitívne známa. Vo všeobecnosti je považovaná za bezpečnú hranicu dávka kyseliny listovej do 1mg denne per os v snahe zabrániť vzniku novej pernicioznej anémie (Sweeney et al., 2009). Stanovený horný limit príjmu kyseliny listovej bol u dospelých na 1mg denne a 600-800 µg u adolescentov. U dojčiacich a tehotných žien sú odporúčané denné dávky kyseliny listovej 300-400 µg (Turzová a Šmalová, 2008).

Otázkou ostáva skupina nedonosených novorodencov. Odporúčaná dávka kyseliny listovej u novorodencov je 60 µg denne (Gregory, 1997; Kajaba et al., 1997) Minimálny denný perorálny príjem kyseliny listovej u detí do prvého roka života je 30 µg, optimálny príjem je 50 µg kyseliny listovej denne (Jackson et al., 2006). U detí do šesť mesiacov života, ktoré sú plne dojčené, je koncentrácia folátov vysoká. Následne však koncentrácia folátov klesá na rozdiel od kobalamínu, čo znamená, že foláty pozitívne korelujú s dĺžkou výlučného dojčenia (Hay et al., 2008).

Súčasťou stravy, ako aj v skupine našich pacientov, sú umelé mliečne formuly pre nedonosené deti alebo fortifikátory slúžiace na obohatenie materského mlieka, ktoré často nepokrýva nároky živín potrebné pre rýchlo rastúci nezrelý organizmus. V materskom mlieku je koncentrácia folátov závislá od ich príjmu v strave matky, čo môže zabezpečiť vyvážená strava počas dojčenia.

V niektorých krajinách ako USA, Kanada alebo Chile pristúpili k povinnej fortifikácii vybraných druhov potravín (múka, cereálie) s cieľom prevencie vrodených vývojových chýb v populácii (Crider et al., 2011). Pri výrobe umelých mliečnych formlí je snaha zabezpečiť optimálny prísun všetkých živín vrátane mikronutrientov. V prípade našich pacientov sa v ich strave obsah kyseliny listovej líši (Nenatal - 28 µg/100 ml; Beba HA -12 µg/100 ml). Výrazný nárast koncentrácie folátov o takmer 130 % bol u pacientov 1, 2, 5 a 6. Je potrebné uviesť, že v prípade pacientov 5 a 6 mohlo koncentráciu folátov ovplyvniť podanie transfúzie erythrocytarnej masy.

Rozdielnosť v rámci obohatenia umelej mliečnej formuly uvádza Sweeney a kolektív vo svojej práci. V skupine 4-dňových novorodencov, ktorí prijímali umelú mliečnu formulu obohatenú kyselinou listovou boli stanovené jej koncentrácie v sére pupočníkovej krvi (0,185 µg/l) a následne na 4. deň života (0,468 µg/l) z päť

novorodenca. Napriek tomu, že v tom čase nebola zavedená povinná fortifikácia stravy kyselinou listovou v Írsku, novorodenci mali po 4 dňoch fortifikovanej stravy 2,5 násobne vyššie hladiny kyseliny listovej, čo súvisí s podávaním umelej mliečnej formuly (Sweeney et al., 2005). Vzhľadom na použitie odlišnej metódy stanovenia folátov v organizme nie sú hodnoty porovnateľné s našimi výsledkami.

Prísun folátov je možný aj u novorodenca z viacerých zdrojov. Nielen ako súčasť stravy a výživových doplnkov, ale aj v rámci prevencie anémie nedonoseného dieťaťa. V našom súbore každý pacient užíval kyselinu listovú v dávke 5 mg per os týždenne.

ZÁVER

Kyselina listová má svoju nezastupiteľnú úlohu u rýchlo rastúceho organizmu. Jej prísun je zabezpečený nielen v strave, ale aj v rámci prevencie a liečby anémie nedonoseného dieťaťa.

Otázka stanovenia optimálnej dávky kyseliny listovej v novorodeneckom období ostáva nezodpovedaná. Zistenia rozdielných hodnôt kyseliny listovej v niektorých krajinách viedli k odlišnému prístupu v povinnej fortifikácii potravín kyselinou listovou.

Na základe našich doterajších výsledkov navrhujeme, aby rozpätie hodnôt dávky kyseliny listovej vychádzalo zo stravovacích návykov a zvyklostí v jednotlivých krajinách s ohľadom na špecifiká novorodeneckého veku.

Úlohou ďalšieho sledovania by malo byť monitorovanie a zistenie vplyvu nezmetabolizovaných foriem kyseliny listovej v novorodeneckom období.

LITERATÚRA

Bánhidý, F., Dakhalaoui, A., Puhó, E. H., Czeizel, A. A. E. 2011. Is there a reduction of congenital abnormalities in the offspring of diabetic pregnant women after folic acid supplementation? Population-based case-control study. *Congenital Anomalies*, vol. 51, p. 80-86. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1741-4520.2010.00302.x> PMID:21039913

Beaudin, A. E., Stover, P. J. 2007. Folate-mediated one-carbon metabolism and neural tube defects: Balancing genome synthesis and gene expression. *Birth Defects Research (Part C)*, vol. 81, no. 3, p. 183-203. <http://dx.doi.org/10.1002/bdrc.20100> PMID:17963270

Canfield, M. A., Collins, J. S., Botto, L. D., Williams, L. J., Mai, C. T., Kirby, R. S., Pearson, K., Devine, O., Mulinare, J. 2005. Changes in the birth prevalence of selected birth defects after grain fortification with folic acid in the United States: Findings from a multi-state population-based study. *Birth Defects Research Part A: Clinical and Molecular Teratology*, vol. 73, no. 10, p. 679-689.

<http://dx.doi.org/10.1002/bdra.20210> PMID:16240378

Couto, F. D., Moreira, L. M., dos Santos, D. B., Reis, M. G., Gonçalves, M. S. 2007. Folate, vitamin B12 and total homocysteine levels in neonates from Brazil. *European Journal of Clinical Nutrition*, vol. 61, no. 3, p. 382-386. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.ejcn.1602528> PMID:16988650

Crider, K. S., Bailey, L. B., Berry, R. J. 2011. Folic acid food fortification - its history, effect, concerns, and future directions. *Nutrients*, no. 3, p. 370-384. <http://dx.doi.org/10.3390%2Fnu3030370>, PMID: PMC3257747

- Dary, O. 2009. Nutritional interpretation of folic acid interventions. *Nutrition Reviews*, vol. 67, no. 4, p. 235-244. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1753-4887.2009.00193.x>
- Dev, S., Wani, A., Kaur, J. 2010. Regulatory mechanisms of intestinal folate uptake in a rat model of folate oversupplementation. *British Journal of Nutrition*. Vol. 105, issue 105, p. 827-835 <http://dx.doi.org/10.1017/S0007114510004538>
- Gregory, J. F. 1997. Bioavailability of folate. *European Journal of Clinical Nutrition*, vol. 51 (Suppl 1), p. 554-559.
- Hay, G., Johnston, C., Whitelaw, A., Trygg, K., Refsum, H. 2008. Folate and cobalamin status in relation to breastfeeding and weaning in healthy infants. *American Journal of Clinical Nutrition*, no. 88, vol. 1, p. 105-114. [PMid:18614730](http://dx.doi.org/10.1093/ajcn/88.1.105)
- Hlúbik, P., Opltová, L. 2004. Vitamíny. Praha: Grada Publishing. 232 p. ISBN 80-247-0373-4. [PMid:15141970](http://dx.doi.org/10.1017/S0007114510004538)
- Institute of Medicine, Food and Nutrition Board. 1998. Dietary reference intakes for thiamin, riboflavin, niacin, vitamin B6, folate, vitamin B12, pantothenic acid, biotin, and choline / a report of the Standing Committee on the Scientific Evaluation of Dietary Reference Intakes and its Panel on Folate, Other B Vitamins, and Choline and Subcommittee on Upper Reference Levels of Nutrients, National Academy Press, Washington, DC. 196-305 p. ISBN 0309065542.
- Jackson, A. et al. 2006. *Folate and disease prevention*. London, United Kingdom, The Stationery Office. 222 p. ISBN 978 0 11 243111 4.
- Joythi, S., Misra, I., Morris, G., Benton, A., Griffin, D., Allen, S. 2007. Red cell folate and plasma homocysteine in preterm infants. *Neonatology*, vol. 92, p. 264-268. <http://dx.doi.org/10.1159/000103745> [PMid:17556845](http://dx.doi.org/10.1159/000103745)
- Kajaba, I., Šimončíč, R., Ginter, E., Ondrejka, J., Trusková, I., Kaláč, J., Bzdúch, V. Odporúčané výživové dávky pre obyvateľstvo SR - platné od r. 1997. Retrieved from the web: <http://www.jedalne.sk/sk/public/tabulka1.pdf>
- Peña-Rosas, J. P., De-Regil, L. M., Dowswell, T., Viteri, F. E. 2012. Daily oral iron supplementation during pregnancy. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, Issue 12. Art. No.:CD004736. <http://dx.doi.org/10.1002/14651858.CD004736.pub3>
- Sweeney, M. R., McPartlin, J., Weir, D. G., Daly, S., Pentieva, K., Daly, L., Scott, J. M. 2005. Evidence of unmetabolized folic acid in cord blood of newborn and serum of 4-day-old infants. *British Journal of Nutrition*, vol. 94, p. 727-730. <http://dx.doi.org/10.1079/BJN20051572> [PMid:16277775](http://dx.doi.org/10.1079/BJN20051572)
- Sweeney, M. R., Staines, A., Daly, L., Traynor, A., Daly, S., Bailey, S. W., Alverson, P. B., Ayling, J., Scott, J. M. 2009. Persistent circulating unmetabolized folic acid in a setting of liberal voluntary folic acid fortification. Implications for further mandatory fortification? *BMC Public Health*, vol. 9, no. 295, p. 1-7. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2458-9-295> [PMid:19689788](http://dx.doi.org/10.1186/1471-2458-9-295)
- Takimoto, H., Hayashi, F., Kusama, K., Kato, N., Yoshiike, N., Toba, M., Ishibashi, T., Miyasaka, N., Kubota, T. 2011. Elevated maternal serum folate in the third trimester and reduced fetal growth: a longitudinal study. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, vol. 57, p. 130-137. <http://dx.doi.org/10.3177/jnsv.57.130> [PMid:21697631](http://dx.doi.org/10.3177/jnsv.57.130)
- Turzová, A., Šmalová, I. 2008. Význam kyseliny listovej pre zdravie. *TRENDY v potravinárstve*, vol. XV, no. 2, p. 16-17.
- Wehby, G. L., Murray, J. C. 2007. The effect of prenatal use of folic acid and other dietary supplements on early child development. *Maternal and Child Health Journal*, vol. 12, p. 180-187. <http://dx.doi.org/10.1007/s10995-007-0230-3> [PMid:17554612](http://dx.doi.org/10.1007/s10995-007-0230-3)
- Wilcox, A. J., Lie, R. T., Solvoll, K., Taylor, J., McConaughy, D. R., Abyholm, F., Vindenes, H., Vollset, S. E., Drevon, C. A. 2007. Folic acid supplements and risk of facial clefts: national population based case-control study. *BMJ*, 334(7591): 464. <http://dx.doi.org/10.1136/bmj.39079.618287.0B> [PMid:17259187](http://dx.doi.org/10.1136/bmj.39079.618287.0B)
- Žikavská, T., Brucknerová, I., Vasilenková, A., Behúlová, D., Franková E. 2011. Stanovenie koncentrácie folátov v erytrocytoch u novorodenca - naše prvé skúsenosti. Sborník abstraktu a prednášok. Plzeň. p 58. ISBN 978-80-7177-990-2.

Acknowledgments:

I would like to thank for measurement of red blood cell folate concentration levels to our colleagues from Department of Clinical Biochemistry in Children's Hospital Bratislava, Slovakia.

This work was supported by grant UK (GUK 376/2012).

Contact address:

Tatiana Zikavska, M. D., Department of Pediatrics, Faculty of Medicine, Comenius University in Bratislava, Limbova 1, 833 40 Bratislava, Slovak Republic, E-mail: zikavska@gmail.com.

Ingrid Brucknerova Assoc Prof, M. D., PhD., Department of Pediatrics, Faculty of Medicine, Comenius University in Bratislava, Limbova 1, 833 40 Bratislava, Slovak Republic, E-mail: osmium@centrum.sk.

ANTIOXIDANT AND ANTIPROTEINASE EFFECTS OF BUCKWHEAT HULL EXTRACTS

Martina Danihelová, Ernest Šturdík

ABSTRACT

Buckwheat is known not only due to its appropriate nutritional composition but the content of prophylactic compounds, too. These are responsible for buckwheat beneficial impact on human health. Most of them are concentrated in outer layers of buckwheat grain. The subject of this work was to screen hulls of nine common and one tartary buckwheat cultivar for the content of flavonoids and its antioxidant and antiprotease effects. The highest content of total flavonoids was determined for tartary buckwheat cultivar *Madawaska* (0.6% of hulls weight). Among common buckwheat cultivars the best values reached samples *Bamby* (0.23%) and *KASHO-2* (0.11%). Antioxidant activity as detected via binding radical ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)) and monitoring reducing power was the most effective for samples with highest flavonoid content. Buckwheat hulls effectively inhibited pathophysiological proteases thrombin and urokinase, whereas only little effects were seen to trypsin and elastase. In this testing there were again the best samples with highest flavonoid content. Only tartary buckwheat *Madawaska* effectively inhibited elastase at tested concentrations. No significant correlation was determined between flavonoid content and measured antioxidant or protease inhibitory action. Obtained results allow us to commend tartary buckwheat cultivar *Madawaska* as well as common buckwheat cultivars *Bamby* and *KASHO-2* for further experiments.

Keywords: antioxidant activity; buckwheat hulls; enzyme inhibition; flavonoids; serine proteases

INTRODUCTION

Food is not only a source of energy and nutrition for maintenance and growth of the body but is also a source of bioactive compounds that have beneficial effects on humans. Common buckwheat (*Fagopyrum esculentum*) and tartary buckwheat (*Fagopyrum tataricum*) are traditional foodstuffs available worldwide. Buckwheat is a traditional crop in Central and Eastern Europe and Asia. It is not a cereal, but buckwheat seed has chemical, structural and utilisation characteristics similar to those of cereal grains and thus is usually classified as a pseudocereal (Yildiz, Bilgiçli, 2012).

Buckwheat represents raw material interesting in term of its health beneficial properties. It contains many prophylactic compounds that can in the positive way influence genesis and development of many diseases. Dietary fibre is contained mainly in coating layers. It is useful in preventing gastrointestinal disorders. Phytosterols present in endosperm lower blood cholesterol. Buckwheat bran is rich in B group vitamins. Due to binding proteins they are more bioavailable than from other sources. In comparison with other cereals and pseudocereals buckwheat is better source of magnesium, potassium, phosphorus, zinc, manganese and copper. They are located in peripheral layers and in embryo (Danihelová, Šturdík, 2012).

Buckwheat is known as one of the richest sources of polyphenols and flavonoids. These are concentrated mainly in outer layers of buckwheat grain (Sedej et al.,

2012). Among them the most abundant is rutin with its content from 0.02% to 2% (Jiang et al., 2007). In buckwheat we can find also other polyphenols – sinapic, ferulic, syringic or protocatechuic acid (Sedej et al., 2012) and flavonoids such as quercetin, catechin, epicatechin, quercitrin, orientin or luteolin (Verardo et al., 2010).

In vitro, *ex vivo* and some *in vivo* experiments have shown that buckwheat possess many positive effects. Plant parts, seeds and even hulls displayed antioxidant properties (Sun, Chi-Tang, 2005), the ability to inhibit cancer cell proliferation (Kim et al., 2007), have anti-allergic (Kim et al., 2003), anti-obesity and anti-inflammatory action (Wieslander et al., 2011). There were investigated inhibitory effects mainly to pathophysiological proteases trypsin and chymotrypsin. In most cases molecules of protein origin were detected as inhibitors (Tsybina et al., 2004).

This paper links to the previous one, that was aimed at screening of buckwheat cultivars for their cytotoxic and antioxidant activity (Danihelová, Jantová, Šturdík, 2013). The subject of this work was to screen nine common buckwheat cultivars and one tartary buckwheat cultivar for total flavonoid content. We have tested buckwheat hull methanolic extracts. Samples were examined for antioxidant activity as detected via binding radical ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)) and via measuring reducing power

(FRAP). Inhibitory activity to serine proteases trypsin, thrombin, urokinase and elastase was also determined.

MATERIAL AND METHODOLOGY

MATERIAL

Trypsin from porcine pancreas (EC 3.4.21.4, 2000 BAEE U/mg), thrombin from bovine plasma (EC 3.4.21.5, 2000 NIH U/mg), elastase from porcine pancreas (EC 3.4.21.36, 4 U/mg), α -benzoyl-D,L-arginine-paranitroanilide hydrochloride, N-glycine-arginine-paranitroanilide dihydrochloride, α -benzoyl-L-phenylalanyl-L-valyl-L-arginine-paranitroanilide hydrochloride, N-succinyl-L-alanyl-L-alanyl-L-alanine-paranitroanilide, 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS), potassium persulfate and 2,4,6-tris(2-pyridyl)-S-triazine (TPTZ) were purchased from Sigma-Aldrich. Urokinase 500 000 HS from human urine (EC 3.4.21.73, 500 000 IU/mg) was from Medac GmbH. All solvents and other reagents were supplied from local companies and were of analytical or HPLC grade.

PLANT MATERIAL TREATMENT

Nine common buckwheat cultivars and one tartary buckwheat cultivar were kindly provided from Plant production research center in Piešťany (SR). Overview of tested cultivars is outlined in Table 1. Buckwheat grains were mechanically dehulled. Obtained hulls were extracted using methanol (p. a.) for 24 hours at room temperature (diluent : weighing material = 10 : 1), filtered and used for flavonoid content determination and antioxidant activity testing. For purposes of enzyme inhibition evaluation extracts were evaporated and dissolved in dimethyl sulfoxide.

Table 1. Overview of tested buckwheat cultivars.

Buckwheat cultivars	Buckwheat variety	Crop year
<i>Pyra</i>	Common buckwheat	2011
<i>Špačinská 1</i>	Common buckwheat	2011
<i>Siva</i>	Common buckwheat	2011
<i>Emka</i>	Common buckwheat	2011
<i>Bamby</i>	Common buckwheat	2011
<i>Aiva</i>	Common buckwheat	2011
<i>Madawaska</i>	Tartary buckwheat	2011
<i>KASHO-2</i>	Common buckwheat	2011
<i>JANA C1</i>	Common buckwheat	2011
<i>Hrusowska</i>	Common buckwheat	2011

TOTAL FLAVONOID CONTENT

The content of flavonoids was determined spectrophotometrically according **Kreft et al. (2002)**. The 200 μ l of 5% AlCl_3 methanolic solution was added to 2 ml of sample. After 30 min flavonoid-aluminium complex was detected via measuring absorbance at 420 nm. Samples were measured in three replicates. Standard curve of rutin was prepared using the similar procedure. Results were expressed in rutin equivalents (mg RE/g dry sample). Data were presented as means of the percentage of control \pm SD (standard deviation).

FREE RADICAL SCAVENGING ACTIVITY (ABTS)

The ability to scavenge free radicals was observed using spectrophotometric method according **Re et al. (1999)**. Cationradical ABTS^+ was prepared by reaction between 7 mM ABTS in phosphate buffered saline (0,1 M, pH 7.4) and 2.45 mM potassium persulfate in phosphate buffered saline (0.1 M, pH 7.4) in the rate of 1:1. This mixture stayed at room temperature in the dark for 12 hours. Solution of cationradical ABTS^+ was diluted with methanol (1.5 ml of ABTS^+ was pipetted into 60 ml of methanol) to get an absorbance of 0.700 at 734 nm. Then 1.95 ml of diluted ABTS^+ was added to 0.05 ml of sample. Reaction mixture was incubated 7 min at room temperature in the dark. Thereafter the absorbance was measured at 734 nm. Samples were measured in three replicates. Trolox served as standard antioxidant control. Results were expressed in trolox equivalents ($\mu\text{M TE/g}$ dry sample). Data were presented as means of the percentage of control \pm SD (standard deviation).

FERRIC REDUCING ANTIOXIDANT POWER (FRAP)

Antioxidant reducing power of tested samples was performed using FRAP method according **Benzie and Strain (1996)**. This spectrophotometric procedure measures the ability to reduce ferric complex to ferrous. Working FRAP reagent was prepared by mixing 10 ml of acetate buffer (0.1 M, pH = 3.6), 2.5 ml of 10 mM TPTZ (2,4,6-tris(2-pyridyl)-S-triazine) in 40 mM HCl and 2.5 ml of 20 mM $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$. 25 μ l of sample and 175 μ l of FRAP reagent were pipetted into microplate well. The reaction lasted for 10 min at 37 °C. At the end, absorbance changes were measured spectrophotometrically at 593 nm. Samples were measured in five replicates. Trolox served as standard antioxidant control. Results were expressed in trolox equivalents ($\mu\text{M TE/g}$ dry sample). Data were presented as means of the percentage of control \pm SD (standard deviation).

ASSESSMENT OF ENZYME INHIBITION

For the purpose of enzyme inhibition determination we used spectrophotometric method that was reported previously. We adapted methodological modifications from **Jedinák et al. (2006)**. Suitable chromogenic substrates were applied for particular enzymes, concrete α -benzoyl-D,L-arginine-paranitroanilide hydrochloride for trypsin, N-glycine-arginine-paranitroanilide dihydrochloride for urokinase, α -benzoyl-L-phenylalanyl-L-valyl-L-arginine-paranitroanilide hydrochloride for thrombin and N-succinyl-L-alanyl-L-alanyl-L-alanine-paranitroanilide for elastase.

Hydrolysis of substrates released free nitroaniline, that was measured at 410 nm using microplate screening system. Hydrolytic reactions of substrates (0.03 M) and trypsin (30 BAEE U/ml), urokinase (62 500 IU/ml), thrombin (0.58 NIH U/ml) and elastase (0.02 U/ml) were carried out in phosphate buffered saline (0.01 M, pH = 7.6) at 37°C during 60 min.

All tested extracts were initially solubilized in dimethyl sulfoxide (DMSO) at a concentration of 10 mg/ml and subsequently diluted in the reaction mixture to final concentrations 6.25 - 100 $\mu\text{g/ml}$. The highest concentration

of DMSO in the reaction mixture never exceeded 2 %. The absorbance was measured in the 1st and 61st minute after reaction started. Each experiment was performed in quintuplicate. Inhibitory activity was expressed as the concentration that is responsible for 50 % of substrate cleavage inhibition (IC₅₀). Data were presented as means of the percentage of control ± SD (standard deviation).

RESULTS AND DISCUSSION

TOTAL FLAVONOID CONTENT

Among natural plant sources rich in bioactive compounds we have chosen buckwheat due to its high content of rutin, tradition of cultivation in Slovakia as well as large scale of documented biological effects (Krkošková, Mrázová, 2005). Buckwheat hulls represent waste material that has no important commercial utilization. But in comparison with other parts of buckwheat grain in hulls are concentrated present polyphenols and flavonoids (Sedej et al., 2012). We therefore decided to use these in our experiments. From the collection of nine common buckwheat cultivars and one tartary buckwheat cultivar we prepared hull extracts in methanol using diluent to weighing material ratio 10:1. In samples we first determined total flavonoid content. Results are presented in Figure 1.

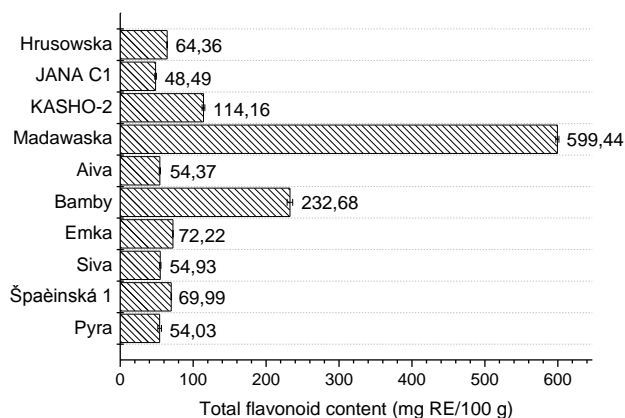


Figure 1. Total flavonoid content determined in buckwheat cultivars (RE = rutin equivalent).

According to the literature the highest flavonoid content was detected in tartary buckwheat (about 0.6% of hulls weight). The most of common buckwheat cultivars have shown approximately 10 times lower content of flavonoids as compared to tartary buckwheat. Among common buckwheat cultivars the most flavonoids contained cultivars KASHO-2 (0.11%) and Bamby (0.23%).

Sedej et al. (2012) found significantly higher content of total flavonoids in buckwheat hull than in whole grain and groat. Also other authors discovered that flavonoids are more abundant in hulls than in the flour (45.6 mg/100 g DW for hulls and 9.8 mg/100 g DW for flour) (Quettier-Deleu et al., 2000).

Obtained data from the literature about buckwheat flavonoid content lie in the wide range because they are dependent on varietal and growth conditions. Common buckwheat hulls contained total flavonoids from 36 mg/100 g to 1180 mg/100 g of hulls weight (Watanabe, Ohshita, Tsushida, 1997; Quettier-Deleu et al., 2000; Sedej et al., 2008). Data stated for tartary buckwheat hulls

are higher – 1100 mg/100 g to 3000 mg/100 g of hulls weight (Yongyan et al., 2007; Xiong et al., 2009). Our results are comparable with these values, but flavonoid content for tartary buckwheat is lower.

ANTIOXIDANT ACTIVITY

Because flavonoids are known for their antioxidant properties and our previous investigations have shown, that buckwheat hull extracts possess antioxidant action, in the next step we have examined their antioxidant activity using other two different spectrophotometric methods. The first one follows the ability to bind cationradical ABTS⁺. Antioxidants present in buckwheat caused radical binding and thereby its decolorization. The second one measures reducing power of samples (FRAP). Active samples could reduce ferric complex to ferrous, what resulted in color change. Activity was compared to standard antioxidant trolox (TE = trolox equivalent). Determined effects are presented in Table 2.

Table 2. Antioxidant activity of buckwheat hull samples as determined via binding radical 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS) and by measuring ferric reducing power (FRAP method).

Buckwheat cultivars	ABTS (µM TE/g DW)*	FRAP (µM TE/g DW)*
<i>Pyra</i>	691.19 ± 35.78	227.94 ± 4.77
<i>Špaěinská 1</i>	822.87 ± 21.97	227.55 ± 9.08
<i>Siva</i>	765.85 ± 16.26	117.44 ± 3.74
<i>Emka</i>	781.91 ± 12.33	174.57 ± 2.09
<i>Bamby</i>	1083.48 ± 23.63	472.59 ± 12.27
<i>Aiva</i>	479.70 ± 11.15	96.64 ± 4.32
<i>Madawaska</i>	1603.14 ± 37.42	1103.61 ± 6.62
<i>KASHO-2</i>	1141.15 ± 25.11	581.98 ± 19.17
<i>JANA C1</i>	501.51 ± 5.28	84.25 ± 0.76
<i>Hrusowska</i>	698.39 ± 16.33	121.36 ± 3.14

*TE = trolox equivalent
DW = dry weight

Comparing obtained results of both measurements we came to the same conclusion. Antioxidant activity determined via binding radical ABTS as well as measuring reducing power (FRAP) was the highest in the case of tartary buckwheat *Madawaska*, which concurrent contained the highest amount of total flavonoids among tested samples. Among common buckwheat samples we observed best antioxidant properties for cultivars *Bamby* and *KASHO-2*, that was about one third lower than for tartary buckwheat. These two cultivars also contained relatively high amount of flavonoids.

Available literature documents, that tartary buckwheat because of higher polyphenol and flavonoid content exhibit higher antioxidant properties (Tsai et al., 2012; Zhao et al., 2012). Guo et al. (2011) reported for tartary buckwheat antioxidant activity similar values with our determination. Zielińska et al. (2010) observed for common buckwheat hulls higher ability to bind free radicals than we have stated for our cultivars.

Most of authors detected positive correlation between flavonoid content and antioxidant activity in buckwheat samples (Sedej et al., 2008; Markovic et al., 2009). But there were some that claimed no relationship in this case (Oomah, Mazza, 1996). Our results show no significant

correlation between determined flavonoid content and measured antioxidant action.

SERINE PROTEASE INHIBITION

Data from the literature indicate potential inhibitory activity of buckwheat extracts to set of enzymes including serine proteases. This inhibitory activity authors ascribe mainly to various peptides present in buckwheat seed (Tsybina et al., 2004).

Because flavonoids are known for their inhibitory action to various enzymes (Jedinák et al., 2006), we decided to test buckwheat hull samples with proven flavonoid content for inhibition of serine proteases trypsin, thrombin, urokinase and elastase. Results were expressed in IC₅₀ values, that represent extract concentration with 50% inhibitory activity in comparison with control (without an inhibitor). Determinations are listed in Table 3.

Table 3. Inhibitory effects of buckwheat hull extracts to serine proteases trypsin, thrombin, urokinase and elastase.

Buckwheat cultivars	IC ₅₀ (mg/ml)			
	Trypsin	Thrombin	Urokinase	Elastase
<i>Pyra</i>	> 0,5	0,352 ± 0,013	0,343 ± 0,012	> 0,5
<i>Špačinská 1</i>	> 0,5	0,350 ± 0,006	0,350 ± 0,006	> 0,5
<i>Siva</i>	> 0,5	0,371 ± 0,015	0,358 ± 0,015	> 0,5
<i>Emka</i>	> 0,5	0,332 ± 0,012	0,305 ± 0,016	> 0,5
<i>Bamby</i>	> 0,5	0,127 ± 0,006	0,156 ± 0,004	> 0,5
<i>Aiva</i>	> 0,5	0,272 ± 0,002	0,310 ± 0,010	> 0,5
<i>Madawaska</i>	> 0,5	0,134 ± 0,005	0,141 ± 0,002	0,353 ± 0,018
<i>KASHO-2</i>	> 0,5	0,113 ± 0,003	0,151 ± 0,005	> 0,5
<i>JANA C1</i>	> 0,5	0,386 ± 0,014	0,330 ± 0,012	> 0,5
<i>Hrusowska</i>	> 0,5	0,364 ± 0,011	0,338 ± 0,016	> 0,5

Among tested enzymes buckwheat hull extracts were the most potent inhibitors of thrombin and urokinase. Best inhibitory activities to both enzymes revealed common buckwheat cultivars *KASHO-2* and *Bamby* as well as tartary buckwheat cultivar *Madawaska*. These cultivars were about three times better than other tested samples. Buckwheat hull extracts have shown minimal inhibitory effects to trypsin and elastase. Only tartary buckwheat *Madawaska* inhibited effectively elastase at tested concentrations (IC₅₀ = 0.353 mg/ml).

Tsybina et al. (2001) obtained low molecular weight protein inhibitors of serine proteinases from buckwheat seeds. These effectively inhibited trypsin, chymotrypsin and subtilisin. Other authors discovered inhibitory activity of peptide from buckwheat seed to trypsin, chymotrypsin and cathepsin G (Gladysheva et al., 1995). Wang et al. (2006) purified and characterized protease inhibitor from tartary buckwheat seeds with specific trypsin inhibitory

activity. Oparin et al. (2012) obtained peptide trypsin inhibitor from buckwheat seeds.

As we can see, authors investigated protease inhibitory activity of buckwheat mainly to trypsin, chymotrypsin, subtilisin and cathepsin G. To our knowledge this is for the first time that was examined buckwheat extract inhibition of thrombin, urokinase and elastase. It seems that flavonoids are in this case effective components from buckwheat hull extracts.

CONCLUSION

Buckwheat belongs to traditional crops in Central and Eastern Europe and Asia. It is effective in management of many diseases, mainly cardiovascular and digestion disorders, cancer, diabetes and obesity. Effective prophylactic compounds are present mainly in outer layers of buckwheat grain.

In this study there were screened hulls of ten buckwheat cultivars. We can conclude, that the highest total flavonoid content revealed tartary buckwheat *Madawaska*. Among common buckwheat best values achieved cultivars *Bamby* and *KASHO-2*. Samples with highest flavonoid content were the most effective in testing of their antioxidant and antiproteinase properties. In regard of achieved results we can commend tartary buckwheat *Madawaska* and common buckwheat cultivars *Bamby* and *KASHO-2* for further experiments.

LITERATURE

- Benzie, I. F. F., Strain, J. J. 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of „antioxidant power“: the FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, vol. 239, no. 1, p. 70-76. <http://dx.doi.org/10.1006/abio.1996.0292>, PMID:8660627
- Danihelová, M., Šturdík, E. 2012. Nutritional and health benefits of buckwheat. *Potravinárstvo*, vol. 6, no. 3, p. 1-9. <http://dx.doi.org/10.5219/206>
- Danihelová, M., Jantová, S., Šturdík, E. 2013. Cytotoxic and antioxidant activity of buckwheat hull extracts. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, vol. 2, special issue, p. 1314-1323.
- Gladysheva, I. P., Dunaevskii, I. a E., Belozerskii, M. A., Gladyshev, D. P., Papisova, A. I., Larionova, N. I. 1995. Inhibition of exogenous serine proteinases by a trypsin inhibitor from the buckwheat IT-1 seeds. *Biokhimiia*, vol. 60, no. 9, p. 1530-1535. PMID:8562658
- Guo, X.-D., Ma, Y.-J., Parry, J., Gao, J.-M., Yu, L.-L., Wang, M. 2011. Phenolics content and antioxidant activity of tartary buckwheat from different locations. *Molecules*, vol. 16, no. 12, p. 9850-9867. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules16129850> PMID:22117174
- Jedinák, A., Maliar, T., Grančai, D., Nagy, M. 2006. Inhibition activities of natural products on serine proteases. *Phytotherapy Research*, vol. 20, no. 3, p. 214-217. <http://dx.doi.org/10.1002/ptr.1836>, PMID:16521112
- Jiang, P., Burczynski, F., Campbell, C., Pierce, G., Austria, J. A., Briggs, C. J. 2007. Rutin and flavonoid contents in three buckwheat species *Fagopyrum esculentum*, *F. tataricum*, and *F. homotropicum* and their protective effects against lipid peroxidation. *Food Research International*, vol. 40, no. 3, p. 356-364. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2006.10.009>
- Kim, C. D., Lee, W.-K., No, K.-O., Park, S.-K., Lee, M.-H., Lim, S. R., Roh, S.-S. 2003. Anti-allergic action of buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) grain extract. *International*

- Immunopharmacology*, vol. 3, no. 1, p. 129-136. [http://dx.doi.org/10.1016/S1567-5769\(02\)00261-8](http://dx.doi.org/10.1016/S1567-5769(02)00261-8).
- Kim, S. H., Cui, C. B., Kang, I. J., Kim, S. Y., Ham, S. S. 2007. Cytotoxic effect of buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) hull against cancer cells. *Journal of Medicinal Food*, vol. 10, no. 2, p. 232-238. <http://dx.doi.org/10.1089/jmf.2006.1089>, PMID:17651057
- Kreft, S., Štrukelj, B., Gaberščik, A., Kreft, I. 2002. Rutin in buckwheat herbs grown at different UV-B radiation levels: comparison of two UV spectrophotometric and an HPLC method. *Journal of Experimental Botany*, vol. 53, no. 375, p. 1801-1804. <http://dx.doi.org/10.1093/jxb/erf032>, PMID:12147730
- Krkošková, B., Mrázová, Z. 2005. Prophylactic components of buckwheat. *Food Research International*, vol. 38, no. 5, p. 561-568. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2004.11.009>
- Markovic, G., Sedej, I., Mišan, A., Sakač, M., Tadić, V., Mandić, A., Pestorić, M. 2009. Phenolic compounds and antioxidative properties of buckwheat grain, hull and flours. *Planta Medica*, vol. 75, no. 9, p. 86. <http://dx.doi.org/10.1055/s-0029-1234411>
- Oomah, B. D., Mazza, G. 1996. Flavonoids and antioxidative activities in buckwheat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 44, no. 7, p. 1746-1750. <http://dx.doi.org/10.1021/jf9508357>
- Oparin, P. B., Mineev, K. S., Dunaevsky, Y. E., Arseniev, A. S., Belozersky, M. A., Grishin, E. V., Egorov, T. A., Vassilevski, A. A. 2012. Buckwheat trypsin inhibitor with helical hairpin structure belongs to a new family of plant defence peptidases. *The Biochemical Journal*, vol. 446, no. 1, p. 69-77. <http://dx.doi.org/10.1042/BJ20120548>, PMID:22612157
- Quettier-Deleu, C., Gressier, B., Vasseur, J., Dine, T., Brunet, C., Luyckx, M., Cazin, M., Cazin, J.-C., Bailleul, F., Trotin, F. 2000. Phenolic compounds and antioxidant activities of buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) hulls and flour. *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 72, no. 1-2, p. 35-42. [http://dx.doi.org/10.1016/S0378-8741\(00\)00196-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0378-8741(00)00196-3)
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology & Medicine*, vol. 26, no. 9-10, p. 1231-1237. [http://dx.doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00315-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3)
- Sedej, I., Mišan, A., Sakač, M., Mandić, A., Pestorić, M. 2008. Antioxidative properties of buckwheat grain, hull and flour. *Planta Medica*, 74, no. 9, p. 52. <http://dx.doi.org/10.1055/s-0028-1084897>
- Sedej, I., Sakač, M., Mandić, A., Mišan, A., Tumbas, V., Čanadanović-Brunet, J. 2012. Buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) grain and fractions: antioxidant compounds and activities. *Journal of Food Science*, vol. 77, no. 9, p. C954-C959. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1750-3841.2012.02867.x>, PMID:22888949
- Sun, T., Chi-Tang, H. 2005. Antioxidant activities of buckwheat extracts. *Food Chemistry*, vol. 90, no. 4, p. 743-749. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.04.035>
- Tsai, H., Deng, H., Tsai, S., Hsu, Y. 2012. Bioactivity comparison of extracts from various parts of common and tartary buckwheats: evaluation of the antioxidant- and angiotensin-converting enzyme inhibitory activities. *Chemistry Central Journal*, vol. 6, no. 1, p. 78. <http://dx.doi.org/10.1186/1752-153X-6-78>, PMID:22853321
- Tsybina, T. A., Dunaevsky, Y. E., Musolyamov, A. K., Egorov, T. A., Belozersky, M. A. 2001. Cationic inhibitors of serine proteinases from buckwheat seeds. *Biokhimiia*, vol. 66, no. 9, p. 941-947. <http://dx.doi.org/10.1023/A:1012388805336>
- Tsybina, T., Dunaevsky, Y., Musolyamov, A., Egorov, T., Larionova, N., Popykina, N., Belozersky, M. 2004. New protease inhibitors from buckwheat seeds: properties, partial amino acid sequences and possible biological role. *Biological Chemistry*, vol. 385, no. 5, p. 429-434. <http://dx.doi.org/10.1515/BC.2004.049>, PMID:15196004
- Verardo, V., Arráez-Román, D., Segura-Carretero, A., Marconi, E., Fernández-Gutiérrez, A., Caboni, M. F. 2010. Identification of buckwheat phenolic compounds by reverse phase high performance liquid chromatography-electrospray ionization-time of flight-mass spectrometry (RP-HPLC-ESI-TOF-MS). *Journal of Cereal Science*, vol. 52, no. 2, p. 170-176. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcs.2010.04.009>
- Wang, Z.-H., Zhao, Z.-H., Zhang, Z., Yuan, J.-M., Noback, D., Wieslander, G. 2006. Purification and characterization of a protease inhibitor from *Fagopyrum tartaricum* Gaertn seeds and its effectiveness against insects. *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, vol. 22, no. 12, p. 960-965.
- Watanabe, M., Ohshita, Y., Tsushida, T. 1997. Antioxidant compounds from buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) hulls. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 45, no. 4, p. 1039-1044. <http://dx.doi.org/10.1021/jf9605557>
- Wieslander, G., Fabjan, N., Vogrinčič, M., Kreft, I., Janson, C., Spetz-Nnyström, U., Vombergar, B., Tagesson, C., Leanderson, P., Norbäck, D. 2011. Eating buckwheat cookies is associated with the reduction in serum levels of myeloperoxidase and cholesterol: A double blind crossover study in day-care centre staffs. *The Tohoku Journal of Experimental Medicine*, vol. 225, no. 2, p. 123-130. <http://dx.doi.org/10.1620/tjem.225.123>, PMID:21931228
- Xiong, S.-L., Li, A.-L., Ren, F., Jin, H. 2009. Study on extraction of total flavonoids from powder or husks of different cultivars of buckwheat and analysis on their free radical scavenging activities. *Food Science*, vol. 30, no. 3, p. 118-122.
- Yildiz, G., Bilgiçli, N. 2012. Effects of whole buckwheat flour on physical, chemical, and sensory properties of flat bread, Lavaş. *Czech Journal of Food Sciences*, vol. 30, no. 6, p. 534-540.
- Yongyan, H., Baili, F., Tao, D., Pengtao, L., Jinfeng, G., Yan, C. 2007. Antioxidant activity of ethanol extracts of different buckwheat. *Proceedings of the 10th International Symposium on Buckwheat*, China, p. 465-468. ISBN 9787810923583.
- Zhao, G., Peng, L.-X., Wang, S., Hu, Y.-B., Zou, L. 2012. HPLC fingerprint – antioxidant properties study of buckwheat. *Journal of Integrative Agriculture*, vol. 11, no. 7, p. 1111-1118. [http://dx.doi.org/10.1016/S2095-3119\(12\)60104-X](http://dx.doi.org/10.1016/S2095-3119(12)60104-X)
- Zielińska, D., Sywara-Nowak, D., Zieliński, H., 2010. Determination of the antioxidant activity of rutin and its contribution to the antioxidant capacity of diversified buckwheat origin material by updated analytical strategies. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, vol. 60, no. 4, p. 315-321.

Acknowledgments:

This article was part of the project funded by the Agency of the Ministry of Education, Science, Research and Sport of The Slovak Republic for EU Structural Funds entitled "Evaluation of natural substances and their choice for the

prevention and treatment of lifestyle diseases" (ITMS 26240220040).

Contact address:

Mgr. Martina Danihelová, Institute of Biochemistry, Nutrition and Health Protection, Department of nutrition and food assessment, Faculty of Chemical and Food Technology, Slovak University of Technology in

Bratislava, Radlinského 9, 812 37 Bratislava, Slovakia, 02/59325400, E-mail: martina.danihelova@stuba.sk.

doc. Ing. Ernest Šturdík, CSc., Institute of Biochemistry, Nutrition and Health Protection, Department of nutrition and food assessment, Faculty of Chemical and Food Technology, Slovak University of Technology in Bratislava, Radlinského 9, 812 37 Bratislava, Slovakia, 02/59325524, E-mail: ernest.sturdik@stuba.sk.

CELIAC DISEASE AND GLUTEN-FREE DIET

Eva Hybenová, Júlia Štofirová, Anna Mikulajová

ABSTRACT

Celiac disease is an autoimmunity inflammatory disorder of the small intestine caused by the ingestion of gluten in genetically predisposed individuals. The prevalence of the disorder is around 1 % of the Western population and is still increasing. The symptoms of celiac disease include chronic abdominal pain, diarrhoea, and growth retardation in children, and chronic fatigue and headache, bowel complaints, reduced fertility, dermatitis herpetiformis, osteoporosis, nerve and brain disorders, increasing risk of intestinal cancer. The clinical diagnosis of the disease is based on the serological tests and bowel biopsy. The treatment is a long-life gluten-free diet. It is necessary exclude from the diet wheat, rye, barley and probably oats and buckwheat and their products. The novel approaches for celiac disease are focused on the genetic manipulation of nontoxic gluten proteins, enzyme therapy, immune modulation, and induction of oral tolerance to gluten.

Keywords: celiac disease; epidemiology; pathogenesis; gluten-free diet

ÚVOD

Slovo celiakia (iné názvy: primárny malabsorpčný syndróm, gluténová enteropatia, idiopatická steatorea, netropická sprue, Herterova-Heubnerova choroba, intestinálny infantilizmus) pochádza z gréckeho slova koiliakos, t.j. trpiaci črevnými ťažkosťami (**Svačina, Bretšnajdrová, 2008**). Ide o zápalové autoimunitné ochorenie tráviaceho traktu, ktoré postihuje najmä sliznicu proximálnych častí tenkého čreva. V ťažkých prípadoch sa lézie šíria až do ilea, ale boli pozorované aj abnormality rektálnej mukózy (**Ciclitira et al., 2005a**).

Celiakia sa vyskytuje u geneticky predisponovaných jedincov, ktorí konzumujú potraviny obsahujúce lepok (glutén). Proteíny lepku, prolamíny a gluteníny, ktoré môžu vyvolať zápalové zmeny tenkého čreva, sa vyskytujú v zrnách pšenice, jačmeňa, raže, ovsu a pohánky (**Pekárková et al., 2009; Kanerva et al., 2012**).

Pri celiakii dochádza k poruche absorpcie živín z potravy. Dôsledkom sú chronické hnačky, podvýživa, hlavne u vitamínov skupiny B (kyselina listová, kobalamíny) a minerálnych látok (najmä Ca a Fe). Ochorenie je často spojené s inými autoimunitnými ochoreniami, ale aj s osteoporózou, zníženou fertilitou a Downovým syndrómom (**Howdle, 2003, Stachová et al., 2009; Páv, 2006**). Pri neliečenej celiakii je zvýšené riziko malígnych ochorení (**Páv, 2006; Presutti et al. 2007; Pekárková et al., 2009**).

Ochorenie sa vyskytuje celosvetovo najmä u príslušníkov kaukazskej rasy, u oboch pohlaví a v každom veku. Mnohí pacienti sú asymptomatickí a o ochoreni nevedia. Podľa odhadov, na jedného diagnostikovaného pacienta pripadá 7-10 pacientov s nepoznaným ochorením (**Ciclitira et al., 2005a; Presutti et al., 2007**).

Liečba celiakie spočíva v doživotnom bezpečnom diétnom režime a prípadnej substitúcii chýbajúcich nutričných látok (**Pekárková et al., 2009; Páv, 2006**).

HISTÓRIA CELIAKIE

Prvý popis celiakie pochádza pravdepodobne z 2. storočia pred naším letopočtom, kedy Aretaeus z Cappadocie popísal pacienta s neprospevaním a chronickými hnačkami. Podrobnejšie popísal chorobu v roku 1887 Samuel Gee, pediater z londýnskej nemocnice Sv. Bartolomeja, ktorý ako prvý uviedol možnosť ovplyvnenia ochorenia stravou. V roku 1924 zaviedol Haas do liečby celiakie u detí diétu, ktorá sa používala až do 50. rokov 20. storočia (**Ciclitira et al., 2005a; Ciclitira, Moodie, 2003**).

Príčinný faktor rozvoja celiakie bol opísaný v roku 1950 pozorovaním zlepšenia stavu detí v Holandsku počas II. svetovej vojny, v čase nedostatku obilnín. Holandský pediater W. K. Dicke vtedy pozoroval zhoršenie zdravotného stavu u celiatických detí po tom, ako požili chlieb. To ho viedlo k záveru, že pšenica je toxická pre pacientov s celiakiou. Dicke aj s kolegami potom preukázal, že pšeničná múka bola tá nežiadúca zložka stravy a jej toxicita spočívala vo frakcii lepku (**Rimárová, 2005; Ciclitira et al., 2005a**).

Až po II. svetovej vojne Dicke v spolupráci s J. H. van de Kamerom a H. A. Vayersom dokázal, že gliadín, v alkohole rozpustná zložka vo vode nerozpustnej bielkoviny gluténu, je zodpovedná za patologické zmeny črevnej sliznice i za väčšinu klinických prejavov celiakie (**Rimárová, 2005**).

Histologické nálezy v čreve boli popísané pomerne neskoro, najmä kvôli domnienke, že abnormálne zmeny na sliznici pozorované pri pitve boli v dôsledku postmortálnych zmien. V roku 1954 Paulley so spolupracovníkmi popísal histológiu sliznice jejuna u celiatického pacienta. Skinner a Royer vyvinuli metódu biopsie duodena (**Ciclitira et al., 2005a**).

Aj keď tieto objavy dramaticky zlepšili diagnostiku

a prognózu ochorenia, zostáva okolo celiakie stále mnoho nejasností.

EPIDEMIOLOGIA

Podľa výskumu v 50-tych rokoch 20. storočia bola frekvencia celiakie vo svete stanovená v rozsahu 1 prípad na 4 000 až 8 000 obyvateľov. Za hlavné kritérium na stanovenie diagnózy sa považovala typická symptomatológia kompletného malabsorpčného syndrómu. Začiatkom 60-tych rokov sa zavedením enterobiopsie pohľad na výskyt celiakie zmenil. Napriek tomu, ostáva celiakia celosvetovo nedostatočne diagnostikovaným ochorením a počet diagnostikovaných prípadov je oveľa nižší ako reálne počty celiatikov (Lukáš, 2009; Makovický, Rimárová, 2011).

Celiakia je výsledkom pôsobenia dvoch faktorov: enviromentálneho (konzumácia pšenice) a genetického (HLA gény) a distribúcia týchto dvoch zložiek uľahčuje identifikáciu krajín s vyšším rizikom celiakie. Takže gluténová intolerancia je častá v Európe, severnej a južnej Amerike, severnej Afrike, Austrálii a juhozápadnej Ázii a naopak nie je veľmi bežná na ďalekom Východe, kde potraviny na báze pšenice nie sú súčasťou základnej stravy a výskyt haplotypov DQ2 a DQ8 je zriedkavý (výskyt haplotypu DQ2 v Číne je okolo 3 %), alebo absentuje (Japonsko), prípadne nie je známy (Kórea, Malajzia, Filipíny atď.) (Accomando, Cataldo, 2004).

Ochorenie bolo opísané hlavne u kaukazských národov, ale boli diagnostikované prípady vo všetkých etnických skupinách. Akékoľvek rozdiely medzi etnickými skupinami môžu byť v dôsledku genetickej rozdielnosti medzi populáciami, dostupnosti diagnostických zariadení a konzumácie príslušných obilnín, pretože celiakia sa môže prejaviť len u populácie, ktorá konzumuje pšenicu (Howdle, 2003).

Zaujímavé sú údaje, aj keď je ich obmedzené množstvo, o rozšírení celiakie v Afrike. Gluténová intolerancia je rozšírená v Magrebskej oblasti (severné regióny Afriky). Najvyšší výskyt celiakie 1:20 bol popísaný u ľudí kmeňa Saharawi zo saharského regiónu Afriky. Naproti tomu, obyvatelia centrálnej Afriky (Burkina Faso) sérologicky testovaní neboli pozitívni na protilátky. Sú však potrebné ďalšie štúdie na potvrdenie týchto údajov (Accomando, Cataldo, 2004; Ciclitira, Moodie, 2003).

Tabuľka 1 Prevalencia celiakie v niektorých európskych krajinách (Krajčirová, 2007; Accomando, Cataldo, 2004)

Krajina	Prevalencia	%
Chorvátsko	1 : 500	2,00
Dánsko	1 : 394	2,50
Estónsko	1 : 88	11,36
Fínsko	1 : 99	10,00
Nemecko	1 : 500	2,00
Maďarsko	1 : 85	11,76
Írsko	1 : 122	8,20
Nórsko	1 : 340	2,94
Portugalsko	1 : 134	7,46
Španielsko	1 : 389	2,57
Švédsko	1 : 190	5,26
Švajčiarsko	1 : 132	7,56
Holandsko	1 : 192	5,20
Veľká Británia	1 : 100	10,00

Súčasný údaje o priemernej celosvetovej prevalencii sú 1:100 až 1:250 obyvateľov. V Tab. 1 je uvedený výskyt celiakie v rôznych európskych krajinách na základe skriningových štúdií. Skutočná frekvencia výskytu je len ťažko stanoviteľná, pretože symptomatickí pacienti tvoria len vrchol ľadovca. Najmä u dospelých sa celiakia prejavuje značne variabilne a atypické formy sú častejšie než klasická forma vyskytujúca sa najmä u detí. Na Slovensku bolo v roku 2008 diagnostikovaných 7 930 pacientov, čo predstavuje prevalenciu 1:677. Na základe údajov z iných európskych krajín sa predpokladá výskyt 1:250, čo znamená, že diagnostika celiakie stále nie je dostatočná a predstavuje len vrchol ľadovca (Ciclitira et al., 2005a; Pekárková et al., 2009; Makovický, Rimárová, 2011).

Veková distribúcia celiakie v dospelosti je bimodálna, prvý vrchol je v 3.-4. dekáde, druhý v 5.-6. dekáde. Rozdiel medzi pohlaviami je minimálny, o niečo viac sú postihované ženy (Stachová et al., 2009).

V súčasnosti sa hľadajú spôsoby, ako diagnostikovať ochorenie už v rannom štádiu, pričom hlavný dôraz sa kladie na presnosť, rýchlosť, minimálnu invazívnosť a samozrejme aj primeranú cenu vyšetrenia. Včasným stanovením diagnózy a okamžitým zavedením bezlepkovej diéty je možné u podstatnej časti pacientov dosiahnuť ústup klinických symptómov a znížiť výskyt závažných komplikácií choroby (Pekárková et al., 2009; Stachová et al., 2009).

PATOGENÉZA

Celiakia je komplexným autoimunitným ochorením postihujúcim najmä tenké črevo. Ide o zápalové ochorenie vyvolané príjmom lepku u geneticky citlivých jedincov. Tieto dva faktory ovplyvňujúce vznik celiakie sú v súčasnosti intenzívne skúmané. Potencionálne spúšťače faktory patologickej imunitnej odpovede sú predmetom výskumu (Pekárková et al., 2009).

GENETICKÉ FAKTORY

Rozvoj celiakie je podmienený interakciou medzi génmi a prostredím, a teda vzniká u jedincov s genetickou predispozíciou. Tá je daná prítomnosťou jedného alebo oboch génov HLA (Human Leukocyte Antigens) komplexu II. triedy - HLA DQ2 a/alebo DQ8 (hlavné predisponujúce gény) (Trynka et al., 2010).

Molekuly HLA II. triedy patria k transmembránovým glykoproteínom, ktorých funkciou je prijať imunogénny fragment a transportovať ho k imunokompetentným (APC) bunkám. V genotype je každý gén zastúpený dvoma alelami, jednou od matky, druhou od otca. V etiopatogenéze celiakie stačí prítomnosť jednej alely predisponujúceho génu na vznik a rozvoj ochorenia, čím vzniká širší priestor pre enviromentálne faktory (Stachová et al., 2009).

Vyššie 98 % pacientov s celiakiou má jeden z uvedených HLA génov. HLA DQ2 má asi 90 % a HLA DQ8 menej ako 10 % pacientov. Hoci prítomnosť HLA génov je dôležitá pre rozvoj celiakie, nie je postačujúca. Vzhľadom na to, že dedičnosť celiakie sa odhaduje na 80 % a výskyt HLA génov predstavuje 35 %-né riziko, do celiakie musí byť zahrnutých viacero geneticky rizikových faktorov. To potvrdili štúdie s dvojčatami, ktoré preukázali veľké rozdiely vo výskyte celiakie u jednovaječných dvojčiat

v porovnaní s HLA identickými dvojjajecnými dvojčatami. Realizovali sa rozsiahle výskumy ľudského genómu, pri ktorých sa dosiaľ identifikovalo 39 nonHLA lokusov predisponujúcich celiakii. Väčšina z nich nie je špecifická len pre celiakii, ale súvisia aj s inými poruchami (van Heel et al., 2005; Trynka et al., 2010; Koning et al., 2005; Karell et al., 2003; Heap, van Heel, 2009).

Existuje viacero typov genetických testov, ktoré možno použiť v diagnostike celiakie. Na vyšetrenie je potrebná periférna krv alebo bunkový ster zo sliznice ústnej dutiny. Genetické vyšetrenie nemôže stanoviť diagnózu, ale preukáže, či pacient má, alebo nemá gény predisponujúce vznik ochorenia. Približne 25-40 % zdravej populácie má aspoň jeden z uvedených génov. Naopak, neprítomnosť týchto génov s vysokou pravdepodobnosťou vylučuje prítomnosť celiakie (Stachová et al., 2009).

ETIOPATOGENÉZA

Kľúčovým faktorom vonkajšieho prostredia nevyhnutným pre vznik ochorenia je lepok. Proteíny lepku interagujú s génmi pre celiakii a spôsobujú abnormálnu imunitnú odpoveď, v dôsledku ktorej dochádza prostredníctvom aktivovaných imunitných buniek (T-lymfocytov a ich produktov) k poškodeniu sliznice tenkého čreva. Nejde priamo o alergiu na lepok, pretože imunitný systém vytvára protilátky súčasne aj proti endomýziu, časti črevnej svaloviny, ktorá je týmito protilátkami poškodzovaná (Stachová et al., 2009).

Lepok je komplex zásobných bielkovín obsiahnutý v obilných zrnách. Možno ho rozdeliť etanolom na rozpustnú frakciu, prolamíny a nerozpustnú, gluteníny. Prolamíny majú u cereálií rozličné názvy: gliadíny v pšenici, hordeíny v jačmeni, sekalíny v raži, aveníny v ovse. Gliadíny sa ďalej delia na alfa, beta, gama a omega podľa relatívnej elektroforetickej rýchlosti alebo podľa poradia aminokyselín na N-terminálnom reťazci. Všetky štyri subfrakcie gliadínu zhoršujú celiakii. Štúdie poukazujú aj na úlohu nízko a vysokomolekulárnych glutenínov v patogenéze celiakie (Ciclitira et al., 2005b; Pekárková et al., 2009; Koning et al., 2005).

Gliadíny ťažko podliehajú tráveniu; takmer rezistentný na trávenie a enzymatickú degradáciu je 33 aminokyselinový fragment alfa-gliadínu, ktorý je naopak výborným substrátom pre tkanivovú transglutaminázu (Stachová et al., 2009; Krajčirová, 2007).

Aj keď presná štruktúra častí gluténu, ktoré spôsobujú celiakii, zostáva nejasná, výskum v tejto oblasti poukázal na zrejme kľúčovú úlohu vyššieho obsahu glutamínu a prolínu. Dôkazom toho je, že úplná deamidácia gluténu odstráni jeho pre celiatikov toxické vlastnosti. Avšak parciálna deamidácia zvyšuje citlivosť glutén-senzitívnych T-buniek na tieto proteíny. Práve enzým tkanivová transglutamináza (tTG) zapríčiňuje selektívnu deamidáciu gluténových proteínov, čím zvyšuje ich účinok na glutén-senzitívne T-bunky u celiatikov (Ciclitira et al. 2005b; Koning et al., 2005).

V etiopatogenéze celiakie sa faktory vonkajšieho prostredia uplatňujú zrejme ako spúšťače ochorenia. Samy osebe nevyvolávajú chorobu, ale u predisponovaného jedinca môžu spustiť jej rozvoj, či modulovať jeho priebeh. Najčastejšie opísané faktory sú rôzne infekcie - vírusové, parazitické, bakteriálne, prekonaný fyzický, či

psychický stres, gravidita, pôrod, dojčenie, operácie, trauma, malignity (Stachová et al., 2009; Accomando, Cataldo, 2004; Koning et al., 2005; Pekárková et al., 2009).

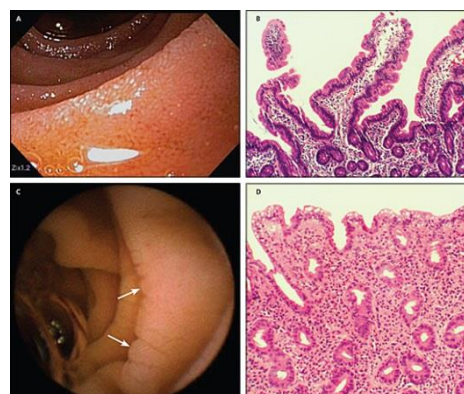
Veľmi dôležitým sa ukazuje dojčenie, jeho dĺžka a prípadne zloženie náhradnej dojčenskej výživy. Lepok je vhodné zaviesť do výživy najskôr po ukončení 4. a najneskôr do konca 7. mesiaca veku dieťaťa, pričom je dôležité v čase zavádzania lepku do stravy pokračovať v dojčení. Bolo dokázané, že deti, ktoré matky dojčili aspoň do obdobia zavedenia lepku do stravy, mali významne nižšie riziko vzniku celiakie. Súčasné porovnávacie štúdie tiež poukazujú na vplyv zloženia pokračovacej dojčenskej výživy. V krajinách, kde tieto výživy obsahujú vysoký podiel prolamínov (Švédsko, Taliansko), je prevalencia celiakie vyššia ako v krajinách, v ktorých dojčenské výživy majú nižší obsah prolamínov (Fínsko, Dánsko), a to aj napriek rovnakému genotypovému zloženiu obyvateľstva (Stachová et al., 2009; Accomando, Cataldo, 2004).

DIAGNOSTIKA

Dosiaľ neexistuje žiaden test univerzálne akceptovaný ako štandard na diagnostiku celiakie. Ale sérologické testy a biopsia tenkého čreva sú veľmi citlivé a špecifické najmä u pacientov s príznakmi celiakie a u ľudí so zvýšeným rizikom (napr. výskyt ochorenia v rodine a u ľudí s autoimunitnými ochoreniami) (Presutti et al., 2007).

Najčastejšími sérologickými markermi pri diagnóze celiakie sú imunoglobulín A (IgA) protilátky proti endomýziu a IgA protilátky proti tkanivovej transglutamináze (tTG). Testovanie na gliadínové protilátky sa neodporúča kvôli nízkej citlivosti a špecifite (Presutti et al., 2007; Pekárková et al., 2009).

Selektívny deficit IgA sa vyskytuje u 2-5 % celiatikov, takže časť pacientov by mohla pri sérologickej diagnostike vykazovať falošnú negativitu. Preto je potrebné aj súčasne stanovenie hladiny celkového IgA. Najnovšie sa používa aj vyšetrenie protilátok triedy IgG. Vysoko špecifické a citlivé sú protilátky proti tkanivovej transglutamináze a proti endomýziu (Ciclitira, Moodie, 2003; Páv, 2006; Hill, 2004; Presutti et al., 2007).



Obrázok 1 Endoskopické a bioptické nálezy u pacientov s a bez celiakie: (A, vľavo hore) endoskopická fotografia normálneho tenkého čreva. (B, vpravo hore) bioptická vzorka normálneho tenkého čreva. (C, vľavo dole) obrázok tenkého čreva celiatika s viditeľnou atrofiou vĺ. (D, vpravo dole) bioptická vzorka tenkého čreva celiatika s atrofiou vĺ (Presutti et al., 2007)

Na potvrdenie diagnózy je nevyhnutná biopsia tenkého čreva a adekvátny histologický nález. Sú potrebné najmenej 4 vzorky tkaniva odobraté zo sliznice duodena pri gastrofibroskopickom vyšetrení, alebo jejuna pri enteroskopii (Páv, 2006; Presutti et al., 2007; Ciclitira et al., 2005a).

Vzorky sa hodnotia podľa Marshovej klasifikácie, ktorá popisuje 5 základných vzhľadov mukózy od typu 0, ktorý zodpovedá normálnej slizničnej a vilóznej architektúre až po typ IV, hypoplastický stupeň, charakteristický totálnou atrofiou vil a hypopláziou krýpt, ktorý sa môže rozvinúť do malígnych komplikácií (Páv, 2006; Pekárková et al., 2009; Ciclitira et al., 2005a). Na obr. 1 sú zobrazené endoskopické a bioptické nálezy u pacientov s a bez celiakie. Lézie tenkého čreva sú charakteristické morfológiou, ale to sa môže líšiť od pacienta k pacientovi v závislosti od závažnosti a rozsahu ochorenia.

KLINICKÉ PREJAVY

Celiakia je autoimunitná porucha, ktorá vedie k zápalovým procesom v tenkom čreve. Okrem črevných príznakov je spojená s rôznymi mimočrevnými komplikáciami, vrátane kostí a kožných ochorení, anémie, deficitu vitamínov a minerálnych látok, zníženou fertilitou, endokrinnými poruchami a neurologickými deficitmi, či Downovým syndrómom (Briani et al., 2008; Samaroo et al., 2010).

Celiakia je spájaná s inými autoimunitnými ochoreniami ako sú *diabetes mellitus* I. typu, autoimunitná tyreoiditída, autoimunitná hepatitída, kardiomyopatia, Adisonova choroba (Tab. 2) (Páv, 2006; Presutti et al., 2007).

Dühringova herpetiformná dermatitída predstavuje kožnú formu manifestácie celiakie. Zo zhubných nádorov sa u celiatikov najčastejšie vyskytuje nonHodgkinov lymfóm. Menej častý je karcinóm tenkého čreva, pažeráka alebo hltanu (Pekárková et al., 2009; Catassi, 2004; Ciclitira, Moodie, 2003; Presutti et al., 2007).

Mortalita u nekomplikovaných, správne liečených pacientov, sa nelíši od bežnej populácie. U neliečených pacientov je uvádzaná mortalita v rozmedzí 10-30 %, po zavedení bezlepkovej stravy klesá na 0,4 % (Ciclitira et al., 2005a).

Tabuľka 2 Rizikové faktory celiakie (Presutti et al., 2007)

Rizikový faktor	Prevalencia celiakie (%)
<i>Dermatitis herpetiformis</i>	100
Autoimunitné ochorenie štítnej žľazy	1,5 - 14
Downov syndróm	5 - 12
Turnerov syndróm	2 - 10
<i>Diabetes mellitus</i> typu 1	
Deti	3 - 8
Dospelí	2 - 5

Formy celiakie tvoria typický obraz ľadovca. Asi 10 % pacientov manifestuje typickými prejavmi ochorenia, 90 % pacientov je bez klinických príznakov. Rozoznávame tieto klinické formy celiakie: typická (klasická), atypická (subklinická), tichá, latentná a potenciálna. Všetky vykazujú pozitívne protilátky proti endomýziu, resp.

tkanivovej transglutamináze (Ciclitira et al., 2005a; Pekárková et al., 2009).

Klinické prejavy celiakie sú veľmi variabilné. V detskom veku sa ochorenie často prejavuje neprospievaním, malým vzrastom, oneskorenou pubertou, chronickými hnačkami, nadúvaním, anémiou. U dospelých sa môžu vyskytnúť klasické prípady tohto ochorenia s chronickými hnačkami, nadúvaním a bolesťami brucha, slabosťou a malabsorpciou. Avšak mnoho pacientov má iba málo, alebo žiadne gastrointestinálne príznaky, pri ktorých sa vyskytujú rozličné extra-intestinálne poruchy (Tab. 3). Je preto vhodnejšie považovať celiakiu za multisystémovú, nie iba za gastrointestinálnu poruchu (Briani et al., 2008; Krajčírová, 2007).

Tabuľka 3 Príznaky a symptómy celiakie (Presutti et al., 2007)

Príznak/symptóm	Výskyt u celiatikov (%)
Bežné	
Hnačka	45 - 85
Únava	78 - 80
Abdominálne bolesti	34 - 64
Strata hmotnosti	45
Nadúvanie	28
Zriedkavé alebo vzácne	
Osteopénia/osteoporóza	1 - 34
Abnormálna funkcia pečene	2 - 19
Zvracanie	5 - 16
Anémia z nedostatku železa	10 - 15
Neurologické poruchy	8 - 14
Zápcha	3 - 12

LIEČBA CELIAKIE

Základom liečby celiakie je prísna celoživotná bezlepková diéta. Vzhľadom na to, že diéta predstavuje veľký zásah do stravovacích návykov tak detí, ako aj dospelých, je potrebné pacientom zdôrazniť jej nevyhnutnosť a následky pri jej porušovaní. Hlavným problémom pri liečbe je nedodržovanie diéty, ktoré sa vyskytuje u 50-80 % pacientov. Pacienti pokračujú v strave obsahujúcej lepok kvôli nedostatku motivácie alebo informácií. Kľúčová je teda motivácia pacienta, prístup lekára a spolupráca s gastroenterológom alebo dietológom, ktorí majú odborné znalosti v oblasti bezlepkovej diéty. Porušovanie diéty a aj občasná konzumácia lepku nevedie k úprave poškodenej sliznice čreva, čo môže predstavovať permanentný zápal a systémové poškodenie organizmu s ďalšími následkami, ktoré prináša neliečená celiakia (Ciclitira et al., 2005b; Pekárková et al., 2009; Čierna, 2009; Presutti et al., 2007).

U väčšiny pacientov diétne opatrenia vedú k normalizácii klinického, laboratórneho aj enterobioptického nálezu, a to v rôzne dlhom čase od zavedenia bezlepkovej diéty. Asi u 70 % pacientov je zreteľné klinické zlepšenie už po 14 dňoch od začiatku liečby, intestinálna permeabilita sa zlepší po 2 mesiacoch, ale zlepšenie sliznice vyžaduje najmenej 3-6 mesiacov. Predchádzajúce trvanie expozície lepkom významne ovplyvňuje prognózu ochorenia, ako aj výskyt závažných komplikácií celiakie (Pekárková et al., 2009; Ciclitira, Moodie, 2003).

Na začiatku stanovenia diagnózy okrem bezlepkovej diéty majú pacienti dodržiavať aj diétu s obmedzením laktózy. Keďže pacient má poškodenú sliznicu tenkého čreva, vyplýva z toho aj znížená aktivita črevných enzýmov, ku ktorým patrí aj laktáza. Po začatí bezlepkovej diéty nastáva úprava črevnej sliznice a zvyšuje sa aj aktivita laktázy a mlieko a mliečne výrobky sa môžu opäť zaradiť do jedálneho lístka (Ciclitira, Moodie, 2003; Čierna, 2009).

BEZLEPKOVÉ POTRAVINY

Každodennou úlohou celiatikov je výber vhodnej bezlepkovej stravy, pričom stále nezodpovedanou otázkou zostáva akceptovateľný obsah gluténu v potravinách. V januári 2009 prijala Európska Únia Nariadenie Komisie (ES) č. 41/2009, v ktorom sa špecifikujú kritériá pre potraviny určené na osobitné výživové účely so špeciálnym zložením, vhodným aj pre celiatikov. Záväzné pravidlá boli prijaté na 31. zasadnutí Komisie Codex Alimentarius v júli 2008, kde bol prijatý Kódex noriem. V Nariadení sa uvádza, že „potraviny pre osoby trpiace neznášanlivosťou gluténu, ktoré obsahujú jednu alebo viac zložiek vyrobených z pšenice, raže, jačmeňa, ovsu alebo ich krížených druhov, alebo sú z nich zložené, a ktoré boli špeciálne spracované tak, aby v nich bol znížený obsah gluténu, nesmú obsahovať viac ako 100 mg.kg⁻¹ gluténu v potravine vo forme, v akej sa predáva konečnému spotrebiteľovi.“ Vtedy sa na ich označenie použije termín „veľmi nízky obsah gluténu“. Pojem „bezgluténový“ sa môže použiť vtedy, ak obsah gluténu v potravine nepresahuje 20 mg.kg⁻¹. Toto nariadenie sa uplatňuje od 1. januára 2012 (Ú.v.E.Ú. L16, 2009). Bezlepkové potraviny sa označujú logom znázorňujúcim preškrtnutý pšeničný klas.



Obrázok 2 Označovanie bezlepkových potravín

Celiakia je celoživotné ochorenie charakterizované permanentnou intoleranciou lepku. Základným kameňom úspešnej liečby je zavedenie bezlepkovej diéty. To znamená vylúčiť zo stravy pšenicu, raž, jačmeň a triticale a podľa najnovších údajov aj pohánku a výrobky z nich (Pekárková et al., 2009; Ciclitira et al., 2005b; Kanerva et al., 2012).

Aj starobylé odrody pšenice ako kamut, špald a einkorn, ktoré dnes prežívajú renesanciu, sú pre celiatikov škodlivé, pretože majú spoločný genetický základ a podobné aminokyselinové zloženie ako moderné odrody pšeníc (Ciclitira et al., 2005b).

Ovos predstavuje riziková a často diskutovanú potravinu. Štúdie o konzumácii ovsenej múky u pacientov s celiakiou nie sú jednotné a táto otázka je predmetom prebiehajúceho výskumu. Podľa Nariadenia EÚ ovos v potravinách určených pre celiatikov musí byť špeciálne vypestovaný, pripravený a/alebo spracovaný tak, aby sa predišlo kontaminácii pšenicom, ražou, jačmeňom alebo ich kríženými variantmi, pričom obsah gluténu nesmie

presiahnuť 20 mg.kg⁻¹ (Ciclitira et al., 2005b; Čierna, 2009; Ú.v.E.Ú. L16, 2009).

Bezlepková diéta nepredstavuje len vylúčenie pekárskeho výrobkov z uvedených obilnín, ale treba si uvedomiť, že múka sa pridáva aj do veľkého množstva ďalších potravín. Zložky obilnín sú súčasťou mnohých hotových pokrmov, polotovarov aj prísad; lepok môžu obsahovať potravinové prísady, emulgátory a stabilizátory, ktoré sa môžu nachádzať v jogurte, kečupe, údeninách, zmrzline, sladkostiach, čokoláde a rôznych konzervovaných potravinách (Čierna, 2009; Pekárková et al., 2009).

Ako náhradu možno použiť potraviny vyrobené z kukurice, sóje, zemiakov, ryže, amarantu a iných plodín, ktoré neobsahujú lepok (Pekárková et al., 2009; Čierna, 2009; Krajčířová, 2007; Ciclitira, Moodie, 2003).

MODERNÉ PRÍSTUPY VO VÝSKUME A LIEČBE CELIAKIE

Zistenie, že črevná mikroflóra pacientov s celiakiou sa líši od zdravých jedincov, poskytuje nové možnosti v použití probiotických mikroorganizmov, ktoré sa môžu podieľať na zlepšení zdravotného stavu celiatikov rôznymi mechanizmami.

Vybrané laktobacily so špecifickými peptidázami boli použité napr. pri výrobe kváskového chleba. Výsledky štúdie preukázali, že pacienti s celiakiou tolerovali takýto chlieb lepšie v porovnaní s „klasickým“ chlebom (Ciclitira et al., 2005b).

Rozsiahle možnosti v príprave bezlepkových surovín prinášajú moderné genetické metódy. Genetická manipulácia a prenos netoxických gluténových frakcií do kukurice, je jednou z možností, ako vytvoriť produkt s dobrými pekárskejšími vlastnosťami (Ciclitira et al., 2005b; Schuppan et al., 2009).

Jednou z navrhovaných možností liečby celiakie bola inhibícia tkanivovej transglutaminázy. Ukázalo sa však, že tento enzým má rôznorodú biologickú úlohu a aj lokálna inhibícia môže spôsobiť nepredvídané nežiaduce účinky. V súčasnosti sa skúmajú najmä možnosti obnovy imunologickej tolerancie na glutén, čo by bolo ideálnym liekom pre liečbu celiakie. Podanie antigénu s cieľom desenzitizovať auto-reakciu voči vlastným antigénom v pokusoch na zvieratách preukázalo ochranu pred vznikom niektorých autoimunitných ochorení. Pochopenie mechanizmov, ktoré vedú k strate tolerancie na glutén, umožní identifikovať jednotlivcov s potenciálnym rozvojom tohto ochorenia a v budúcnosti vyvinúť imunomodulačné postupy na liečbu celiakie šité na mieru (Dewar et al., 2004; Schuppan et al., 2009).

LITERATÚRA

- Accomando, S., Cataldo, F. 2004 The global village of celiac disease. *Digestive Liver Disease*, vol. 36, no. 7, p. 492-498. <http://dx.doi.org/10.1016/j.dld.2004.01.026> PMID: 15285531
- Briani, C., Samaroo, D., Alaadini, A. 2008. Celiac disease: From gluten to autoimmunity. *Autoimmunity Reviews*, vol. 7, no. 8, p. 644-650. <http://dx.doi.org/10.1016/j.autrev.2008.05.006> PMID: 18589004
- Catassi, C. 2004. Association of Celiac Disease and Gastrointestinal (GI) Lymphomas and Other GI Cancers. *NIH Consensus development conference on celiac disease*. Bethesda: National Institutes of Health, p. 69-72.

- Ciclitira, P. J., Johnson, M. W., Dewar, D. H., Ellis, H. J. 2005a. The pathogenesis of coeliac disease. *Molecular Aspects of Medicine*, vol. 26, no. 6, p. 421-458. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mam.2005.05.001>
- Ciclitira, P. J., Ellis, H. J., Lundin, K. E. A. 2005b. Gluten-free diet - what is toxic? *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, vol. 19, no. 3, p. 359-371. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bpg.2005.01.003>
- Ciclitira, P. J., Moodie, S. J. 2003. Coeliac disease. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, vol. 17, no. 2, p. 181-195. [http://dx.doi.org/10.1016/S1521-6918\(02\)00147-6](http://dx.doi.org/10.1016/S1521-6918(02)00147-6)
- Čierna, I. 2009. Liečba celiakie – celoživotná bezlepková diéta. *Detský lekár*, vol. 16, no. 1, p. 8-10.
- Dewar, D., Pereira, S. P., Ciclitira, P. J. 2004. The pathogenesis of coeliac disease. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 36, p. 17-24. [http://dx.doi.org/10.1016/S1357-2725\(03\)00239-5](http://dx.doi.org/10.1016/S1357-2725(03)00239-5)
- Heap, G. A., van Heel, D. A. 2009. Genetics and pathogenesis of coeliac disease. *Seminars in Immunology*, vol. 21, no. 6, p. 346-354. <http://dx.doi.org/10.1016/j.smim.2009.04.001>
- Hill, D. I. 2004. What Are the Sensitivity and Specificity of Serological Tests for Celiac Disease? Do Sensitivity and Specificity Vary in Different Populations? *NIH Consensus development conference on celiac disease*. Bethesda: National Institutes of Health, p. 27-32.
- Howdle, P. D. 2003. Celiac (Coeliac) Disease. *Encyclopedia of Food Science and Nutrition*. 2ed. Oxford: Academic Press, p. 987-994. ISBN: 978-0-12-227055-0.
- Kanerva, P., Brinck, O., Salovaara, H., Sontag-Strohm, T. 2012. Analysis of oat and buckwheat proteins by sandwich R5 ELISA. *Proceedings of the 25th Meeting. Working Group on Prolamin Analysis and Toxicity*. Freising: German Research Centre for Food Chemistry, p. 43-46. ISBN 078-3-938896-54-9. Available on the web: http://www.wgpat.com.ar/proceeding_25th.pdf
- Karell, K., Louka, A. S., Moodie, S. J. et al. 2003. HLA Types in Celiac Disease Patients not Carrying the *DQA1*05-DQB1*02* (DQ2) Heterodimer: Results From the European Genetics Cluster on Celiac Disease. *Human Immunology*, vol. 64, no. 4, p. 469-477. [http://dx.doi.org/10.1016/S0198-8859\(03\)00027-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0198-8859(03)00027-2)
- Koning, F., Schuppan, D., Cerf-Bensussan, N., Sollid, L. M. 2005. Pathomechanisms in celiac disease. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, vol. 19, no. 3, p. 373-387. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bpg.2005.02.003>
- Krajčirová, M. 2007. Celiakálna choroba v primárnej starostlivosti. *Pediatrica pre prax*, vol. 8, no. 5, p. 268-269.
- Lukáš, M. 2009. Autoimunitné podmienené zánety střevního traktu. *Gastroenterológia pre prax*, vol. 8, no. 3, p. 159-165.
- Makovický, P., Rimárová, K. 2011. Význam a možnosti skríningu v diagnostike celiakie. *Vnitřní lékařství*, vol. 57, no. 2, p. 183-187.
- Nariadenie komisie (ES) č. 41/2009 z 20. januára 2009 o zložení a označovaní potravín vhodných pre osoby trpiace neznášanlivosťou gluténu. *Úradný vestník Európskej únie*, L16/3-L16/5, 21.1.2009. Available on the web: <http://eur-lex.europa.eu>
- Páv, I. 2006. Celiakia v ambulatnej praxi. *Via practica*, vol. 3, no. 1, p. 22-24.
- Pekárková, B., Pekárek, B., Kabátová, J. 2009. Racionálna diagnostika a liečba celiakie. Štandardný diagnostický a terapeutický postup. 46. *Metodický list racionálnej farmakoterapie*, vol. 13, no. 1-2, p. 1-7.
- Presutti, R. J., Cangemi, J. R., Cassidy, H. D., Hill, D. A. 2007. Celiac disease. *American Family Physician*, vol. 76, no. 12, p. 1795-1802. Available on the web: <http://www.aafp.org/afp/2007/1215/p1795.html> PMID: 18217518
- Rimárová, K. 2005. Úvod do celiakie. *Celiakia časopis všetkých celiatikov*, 1, p. 4-5.
- Samaroo, D., Dickerson, F., Kasarda, D. D. et al. 2010. Novel immune response to gluten in individuals with schizophrenia. *Schizophrenia Research*, vol. 118, no. 1-3, p. 248-255. <http://dx.doi.org/10.1016/j.schres.2009.08.009>
- Schuppan, D., Junker, Y., Barisani, D. 2009. Celiac Disease: From Pathogenesis to Novel Therapies. *Gastroenterology*, vol. 137, no. 6, p. 1912-1933. <http://dx.doi.org/10.1053/j.gastro.2009.09.008>
- Stachová, I., Bánovčin, P., Hyrdel, R. 2009. Celiakia ako autoimunitné ochorenie tráviaceho traktu. *Gastroenterológia pre prax*, vol. 8, no. 3, p. 137-146.
- Svačina, Š., Bretšnajdrová, A. 2008. Dieta pri onemocnení tráviaceho traktu. Svačina, Š. a kol.: *Klinická diétologie*. 1.vyd. Praha: Grada Publishing, p. 209-221. ISBN 978-80-247-2256-6.
- Trynka, G., Wijmenga, C., van Heel, D. A. 2010. A genetic perspective on coeliac disease. *Trends in Molecular Medicine*, vol. 16, no. 11, p. 537-550. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molmed.2010.09.003>
- van Heel, D. A., Hunt, K., Greco, L., Wijmenga, C. 2005. Genetics in coeliac disease. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, vol. 19, no. 3, p. 323-339. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bpg.2005.01.001>

Acknowledgments:

This work was part of the project funded by the Agency of the Ministry of Education, Science, Research and Sport of The Slovak Republic for EU Structural Funds entitled „Evaluation of natural substances and their choice for the prevention and treatment of lifestyle diseases“ (ITMS 26240220040).

Contact address:

Ing. Eva Hybenová, PhD., Institute of Biochemistry, Nutrition and Health Protection, Department of Nutrition and Food Assessment, Faculty of Chemical and Food Technology, Slovak University of Technology in Bratislava, Radlinského 9, 812 37 Bratislava, Slovakia, 02/59325436, E-mail: eva.hybenova@stuba.sk

Ing. Júlia Štofirová, Institute of Biochemistry, Nutrition and Health Protection, Department of Nutrition and Food Assessment, Faculty of Chemical and Food Technology, Slovak University of Technology in Bratislava, Radlinského 9, 812 37 Bratislava, Slovakia, 02/59325436, E-mail: xstofirova@stuba.sk

Ing. Anna Mikulajová, PhD., Institute of Biochemistry, Nutrition and Health Protection, Department of Nutrition and Food Assessment, Faculty of Chemical and Food Technology, Slovak University of Technology in Bratislava, Radlinského 9, 812 37 Bratislava, Slovakia, 02/59325512, E-mail: anna.mikulajova@stuba.sk

OILSEED RAPE AS FEEDSTOCK FOR BIODIESEL PRODUCTION IN RELATION TO THE ENVIRONMENT AND HUMAN HEALTH

Michal Angelovič, Zdenko Tkáč, Marek Angelovič

ABSTRACT

Oilseed rape is one of the most important crops in cultivation process. A current developmental trend in non-food rapeseed production on agricultural land shows that this new course is irreversible and is a great opportunity for agriculture. Non-food rapeseed production is focused on the production of biodiesel. Biodiesel has good environmental properties. Lower emissions are produced by the combustion of biodiesel than for diesel. In content of exhaust gas is observed a significant decrease of polycyclic aromatic hydrocarbons, particulate matter and etc. The analysis of the literary knowledge on impacts of biodiesel on exhaust emissions, on regulated emissions, shows a reduction of 10.1% for particulate matter, of 21.1% for hydrocarbons, and 11.0% for carbon monoxide with the use of B20. Nitrogen oxides (NO_x) increased by 2.0%. Biodiesel was introduced into the European market in the 1980s as B100. The use of blends with content up to 5% biodiesel has no significant impact on the emissions and their toxicity. An increased mutagenicity was observed with blends containing 20%. Nevertheless, increased mutagenic effects were observed under specific conditions. Accordingly, the problem concerning blends of diesel fuel with biodiesel (B20) should be investigated with high priority. No comprehensive risk assessment for diesel engine emissions from biodiesel and its blends is possible. In regard to a comprehensive hazard characterization it is urged to develop a panel of standardized and internationally accepted protocols which allow a reliable assessment of possible health hazards which may arise from the combustion of new fuels compared to conventional diesel fuel. These methods should be robust and should reflect the various health hazards associated with diesel engine emissions to supplement data on regulated emissions. Methods for the generation of the exhaust and sample preparation should be harmonized. There is sufficient evidence supporting a causal relationship between diesel engine emissions and acute health effects, as are childhood asthma, non-asthma respiratory symptoms, impaired lung function, total and cardiovascular mortality, and cardiovascular morbidity. Although, diesel engine emissions exposures in developed countries changed strongly during recent years, reliable animal experiments or epidemiological studies concerning the use of new fuels and technologies are almost lacking.

Keywords: oilseed rape; energy resource; biodiesel; ecological attribute; environment; human health

INTRODUCTION

Oilseed rape is a major agricultural crop. It has wide application in agriculture, food science and industry. The aim of this paper is to present an overview of current knowledge on the using of oilseed rape for biodiesel production in terms of protecting the environment and human health.

Oilseed rape as feedstock of biodiesel

Diesel engines are important in industry, agriculture and transportation because they have a simple and strong mechanical structure, a low fuel cost and a high thermal efficiency. However, diesel engines are commonly responsible for the emission of large amounts of gaseous and particulate pollutants, which adversely affect health (Geiss et al., 2010; Wu et al., 2010; Avino et al., 2011). The gaseous pollutants from diesel engines mainly comprise carbon monoxide (CO), nitrogen oxides (NO_x), sulfur oxides (SO_x) and hydrocarbons (HC) (Colbeck et al., 2011; Ma et al., 2011). Nitrogen oxides are usually generated in combustion at high temperature, and its concentration increases with the engine combustion efficiency (Yanowitz et al., 2000). Most sulfur oxides from diesel engines are produced by the high-temperature

oxidation of the sulfates in petroleum diesel. After they are emitted into the atmosphere, nitrogen oxides and sulfur oxides become nitrates, sulfuric acid or sulfate aerosols that detrimentally affect the environment. With the Kyoto Protocol, developed countries are to reduce their greenhouse gas emissions in the period 2008-2012 by roughly 5% compared to the 1990 level. Diesel engine emissions are related to quality characteristics of diesel fuels. The main pollutants emitted from diesel engines is unburned hydrocarbons, solid particles, aldehydes, polycyclic aromatic hydrocarbons, carbon monoxide, nitrogen oxides (Burnete et al., 2008). The depletion of world petroleum reserves and the increased environmental concerns have stimulated the search for alternative sources for petroleum - based fuel, including diesel fuels. Because of the closer properties, biodiesel fuel (fatty acid methyl ester) from vegetable oil is considered as the best candidate for diesel fuel substitute in diesel engines.

Production capacity in the 27 countries that comprise the European Union in 2008 was estimated by the European Biodiesel Board to be 4.8 billion gallons per year versus 1.4 billion gallons per year in 2006. The continued drive for energy sustainability and independence among energy-consuming countries, governmental mandates for alternative fuel usage and increased global production

capacity contribute to the need for alternative sources of biodiesel fuel). By 2012, one billion gallons of biomass-based diesel is required under the renewable fuels standard (Kotrba, 2008).

Lastly, the high prices of commodity vegetable oils and animal fats have made exploration of economical alternative non-food feedstock an important research topic. Fossil fuel resources are decreasing daily. As a renewable energy, biodiesel has been receiving increasing attention because of the relevance it gains from the rising petroleum price and its environmental advantages. This review highlights some of the perspectives for the biodiesel industry to thrive as an alternative fuel, while discussing

opportunities and challenges of biodiesel. Lin et al. (2011) paid attention to overview about developments of biodiesel in past and present, especially for the different feedstock's and the conversion technologies of biodiesel industry. More specifically, an overview is given on possible environmental and social impacts associated with biodiesel production, such as food security, land change and water source. Further emphasis is given on the need for government's incentives and public awareness for the use and benefits of biodiesel, while promoting policies that will not only endorse the industry, but also promote effective land management.

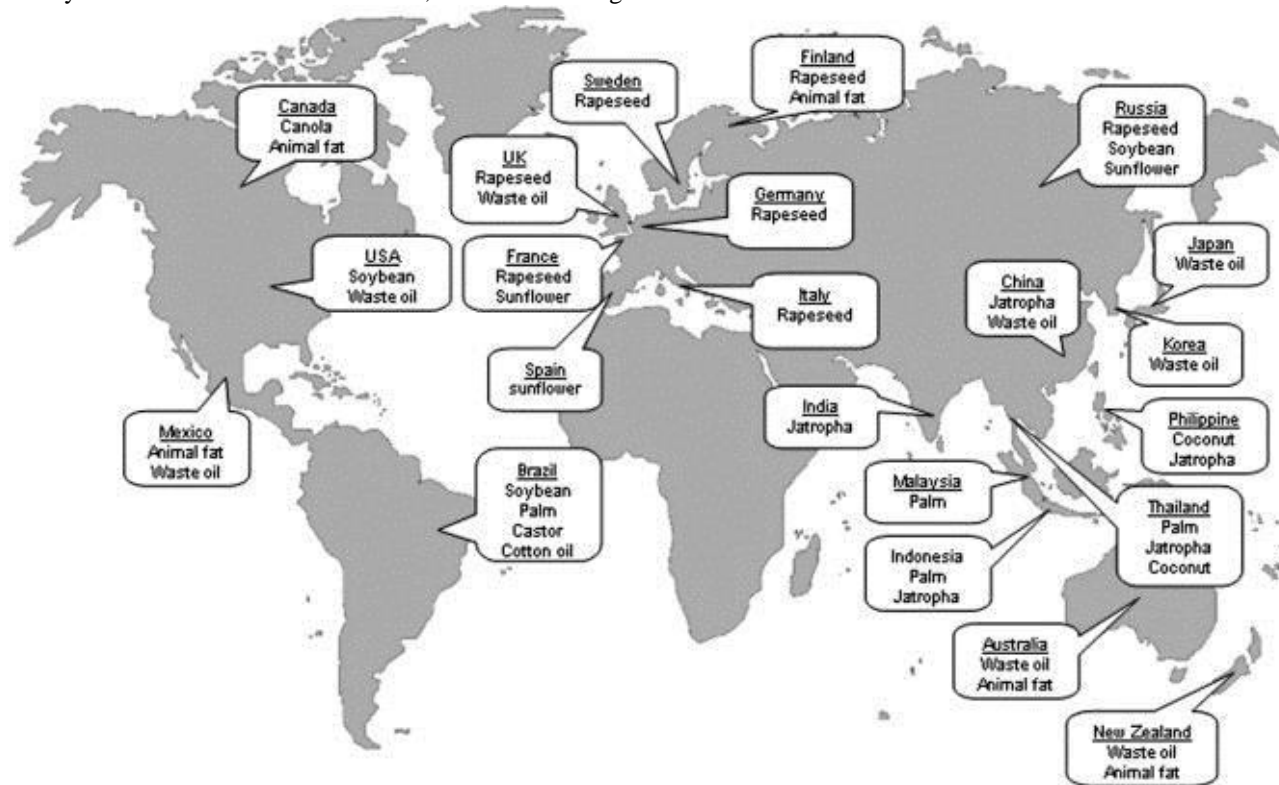


Figure 2 Fatty acid methyl esters around the world (Lin et al., 2011)

Table 1 Tests of diesel-engines fuelled with biodiesel in literature, rapeseed oil is use

Species of biodiesels Diesel engines	Types of tested	Measurements	References
Rapeseed-oil-based biodiesel	A heavy duty diesel engine (Model: EURO 2 IVECO 8360.46R) (Six cylinders; Turbocharged with indirect fuel injection; 130 mm bore×112 mm stroke; Max output power: 158 kW)	Total PM; Soluble organic fraction (SOF); Gaseous pollutants (NOx and CO); PAH/nitro-PAH; Carbonyl compounds and light aromatics; Mutagenicity assays; Brake-specific fuel consumption (BSFC)	(Turrio-Baldassarri et al., 2004)
Five typical biodiesels (cottonseed oil, soybean oil, rapeseed oil, palm oil and waste cooking oil)	A Euro-III diesel engine (Model: Cummins ISBe6) (Six cylinders; Turbocharged with indirect fuel injection; Rated output power: 136 kW/2500 rpm)	Total PM; Dry soot; Gaseous pollutants (NOx, CO, and HC)	(Wu et al., 2009)

Transesterification reaction of rapeseed oil in supercritical methanol was investigated without using any catalyst. An experiment has been carried out in the batch-type reaction vessel preheated at 350 and 400 °C and at a

pressure of 45-65 MPa, and with a molar ratio of 1:42 of the rapeseed oil to methanol. It was consequently demonstrated that, in a preheating temperature of 350 °C, 240 s of supercritical treatment of methanol was sufficient

to convert the rapeseed oil to methyl esters and that, although the prepared methyl esters were basically the same as those of the common method with a basic catalyst, the yield of methyl esters by the former was found to be higher than that by the latter. In addition, it was found that this new supercritical methanol process requires the shorter reaction time and simpler purification procedure because of the unused catalyst (Saka a Kusdiana, 2009). In the work, the transesterification reaction of rapeseed oil with methanol, in the presence of alkaline catalysts, either homogeneous (NaOH) or heterogeneous (Mg MCM-41, Mg-Al Hydrotalcite, and K⁺ impregnated zirconia), using low frequency ultrasonication (24 kHz) and mechanical stirring (600 rpm) for the production of biodiesel fuel was studied. Selection of heterogeneous catalysts was based on a combination of their porosity and surface basicity. Their characterization was carried out using X-ray diffraction, nitrogen adsorption-desorption porosimetry and scanning electron microscopy with energy dispersive spectroscopy. The activities of the catalysts were related to their basic strength. Mg-Al hydrotalcite showed particularly the highest activity with conversion reaching 97%). The activity of ZrO₂ in the transesterification reaction increased as the catalyst was doped with more potassium cations, becoming thus more basic. Use of ultrasonication significantly accelerated the transesterification reaction compared to the use of mechanical stirring (5 h vs. 24 h). Given the differences in experimental design, it can be concluded that the homogeneous catalyst accelerated significantly the transesterification reaction, as compared to all heterogeneous catalysts, using both mechanical stirring (15 min vs. 24 h) and ultrasonication (10 min vs. 5 h). However, the use of homogeneous base catalysts requires neutralization and separation from the reaction mixture leading to a series of environmental problems related to the use of high amounts of solvents and energy. Heterogeneous solid base catalysts can be easily separated from the reaction mixture by simple filtration, they are easily regenerated and bear a less corrosive nature, leading to safer, cheaper and more environment-friendly operations (Georgogianni et al., 2009). The purpose of this work was to examine a heterogeneous catalyst, in particular calcium compounds, to produce methyl esters of rapeseed oil. This research showed that the transesterification of rapeseed oil by methyl alcohol can be catalysed effectively by basic alkaline-earth metal compounds: calcium oxide, calcium methoxide and barium hydroxide. Calcium catalysts, due to their weak solubility in the reaction medium, are less active than sodium hydroxide. However, calcium catalysts are cheaper and lead to decreases in the number of technological stages and the amount of unwanted waste products. It was found that the transesterification reaction rate can be enhanced by ultrasound as well as by introducing an appropriate reagent into a reactor to promote methanol solubility in the rapeseed oil. Tetrahydrofuran was used as additive to accelerate the transesterification process (Gryglewicz, S. 1999). Methyl esters of fatty acids are characterized by excellent properties as diesel engine fuels. They have proper viscosity and boiling point and a high cetane number. Methyl esters added to a hydrocarbon fuel reduce the emission of noxious combustion products to the atmosphere (Chang et al., 1996). Transesterification can

be catalyzed by both acids and bases (Koskikallio, 1969) and even enzymatically (Briand et al., 1991). The use of bases is not associated with intensive corrosion of the equipment. The general mechanism of the methanolysis of esters is given in Fig. 1.

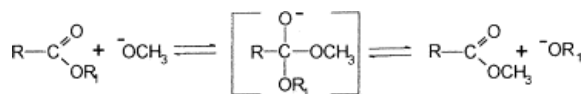


Figure 1 Mechanism of base catalysed alcoholysis of esters (Gryglewicz, 1999)

The biodiesel (fatty acid methyl esters, FAME) was prepared by transesterification of the mixed oil (soybean oil and rapeseed oil) with sodium hydroxide (NaOH) as catalyst. The effects of mole ratio of methanol to oil, reaction temperature, catalyst amount and reaction time on the yield were studied. In order to decrease the operational temperature, a co-solvent (hexane) was added into the reactants and the conversion efficiency of the reaction was improved. The optimal reaction conditions were obtained by this experiment: methanol/oil mole ratio 5.0:1, reaction temperature 55 °C, catalyst amount 0.8 wt.% and reaction time 2.0 h. Under the optimum conditions, a 94% yield of methyl esters was reached ~94%. The structure of the biodiesel was characterized by FT-IR spectroscopy. The sulfur content of biodiesel was determined by Inductively Coupled Plasma emission spectrometer (ICP), and the satisfied result was obtained. The properties of obtained biodiesel from mixed oil are close to commercial diesel fuel and is rated as a realistic fuel as an alternative to diesel (Qiu et al., 2011).

Biodiesel has similar properties as mineral oil-derived fuel and can be used in pure form (B100) or blended with common diesel fuel at any concentration (Knothe et al., 2010). Biodiesel use has been increased in the USA mainly as a 20% blend with diesel fuel (B20), since the “Energy Policy Act” came into force. ASTM D6751-08 details the US specifications for biodiesel blends. Biodiesel was introduced into the European market in the 1988s as B100. In 2003, fuel suppliers were committed to include increasing amounts of renewable fuels in all transport fuel sold in the EU by the Directive 2003/30/EC. At the same time, the European Committee for Standardization (CEN) released the standard EN 14214 for biodiesel which was updated in 2008. Currently, diesel fuel is supplemented with 7% biodiesel (B7) in Germany. Determination of the emissions profile is a key step in assessing the acceptability of a biodiesel fuel produced from a new feedstock (Michael et al., 2001). Other authors took a similar position in their studies on research of emissions in this field, too (Jablonický et al., 2010; Müllerová et al., 2011).

Biodiesel and human health

Diesel engine emissions are highly complex mixtures. They consist of a wide range of organic and inorganic compounds which are distributed among the gaseous and particulate phases. Public health concern has arisen about diesel engine emissions for these reasons (HEI, 1995). Most particles of diesel engine emissions are nanoscaled making them readily respirable. These particles have hundreds of chemicals adsorbed onto their surfaces,

including many known or suspected mutagens and carcinogens, e.g. polycyclic hydrocarbons (PAH) and nitrated polycyclic hydrocarbons (nPAH). The gaseous phase contains many irritants and toxic chemicals, e.g. aldehydes. Also nitrogen oxides (NO_x), which are irritants and ozone precursors, are among the combustion products in the gaseous phase. Health Effects Institute has published a series of special reports and research papers - most of the reviews written by interdisciplinary expert panels - dealing with health effects of diesel engine emissions (HEI, 1999, 2010). According to these reviews, there is sufficient evidence supporting a causal relationship between diesel engine emissions and acute health effects, namely the exacerbation of asthma. The experts also found a suggestive evidence of a causal relationship with chronic health effects like childhood asthma, non-asthma respiratory symptoms, impaired lung function, total and cardiovascular mortality, and cardiovascular morbidity.

Also in 2002, US-EPA released a Draft Technical Report on impacts of biodiesel on exhaust emissions (EPA, 2002). The analysis mainly comprised data on regulated emissions, showing a reduction of 10.1% for particulate matter (PM), of 21.1% for hydrocarbons (HC), and 11.0% for carbon monoxide (CO) with the use of B20. Nitrogen oxides (NO_x) increased by 2.0%. In addition, 11 "air toxics" were evaluated, including mainly small carbonyls and aromatics which are associated with the gaseous phase of the emissions. A small reduction of these compounds was calculated overall. McCormick (2007) included more recent data in a short review. He found the evaluation of U. S. Environmental Protection Agency confirmed and added some studies providing results of biological assays showing a reduced mutagenicity.

Health risks from diesel engine emissions were assessed for inhabitants (Morris et al., 2003). The alteration of health risk by use of B20 was calculated based on "Unit Risk Factors" of the following six exhaust components: benzene, 1,3-butadiene, acetaldehyde, formaldehyde, standard diesel particles and B20 diesel particles. According to the authors these compounds contribute to 90% of the health risk, which is caused by air pollution in evaluated region and heavy-duty vehicles ought to contribute with 53% to the entire particulate matter emissions of all trucks in this region. B20 would therefore reduce particulate matter emissions by about 5%. According to a calculation of Lindhjem and Pollack (2000), the use of B20 should lead to a reduction of emitted particle mass by 9% and consequently to a reduction of particulate matter toxicity by 5%. Based on these assumptions, Morris et al. (2003) estimated that B20 would lead to 2% less deaths if 50% and to 5% less deaths when all of the heavy-duty vehicles were run on B20. The authors of this assessment made several assumptions which cumulate to a considerable uncertainty. Besides the notion that the procedure used in this study is not uniformly accepted and the unit risk factors are already estimates, it is not known if these six compounds really contribute to 90% of the health risk which is associated to air pollution in evaluated region. In addition, unexpected effects occur when biodiesel in certain amounts is added to common diesel fuel (blending). Krahl et al. (2008) observed an increase of the mutagenic potency when combusting blends showing the maximum using B20. This

effect occurred when biodiesel was mixed with different petroleum-derived fuels and was reproduced using three separate engines.

In several critical reviews of the literature on health effects of diesel engine emissions, Hesterberg and coworkers highlighted weaknesses and shortcomings of the studies on which Health Effects Institute and Environmental Protection Agency conclusions on diesel engine emissions were based (Bunn et al., 2004; Hesterberg et al., 2005, 2006, 2009, 2010). Regarding the epidemiological studies concerning the lung cancer risk the lack of contemporaneous measurements of diesel engine emissions exposures, uncertainties concerning exposure history, and inadequate consideration of confounding exposures such as gasoline exhaust and cigarette smoke were criticized (Bunn et al., 2004). Additionally the lacking dose response relationship was pronounced with regard to the observation that underground miners experiencing the highest exposures to diesel engine emissions did not show elevations in lung cancer (Hesterberg et al., 2006). Moreover, animal studies showed lung tumors only in rats but not in mice or Syrian hamsters, and in rats only under "lung overload" conditions (Hesterberg et al., 2005). According to clinical and exposure studies showing lung inflammatory effects and thrombogenic and ischemic effects of inhaled diesel engine emissions in humans it was remarked that unrealistically high diesel engine emissions concentrations from older-model diesel engines were used (Hesterberg et al., 2009). Additionally, till now no mechanism of action was established allowing a reliable prediction of adverse health effects of diesel engine emissions and it is uncertain which diesel engine emissions constituents underlie the observed responses. There are necessary the studies for using realistic environmental and occupational exposures from new technology diesel engines including low sulfur fuels and exhaust after-treatment (Hesterberg et al., 2010). In fact, during recent years strong efforts were made to minimize diesel engine emissions-related health hazards. This includes improved combustion, exhaust after-treatment, the reduction of sulfur and aromatics, and the introduction of reformulated fuels. Therefore the contemporaneous risk assessment may be based on over-aged data. Hesterberg and coworkers suggest to differentiate "New Technology Diesel Exhaust" (defined as diesel engine emissions) from post-2006 and traditional diesel exhaust (Hesterberg et al., 2011, 2012; McClellan et al., 2012). Although, diesel engine emissions exposures in developed countries changed strongly during recent years, reliable animal experiments or epidemiological studies concerning the use of new fuels and technologies are almost lacking.

CONCLUSION

The knowledge of the feedstock oilseed rape we can summarize the following points, including perspectives its use in the EU:

- a) Oilseed rape is suitable feedstock for biodiesel production.
- b) Biodiesel of rapeseed oil includes energy security reasons, environmental concerns, foreign exchange savings, and socioeconomic issues related to the rural sector.

c) Biofuels have to meet certain criteria to count against the 10% goal. In the Renewable Energy Directive, specific sustainability requirements are laid out. These include minimum greenhouse gas emissions reductions, land use and environmental criteria as well as economic and social criteria, and adherence to International Labor Organization conventions. The European Commission is reportedly working on updating the default values on greenhouse gas emissions in the Renewable Energy Directive.

d) European Commission, Renewable Energy Directive (Indirect land use is not included) for rape seed biodiesel typical greenhouse gas emissions savings 45% (typical implies an estimate of the representative greenhouse gas emission saving for a particular biofuel production pathway) and default greenhouse gas emissions savings 38% (default implies a value derived from a typical value by the application of predetermined factors and that may, in circumstances specified in this Directive, be used in place of an actual value.

e) Rapeseed oil forms the major feedstock in the EU and accounts for two thirds of total input in biodiesel production.

f) After years of rapid use increases, EU-27 biodiesel consumption seems to have reached a plateau. In 2011, Germany, France, Spain, Italy, and the UK were the largest biodiesel consumers in the EU. For 2012, EU consumption is forecast to marginally increase by 0.4%, driven almost exclusively by MS mandates and to a lesser extent by tax incentives. Increases are projected, most prominently, in Poland, France, and the Benelux. For 2013, EU-27 consumption is forecast to marginally decline as projected increase in Romania, Poland, and Ireland are more than offset by an expected reduction in Germany.

g) There are necessary the studies for using realistic environmental and occupational exposures from new technology diesel engines including low sulfur fuels and exhaust after-treatment.

h) In fact, during recent years strong efforts were made to minimize diesel engine emissions-related health hazards.

i) Although, diesel engine emissions exposures in developed countries changed strongly during recent years, reliable animal experiments or epidemio-logical studies concerning the use of new fuels and technologies are almost lacking.

j) The use of blends with content up to 5% biodiesel has no significant impact on the emissions and their toxicity. An increased mutagenicity was observed with blends containing 20%. Nevertheless, increased mutagenic effects were observed under specific conditions. Accordingly, the problem concerning blends of diesel fuel with biodiesel (B20) should be investigated with high priority.

k) No comprehensive risk assessment for diesel engine emissions from biodiesel and its blends is possible. In regard to a comprehensive hazard characterization it is urged to develop a panel of standardized and internationally accepted protocols which allow a reliable assessment of possible health hazards which may arise from the combustion of new fuels compared to conventional diesel fuel. These methods should be robust and should reflect the various health hazards associated with diesel engine emissions to supplement data on regulated emissions. Methods for the generation of the exhaust and sample preparation should be harmonized.

REFERENCES

- Avino, P., Casciardi, S., Fanizza, C., Manigrasso, M. 2011. Deep Investigation of Ultrafine Particles in Urban Air. *Aerosol Air Qual. Res.*, vol. 11, p. 654-663.
- Briand, D., Dubreucq, E., Galzy, P. 1991. Enzymatic fatty esters synthesis in aqueous medium with lipase from *Candida Parapsilosis* (Ashford) langeron and talice, *Biotechnology Lett.*, vol. 16, no. 8, p. 813-818. <http://dx.doi.org/10.1007/BF00133959>
- Bunn, W. B., Hesterberg, T. W., Valberg, P. A., Slavin, T. J., Hart, G., Lapin, C. A. 2004. A reevaluation of the literature regarding the health assessment of diesel engine exhaust. *Inhalation Toxicology*, vol. 16, no. 14, p. 889-900. <http://dx.doi.org/10.1080/08958370490883783> PMID: 15764476
- Burnete, N. et al. 2008. *Diesel engines and biofuels for urban transport* (in Romanian). Publishing House Mediamira. 1054 p. ISBN 978-973-713-217-8.
- Chang, D. Y. Z., Van Gerpen, J. H., Lee, I., Johnson, L. A., Hammond, E. G., Marley, S. J. 1996. Fuel properties and emissions of soybean oil esters as diesel fuel. *JAOCs.*, vol. 73, no. 11, p. 1549-1555. <http://dx.doi.org/10.1007/BF02523523>
- Colbeck, I., Nasir, Z. A., Ahmad, S., Ali, Z. 2011. Exposure to PM10, PM2.5, PM1 and Carbon Monoxide on Roads in Lahore, Pakistan. *Aerosol Air Qual. Res.*, vol. 11, p. 689-695.
- Directive 2003/30/EC of the European Parliament and of the Council of 8 May 2003 on the promotion of the use of biofuels or other renewable fuels for transport.
- EPA - U.S. Environmental Protection Agency. 2002b. A Comprehensive analysis of biodiesel impacts on exhaust emissions. Draft Technical Report. EPA420-P-02-001, October 2002. Available at internet: <http://www.epa.gov/otaq/models/analysis/biodslp02001.pdf>
- European Norm EN 14214/Biodiesel.
- Geiss, O., Barrero-Moreno, J., Tirendi, S., Kotzias, D. 2010. Exposure to Particulate Matter in Vehicle Cabins of Private Cars. *Aerosol Air Qual Res.*, vol. 10, p. 581-588.
- Georgogianni, K. G., Katsoulidis, A. K., Pomonis, P. J., Manos, G., Kontominas, M. G. 2009. Transesterification of rapeseed oil for the production of biodiesel using homogeneous and heterogeneous catalysis. *Fuel Proc. Technol.*, vol. 90, no. 7-8, p.1016-1022. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fuproc.2009.03.002>
- Gryglewicz, S. 1999. Rapeseed oil methyl esters preparation using heterogeneous catalysts. *Bioresource Technology*, vol. 70, no. 3, p. 249-253. [http://dx.doi.org/10.1016/S0960-8524\(99\)00042-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0960-8524(99)00042-5)
- HEI. A special report of the institute's diesel working group. USA: Cambridge; 1995. Health Effects Institute: Diesel exhaust: A critical analysis of emissions, exposure, and health effects. Available at internet: <http://www.healtheffects.org/Pubs/diesum.htm>
- HEI. A special report of the institute's diesel epidemiology expert panel. USA: Cambridge; 1999. Health Effects Institute: Diesel exhaust and lung cancer: Epidemiology and quantitative risk assessment.
- HEI. Special Report 17. Boston, MA: Health Effects Institute; 2010. Health Effects Institute Panel on the Health Effects of traffic-related Air Pollution. Traffic-related air pollution: A critical review of the literature on emissions, exposure, and health effects.
- Hesterberg, T. W., Bunn, W. B., McClellan, R. O., Hart, G. A., Lapin, C. A. 2005. Carcinogenicity studies of diesel engine exhausts in laboratory animals: a review of past studies and a discussion of future research needs. *Crit. Rev.*

- Toxicol.*, vol. 35, no. 5, p. 379-411. <http://dx.doi.org/10.1080/10408440590950542> PMID: 16097136
- Hesterberg, T. W., Bunn, W. B., Chase, G. R., Valberg, P. A., Slavin, T. J., Lapin, C. A., et al. 2006. A critical assessment of studies on the carcinogenic potential of diesel exhaust. *Crit. Rev. Toxicol.*, vol. 36, no. 9, p. 727-776. <http://dx.doi.org/10.1080/10408440600908821> PMID: 17050083
- Hesterberg, T. W., Long, C. M., Bunn, W. B., Sax, S. N., Lapin, C. A., Valberg, P. A. 2009. Non-cancer health effects of diesel exhaust: a critical assessment of recent human and animal toxicological literature. *Crit. Rev. Toxicol.*, vol. 39, no. 3, p. 195-227. <http://dx.doi.org/10.1080/10408440802220603> PMID: 19280432
- Hesterberg, T. W., Long, C. M., Lapin, C. A., Hamade, A. K., Valberg, P. A. 2010. Diesel exhaust particulate (DEP) and nanoparticle exposures: what do DEP human clinical studies tell us about potential human health hazards of nanoparticles? *Inhal. Toxicol.*, vol. 22, no. 8, p. 679-694. <http://dx.doi.org/10.3109/08958371003758823> PMID: 20462394
- Hesterberg, T. W., Long, C. M., Sax, S. N., Lapin, C. A., McClellan, R. O., Bunn, W. B. et al. 2011. Particulate matter in new technology diesel exhaust (NTDE) is quantitatively and qualitatively very different from that found in traditional diesel exhaust (TDE). *J. Air. Waste Manag. Assoc.*, vol. 61, no. 9, p. 894-913. <http://dx.doi.org/10.1080/10473289.2011.599277> PMID: 22010375
- Hesterberg, T. W., Long, C. M., Bunn, W. B., Lapin, C. A., McClellan, R. O., Valberg, P. A. 2012. Health effects research and regulation of diesel exhaust: an historical overview focused on lung cancer risk. *Inhal. Toxicol.*, vol. 24, no. S1, p.1-45. <http://dx.doi.org/10.3109/08958378.2012.691913> PMID: 22663144
- Jablonický, J., Žikla, A., Tkáč, Z., Boďo, T., and Bohát, M. 2010. Alternative fuels and their impact on the operating parameters of ci engine. *Savremena poljoprivredna tehnika*, vol. 36, no. 3, p. 285-294.
- Knothe, G., Krahl, J., van Gerpen, J. 2010. The Biodiesel Handbook. USA : AOCS Press 2710. p. 61802-6996. ISBN 978-1-893997-62-2.
- Koskikallio, J. 1969. Alcoholysis, acidolysis and redistribution of esters. Saul Patai: *The Chemistry of Carboxylic Acids and Esters*. New York : Wiley.
- Kotrba, R. 2008. Transition period, Biodiesel. *Mag.*, vol. 52, no. 57, p. 512.
- Krahl, J., Munack, A., Ruschel, Y., Schröder, O., Büniger, J. 2008. Exhaust gas emissions and mutagenic effects of diesel fuel, biodiesel and biodiesel blends. *SAE Technical Paper 2008*, p. 2501-2508.
- Lin, L., Cunshan, Z., Vittayapadung, S., Xiangqian, S., Mingdong, D. 2011. Opportunities and challenges for biodiesel fuel. *Applied Energy*, vol. 88, no. 4, p. 1020-1031. <http://dx.doi.org/10.1016/j.apenergy.2010.09.029>
- Lindhjem, C., Pollack, A. 2000. "Impact of biodiesel fuels on air quality - Task 1 report: Incorporate biodiesel data into vehicle emission databases for modeling". Prepared for National Renewal Energy Laboratory, Golden, CO.
- Ma, C. M., Hong, G. B., Chang, C. T. 2011. Influence of Traffic Flow Patterns on Air Quality inside the Longest Tunnel in Asia. *Aerosol Air Qual. Res.*, vol. 11, p. 44-50.
- McClellan, R. O., Hesterberg, T. W., Wall, J. C. Evaluation of carcinogenic hazard of diesel engine exhaust needs to consider revolutionary changes in diesel technology. *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, vol. 63, no. 2, p. 225-258. <http://dx.doi.org/10.1016/j.yrtph.2012.04.005> PMID: 22561182
- McCormick, R. L., Westbrook, S. R. 2010. Storage stability of biodiesel and biodiesel blends. *Energy Fuels*, vol. 24, no. 1, p. 690-698. <http://dx.doi.org/10.1021/ef900878u>
- Michael, J., Haas, M. J., Scott, K. M., Alleman, T. L. and McCormick, R., L. 2001. Engine Performance of Biodiesel Fuel Prepared from Soybean Soapstock: A High Quality Renewable Fuel Produced from a Waste Feedstock. *Energy and Fuels*, 2001, vol. 15, no. 5, p. 1207-1212. <http://dx.doi.org/10.1021/ef010051x>
- Morris, R. E., Pollack, A. K., Mansell, G. E., Lindhjem, C., Jia, Y., Wilson, G. 2003. Impact of biodiesel fuels on air quality and human health. Summary report, National Renewable Energy Laboratory. ENVIRON International Corporation Novato
- Müllerová, D., Jablonický, J., Hujo, L., Kosiba, J. 2011. Detection of emission in combustion engines' exhaust. *Machines, technologies, materials*, vol. 5, no. 4, p. 53-56.
- Qiu, F., Yihuai, Li., Y., Yang, D., Li, X., Sun, P. 2011. Biodiesel production from mixed soybean oil and rapeseed oil. *Applied Energy*, vol., 88, no. 6, p. 2050-2055. <http://dx.doi.org/10.1016/j.apenergy.2010.12.070>
- Saka, S., Kusdiana, D. 2001. Biodiesel fuel from rapeseed oil as prepared in supercritical methanol. *Fuel*, vol. 80, no. 2, p. 225-231. [http://dx.doi.org/10.1016/S0016-2361\(00\)00083-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0016-2361(00)00083-1)
- Turrio-Baldassarri, L., Battistelli, C. L., Conti, L., Crebelli, R., Berardis, B. D., Iamiceli, A. L., Gambino, M., Iannaccone, S. 2004. Emission Comparison of Urban Bus Engine Fueled with Diesel Oil and 'Biodiesel' Blend. *Sci. Total Environ.*, vol. 327, p. 147-162. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2003.10.033> PMID: 15172578
- Wu, F., Wang, J., Chen, W., Shual, S. 2009. A Study on Emission Performance of a Diesel Engine Fueled with Five Typical Methyl Ester Biodiesels. *Atmos. Environ.*, vol. 43, p. 1481-1485. <http://dx.doi.org/10.1016/j.atmosenv.2008.12.007>
- Wu, S. P., Wang, X. H., Yan, J. M., Zhang, M. M., Hong, H. S. 2010. Diurnal Variations of Particle-bound PAHs at a Traffic Site in Xiamen, China. *Aerosol Air Qual. Res.*, vol. 10, pp. 497-506.
- Yanowitz, J., McCormick R. L., Graboski M. S. 2000. In-use Emission from Heavy-duty Diesel Vehicles. *Environ. Sci. Technol.*, vol. 34, no. 5, p. 729-740. <http://dx.doi.org/10.1021/es990903w>

Acknowledgments

This paper was prepared with the support of a grant project of the Ministry of Education of the Slovak Republic VEGA 1/0857/12 Reducing of unfavourable impacts of agricultural and transport machinery on the environment.

Contact address:

Michal Angelovič, Slovak University of Agriculture, Faculty of Engineering, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovakia, E-mail: michal.angelovic@gmail.com

Zdenko Tkač, Slovak University of Agriculture, Faculty of Engineering, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovakia, E-mail: zdenko.tkac@uniag.sk

Marek Angelovič, Slovak University of Agriculture, Faculty of Engineering, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovakia, E-mail: marek.angelovic@uniag.sk

SENSORY EVALUATION OF BROILER MEAT AFTER ADDITION SLOVAK BEE POLLEN IN THEIR FEED MIXTURE

Peter Haščík, Ibrahim Omer Elamin Elimam, Jozef Garlík, Marek Bobko, Miroslav Kročko

ABSTRACT

The study aimed to investigate the impact of Slovak bee pollen as supplement dietary in different doses (1000, 1500, 2500, 3500 and 4500 mg.kg⁻¹ of feed mixture) on the sensory quality of broiler chickens. The study was carried out 180 one day-old chickens, which were divided into 6 groups (n=30). From each halves were separately sensory evaluated part from a thigh and breast. Samples of heat treated meat were evaluated by a 6 member semi-trained panel of laboratory co-workers. Panelists evaluate aroma, juiciness, taste and tenderness on 5 point hedonic scale where 1 (the worst) and 5 (the best) were the extremes of each characteristic. The values of aroma, taste, juiciness and tenderness in breast and thigh muscles were higher in experimental groups in compare to control. The bee pollen has a positive impact on the taste, aroma, juiciness and tenderness of chickens thighs and breasts. Although the value of shear force in chicken thigh was significantly highest in E2 samples, addition of bee pollen to the diet for broiler chickens had no significant negative effect on the thigh tenderness. Baking losses, as the second technological parameter, were also not significantly affected by nutrition with bee pollen supplement.

Keywords: broiler; bee pollen; sensory; smell; juiciness; shear force

INTRODUCTION

Poultry meat is suitable for the production of so-called functional foods for human consumption, which is currently at the heart of agricultural and food research (Berri et al., 2001; FAO 2002; Strakova et al., 2003; Gueye, 2009). Sensory evaluation is analysis of product attributes perceived by the human senses of smell, taste, touch, sight, also tenderness. Volunteers (consumers or users of the product) are used to assess the sensory characteristics and providing a response. There are two general types of sensory methods. Laboratory/analytical methods use a small number of panellists to determine if a difference exists between samples and the nature, direction, and intensity of the difference. Consumer affective methods involve a larger number of panellists and include tests that measure how consumers feel or react to the product to provide a measure of preference, acceptance, and like/dislike (Brenda et al., 2000). Colour, appearance, and texture are important factors that consumers will consider before making a decision to buy poultry (Liu et al., 2004). Quality assessment parameters of chicken meat, including sensory flavour and texture profiles, cooking loss/cooking yield and shear force, have been widely used in scientific studies to validate preprocessing treatments and postharvest processing technologies for chicken meat (Swatland et al., 1999; Lyon et al., 2001). Also, shear force (Warner-Bratzler, WB) data are more strongly related to sensory panel tenderness rating using the slice shear force (SSF) protocol developed for broiler tenderness classification (Shackelford et al., 1999), rather than the traditional WBSF protocol (Shackelford et al., 1999). Bee pollen is a bee product which constitute a part of dietary supplements rich in proteins (Le Blancet al., 2009; Baltrusaityte et al.,

2007). The bees are among the beneficial insects that produce mainly the honey, and also many by-products such as royal jelly, beeswax, propolis, pollen and bee stings. Bee pollen represents a rich source of proteins (25 %), essential amino acids, oils (6 %), containing more than 51 % of polyunsaturated fatty acids of which 39 % represents linolenic acid, 20 % represent palmitic acid and 13 % linoleic acid. Bee pollen also represents a source of more than 12 vitamins, 28 minerals, 11 enzymes or co-enzymes, 11 carbohydrates (35 - 61 %; mainly glucose, fructose and sucrose), free amino acids, flavonoids, carotenoids and phytosterols (Crane, 1990; Abreu, 1992; Xu et al., 2009). It is well known great amount and variability of bee pollen phenolic constituents (total phenols, phenyl-propanoids, flavonoids and anthocyanins) and its antioxidant activity (Broadhurst, 1999; Leja et al., 2007; Saric et al., 2009). The objective of present study was to evaluate the effect of bee pollen as a dietary supplement added to broilers in different doses to the sensory quality of broiler chicken meat.

MATERIAL AND METHODS

Animals and diets

The experiment was implemented in the test poultry station of Slovak University of Agriculture in Nitra. The experiment included 180 one day-old chicken hybrid combination Ross 308, which were divided into 6 groups (n=30): control (I) and experimental groups (E1, E2, E3, E4 and E5). Experimental broiler chickens were fed during 42 days of age by *ad libitum* system with feed mixture HYD-01 (until the age of 21st days) and HYD-02 (from 22nd to 42nd days of age). Feed mixtures HYD-01 and HYD-02 were produced without any antibiotic

preparations and coccidiostats. Nutritional value (Table 1) of feed mixture was the same in each group during the whole experiment. However, the diet of broiler chickens in experimental groups were supplemented by natural bee pollen at doses of 100 mg.kg⁻¹ (E1); 1500 mg.kg⁻¹ (E2); 2500 mg.kg⁻¹ (E3); 3500 mg.kg⁻¹ (E4) and 4500 mg.kg⁻¹ (E5).

Sample analysis

One hundred and twenty broiler chickens were submitted to sensory analysis at the end of fattening period (42nd days). From each group were chosen 20 pieces of chickens halves and submitted to heat treatment at 200 °C for 60 minutes. From each halves were separately sensory evaluated part from a thigh and breast. Samples of heat treated meat were evaluated by a 6 member semi-trained panel of laboratory co-workers. Panelists evaluate aroma, juiciness, taste and

tenderness on 5 point hedonic scale where 1 (the worst) and 5 (the best) were the extremes of each characteristic. Shear force is defined as the force, which is necessary to slit the meat sample of 1 cm² cross section across the fibres of the meat. Shear force (Warner-Bratzler WB) of culinary prepared meat (breast and thigh meat) were determined by the Warner-Bratzler apparatus (Chatillon Brandt, USA) according the method of Goodson et al. (2002).

Statistical analysis

The results of the experiment were evaluated with statistical program Statgraphics Plus Version 5.1 (AV Trading Umex, Dresden, Germany). The variables-statistical values (arithmetic mean, standard deviation) were calculated and to determine the significant differences among groups was used variance analyses with subsequent Scheffé's test.

Table 1 Composition of the broiler feed mixture

Ingredients (%)	Starter (1 to 21 days of age)	Grower (22 to 42 days of age)
Wheat	35.00	35.00
Maize	35.00	40.00
Soybean meal (48 % N)	21.30	18.70
Fish meal (71 % N)	3.80	2.00
Dried blood	1.25	1.25
Ground limestone	1.00	1.05
Monocalcium phosphate	1.00	0.70
Fodder salt	0.10	0.15
Sodium bicarbonate	0.15	0.20
Lysine	0.05	0.07
Methionine	0.15	0.22
Palm kernel oil Bergafat	0.70	0.16
¹ Premix Euromix BR 0,5 % ¹	0.50	0.50
Analyzed composition (g.kg⁻¹)		
Crude protein	210.76	190.42
Fibre	30.19	29.93
Ash	24.24	19.94
Ca	8.16	7.28
P	6.76	5.71
Mg	1.41	1.36
Linoleic acid	13.51	14.19
MEN (MJ.kg⁻¹) by calculation	12.02	12.03

¹ active substances per kilogram of premix: vitamin A 2 500 000 IU; vitamin E 50 000 mg; vitamin D3 800 000 IU; niacin 12 000 mg; d-pantothenic acid 3 000 mg; riboflavin 1 800 mg; pyridoxine 1 200 mg; thiamine 600 mg; menadione 800 mg; ascorbic acid 50 000 mg; folic acid 400 mg; biotin 40 mg; vitamin B12 10.0 mg; choline 100 000 mg; betaine 50 000 mg; Mn 20 000 mg; Zn 16 000 mg; Fe 14 000 mg; Cu 2 400 mg; Co 80 mg; I 200 mg; Se 50 mg

RESULTS AND DISCUSSION

The current study was conducted to investigate the influence of bee pollen as supplement dietary in different levels (1000, 1500, 2500, 3500 and 4500 mg.kg⁻¹) on broiler's Ross 308 meat sensory. Values of the aroma, taste, juiciness and tenderness of breast muscle were higher in the experimental groups in compare to the control group (table 2). The significant differences (P ≤ 0.05) were found in aroma of breast muscle between control group and experimental groups E2 and E3. Also significant differences were found in breast muscle aroma between E1 and E2. Values of juiciness chickens breast

were significantly (P ≤ 0.05) lower in control meat samples than in samples of E2. Sensory values of thighs muscles from control group were lower than in experimental groups (table 3). Significantly (P ≤ 0.05) lower values of chickens thigh aroma were found in control samples compare to samples of E4 group. Also significant differences (P ≤ 0.05) of chickens thigh aroma were found between samples of E3 – E4 and E3 – E5. Taste, juiciness and tenderness were significantly higher in samples of E5 groups compare to control. Significantly higher values of taste were found in E1 and E5 samples of thigh. Significantly (P ≤ 0.05) better tenderness was found

in thighs of E4 and E5 samples. Also Haščík et al., 2011; 2013 found comparable results of sensory evaluation carried on chickens breast and thigh muscles, however with propolis addition to broiler chickens nutrition. (Haščík et al., 2011; 2013). The improvement of sensory parameters found in experimental groups were probably due to content of the predominant minerals in bee pollen such as phosphorus, potassium, calcium and magnesium also phenolic compounds and total flavonoids (Carpes et al., 2009; Almeida et al., 2005). Although, these minerals play a functional role in sugar and lipids metabolism, maintaining the osmotic pressure, regulating the acid-base balance, maintaining cell permeability and the neuromuscular activity (Georgetown et al., 2007), they can contribute to the sensory qualities of broiler's meat. Bee pollen increases the water content in tissues of broiler's meat (Haščík et al., 2013; Čuboň et al., 2013) and from that reason it can lead to improvement of the sensory parameters as juiciness and tenderness. In the parameter of shear force ($\text{kg}\cdot\text{cm}^{-2}$) were statistical differences found only in the thigh muscles of chickens (table 4). Values of shear force determined in breast muscles were not significantly higher in E2 and E4 samples. Significantly lower values of shear force were found in samples of E1 and E3 in compare to control. Also among experimental samples were found significant differences. Samples of

chicken breast from E2 were characterized by significantly highest values of shear force. This results are in accordance with Bobko et al., (2012). These authors found significant influence of different plant supplements applied in chicken nutrition on the sensory quality of their meat. On the other hand Haščík et al. (2012) reported more firmness consistency of chicken meat after propolis supplement addition to broilers. The baking losses (%) were not significantly higher in the control group than in experimental groups. This findings are in agreement with Bobko et al., 2012 and Haščík et al., 2012 who were focused in different plant supplements and propolis evaluation for improving the sensory quality of chickens meat.

CONCLUSION

The bee pollen has a positive impact on the taste, aroma, juiciness and tenderness of chickens thighs and breasts. Although the value of shear force in chicken thigh was significantly highest in E2 samples, addition of bee pollen to the diet for broiler chickens had no significant negative effect on the thigh tenderness. Baking losses, as the second technological parameter, were also not significantly affected by nutrition with bee pollen supplement.

Table 2 broiler breast muscles sensory evaluation

	Control	E1	E2	E3	E4	E5
Aroma	4.18±0.16 ^a	4.20±0.18 ^a	4.39±0.16 ^b	4.36±0.19 ^b	4.21±0.22 ^{abc}	4.24±0.11 ^{abc}
Taste	4.03±0.19	4.04±0.25	4.18±0.19	4.16±0.12	4.09±0.14	4.12±0.10
juiciness	3.75±0.22 ^a	3.79±0.28 ^{ab}	4.06±0.33 ^b	3.83±0.19 ^{ab}	3.84±0.24 ^{ab}	3.95±0.23 ^{ab}
tenderness	3.83±0.31	3.92±0.27	4.06±0.36	3.95±0.26	4.0±0.28	4.12±0.20

Table 3 broiler thigh muscles sensory evaluation

	Control	E1	E2	E3	E4	E5
Aroma	4.10±0.30 ^{ac}	4.18±0.20 ^{abc}	4.22±0.25 ^{abc}	4.14±0.17 ^a	4.33±0.11 ^b	4.31±0.12 ^{bc}
Taste	3.93±0.20 ^a	4.15±0.25 ^b	4.05±0.15 ^{ab}	4.05±0.20 ^{ab}	4.12±0.17 ^{ab}	4.17±0.15 ^b
juiciness	4.10±0.15 ^a	4.17±0.29 ^{ab}	4.23±0.16 ^{ab}	4.13±0.11 ^{ab}	4.22±0.23 ^{ab}	4.27±0.13 ^b
tenderness	4.18±0.69 ^a	4.24±0.16 ^{ab}	4.30±0.14 ^{ab}	4.28±0.11 ^{ab}	4.36±0.15 ^b	4.33±0.14 ^b

Table 4 Quality indicators for meat of fattening chickens Ross 308

		Control	E1	E2	E3	E4	E5
Shear force [$\text{kg}\cdot\text{cm}^{-2}$]	Breast	1.91±0.7	1.86±0.7	2.01±0.1	1.88±0.7	2.06±0.8	1.64±0.4
	Thigh	1.31±0.3 ^{ac}	0.94±0.3 ^b	1.52±0.4 ^a	0.98±0.3 ^b	1.13±0.2 ^{abc}	1.17±0.4 ^{bc}
Baking losses [%]	Broiler carcass	30.29±1.4	28.25±1.9	29.85±1.5	29.21±1.2	29.69±1.3	30.27±0.5

Conflict of Interest Statement:

This manuscript has no conflicts of interest. This research received no specific grant from any funding agency in the public, commercial or not-for-profit sectors. All authors contributed equally to this work.

REFERENCES

- Abreu, M. 1992. Food use of pollen in relation to human nutrition. *Alimentaria*, vol. 235, p. 45-46.
- Almeida-Muradian, L. B., Pamplona, L. C., Coimbra, S., Barth, O. M. 2005. Chemical composition and botanical evaluation of dried bee pollen pellets. *Journal of Food Composition and Analysis*, vol. 18, no. 1, p. 105-111. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfca.2003.10.008>
- Baltrusaityte, V., Venscutonis, P. R., Ceksteryte, V. 2007. Radical scavenging activity of different floral origin honey and beebread phenolic extracts. *Food Chemistry*, vol.101, no.

2. p. 502-514. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.02.007>

Berri, C., Wacreinier, N., Millet, N., Le Bihan-Duval, E. 2001. Effect of selection for improved body composition on muscle and meat characteristics of broilers from experimental and commercial lines. *Poultry Science*, vol. 80, p. 833-838. [PMid: 11469641](http://dx.doi.org/10.1016/j.psc.2001.05.007)

Bobko, M., Haščík, P., Bobková, A., Kňazovická, V., Tóth, T., Angelovičová, M., 2012. Influence of different plant supplements applied in chicken nutrition on quality of their meat. *Journal of microbiology biotechnology and food sciences*. no. 1, p. 1020-1031.

Lyon, B. G., Lyon, C. E., 2000. *Meat quality: sensory and instrumental evaluations*. Poultry Meat Processing. Print ISBN: 978-0-8493-0120-9, eBook ISBN: 978-1-4200-4217-7.

Broadhurst, C. L. 1999. Bee products: medicine from the hive. *Nutrition Science*, vol. 4, p. 366-368.

Carpes, S. T., DeAlencar, S. M., Masson, M. L. 2009. Chemical composition and free radical scavenging activity of Apismellifera bee pollen from Southern Brazil. *Journal Food Technology*, vol. 12, no. 3, p. 220-229. <http://dx.doi.org/10.4260/BJFT2009800900016>

Crane, E., 1990. *Bees and Beekeeping. Science, Practice and World Resources*. Comstock Pub. Ithaca, NY, USA, 593-594.

Čuboň, J., Haščík, P., Elimam, I. O., Garlík, J., Kačániová, M., Mohammed, H. A. 2013. The influence of bee pollen on the meat chemical composition for broiler's Rosas' 308 muscles. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, vol. 2, p. 1128-1137.

FAO. 2002. *World agriculture towards 2015/2030*. Rome, Italy.

Ciurescu, G. Anca, G., Nagy, C. I. 2007. Effects of the mineral premix based on phosphate fritte with chelated bioelements on broiler performance. *Archiva Zootechnica* vol. 10, p. 26-32.

Goodson, K. J., Morgan, W. W., Reagan, J. O. 2002. Beef customer satisfaction: Factors affecting consumer evaluation of clod steaks. *Journal Animal Science*, vol. 80, p. 401-408. [PMid: 11881929](http://dx.doi.org/10.1093/jas/80.3.401)

Gueye, E. F. 2009. The role of networks in information dissemination to family poultry farmers. *World's Poultry Science Journal*, vol. 65, p. 115-123.

Haščík, P., Elimam, I. E., Garlík, J., Kačániová, M., Bobko, M., Kňazovická, V., Vavrišinová, K., Arpášová, H., Bučko, O. 2013. The effect of bee pollen as dietary Supplement on meat chemical Composition for broiler Ross 308. *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis*, vol. 12, p. 71-76. <http://dx.doi.org/10.11118/actaun201361010071>

Haščík, P., Garlík, J., Kňazovická, V., Kačániová, M., Elimam, I., Omer, E., Pochop, J., Benzová, E., Vavrišinová, K. 2012. Technological properties of chickens meat after application of propolis extract in their diet. *Journal fo microbiology, biotechnology and food sciences*, vol. 1, p. 1295-1304.

LeBlanc, B. W., Davis O. K., Boue S., DeLucca A., Debby T. 2009. Antioxidativ activity of sonorant desert bee pollen. *Food Chemistry*, vol. 115, p. 1299-1305. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.01.055>

Leja, M., Mareczek, A., Wyzgolik, G., Klepacz-Baniak, J., Czekonska, K. 2007. Antioxidative properties of bee pollen in selected plant species. *Food Chemistry*, vol. 100, p. 237-240. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.09.047>

Liu, Y., Lyon, B. G., Windham, W. R., Lyon, C. E., Savage, E. M. 2004. Prediction of physical, color, and sensory

characteristics of broiler breasts by visible/near infrared reflectance spectroscopy. *Poultry Science*, vol. 83, no. 8, p. 1467-1474. [PMid: 153390271](http://dx.doi.org/10.1016/j.psc.2004.05.027)

Lyon, B. G., Windham, W. R., Lyon, C. E., Barton, F. E. 2001. Sensory characteristics and nearinfrared spectroscopy of broiler breast meat from various chill-storage regimes. *Journal Food Qual*, vol. 24, 2001, p. 435-52. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1745-4557.2001.tb00621.x>

Saric, A., Balog, T., Sobocanec, S., Kusic, B., Sverko, V., Rusak, G., Likic, S., Bubalo, D., Pinto, B., Reali, D., Marott, T. 2009. Antioxidant effects of flavonoid from Croatian *Cystus incanus* L. rich bee pollen. *Food and Chemical Toxicology*, vol. 47, p. 547-554. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2008.12.007> [PMid: 19124059](http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2008.12.007)

Shackelford, S. D., Wheeler, T. L., Koohmaraie, M. 1999. Evaluation of slice shear force as an objective method of assessing beef longissimus tenderness. *Journal of Animal Sciences*, vol. 77, p. 2693-2699. [PMid: 10521029](http://dx.doi.org/10.1093/jas/77.12.2693)

Strakova, E., Večerek, V., Suchy, P., Vitula, F. 2003. *The comparison of carcass quality in fattening chicks and pheasants*. Současnost a perspektivy chovu drůbeže. Praha, p. 83-87, ISBN 80-213-1037-5.

Swatland, H. J. 1999. On-line assessment of poultry meat quality. Richardson RI, Mead GC, editor. *Poultry meat science*. New York: CABI Publishing. p 315-345.

Xu, X., Sun, L., Dong, J., Zhang, H. 2009. Breaking the cells of rape bee pollen and consecutive extraction of functional oil with supercritical carbon oxide. *Innovative food science & emerging technologies*, vol. 10, p. 42-46. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ifset.2008.08.004>

Acknowledgments:

This work was supported by the VEGA grants from the Ministry of Education Science, Research and Sport of the Slovak Republic, grants No. 1/0897/11 and 1/0129/13.

Contact address:

Doc. Ing. Peter Haščík, Slovak University of Agriculture in Nitra, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Department of Evaluation and Processing of Animal Products, Trieda A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, E-mail: peter.hascik@uniag.sk

Msc. Ibrahim Omer Eliman Elimam, Slovak University of Agriculture in Nitra, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Department of Evaluation and Processing of Animal Products, Trieda A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, E-mail: alkrshola@yahoo.com

Ing. Jozef Garlík, Slovak University of Agriculture in Nitra, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Department of Evaluation and Processing of Animal Products, Trieda A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, E-mail: jozef.garlik@gmail.com

Ing. Marek Bobko, PhD., Slovak University of Agriculture in Nitra, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Department of Evaluation and Processing of Animal Products, Trieda A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, E-mail: marek.bobko@uniag.sk

Ing. Miroslav Kročko, PhD., Slovak University of Agriculture in Nitra, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Department of Evaluation and Processing of Animal Products, Trieda A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, E-mail: miro.krocko@uniag.sk

THE EFFECT OF IODINE IN PRODUCTION OF BROILER CHICKENS AND SELECTED QUALITY INDICATORS OF BREAST MUSCLES

Mária Angelovičová, Marieta Semivanová

ABSTRACT

Due to the different effects on the human health it is necessary to avoid excessive or insufficient consumption of iodine. Iodine deficiency weakens the synthesis of the thyroid hormones, causes hypothyroidism and can lead to various developmental and functional disturbances known as the disorders from iodine deficiency. The latest literary knowledge about the use of iodine in the broiler chickens identifies the concentration of iodine 5 mg per kg feed as safe for a given group of the animals. Working Group on Additives and Products or Substances used in Animal Feed of Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed notes that the maximum authorized limit of iodine in the feed of the broiler chickens 10 mg per kg does not represent a health risk. The aim of our research was an observation and assessment of the effect of feed mixtures with iodized oil on production quality of the line hybrid chickens Cobb 500 and selected indicators of breast muscle. For comparison, a control group consists of the chickens, which were fed the feed mixtures without iodized oil. Dietary iodine in the form of potassium iodide was applied to sunflower oil. The mixture was heated at 70 °C with continuous stirring until dissolution of potassium iodide. The content of iodine in iodine supplement was 0.04 mg per g per 1 kg of feed mixture of starter, growth and the finisher was used 5 g of iodine supplement. The oil mixture was mixed into kibbled grain of corn and carefully homogenized with other components of the feed mixtures. To meet the aim of research, we realized an experiment, where body weight of the chickens was observed at the end of the experiment, the breast muscle weight and chemical analysis was made from selected indicators of breast muscle. A body weight of broiler chickens at the beginning and the end of the experiment and a breast muscle weight were observed by weighing on the Kern ECB 20K20 type scale with an accuracy of $d = 0,1$ g. The breast muscles were analyzed for selected indicators according to the methodology for analytical laboratories (2009). The data were evaluated according to the basic statistical characteristics.

The differences in the values of indicators between groups were evaluated by the SAS system program by t-test. The broiler chickens that were included in the experiment were first grade with a balanced average weight of 42 g. Statistical evaluation of body weight of the broiler chickens at the beginning of the experiment results in not significant difference between the control group and the experimental group – iodine supplement. Average body weight of the chickens was 2183.06 g at end of experiment in the group with the addition of iodine compared to 2145.21 g in control group with a statistically not significant difference ($P > 0.05$). Average weight of the breast muscles was 426.83 g in the group with the addition of iodine compared to 412.11 g in control group with a statistically not significant difference ($P > 0.05$). Average dry matter content in the breast muscles was 26.13 g per 100 g in the group with the addition of iodine compared to 26.25 g per 100 g in control group with a statistically not significant difference ($P > 0.05$). Average protein contents in breast muscles was 23.63 g per 100 g in the group with the addition of iodine compared to 23.31 g per 100 g in control group with a statistically not significant difference ($P > 0.05$). Average fat contents in breast muscles was 1.05 g per 100 g in the group with the addition of iodine compared to 0.88 g per 100 g in control group with a statistically significant difference ($P < 0.05$). The results of the experiment indicated some tendency of the positive effect of the feed mixtures with iodized oil on the quality of production of broiler chickens. Based on results, further research was recommended.

Keywords: iodine; broiler chicken; body weight; breast muscle; protein; fat

ÚVOD

Asi dve tretiny jódu sa nachádza v štítnej žľaze, ktorá má hlavnú funkciu v kontrole metabolizmu (hlavne vo využití tukov). Tento minerálny prvok môže ovplyvňovať duševnú aktivitu, taktiež reguluje využitie prijatej a vydananej energie. Nachádza sa vo všetkých produktoch, ktoré

pochádzajú z mora, hlavne ryby, kôrovce a chaluhy. Jeho nedostatok môže mať za následok zníženie duševnú i fyzickú výkonnosť. Udržiava dobrý zdravotní stav kože, nechtov, zubov a vlasov. Potrebná denná dávka pre tehotné ženy je stanovená na 150 – 200 μg (Mindell, 2000; Grofová, 2007). Jód sa v prírode vyskytuje ako jodid

alebo jodičnan. Jeho minerálna forma sa nachádza vo vyvretých horninách a pôdach, najčastejšie ako nečistoty v liadku alebo v prírodných vodách. Jód je základný stopový prvok pre ľudí, ale aj pre zvieratá. Jód sa nachádza v hormónoch štítnej žľazy, t. j. tyroxíne (T_4 ; 3:5,3':5'-tetra-jodotyronín) a trijódtyroníne (T_3 ; 3:5,3'-trijódtyronín) a pôsobí ako prekursor jódtyronínov. Oba hormóny regulujú bunkovú aktivitu (metabolizmus energie) a rast, prenášajú nervové stimuly a zohrávajú dôležitú úlohu v rozvoji mozgu (EFSA, 2013). Organizmus dospelého človeka obsahuje približne 10 – 20 mg jódu, z čoho zhruba 8–15 mg je využité štítnou žľazou k syntéze tyreoidálnych hormónov (FAO/WHO, 2004; Deutsche Gesellschaft für Ernährung, 2011).

Jód prijatý potravou býva vo forme jodidu alebo jeho organických zlúčenín, ktoré sú absorbované až po redukcii na jodid. Jodid sa vstrebáva rýchlo a takmer všetok v tenkom čreve. Potom vstupuje do krvného obehu, kde je pomocou enzymatického systému vychytávaný denne približne 60 μg jodidu štítnou žľazou, ktorou je potom využitý k syntéze hormónov. Prebytočné množstvo jodidu je vylúčené z tela močom a približne 15 – 20 μg stolicou. Stanovenie koncentrácie jódu v moči je považované za dobrý ukazovateľ jeho príjmu (Velíšek, 2002; FAO/WHO, 2004; Zamrazil, 2004; Deutsche Gesellschaft für Ernährung, 2011). Hlavným zdrojom príjmu jódu pre populáciu je potrava. Typicky najvyšší obsah jódu vykazujú morské ryby (priemerne 660 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$), kôrovce, morské riasy (1 – 2 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) a morská soľ (vyšší než 1,4 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$). V priemyslových krajinách sú však najvýznamnejšími zdrojmi jódu mlieko a mliečne výrobky (priemerne 27 – 47 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$), vajcia (priemerne 93 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$) a výrobky z obilnín (priemerne 47 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$). Ďalšími zdrojmi jódu sú sladkovodné ryby (priemerne 30 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$), všetky druhy mäsa (priemerne 50 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$), struková zelenina (priemerne 30 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$) a ďalšie druhy zeleniny (priemerne 29 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$). Najmenej jódu sa nachádza v ovocí (priemerne 18 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$) (WHO, 2009; Ryšavá, 2010). Obsah jódu v potravinách závisí od oblasti, koncentrácie jódu v pôde, ročného obdobia a od úpravy potravín pri príprave pokrmov (druh kulinárskej úpravy, použitie soli obohatenej jódom atď.). Obsah jódu v potravinách živočíšneho pôvodu závisí od hladiny jódu v krmivách, prípadne od suplementácie krmív jódovými prídavnými látkami, resp. použitia veterinárnych farmaceutík obsahujúcich jód (Ryšavá, 2001; Velíšek, 2002). Nedostatok jódu ovplyvňuje celú populáciu vo všetkých obdobiach života, od vnútro maternicového vývoja až do staroby (FAO/WHO, 2004). Nadbytok jódu primárne spôsobuje hypertyreózu a môže byť príčinou autoimúnnej tyreoiditídy hlavne u populácie s nedostatkom jódu alebo hypertyreózy, hlavne u ľudí a matiek, ktorí už trpia problémami štítnej žľazy, resp. aj ich plodu. Sekundárne vplyvy zahŕňajú zmeny v úrovni a metabolizme steroidných hormónov a Amenorea-u (EFSA, 2013). Z dôvodu odlišných účinkov na zdravie je nevyhnutné sa vyhnúť prebytočnej ako aj nedostatočnej spotrebe jódu. Nedostatok jódu oslabuje syntézu hormónov štítnej žľazy, čo rezultuje v hypotyreózu a môže viesť k rôznym vývojovým a funkčným poruchám nazývaných ako „poruchy z nedostatku jódu“ („IDD – Iodine Deficiency Disorders“) (Hetzel, 1983; De Benoist et al., 2004). IDD môže postihnúť organizmus vo všetkých

obdobiach ľudského života; ľudský plod (aborcia, endemický kreténizmus), novorodenec (endemická mentálna retardácia), dieťa a adolescent (struma, retardovaný telesný vývoj) a dospelý (hypotyreóza, samovoľná hypertyreóza v starobe) (Hetzel, 1983; Stanbury et al., 1998; Laurberg et al., 2000). Nemecká; Rakúska a Švajčiarska Spoločnosť pre Výživu („D-A-CH - German-, Austrian- and Swiss Nutrition Society“) odporúča 180 – 200 μg jódu ako denný príjem jódu pre dospelých a 500 μg jódu za deň ako hornú tolerovanú hranicu jódu (D-A-CH, 2008). Pracovná skupina pre aditíva a výrobky alebo látky používané v krmivách pre zvieratá („FEEDAP – Panel of Additives and Products or Substances used in Animal Feed“) stanovil, že odporúčanú dávku jódu pre dospelých (180 μg jódu za deň) je možné zabezpečiť konzumáciou 9 g jodizovanej soli (EFSA, 2013). Vedecký výbor Európskej komisie pre potraviny („SCF – The Scientific Committee on Food“) stanovil maximálnu hranicu príjmu jódu 600 μg jódu.deň⁻¹ pre dospelých na základe biochemických zmien v úrovni tyreotropínu („TSH – Thyroid-Stimulating Hormone“) a na základe odozvy tyreotropínu na tyreoliberin („TRH – Thyrotropin-Releasing Hormone“). Táto horná hranica je považovaná za prijateľnú aj pre tehotné a dojčiace ženy. Horná hranica pre batolata 200 μg jódu.deň⁻¹ bola Vedeckým výborom Európskej komisie pre potraviny odvodená (prepočítaná) od hornej hranice dospelých na základe telesnej hmotnosti (European Commission, 2002). Za nedostatočný prísun jódu je u bežnej populácie považovaný príjem nižší než 150 μg denne a u tehotných a dojčiacich žien menej než 250 μg denne (Ryšavá, 2010). Hlavnou príčinou jódového deficitu u ľudí je nízka koncentrácia jódu v prostredí. Od roku 1947 je tento deficit riešený jódovou profylaxiou v podobe obohacovania jedlej kuchynskej soli. V tejto dobe sa zdal problém vyriešený. Morfológický a funkčný stav štítnej žľazy sa v populácii výrazne zlepšil a došlo ku zníženiu výskytu jej ochorení. V 2. polovici 80. rokov bol zistený rastúci počet detí a mladistvých s palpačne zistiteľnými zväčšenými štítnymi žľazami. Prijatá jódová profylaxia udržiavala morfológický a funkčný stav štítnej žľazy v normálnom stave. Táto priaznivá situácia tiež spôsobila znížený záujem o jódovú profylaxiu. Došlo ku zníženiu kvality jodácie jedlej soli, ku zhoršeniu opatrení pri jej balení a jej distribúcii. Dôsledkom bol znížený príjem jódu tak u bežnej populácie, ako i u tehotných a dojčiacich žien. Tak v 90. rokoch vznikla pri Štátnom zdravotnom ústave (SZÚ) v Prahe Medzirezortná komisia pre riešenie jódového deficitu (MKJD) (Dvořáková et al., 2007; Zamrazil, 2007; Ryšavá, 2010). Cieľom Medzinárodnej komisie pre riešenie jeho deficitu je koordinovať, riešiť a predchádzať zdravotným problémom v dôsledku jódového deficitu, ale tiež sledovať vývoj situácie, aby naopak nedošlo k nadmernému príjmu jódu z potravín. V soli bol navýšený obsah jódu na 20 – 34 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ a forma jodidu je v súčasnej dobe nahradená stabilnejším jodičnanom. Z dôvodu prevencie strát jódu je soľ balená do vrstevného obalu (Ryšavá, 2010). Program, ktorý sa realizuje už niekoľko rokov hodnotí účinky zvýšeného príjmu jódu na ľudský organizmus. Nepriaznivé účinky zahŕňujú zmeny vo funkcii štítnej žľazy a zvýšený výskyt autoimunitných tyreopatií (Zamrazil, 2007). V dôsledku zvýšeného príjmu jódu bol zaznamenaný nárast výskytu

tyreotoxikóz. Bolo zistené, že tento stav u ľudí má prechodný charakter tzn. zhruba 3 – 5 rokov. Incidencia a prevalencia tohto ochorenia sa vracia k pôvodným hodnotám. U osôb s autoimunitnou tyreoiditídou a osôb po subtotálnej tyreoidektómii, teda po operácii štítnej žľazy, sa často vyskytuje hypotyreóza, ktorá je často zapríčinená náhlym prísunom vysokých dávok jódu. Po zvýšení prísunu jódu u matiek pred alebo po pôrode bola zistená prechodná hypotyreóza u novorodencov. Zvýšená spotreba potravín bohatých na jód, napr. morských rias, je spojovaná s narušením funkcie štítnej žľazy a dáva sa do vzťahu ku zvýšenému výskytu subklinickej hypotyreózy. Na základe prieskumu zaznamenaného v štúdiu v súvislosti s realizáciou programu hodnotenia zvýšeného účinku príjmu jódu bol preukázaný zvýšený výskyt hypotyreóz vzniknutých na základe autoimunitnej tyreoiditídy a bol zistený tiež vyšší výskyt popôrodnej tyreoiditídy. Či sú autoimunitné tyreoiditídy tiež prechodným stavom, nie je zatiaľ známe (**Zamrazil, 2007; Azizi a Smyth, 2009**). Jódové zlúčeniny jodičnan vápenatý a jodid draselný sú určené pre použitie ako zdroje stopového prvku jódu pre všetky druhy a kategórie zvierat, maximálne však v celkovom objeme jódu 10 mg.kg⁻¹ kompletnej krmnej zmesi s výnimkou nosníc určených na produkciu konzumných vajec 5 mg.kg⁻¹ kompletnej krmnej zmesi. Obe zlúčeniny sú navrhnuté pre použitie do krmiva prostredníctvom premixu (**EFSA, 2013**). Jodácia krmiva je limitovaná nariadeniami Európskej únie, pričom maximálna schválená hranica jodácie krmiva brojlerov je 10 mg.kg⁻¹ krmnej zmesi (**European Commission, 2005**). Najnovšie poznatky o kurčatách určených na produkciu mäsa identifikujú, že koncentrácia jódu 5 mg.kg⁻¹ krmiva je bezpečná pre danú skupinu zvierat. Pracovná skupina pre prídavné látky a výrobky alebo látky používané v krmivách pre zvieratá („*FEEDAP – Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed*“) konštatuje, že súčasne schválená maximálna hranica jódu v krmive kurčiat určených na produkciu mäsa 10 mg.kg⁻¹ nepredstavuje riziko (**EFSA, 2013**). **Röttger et al. (2011)** uskutočnili dva experimenty s kurčatami určenými na produkciu mäsa použitím jodičnanu vápenatého a jodidu draselného. Porovnávali vplyv rôznej úrovne jódu (0; 1,0; 2,5 a 5,0 mg.kg⁻¹ krmiva). V každom experimente bolo 288 jednodňových brojlerových kurčiat rozdelených do 4 skupín (72 ks v každej skupine). Šesť kusov kurčiat z každej skupiny bolo zabitých na 35. deň ich veku a boli odobraté vzorky krvi, štítnej žľazy, pečene, prsného svalu a stehna. Nezistili žiadny škodlivý účinok jódu na funkciu alebo hmotnosť štítnej žľazy. Ich výsledky preukázali zvýšenú koncentráciu jódu vo svaloch, pečení a štítnej žľaze v závislosti od dávky jódu v krmive. Výsledky sú zhrnuté v tabuľke 1.

Baker (2004) kŕmil kurčatá určené na produkciu mäsa krmivom so sójovými semenami a dávkami jódu 0, 600, 900 a 1 200 mg.kg⁻¹ krmiva. Konštatuje, že 600 mg.kg⁻¹ (12 mg.deň⁻¹) dávka jódu vo forme KI v krmive kurčiat sa preukázala ako rast potlačujúca, v prípade, ak bol jód podávaný v krmive s nedostatkom metionínu („- Met“). Rovnaká dávka jódu v krmive s primeraním množstvom metionínu („+ Met“) sa javila iba ako marginálne potlačujúca rast (obrázok 2).

Tabuľka 1 Koncentrácia jódu v mäse a pečení pri rôznych koncentráciách jódu v krmive kurčiat určených na produkciu mäsa (µg.kg⁻¹ čerstvého mäsa) – The concentration of iodine in meat and liver at different concentrations of iodine in the feed of broiler chickens (µg per 1 kg fresh meat) (**Röttger et al., 2011**)

Potravina živočíšneho pôvodu ¹	Jód (mg.kg ⁻¹ krmiva) ⁴			
	0,5	1,0	2,5	5,0
Mäso ²	5,0	10,0	40,0	60,0
Pečeň ³	20,0	40,0	100,0	180,0

¹foodstuff animal origin, ²meat, ³liver, ⁴iodine (mg per 1 kg feed)

Po piatich až siedmych dňoch *ad libitum* kŕmenia kurčiat krmivom s dávkou jódu 900 mg.kg⁻¹ alebo vyššou (600 mg.kg⁻¹ v prípade „- Met“) sa u kurčiat objavili zvláštne symptómy. Bolo spozorované zvalenie kurčiat, niekoľko minút ostali nehybne ležať, potom sa vrátili do svojej normálnej stojacej polohy. Potlačenie rastu spôsobené dávkami jódu autor vysvetľuje dobrovoľným znížením spotreby krmiva, napriek tomu sa efektívnosť krmiva ku prírastku hmotnosti (konverzia krmiva) dávkami jódu neznižila. **Herzig et al. (2007)** skúmali hladinu jódu v prsnej a stehennej svalovine kurčiat určených na produkciu mäsa. Metódou Sandell-Kolthoffa stanovili koncentráciu jódu v 84 vzorkách prsnej a stehennej svaloviny. Priemerná koncentrácia jódu bola v prsnej svalovine 18,9 ± 6,71 µg.kg⁻¹, variačný koeficient 35,5 % a v stehennej svalovine 38,1 ± 19,79 µg.kg⁻¹, variačný koeficient 52,0 %. Koncentrácie zistené v stehennej svalovine boli štatisticky vysoko významne vyššie oproti prsnej svalovine ($P < 0,0001$). Kolísanie koncentrácií jódu vo vzorkách z jednotlivých fariem autori vyjadrili variačným rozpätím 11,4 – 24,3 µg.kg⁻¹ pri prsnej svalovine a 18,3 – 61,2 µg.kg⁻¹ pri stehennej svalovine. Zistené kolísanie hodnôt možno považovať za odraz rozdielov v saturácii fyziologických potrieb jódu u kurčiat určených na produkciu mäsa, individuálnej schopnosti zvierat využiť zdroj jódu, možného pôsobenia strumigenných látok a environmentálnych podmienok. Bola potvrdená štatistická významnosť korelačnej závislosti ($P < 0,05$) medzi priemernými hodnotami jódu v prsnej a stehennej svalovine v jednotlivých chovoch ($r = 0,91$). Podľa legislatívy sa pod pojmom hydinové mäso považujú všetky požívateľné časti tiel pochádzajúce z domácich druhov vtákov, patriacich do rodu kur, moriakov, perličiek, kačíc a husí, spĺňajúce požiadavky osobitného právneho predpisu (**Vyhláška Mze CZ č. 264, 2003**). V Európskej únii je tiež veľký záujem o hydinové mäso, spotreba hovädzieho mäsa klesá, u bravčového mäsa spotreba v ostatných rokoch stagnuje. Nárast obľuby hydinového mäsa, obzvlášť kuracieho, spôsobila hlavne jeho nízka cena a jednoduchý spôsob úpravy, ale tiež aj preto, že sa hydinové mäso radí k nízkoenergetickým druhom mäsa (**URL, 1**). Základ ľudskej spotreby mäsa tvorí hlavne svalovina kostrová - priečne pruhovaná vrátane kože, ďalej vnútornosti (srdce, pečeň, svalnatý žalúdok a u hydiny sa k vnútornostiam pridáva aj krk). Hlavnými mäsitými časťami hydiny sú prsné svaly a svaly stehna (**Březina et al., 2001**). Na produkciu kurčacieho

mäsa boli výberom použité plemená, ktoré sa vyznačujú vlastnosťami pre vysokú premenu živín z krmiva a dobré ukladanie svalovej hmoty. Dnes sa na produkciu používajú vysokoprodukčné hybridové línie, ktoré vznikli na základe šľachtiteľských programov (Pípek, 1995). Mäsové úžitkové typy sú šľachtené na vysokú mäsitosť, výťažnosť, ale aj na kvalitu mäsa, ako technologickú, tak i kulinársku (Simeonovová et al., 1999).

Cieľom práce bolo sledovanie a vyhodnotenie produkcie kurčiat *Cobb 500* a vybraných ukazovateľov kvality prsnej svaloviny vplyvom skrmovania krmných zmesí s doplnkom jóduvaného oleja.

MATERIÁL A METÓDY

Bol uskutočnený experiment *in vivo*, pričom objektom skúmania boli kurčatá určené na produkciu mäsa finálnej hybridnej línie *Cobb 500*, ktoré skrmovali krmne zmesi s jóduvaným olejom. Krmna zmes pokusnej skupiny sa od kontrolnej odlišovala tým, že obsahovala doplnok jódu, ktorým sme obohatili štandardné krmne zmesi určené pre kurčatá.

Na porovnanie bola použitá kontrolná skupina kurčiat, ktoré skrmovali krmne zmesi bez doplnku jóduvaného oleja.

Príprava doplnku jódu a jeho aplikácia do pokusných krmných zmesí

Doplnok jódu vo forme jódidu draselného bol aplikovaný do slnečnicového oleja. Zmes sa zahrieva pri teplote 70 °C za stáleho miešania do úplného rozpustenia jódidu draselného. Obsah jódu v jóduvom doplnku bol 0,04 mg.g⁻¹. Na 1 kg krmnej zmesi štartérovej, rastovej a finálnej sa použilo 5 g jóduvaného doplnku. Olejová zmes bola zmiešaná do pošrotovaného zrna kukurice a dôkladne zhomogenizovaná s ostatnými komponentmi krmných zmesí.

Kurčatá, ktoré boli zaradené do experimentu, boli prvej triedy kvality a vyrovnanej priemernej hmotnosti 42 g. Štatistickým vyhodnotením telesnej hmotnosti na začiatku experimentu nebol preukazný rozdiel medzi kontrolnou skupinou a pokusnou skupinou – doplnok jódu. Hmotnosť kurčiat na začiatku a na konci experimentu ako aj hmotnosť prsnej svaloviny boli sledované vážením na váhach typu Kern ECB 20K20 s presnosťou $d = \pm 0,1$ g.

Obsah sušiny v prsnej svalovine bol stanovený (Metodiky k analytickým laboratóriám, 2009) vysúšaním vzorky s pieskom pri teplote 105 °C do konštantnej teploty.

Bielkoviny boli stanovené na prístroji Kjeltec 8200 ako celkový obsah dusíka podľa Kjeldahlovej metódy, ktorý sa vynásobil faktorom 6,25. Bielkoviny v prsnej svalovine boli stanovené podľa **Metodiky k analytickým laboratóriám (2009)**.

Obsah tuku bol stanovený modifikovanou metódou Soxhlet-Henkel (**Metodika k analytickým laboratóriám, 2009**) pomocou extraktora Det-gras.

Štatistické vyhodnotenie výsledkov.

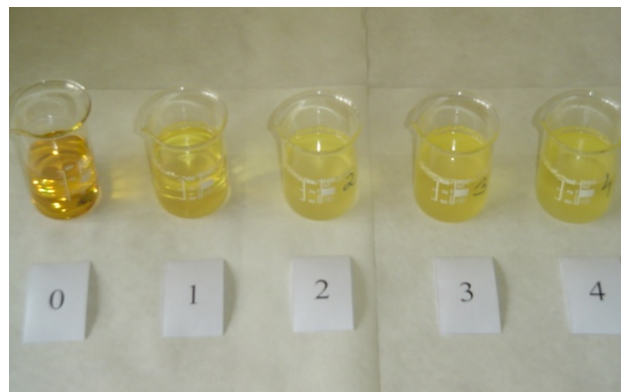
Prvotné údaje boli vyhodnotené podľa základnej štatistickej charakteristiky (\bar{x} – aritmetický priemer, s – smerodajná odchýlka, v_k – variačný koeficient). Rozdiely hodnôt ukazovateľov medzi skupinami boli vyhodnotené

v systémovej programe SAS podľa t-testu. Jednotlivé výsledky boli spracované formou grafov a tabuliek.

Tabuľka 2 Schéma experiment – Scheme of the experiment

Fáza, vek kurčiat v dňoch ⁴			
Skupina ¹	štartérová ⁵ 1 – 18	rastová ⁸ 19 – 31	finálna ¹¹ 32 – 40
Kontrolná ²	štartérová krmna zmes ⁶	rastová krmna zmes ⁹	finálna krmna zmes ¹²
Doplnok jódu ³	štartérová krmna zmes + doplnok jódu ⁷	rastová krmna zmes + doplnok jódu ¹⁰	finálna krmna zmes + doplnok jódu ¹³

¹group, ²control, ³supplement of iodine, ⁴phase, days of chicken age, ⁵starter, ⁶starter feed mixture, ⁷starter feed mixture + iodine supplement, ⁸growth, ⁹grower feed mixture, ¹⁰growth feed mixture + iodine supplement, ¹¹finisher, ¹²finisher feed mixture, ¹³finisher feed mixture + iodine supplement



Obrázok 1 Príprava jóduvaného doplnku krmných zmesí – Preparation of iodine supplement of the feed mixtures

VÝSLEDKY

Telesná hmotnosť kurčiat na konci experimentu

Priemerná hmotnosť kurčiat na konci experimentu bola v skupine s doplnkom jódu 2 183,06 g a v kontrolnej skupine 2 145,21 g. V skupine s doplnkom jódu sme zaznamenali hodnotu smerodajnej odchýlky 168,18 g a v kontrolnej skupine 234,12 g. Hodnota variačného koeficientu bola v skupine s doplnkom jódu 7,70 % a v kontrolnej skupine 10,91 %. Rozdiely v telesnej hmotnosti kurčiat na konci experimentu neboli štatisticky preukazné ($P > 0,05$).

Hmotnosť prsnej svaloviny

Priemerná hmotnosť prsnej svaloviny na konci experimentu bola v skupine s doplnkom jódu 426,83 g a v kontrolnej skupine 412,11 g. V skupine s doplnkom jódu sme zaznamenali hodnotu smerodajnej odchýlky 34,18 a v kontrolnej skupine 58,69 g. Hodnota variačného koeficientu bola v skupine s doplnkom jódu 8,01 % a v kontrolnej skupine 14,24 %. Rozdiely v hmotnosti prsnej svaloviny na konci experimentu neboli štatisticky preukazné ($P > 0,05$).

Priemerný obsah sušiny

Priemerný obsah sušiny v prsnej svalovine bol v skupine s doplnkom jódu 26,13 g.100 g⁻¹ a v kontrolnej skupine 26,25 g.100 g⁻¹. V skupine s doplnkom jódu sme zaznamenali hodnotu smerodajnej odchýlky 0,66 g.100 g⁻¹ a v kontrolnej skupine 0,49 g.100 g⁻¹. Hodnota variačného koeficientu bola v skupine s doplnkom jódu 2,53 % a v kontrolnej skupine 1,87 %. Rozdiely v obsahu sušiny v prsnej svalovine neboli štatisticky preukazné (P>0,05).

Obsah bielkovín v prsnej svalovine

Priemerný obsah bielkovín v prsnej svalovine bol v skupine s doplnkom jódu 23,63 g.100 g⁻¹ a v kontrolnej skupine 23,31 g.100 g⁻¹. V skupine s doplnkom jódu sme zaznamenali hodnotu smerodajnej odchýlky 0,41 g.100 g⁻¹ a v kontrolnej skupine 0,38 g.100 g⁻¹. Hodnota variačného koeficientu bola v skupine s doplnkom jódu 1,73 % a v kontrolnej skupine 1,63 %. Rozdiely v obsahu bielkovín v prsnej svalovine neboli štatisticky preukazné (P>0,05).

Obsah tuku v prsnej svalovine

Priemerný obsah tuku v prsnej svalovine bol v skupine s doplnkom jódu 1,05 g.100 g⁻¹ a v kontrolnej skupine 0,88 g.100 g⁻¹. V skupine s doplnkom jódu sme zaznamenali hodnotu smerodajnej odchýlky 0,13 g.100 g⁻¹ a v kontrolnej skupine 0,16 g.100 g⁻¹. Hodnota variačného koeficientu bola v skupine s doplnkom jódu 12,38 g.100 g⁻¹ a v kontrolnej skupine 18,18. Rozdiely v obsahu tuku v prsnej svalovine boli štatisticky preukazné (P<0,05).

Tabuľka 3 Štatistické vyhodnotenie telesnej hmotnosti kurčiat na konci experimentu – Statistical evaluation of broiler chickens body weight at end of the experiment

Skupina ¹	s, g	v _k , %	t-test
Kontrolná ²	234,12	10,91	2,07 ⁻
Doplnok jódu ³	168,18	7,70	

s – smerodajná odchýlka – standard deviation, v_k – variačný koeficient – coefficient of variation, 2,07⁻ – štatisticky nepreukazný rozdiel medzi skupinami – no statistically significant difference between groups ¹group, ²control group, ³suplement of iodine

Tabuľka 4 Štatistické vyhodnotenie hmotnosti prsnej svaloviny – Statistical evaluation of the breast muscle weight

Skupina ¹	s, g	v _k , %	t-test
Kontrolná ²	58,69	14,24	1,33 ⁻
Doplnok jódu ³	34,18	8,01	

s – smerodajná odchýlka – standard deviation, v_k – variačný koeficient – coefficient of variation, 1,33⁻ – štatisticky nepreukazný rozdiel medzi skupinami – no statistically significant difference between groups ¹group, ²control group, ³suplement of iodine

Tabuľka 5 Štatistické vyhodnotenie obsahu sušiny v prsnej svalovine – Statistical evaluation of the dry matter contents in the breast muscle

Skupina ¹	s, g.100 g ⁻¹	v _k , %	t-test
Kontrolná ²	0,49	1,87	0,34 ⁻
Doplnok jódu ³	0,66	2,53	

s – smerodajná odchýlka – standard deviation, v_k – variačný koeficient – coefficient of variation, 0,34⁻ – štatisticky nepreukazný rozdiel medzi skupinami – no statistically significant difference between groups ¹group, ²control group, ³suplement of iodine

Tabuľka 6 Štatistické vyhodnotenie obsahu bielkovín v prsnej svalovine – Statistical evaluation of the protein contents in the breast muscle

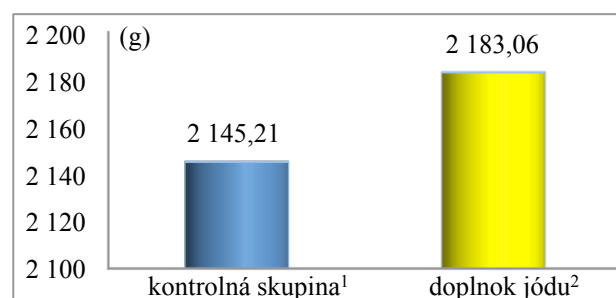
Skupina ¹	s, g.100 g ⁻¹	v _k , %	t-test
Kontrolná ²	0,38	1,63	0,49 ⁻
Doplnok jódu ³	0,41	1,73	

s – smerodajná odchýlka – standard deviation, v_k – variačný koeficient – coefficient of variation, 0,49⁻ – štatisticky nepreukazný rozdiel medzi skupinami – no statistically significant difference between groups ¹group, ²control group, ³suplement of iodine

Tabuľka 7 Štatistické vyhodnotenie obsahu tuku v prsnej svalovine – Statistical evaluation of the fat contents in the breast muscle

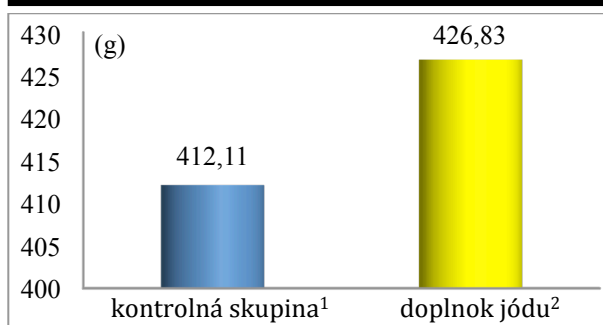
Skupina ¹	s, g.100 g ⁻¹	v _k , %	t-test
Kontrolná ²	0,16	18,18	2,47 ⁺
Doplnok jódu ³	0,13	12,38	

s – smerodajná odchýlka – standard deviation, v_k – variačný koeficient – coefficient of variation, 2,47⁺ – štatisticky nepreukazný rozdiel medzi skupinami – statistically significant difference between groups ¹group, ²control group, ³suplement of iodine

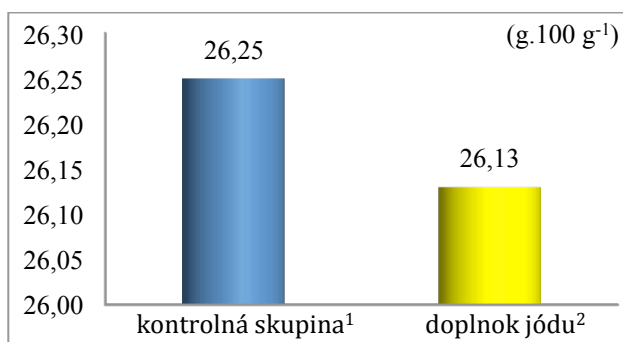


Obrázok 2 Priemerná telesná hmotnosť kurčiat na konci experimentu – Average body weight of broiler chicken at end experiment

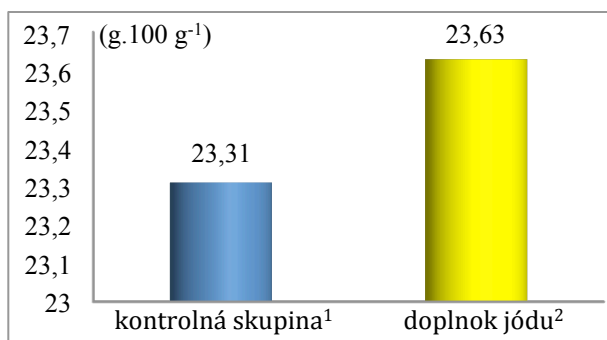
¹control group, ²suplement of iodine



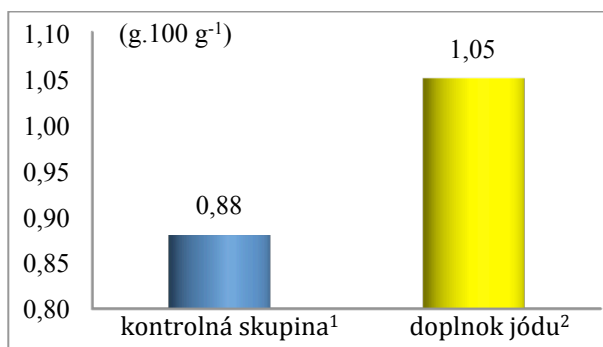
Obrázok 3 Priemerná hmotnosť prsnej svaloviny – Average weight of the breast muscle
¹control group, ²supplement of iodine



Obrázok 4 Priemerný obsah sušiny v prsnej svalovine – Average dry matter contents in breast muscle
¹control group, ²supplement of iodine



Obrázok 5 Priemerný obsah bielkovín v prsnej svalovine – Average protein contents in breast muscle
¹control group, ²supplement of iodine



Obrázok 6 Priemerný obsah tuku v prsnej svalovine – Average fat contents in the breast muscle
¹control group, ²supplement of iodine

DISKUSIA

V ostatných desaťročiach sa zvýšila pozornosť vo výskume zabezpečenia dostatku jódu pre obyvateľstvo. Iniciatíva endokrinológov a hygienikov mala za následok preskúmanie možností, ako zvýšiť podiel jódu v mlieku, mäse a vo vajciach a tak využiť potraviny živočíšneho pôvodu v prevencii nedostatku jódu u ľudí (**Kaufmann et al., 1998**). Táto skupina potravín je obzvlášť nezastupiteľná v našich podmienkach a rešpektuje spotrebu a výživové nároky obyvateľstva (**Borkovcová a Rehůrkova, 2001**). Podiel jódu v produktoch živočíšneho pôvodu súvisí so suplementáciou tohto prvku (Herzig et al., 1999). Suplementácia jódu v krmivách zameraná na prevenciu strumy u ľudí má za následok stonásobné zvýšenie jeho podielu v mlieku a jeho zdvojnásobenie v mäse, t. j. v mäsových produktoch (**Anke et al., 1989**). Jód je jednou z minerálnych látok, ktorá je v podstate nevyhnutná pre kurčatá v malých množstvách vo vzťahu k normálnej produkcii a zabezpečeniu metabolických funkcií (**De Benoist et al., 2008**). Hormóny štítnej žľazy regulujú anabolické ako aj katabolické procesy metabolizmu bielkovín, tukov a sacharidov (**Feng et al., 2000**). **Yahav et al. (1996)** skúmali vplyv rôznych faktorov na trijódtyronín (T3) a tetrajodotyronín (T4) u hydiny, t. j. v závislosti od druhu hydiny, veku, spotreby krmiva, zloženia krmných zmesí, doby výkrmu, svetelného režimu a teploty okolia. Hormóny štítnej žľazy u hydiny sú dôležité na termoreguláciu, metabolizmus energie, reprodukciu, rozvoj tkanív, rast a vývoj, cirkuláciu krvi a činnosť svalov. Hormóny štítnej žľazy kontrolujú intenzitu oxidácie buniek, aktivitu iných endokrinných žliaz a metabolizmus živín. Aktivita štítnej žľazy je ovplyvnená vonkajším prostredím a nedostatok ako aj nadbytok jódu môže viesť k poruchám štítnej žľazy (**Čepuliné, 2008**). **Stanley et al. (1989)** skúmali vplyv pitnej vody s doplnkom jódu na rast kurčiat pri rôznej hustote na jednotku plochy. Zistili, že doplnok 2 ppm jódu v pitnej vode významne zlepšil rast kurčiat. Kurčatá sú schopné produkcie bez významnej straty aj pri určitom nedostatku jódu, ale výrazný nedostatok hormónov štítnej žľazy môže viesť k zníženému rastu (**McDowell, 2003; Maroufyan a Kermanshahi, 2006**). **Röttger et al. (2011)** skúmali vplyv doplnku jódu u kurčiat určených na produkciu mäsa na ich rast. Nezistili významný vplyv na ich produkčné ukazovatele. Konceptia produkcie kuracieho mäsa sa mení vzhľadom na požiadavky spotrebiteľov a spracovateľského priemyslu. Produkcia kuracieho mäsa kladie dôraz na kvalitu a výťažnosť čo najväčších častí jatočného tela (prsna svalovina, stehenná svalovina). Existuje niekoľko faktorov, ktoré majú vplyv na tieto časti, a to typ kurčiat, pohlavie, vek, telesná hmotnosť, doba výkrmu, čiže vek pri zabití a samozrejme výživa (**Siegel, 1984**). Naše výsledky telesnej hmotnosti kurčiat sme porovnávali s výsledkami **Angelovičovej et al. (2012)**. Vo svojom experimente sledovala telesnú hmotnosť kurčiat na konci experimentu, pričom do krmných zmesí kurčiat pridávali premix jodidu draselného a premix jodizovaného oleja. V skupine, v ktorej kurčatá skrmovali premix jódu dosiahli priemernú telesnú hmotnosť na konci experimentu 2103,40 g a v skupine s jodizovaným olejom dosiahli 2127,96 g. Priemerná hmotnosť kurčiat na konci nášho experimentu bola vyššia, t. j. 2183,06 g. **Baker (2004)**, ktorý pridal jód a sójové

semená do kŕmnych zmesí pre kurčatá, zistil, že jód vo forme jodidu draselného v kŕmive sa preukázal ako rast potláčajúci doplnok. Potlačenie rastu spôsobené doplnkom jódu vysvetľuje dobrovoľným znížením príjmu kŕmiva kurčatami. Na základe literárnych poznatkov je známe, rast kurčiat je ovplyvnený vnútornými a vonkajšími faktormi. Závety a údaje, ktoré sme získali z literárnych zdrojov v niektorých štúdiách sú podrobnejšie opísané a v niektorých chýba detailný opis. **Asadi et al. (2012)** skúmali vplyv jódu u jednodňových kurčiat určených na produkciu mäsa. Kŕmivo bolo obohatené dávkami jódu vo forme $\text{Ca}(\text{IO}_3)_2$ (0; 0,74; 1,48; 2,22 a 2,96 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ kŕmiva). Priemerná hmotnosť kurčiat na konci experimentu, ktoré boli kŕmené kŕmnou zmesou s dávkou jódu 0,74 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ bola 1869 g, čo je o 314, 06 g menej v porovnaní s výsledkom, ktorý sme dosiahli v našom experimente.

Szalkowska a Meller (1997) došli k záveru, že genotyp kurčiat určených na produkciu mäsa má veľký vplyv na telesnú hmotnosť a hmotnosť prsnej svaloviny. V ich experimentoch, podobne ako aj v experimente **Nikolovej a Pavlovského (2009)** mali kurčatá *Cobb 500* štatisticky preukazne vyšší podiel prsnej svaloviny než kurčatá Hubbard. **Corzo et al. (2005)** zistili, že výživa a genotyp majú štatisticky významný vplyv na hmotnosť prsnej svaloviny. **Albuquerque et al. (2003)** poukazuje na to, že dĺžka výkrmu vplyva na hmotnosť prsnej svaloviny. Hmotnosť prsnej svaloviny v ich experimente bola vyššia u kurčiat zabíjaných na 49. – 56. deň, než u kurčiat zabíjaných na 42. deň. **Nikolova a Pavlovsky (2009)** vo svojom experimente zistili hmotnosť prsnej svaloviny u kurčiat *Cobb 500* 412,44 g, ktorá je nižšia v porovnaní s hmotnosťou prsnej svaloviny 426,83 g, ktorú dosiahli kurčatá v našom experimente pri skrmovaní kŕmnych zmesí s doplnkom jódu. Telesná hmotnosť u kurčiat je daná ukladaním bielkovín, tuku, vody a minerálnych látok v tele. Výsledky chemických rozborov dokazujú, že existuje výrazný rozdiel v chemickom zložení prsnej a stehennej svaloviny. Prsná svalovina je charakteristická vyšším podielom bielkovín, minerálnych látok a fosforu a nižším obsahom sušiny a vápnika. Naopak, stehenná svalovina je charakteristická vyšším podielom sušiny, tuku a vápnika a nižším podielom bielkovín, minerálnych látok a fosforu (**Suchý et al., 2002**). **Suchý et al. (2002)** vo svojom experimente stanovili obsah sušiny v prsnej svalovine kurčiat *Cobb 26,27 – 26,71 g\cdot 100 g^{-1}. Tieto hodnoty sú porovnateľné s našimi výsledkami 26,13 $\text{g}\cdot 100 \text{g}^{-1}$. Mierne nižšie hodnoty obsahu sušiny v prsnej svalovine zistili **Haščík et al. (2009)** vo svojom experimente s kurčatami určenými na produkciu mäsa 25,4, resp. 25,73 $\text{g}\cdot 100 \text{g}^{-1}$. Podobné hodnoty ako uvádza **Haščík et al. (2009)**, zaznamenali aj **Medved' a Angelovičová (2010)**, ktorí stanovili obsah sušiny v prsnej svalovine kurčiat 25,36 g, resp. 25,67 $\cdot 100 \text{g}^{-1}$. Kuracie mäso je dôležitým zdrojom kvalitných bielkovín, ich podiel v svalovine je podľa jednotlivých autorov rôzny. **Steinhausner et al. (2000)** uvádza podiel bielkovín v svalovine 18 – 22 %. Kuracie mäso teda môžeme klasifikovať ako vysokobielkovinové. V prsnej svalovine sa nachádza vyšší podiel bielkovín než v stehennej svalovine, ako sme uviedli vyššie, čo môže súvisieť s rôznymi funkciami jednotlivých druhov svalov. **Angelovičová et al. (2012)** stanovili obsah bielkovín v prsnej svalovine kurčiat *Cobb 500* kŕmených kŕmnou*

zmesou s premixom jódu 23,48 $\text{g}\cdot 100 \text{g}^{-1}$ a u kurčiat kŕmených kŕmnou zmesou s premixom jodizovaného oleja 23,60 $\text{g}\cdot 100 \text{g}^{-1}$. Tendenciu zvýšenia obsahu bielkovín v prsnej svalovine účinkom jódu ich výsledkov experimentu sme potvrdili výsledkami nášho experimentu. **Medved' a Angelovičová (2010)** skúmali obsah bielkovín v prsnej svalovine kurčiat. Zistený obsah bielkovín v prsnej svalovine kurčiat bol 23,61 $\text{g}\cdot 100 \text{g}^{-1}$, resp. 23,76 $\text{g}\cdot 100 \text{g}^{-1}$. V experimente s kurčatami *Cobb 500* **Suchý et al. (2002)** stanovili obsah bielkovín v prsnej svalovine 22,57 - 23,08 $\text{g}\cdot 100 \text{g}^{-1}$. V porovnaní s našimi výsledkami sú tieto hodnoty nižšie. Tuk v mäse je veľmi dôležitý zo senzorického hľadiska. Je zdrojom mnohých aromatických látok, ktoré ovplyvňujú chuť mäsa. Obsah tuku v prsnej svalovine 1,05 $\text{g}\cdot 100 \text{g}^{-1}$, ktorý sme dosiahli v experimente bol nižší v porovnaní s výsledkami 2,55 - 2,73 $\text{g}\cdot 100 \text{g}^{-1}$, ktoré dosiahli **Suchý et al. (2002)**. Vyššie hodnoty obsahu tuku v prsnej svalovine týchto autorov môžu súvisieť s prípravou vzorky prsných svalov na analýzu. Autori mohli použiť prsné svaly s kožou. Vzorky prsných svalov pre naše analýzy boli bez kože. **Haščík et al. (2009)** vo svojom experimente stanovil obsah tuku v prsnej svalovine kurčiat 1,57 $\text{g}\cdot 100 \text{g}^{-1}$, čo je údaj medzi výsledkami našich analýz a analýz **Suchého et al. (2002)**. Na základe poznatkov z literárnych zdrojov ako aj výsledkov nášho experimentu môžeme konštatovať, že problém pridávania jódu do kŕmiva pre kurčatá určené na produkciu mäsa je veľmi zložitý. Naďalej zostáva otvorenou otázkou pre výskumné riešenie jeho dostatočnosti vo výžive kurčiat určených na produkciu mäsa.

ZÁVER

Cieľom práce bolo sledovanie a vyhodnotenie kvality produkcie kurčiat hybridnej línie *Cobb 500* a vybraných ukazovateľov prsnej svaloviny v závislosti od skrmovania kŕmnych zmesí s doplnkom jódovaného oleja. Na porovnanie bola použitá skupina kurčiat, ktoré skrmovali kŕmne zmesi bez doplneného jódovaného oleja.

V experimente boli dosiahnuté tieto výsledky:

- priemerná telesná hmotnosť kurčiat na konci experimentu bola 2183,06 g v skupine s doplnkom jódu oproti 2145,21 g v kontrolnej skupine, pričom rozdiel medzi skupinami nebol štatisticky preukazný ($P>0,05$),
- priemerná hmotnosť prsnej svaloviny kurčiat bola 426,83 g v skupine s doplnkom jódu oproti 412,11 g v kontrolnej skupine, pričom rozdiel medzi skupinami nebol štatisticky preukazný ($P>0,05$),
- priemerný obsah sušiny v prsnej svalovine kurčiat bol 26,13 $\text{g}\cdot 100 \text{g}^{-1}$ v skupine s doplnkom jódu oproti 26,13 $\text{g}\cdot 100 \text{g}^{-1}$ v kontrolnej skupine, pričom rozdiel medzi skupinami nebol štatisticky preukazný ($P>0,05$),
- priemerný obsah bielkovín v prsnej svalovine kurčiat bol 1,73 $\text{g}\cdot 100 \text{g}^{-1}$ v skupine s doplnkom jódu oproti 1,63 $\text{g}\cdot 100 \text{g}^{-1}$ v kontrolnej skupine, pričom rozdiel medzi skupinami nebol štatisticky preukazný ($P<0,05$),
- priemerný obsah tuku v prsnej svalovine kurčiat bol 1,05 $\text{g}\cdot 100 \text{g}^{-1}$ v skupine s doplnkom jódu oproti 0,88 $\text{g}\cdot 100 \text{g}^{-1}$ v kontrolnej skupine, pričom rozdiel medzi skupinami bol štatisticky preukazný ($P<0,05$).

Výsledky experimentu naznačili určitú tendenciu pozitívneho vplyvu kŕmnych zmesí s jódovaným olejom

na kvalitu produkcie kurčiat určených na produkciu mäsa. Na základe týchto výsledkov odporúčame ďalší výskum.

LITERATÚRA

- Albuquerque, R., Faria, D. E., Junqueira, O. M., Salvador, D., Faria Filho, D. E., RIZZO, M. F. 2003. Effect of energy level in finisher diets and slaughter age of on the performance and carcass yield in broiler chickens. Review. *Revista Brasileira de Ciência Avícola*, vol. 5, no. 2, p. 99-104. <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-635X2003000200002>
- Angelovičová, M., Mrázová, E., Kliment, M., Tkačová, J., Král, M., Alfaig, E. 2012. The Effect of Iodine in Various Forms on the Content of Selected Essential Amino Acids and Their Accumulation into the Broilers Chest Muscles. *Animal Science and Biotechnologies*, vol. 45, no. 1, p. 1-6.
- Anke, M., Wenk, G., Heinrich, H., Groppe, B., Bauch, K. 1989. Die Wirkung jodierter Mineralstoffmischungen für Rind und Schwein auf die Jodversorgung und Strumaprophylaxe. *Verhandlungen der Deutschen Gesellschaft für Innere Medizin*, vol. 44, no. 2, p. 41-44.
- Asadi, H., Eila, N., Shivazad, M., Zarei, A., Akbari, N. 2012. Effect of different calcium iodate levels on performance, carcass traits and concentration of thyroid hormones in broiler chickens. *Annals of Biological Research*, vol. 3, no. 5, p. 2223-2227.
- Azizi, F., Smyth, P. 2009. Breastfeeding and maternal and infant iodine nutrition. *Clinical Endocrinology*, vol. 70, no. 5, p. 803-809.
- Baker, D. 2004. Iodine Toxicity and Its Amelioration. *Experimental Biology and Medicine*, vol. 229, no. 6, p. 473-478. [PMid:15169965](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15169965/)
- Borkovcová, I., Řehůrková, I. 2001. Study of iodine exposure sources in foodstuffs (in Czech). *Report of the National Institute of Public Health*, vol. 6, p. 5-80.
- Březina, P., Hrabě, J., Komár, A. 2001. *Technologie, zbožíznalství a hygiena potravin*. 1. ed. Vyškov : Vysoká vojenská škola pozemního vojska. 144 p. ISBN 80-7157-253-8.
- Corzo, A., Kidd, M. T., Burnham, D. J., Miller, E. R., Branton, S. L., Gonyales-Equerria, R. 2005. Dietary amino acid density effects on growth and carcass of broilers differing in strain cross and sex. *Journal of Applied Poultry Research*, vol. 14, p. 1-9.
- Čepulienė, R., Bobinienė, R., Sirvydis, V., Gudavičiūtė, D., Miškinienė, M., Kepalienė, I. 2008. Effect of Stable Iodine Preparation on the Quality of Poultry Products. *Veterinarija ir zootechnika*, vol. 42, no. 64, p. 38-43.
- D-A-CH. 2008. *Referenzwerte für die Nährstoffzufuhr : Jod*. Frankfurt a. M. : Umschau Braus Verlag. p. 179-184.
- De Benoist, B., Andersson, M., Egli, I., Takkouche, B., Allen, H. 2004. *Iodine status worldwide*. Geneva : WHO. 58 p.
- De Benoist, B., Mclean, E., Anderson, M., Rogers, L. 2008. Iodine deficiency in 2007 : Global progress made since 2003. *Journal of Food Nutrition Bulletin*, vol. 29, no. 3, p. 195-202. [PMid:18947032](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18947032/)
- Deutsche gesellschaft für ernährung. 2011. *Referenční hodnoty pro příjem živin*. 1. ed. Praha : Společnost pro výživu. 192 p. ISBN 978-80-254-6987-3.
- Dvořáková, M., Bílek, R., Čerňovská, J., Hill, M., Novák, Z., Vavřejnová, V., Vlček, P., Vrbková, J., Zikmund, J. 2007. Štítná žláza od minulosti k současnosti u dětské a dospělé populace v České republice. *Diabetologie, metabolismus, endokrinologie, výživa*, vol. 10, no. 1, p. 43-48.
- EFSA. 2013. Scientific Opinion on the safety and efficacy of iodine compounds (E2) as feed additives for all animal species: calcium iodate anhydrous and potassium iodide, based on a dossier submitted by Ajay Europe SARL. *EFSA Journal*, vol. 11 no. 2, 34 p. <http://dx.doi.org/10.2903/j.efsa.2013.3099>
- European Commission. 2002. *Opinion of the Scientific Committee on Food (SCF) on the on the Tolerable Upper Intake Level of Iodine*. Brussels : EC. 25 p.
- European Commission. 2005. Commission Regulation (EC) No 1459/2005 amending the conditions for authorisation of a number of feed additives belonging to the group of trace elements. *Official Journal of the European Union*, vol. 233, p. 8-10.
- FAO/WHO. 2004. *Vitamin and Mineral Requirements in Human Nutrition*. China: Sun Fung. 341 p. ISBN 92-4-154612-3.
- Feng, X., Jiang, Y., Meltzer, P., Yen, P. M. 2000. Thyroid hormone regulation of hepatic genes in vivo detected by complementary DNA microarray. *Journal of Molecular Endocrinology*, vol. 14, no. 7, p. 947-965. <http://dx.doi.org/10.1210/me.14.7.947> [PMid:10894146](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10894146/)
- Grofová, Z. 2007. *Nutriční podpora (praktický rádce pro sestry)*. 1. ed. Praha : Grada publishing. 248 p. ISBN 978-80-247-1868-2.
- Haščík, P., Kačániová, M., Čuboň, J., Bobko, M., Nováková, I., Vavřišínová, K., Arpášová, H., Mihok, M. 2009. Vplyv aplikácie *Lactobacillus fermentum* na chemické zloženie mäsa kurčiat Ross 308. *Acta fytotechnica et zootechnica*, special issue, p. 197-205.
- Herzig, I., Písaříkova, B., Kursa, J., Říha, J. 1999. Defined iodine intake and changes of its concentration in urine and milk of dairy cows. *Veterinární medicína*, vol. 44, no. 2, p. 35-40.
- Hetzl, B. S. 1983. Iodine deficiency disorders (IDD) and their eradication. *The Lancet*, vol. 322, no. 8359, p. 1126-1129. [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(83\)90636-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(83)90636-0) [PMid:6138653](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6138653/)
- Herzig, I., Trávníček, J., Kursa, J., Kroupová, V., Řezníček, J. 2007. Content of Iodine in Broiler Meat. *Acta veterinaria*, vol. 76, no. 1, p. 137-141. <http://dx.doi.org/10.2754/avb200776010137>
- Kaufmann, S., Wolfram, G., Delange, F., Rambeck, W. A. 1998. Iodine supplementation of laying hen feed : A supplementary measure to eliminate iodine deficiency in humans? *Zeitschrift für Ernährungswiss*, vol. 37, no. 3, p. 288-293. ISSN 1436-6207.
- Laurberg, P., Nøhr, S. B., Pedersen, K. M., Hreidarsson, A. B., Andersen, S., Pedersen, I. B., Knudsen, N., Perrild, H., Jørgensen, T., Ovesen, L. 2000. Thyroid disorders in mild iodine deficiency. *Thyroid*, vol. 10, no. 11, p. 951-963. <http://dx.doi.org/10.1089/thy.2000.10.951> [PMid:11128722](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11128722/)
- Maroufyan, E., Kermanshahi, H. 2006. Effect of Different Levels of Rapeseed Meal Supplemented with Calcium Iodate on Performance, Some Carcass Traits and Thyroid Hormones of Broiler Chickens. *International Journal of Poultry Science*, vol. 5, no. 11, p. 1073-1078. <http://dx.doi.org/10.3923/ijps.2006.1073.1078>
- Mc Dowell, L. R. 2003. *Minerals in animal and human nutrition*. 2nd edition. Amsterdam : Elsevier health Sciences. 660 p. ISBN 978-0-444-51367-0.
- Medveď, J., Angelovičová, M. 2010. Protein and fat in breast muscles of broilers in application welfare principles in practical conditions. *Potravinárstvo*, vol. 4, no. 3, p. 50-52. <http://dx.doi.org/10.5219/66>
- Metodiky k analytickým laboratořím. 2009. UTB, Zlín.
- Mindell, E. 2000. *Vitaminová bible pro 21. Století*. Praha : Knižní klub. 304 p. ISBN 80-242-0406-1.

- Nikolova, N., Pavlovsky, Z. 2009. Major carcass parts of broiler chicken from different genotype, sex, age and nutrition system. *Biotechnology in Animal Husbandry*, vol. 25, no. 5-6, p. 1045-1054.
- Pípek, P. 1995. *Technologie masa* I. 3rd. edition. Praha : VŠCHT. 334 p. ISBN 80-7080-174-3.
- Röttger, A. S., Halle, I., Wagner, H., Breves, G., Flachowsky, G. 2011. The effect of various iodine supplementation and two different iodine sources on performance and iodine concentrations in different tissues of broilers. *British Poultry Science*, vol. 52, no. 1, p. 115-123. <http://dx.doi.org/10.1080/00071668.2010.539591> PMID:21337206
- Ryšavá, L. 2001. *Trendy v saturaci dětské populace jódem v okrese Frýdek-Místek* : doktorská disertační práce. Olomouc : Univerzita Palackého, Lékařská fakulta. 58 p.
- Ryšavá, L. 2010. Jód je nezbytný pro zdraví - máme ho dnes dostatek? In *Zásobení jódem a prevence tyreopatií se zaměřením na období těhotenství a kojení : IX. konference u příležitosti Dne jódu* [online]. Praha : SZU. p. 36. Available at: www.szu.cz/uploads/documents/czsp/vyziva/Sbornik_IX_konference_Jod_2010.pdf.
- Siegel, P. B. 1984. Factors influencing excessive fat deposition in meat poultry. *I. Genetics : XVII Worlds Poultry Congress*. Helsinki. p. 51-52.
- Simeonovová, J., Míková, K., Kubišová, S., Ingr, I. 1999. *Technologie drůbeže, vajec a minoritních živočišných produktů*. 1. ed. Brno : Mendlova zemědělská a lesnická univerzita. 246 p. ISBN 80-7157-405-8.
- Stanbury, J. B., Ermans, A. E., Bourdoux, P., Todd, C., Oken, E., Tonglet, R., Vidor, G., Braverman, L. E., Medeiros-Neto, G. 1998. Iodine-induced hyperthyroidism: Occurrence and epidemiology. *Thyroid* [online], vol. 8, no. 1, p. 83-100. <http://dx.doi.org/10.1089/thy.1998.8.83> PMID:9492158
- Stanley, V. G., Bailey, J. E., Krueger, W. F. 1989. Effects of Iodine-Treated Water on the Performance of Broiler Chickens Reared Under Various Stocking Densities. *Poultry Science*, vol. 68, no. 3, p. 435-437. <http://dx.doi.org/10.3382/ps.0680435> PMID:2704701
- Steinhauser, R. L., Beneš, J., Ingr, I. 2000. *Produkce masa*. 1. ed. Tišnov : LAST. 464 p. ISBN 80-900260-7-9.
- Suchý, P., Jelínek, P., Straková, E. 2002. Chemické složení svaloviny masných hybridů brojlerových kuřat při prodlouženém výkrmu. *Czech Journal of Animal Science*, vol. 47, no. 12, p. 511-518.
- Szalkowska, H., Meller, Z. 1997. The influence of age and genotype on the quality and technological suitability of from chicken broilers. *Poultry Meat Quality*, p. 78-82.
- Velíšek, J. 2002. *Chemie potravin 2*. 2. ed. Tábor : OSSIS. 303 p. ISBN 80-86659-01-1.
- Vyhláška Mze CZ č. 264/2003, Sb., kterou se mění vyhláška č. 326/2001 Sb., kterou se provádí § 18 písm. a), d), g), h), i) a j) zákona č. 110/1997 Sb., o potravinách a tabákových výrobcích a o změně a doplnění některých souvisejících zákonů, ve znění pozdějších předpisů, pro maso, masné výrobky, ryby, ostatní vodní živočichy a výrobky z nich, vejce a výrobky z nich.*
- Yahav, S., Straschnow, A., Plavnik, I., Hurwitz, S. 1996. Effects of diurnal cyclic versus constant temperatures on chicken growth and food intake. *Journal of British Poultry Science*, vol. 37, no. 1, p. 43-54. <http://dx.doi.org/10.1080/00071669608417835> PMID: 8833526
- Zamrazil, V. 2004. Problematika optimální saturace jódem. In *Diabetologie, metabolismus, endokrinologie, výživa*, vol. 7, no. 2, p. 27-31.
- Zamrazil, V. 2007. Profylaxe jodového deficitu a problematika s ní spojená. *Diabetologie, metabolismus, endokrinologie, výživa*, vol. 10, no. 1, p. 53-55.
- WHO. 2009. *Iodine and inorganic iodides: human health aspects*. Stuttgart : WHO Press. 53 p. ISBN 978-92-4-153072-9.

Acknowledgments:

This work was supported by grant VEGA no 1/0007/11.

Contact address:

prof. Ing. Mária Angelovičová, CSc., Slovak University of Agriculture in Nitra, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Department of Food Hygiene and Safety, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra Slovakia, E-mail: maria.angelovicova@gmail.com.

Ing. Marieta Semivanová, Slovak University of Agriculture in Nitra, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Department of Food Hygiene and Safety, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra Slovakia, E-mail: markakolesarova@azet.sk.

APPLYING THE PRINCIPLES OF WELFARE AND A QUALITY OF PRODUCTION IN THE ORGANIC FARM OF THE LAYING HENS

Mária Angelovičová, Martin Mellen, Jana Zdechovanová

ABSTRACT

European Union banned with Council Directive No. 74/1999/EC use of the conventional battery cages for laying hens in European Union with effect from January 1, 2012. By this time much attention was paid to the assessment of laying hens welfare in the modified breeding system, namely from aspect of behavior and expression physiological stress. At present are used the enriched cages, which device is defined by the Code of laying hens living conditions. Quantification of intensity and sequence of the events in different behaviour and a time regime can contribute to knowledge of time spending of the laying hens in the breeding area and to determining of prioritizing their behavior. The aim of our research was assessment an application of principles laying hens welfare in the farm, their production and egg quality. An object of investigation was ecological farm of laying hens. In the experiment were observed the housing conditions and nutrition of laying hens in farm, egg production, egg weight at laying hens old 42 weeks and selected indicators of chemical formation of the eggs. In the farm were reared laying hens ISA Brown, which are high-productive and the most the most widely used in EU. The informations and data on farm, laying hen hall, breeding facility, breeding conditions, the behavior of the laying hens, nutrition, feeding and egg production were obtained by personal visit an organic farm and informations which the farmer records and stores. The informations about the behavior of laying hens were obtained by observing and comparing with the knowledge and data of the Slovak Government regulation on December 11, 2002, which minimum standards determine for the protection of laying hens. The informations on feed were obtained directly from an organic farm and feed company that followed by accordance the minimum content of nutrients and energy in accordance with the needs of the laying hens. Egg production was monitored on the base of collecting eggs two and several times a day, which was recorded daily on an organic farm. Chemical analyzes of samples of eggs were conducted according to the methodology for analytical laboratories (2009). In the farm were application welfare principles. The laying hens had unlimited access to feed and water, *ad libitum*, free movement in the stable hall on the litter and perches. The laying hens rummaged and ashed in the free-range are of clay. In the free-range area of grassland where was a shelter, they free ranged and explored environment. The microclimatic conditions, a construction of the perches, nests in the hall and location of the feeders and drinkers in the hall and in the free-range were solution in the accordance with the needs of improved living conditions of the laying hens. The laying hens achieved an intensity of egg-laying 84.60% in the all laying cycle. An egg weight was 62.30 g at laying hens old 42 weeks. The average dry mater contents was in the table eggs 26.21 g per 100 g of egg mass, the proteins 12.34 g per 100 g of egg mass, a fat 11.63 g per 100 g of egg mass and a cholesterol 1.27 g per 100 g of egg yolk. On the base of achivied the results, further research was recommended in the field the welfare of the laying hens intendent for the production of the table eggs.

Keywords: organic farm; laying hen; welfare; principle; production; egg quality

ÚVOD

Európska únia zakázala smernicou Rady č. 74/1999/ES používať konvenčné batériové kliečky pre produkčné nosnice v celej Európskej únii s platnosťou od 1. januára 2012. V niektorých európskych krajinách bol zakázaný tento systém chovu už skôr, hlavne v krajinách severnej Európy. V súčasnosti sa používajú obohatené kliečky, ktorých zariadenie je definované Kódexom pre životné podmienky produkčných nosníc (CEC, 1999). V Európskej únii bola skúmaná otázka o zákaze chovu v batériovom kliečkovom systéme vo všetkých členských krajinách, a to do roku 2012. Do tohto obdobia bola

venovaná veľká pozornosť na posúdenie welfare produkčných nosníc v modifikovanom systéme chovu, a to z hľadiska správania a fyziologických prejavov stresu (Lymbery, 2002; Yue & Duncan 2003). Kvantifikácia intenzity a následnosť udalostí v rôznom správaní a časový režim môžu prispieť k poznaniu trávania času produkčných sliepok v chovnom priestore a k určovaniu priorit v ich správaní. Produkčné nosnice prejavujú rôzne druhy správania počas denného režimu v závislosti od dennej doby. Zdá sa, že následnosť v štruktúre správania je dôležitá pre určenie priority. Následnosť v správaní vyplýva z vlastností produkčných sliepok, ktoré

by mali byť zohľadnené pri návrhu ustajňovacieho priestoru pre produkčné nosnice na základe behaviorálnych potrieb, priorít správania, potreby zariadenia a priestoru na voľný pohyb. Všetky tieto faktory môžu prispieť k optimalizácii vzťahov medzi potrebami produkčných nosníc a životnými podmienkami v ustajňovacom priestore pri zabezpečovaní produkcie konzumných vaječ (Halachmi, 2000). Poznatky rozsiahlych štúdií z oblasti dobrých životných podmienok produkčných nosníc dokumentujú, že výkonnosť a sociálne správanie boli najčastejšie porovnávané vo všetkých súčasných dostupných systémoch. Umožňujú zovšeobecnenie záverov, z ktorých vyplýva, že s poznaním a rešpektovaním potrieb produkčných nosníc a dobrým riadením možno zabezpečiť dobré životné podmienky v každom súčasnom systéme chovu a pravdepodobne aj ich zlepšenie (Elson a Croxall, 2006; Sherwin et al., 2010). Používanie obohatených klieťok má tendenciu šírenia aj mimo Európy. Niekoľko zariadení bolo uplatnených v USA, kde na základe dohody medzi hydinným priemyslom a Inštitútom sociálnej starostlivosti má byť na základe legislatívnych opatrení postupne realizovaná výmena klasického klieťkového chovu do roku 2025. Je pravdepodobné, že tento trend bude pokračovať a rozširovať sa po celom svete (United Egg Producers, 2011). Obohatené klieťky majú potenciál pre ďalšie zlepšenie životných podmienok produkčných nosníc, najmä pokiaľ ide o veľkosť klieťky (plochy), uplatňovanie podstielky a stimulov pre vykonávanie aktivít (Elson a Tauson, 2011). Výskum úpravy klieťok sa začal hlavne v polovici roku 1980, a to s orientovaním na malé skupiny produkčných nosníc. Podľa smernice Európskej komisie platnej od roku 1999 poskytujú obohatené klieťky väčšiu voľnú plochu s podstielkou v porovnaní s konvenčnými klieťkami, ďalej zariadenie na úpravu pazúrov, bidlo a hniezdo (Appleby et al., 2002). Vyššie uvedené ustanovenie rieši hlavne zdravotné problémy produkčných nosníc v batériových klieťkach. Baxter (1994) uvádza, že obavy o welfare produkčných nosníc chovaných v klieťkach nesúvisia iba so zdravotnými problémami. Sú to aj obavy o možnosť prejavovania prirodzených aktivít. Pri takýchto obmedzujúcich podmienkach nemajú produkčné nosnice možnosť hradovania, hniezdenia alebo hrabania v podstielke. Rozhodnutiu o dobrých životných podmienkach produkčných nosníc predchádzali mnohé európske a medzinárodné sympózia. Chov produkčných nosníc zostáva otvorený pre výskum aj v súčasnosti, hlavne v systéme obohatených klieťok, aj napriek tomu, že spotrebiteľ označuje vajcia z neklieťkového systému chovu za výživnejšie, chutnejšie a zdravšie. Zvyšná časť produkčných nosníc je chovaná v systéme s výbehmi, na ekologických farmách. Je nedostatok poznatkov a informácií, na základe ktorých je možné porovnanie konzumných vaječ z klieťkového a neklieťkového systému chovu produkčných nosníc. Preto Európska komisia ešte v roku 1985 prijala nariadenie (v znení neskorších predpisov; CEC, 1999), na základe ktorého sú definované 4 podmienky, na základe ktorých môžu byť vajcia uznané z neklieťkového chovu. V prípade nesplnenia už jednej podmienky aj napriek tomu, že vajcia pochádzajú z neklieťkového chovu, nemôžu byť uznané za vajcia z neklieťkového chovu. Považujú sa za vajcia

z klieťkového chovu (Appleby, 1998). Rozhodnutie ukončenia výmeny obohatených klieťok za konvenčné v systéme chovu produkčných nosníc k 1. januáru 2012 znamenalo úplnú implementáciu smernice a 48 rokov od nastolenia tohto problému Harrisonom v roku 1964. Prebiehajú rokovania o pravidlách pre voľný obchod s poľnohospodárskymi produktmi medzi Svetovou obchodnou organizáciou (WTO) a Európskou úniou. Európska únia navrhuje, aby dobré životné podmienky zvierat boli brané do úvahy pri obchode s produktmi živočíšneho pôvodu. Tento aspekt welfare môže byť zohľadňovaný označovaním produktu alebo finančnou dotáciou chovateľom, ktorí dodržia podmienky dobrých životných podmienok (European Communities, 2000). Už v roku 1996 (Scientific Veterinary Committee) bolo upozornené, že pravdepodobnosť dohody nie je istá, ale udržanie tzv. „vysokých štandardov welfare produkčných nosníc“ môže byť realizované iba vtedy, ak trh Európskej únie bude chránený proti dovozu vaječ z tretích krajín, kde neplatia tak prísne legislatívne opatrenia ako v krajinách Európskej únie. Podobne Wolfram et al. (2002) tento názor podporili a naznačili, že vo svojej súčasnej podobe smernica oslabí konkurencieschopnosť štátov Európskej únie do takej miery, že 65 % domácej spotreby by mohla byť nahradená importovanými vajcami. Kramer ešte v roku 1951 (citované Koelkebeck a Anderson, 2007) definoval kvalitu vaječ ako „súčet charakteristík potravy, ktoré ovplyvňujú prijateľnosť alebo preferenciu tejto potravy spotrebiteľom“. Na základe tejto definície je zrejmé, že kvalita konzumných vaječ znamená rôzne vlastnosti a pre spotrebiteľov vnímanie kvality je pravdepodobne podmienené v závislosti od preferovania ich vlastností. Vajcia sa predávajú v celom svete. Podľa Marketingového poriadku EÚ pre vajcia (Egg Marketing Regulations EU) sú klasifikované v triede A alebo sú zaradené do triedy B (Európska komisia, 2003; Council of the European Union, 2006) a iba vajcia týchto tried môžu byť predávané a použité na priamu ľudskú spotrebu alebo predávané (Council of the European Union, 2006). Podobné zatriedovanie vaječ prijalo Ministerstvo poľnohospodárstva Spojených štátov (USDA), a to na základe vnútornej kvality, vzhľadu a stavu vajcovej škrupiny. Vajcia triedy A sa obvykle predávajú, zatiaľ čo vajcia triedy B sú použité na ďalšie spracovanie. Vnútna kvalita vaječ je najviac ovplyvnená výživou produkčných nosníc, ale manipulácia s nimi po znesení vaječ hrá dôležitú úlohu pre zachovanie ich kvality. Tým, že vajcia majú prirodzený obal, vajcovú škrupinu, dodržiavajú sa určité kritériá pre jej neporušenie z hľadiska prestupu kontaminujúcich látok do vnútorného obsahu (Koelkebeck, 1999). Podľa Pérez-Bonilla et al. (2012a), ktorí sledovali intenzitu znášky počas celého znáškového cyklu u produkčných nosníc Lohman bola v priemere 92,5, resp. 89,8 %. Priemerná hmotnosť vaječ pritom bola 64,9, resp. 62,4 g. Krmivo produkčných nosníc má priamy vplyv na obsah lipidov vo vajci. Pri porovnávaní chemického zloženia živín konzumného vaječ boli zistené rozdiely pri produkčných nosniciach kŕmených zrninami v systéme chovu bez výbehu a s voľným výbehom. Vo vajciach produkčných nosníc z voľného výbehu boli stanovené výrazne odlišné profily mastných kyselín a rôzne úrovne karotenoidy (Karadas et al., 2005; Braden et al., 2006; Daza et al., 2007; Fredriksson a Pickova, 2007). Podľa

Suraia a Sparksa (2001) chemické zloženie vajec môže byť odlišné v závislosti od systému chovu a zloženia krmiva produkčných nosníc. V 100 g vajcovej hmoty sa nachádza 12,8 g bielkovín, 11,8 g tuku a 26,4 g sušiny (**Board, 1969**). Málo je informácií o ukazovateľoch chemického zloženia vajec z voľného chovu produkčných nosníc, resp. zo systému chovu s výbehom pokrytým trávnatým porastom. Na základe poznatkov publikovaných v správe zahrňujúcej výsledky zo 14 nezávislých fariem bolo konštatované, že vajcia produkčných nosníc zo systému voľného výbehu obsahujú približne štyrikrát viac vitamínu E, dvakrát viac vitamínu A, osemkrát viac β -karoténu, trikrát viac n-3 mastných kyselín a 2/3 z celkového množstva cholesterolu v porovnaní s konzumnými vajcami z konvenčných klieťok (URL 1). Navyše, **Karadas et al. (2005)** zistili vo svojom výskume, že vajcia produkčných nosníc z voľného výbehu sa vyznačujú vyšším obsahom karotenoidov v porovnaní s vajcami produkčných nosníc zo systému intenzívneho chovu. Vajcia sú tiež hlavným zdrojom diétného cholesterolu, ktorý sa nachádza iba v žĺtku. Vajcový cholesterol je u spotrebiteľa spájaný s obavami ku vzniku ischemickej choroby srdca. To bola aj hlavná príčina zníženej konzumácie vajec. Cholesterol má svoje dôležité fyziologické funkcie, pre ktoré je významný vo vzťahu k udržaniu zdravia. Vyskytuje sa v bunkových membránach, nevyhnutný je pri tvorbe hormónov a vitamínu D (**Naviglio et al., 2011**). Pri porovnávaní výsledkov na základe literárnych zdrojov boli zistené rozdiely v obsahu cholesterolu produkčných vajec. Obsah cholesterolu v konzumných vajciach sa mení v závislosti od plemena, veku, hmotnosti vajca a žĺtka, ak sa prepočítava na ich hmotnosť a od výživy produkčných nosníc (**Riad et al., 1981; Pandey et al., 1989; Maurice et al., 1994; Zemková et al., 2007**). Obsah cholesterolu vo vajciach, podľa literárnych údajov (**USDA, 1975**) je 274 mg v jednom vajci a tak je aj stanovený pre spotrebiteľa Národohospodárskym ústavom potravín (**USDA, 1976**), pričom táto hodnota sa používa ako referenčná (**Beyer a Jensen, 1989**). V dôsledku tejto skutočnosti odporučili lekári konzumáciu dvoch vajec na osobu a týždeň, a to z dôvodu, že maximálny denný príjem cholesterolu by mal byť 100 mg na 4186, 8 kJ (1000 kcal) energie v strave. Toto stanovisko bolo všeobecne zohľadňované ako prevencia proti hromadeniu cholesterolu v cievach a srdcovocievnyh ochoreniam. Poznanky z aktuálnych štúdií z ostatných rokov potvrdzujú, že konzumácia jedného alebo dvoch vajec za deň, nemá nepriaznivý vplyv na lipidový profil, najmä na obsah lipoproteínu nízkej hustoty (LDL) (**Harman et al., 2008; Spence et al., 2010**).

Cieľom práce bolo zhodnotenie uplatňovania princípov welfare na farme produkčných nosníc, ich produkcie a kvality vajec. V nadväznosti na uvedený hlavný cieľ sme svoju pozornosť zamerali na charakterizáciu farmy z aspektu uplatňovania princípov welfare, opis typu produkčných nosníc a charakterizáciu ich správania vo vzťahu k princípom welfare a zhodnotenie produkcie a kvality vajec.

MATERIÁL A METÓDY

Objektom skúmania bola ekologická farma chovu produkčných nosníc, uplatňovanie princípov welfare, produkcia a kvalita vajec.

Informácie a údaje o farme, ustajňovacom priestore, chovnom zariadení, podmienkach chovu, správaní produkčných nosníc, výžive, kŕmení a produkcii vajec boli získavané osobnou návštevou ekologickej farmy a poskytnutými informáciami, ktoré farmár eviduje a uchováva.

Informácie o správaní produkčných nosníc boli získavané pozorovaním a porovnávaním s poznatkami a údajmi **Nariadenia vlády Slovenskej republiky zo dňa 11. 12. 2002**, ktorým sa ustanovujú minimálne normy ochrany nosníc a jeho doplnenie zo dňa 9. 7. 2003 ku zákonu č. 736/2002, **Nariadenia vlády Slovenskej republiky zo dňa 9. 7. 2003 o ochrane zvierat chovaných na farmárske účely ku zákonu č. 322/2003** a princípov tzv. piatich slobôd.

Informácie o krmive boli získané jednak priamo z ekologickej farmy a jednak z krmivárskej firmy, ktoré nadväzovali na dodržanie minimálneho obsahu živín a energie v súlade s potrebami produkčných nosníc.

Produkcia vajec bola sledovaná na základe zberu vajec 2 a viackrát denne, ktorá bola denne evidovaná na ekologickej farme.

Z počtu znesených vajec bola vypočítaná intenzita znášky.

Hmotnosť vajec bola sledovaná vážením odobratých vzoriek vajec na váhach typu Kern KCB 440-49 N s presnosťou $d = \pm 0,1$. Na zistenie priemernej hmotnosti vajec bolo odobratých 300 ks od nosníc, ktoré boli vo veku 42 týždňov.

Chemické analýzy vzoriek vajec a štatistické hodnotenie bolo vykonané na Katedre hygieny a bezpečnosti potravín Fakulty biotechnológie a potravinárstva pri Slovenskej poľnohospodárskej univerzite v Nitre.

Stanovenie sušiny. Sušina vo vajcovej hmote bola stanovená sušením vzorky v sušiarňi typu J. R. Selecta s. a. (**Metodiky k analytickým laboratóriám, 2009**).

Stanovenie dusíkatých látok. Dusíkaté látky boli stanovené na prístroji Kjeltec 8200 ako celkový obsah dusíka podľa Kjeldahlovej metódy, ktorý sa vynásobil faktorom 6,25 (**Metodiky k analytickým laboratóriám, 2009**).

Stanovenie tuku. Vzorka vajcovej hmoty bola kvantitatívne premiestnená do extrakčného prístroja typu DET-GRAS N, kde sa extrahovala extrakčným čínielom petroléterom. Po extrakcii sa vzorka odparovala od zvyškov petroléteru a sušila v sušiarňi pri teplote 100 °C typu J. R. Selecta s. a. (**Metodiky k analytickým laboratóriám, 2009**).

Stanovenie cholesterolu. Cholesterol vo vajcovom žĺtku bol stanovený podľa nasledujúceho postupu: ručne oddelený vajcový žĺtok bol zhomogenizovaný v laboratórnom mixéri. Z homogenizovanej vzorky bolo navažené 5 g vzorky. Ku vzorke bolo pipetou pridané štvornásobné množstvo fyziologického roztoku 18,5 g NaCl (1 liter H₂O). Zmes bola dôkladne zhomogenizovaná. Obsah cholesterolu bol stanovený podľa **Ingra a Simeonovej (1983)**.

Produkčné nosnice *ISA Brown*, ktoré boli objektom výskumu, sú hybridnou kombináciou sliepok kolorsexingového typu s nižšou živou hmotnosťou.

Na konci odchovu nosnice vážia v priemere 1 450 g a na konci znáškového cyklu 2 100 g. Pohlavne nosnice dospievajú vo veku 145 dní. Znášku dosahujú pomerne vysokú 295 ks vajec do veku 500 dní od počiatočného stavu. Priemerná hmotnosť vajec je 63,3 g s hnedou vajcovou škrupinou. V súčasnosti patria tieto produkčné nosnice medzi najrozšírenejšie hybridné kombinácie sliepok v Európskej únii. Ich podiel vo veľkochovoch tvorí asi 60 % zo všetkých chovaných produkčných typov sliepok.

VÝSLEDKY

Charakterizácia podmienok chovu a správania produkčných nosníc na farme

Ustajňovacia budova pre produkčné nosnice bola riešená dvoma oddeleniami. Menšiu časť tvorila vstupná hala, v ktorej boli umiestnené základné pracovné prostriedky ošetrovateľa produkčných nosníc, ako sú fúrik, vidly, vedro, metla a iné, ako aj krmivo. Druhou veľkou časťou bola hala na chov produkčných nosníc s ekologickým zameraním. Hala mala kapacitu na chov 1 000 produkčných nosníc s uplatňovaním princípov welfare.



Figure 1 Ustajňovacia budova produkčných nosníc – Laying hen house (Foto: Zdechovanová, 2011)



Figure 2 Ustajňovacia hala produkčných nosníc s chovným zariadením – Laying hen hall with breeding facility (Foto: Zdechovanová, 2011)

Ustajňovacia hala bola riešená systémom chovu na podstielke. Podstielku tvorila mechanicky upravená pšeničná slama miaganá. Podstielka sa podľa potreby

doplňala. Jej hygienický stav závisel od vsávania vylučovaného trusu.

Ak bol povrch podstielky utlačený chôdzou nosníc a vylučovaný trus zostáva na povrchu podstielky, ručne sa doplňal povrch ustajňovacej plochy pomiaganou pšeničnou slamou. Počas voľného pohybu nosnice hrabali v podstielke, čo je pre nich prirodzená aktivita uspokojovania behaviorálnych potrieb. Podstielka v hale umožňovala nosniciam uspokojovať ich behaviorálne potreby. Svetelný režim v sledovanej hale bol zameraný od 18. týždňa veku produkčných nosníc na stimuláciu reprodukčných orgánov. V ustajňovacej hale sa postupne predlžoval svetelný režim počas dňa z 8 až 10 hodín na 15 hodín tak, aby vo vrchole znášky okolo 27. až 29. týždňa veku už bola maximálna dĺžka svetelného dňa. Podobne sa postupne zvyšovala intenzita osvetlenia z 8 - 10 luxov na 15 až 25 luxov. Tým, že v hale boli zakryté okná, svetelný režim bol regulovaný. Na odpočinok mali nosnice 8 hodín tmy s tým, že bolo zapnuté svetlo o intenzite 0,5 luxov. Červené svetlo v hale bolo aplikované z dôvodu zabránenia výskytu ozobávania, kanibalizmu. Počas celého znáškového cyklu nebol pozorovaný úhyn nosníc, ozobávanie peria alebo kanibalizmus. Teplota vzduchu v hale sa pohybovala v rozmedzí 18 až 22 °C a relatívna vlhkosť vzduchu od 50 do 75 %. Vetracie bolo riešené ventilátormi na bočnej a zadnej stene haly, ktoré boli automaticky nastavené. Produkčné nosnice mali voľný prístup do výbehu počas celého znáškového cyklu. Otvory boli riešené priamo v stene haly s voľným prístupom do výbehu. Otvory do výbehu sa otvárali každý deň ráno o 6,00 hodine v letnom období a o 8,00 hodine v zimnom období. Večer sa zatvárali v letnom období o 19,00 hodine a v zimnom období o 17,00 hodine. Priestor otvoru bol riešený tak, že jeho rozmery dosahovali minimálnu výšku 35 cm a šírku 40 cm a boli umiestnené pozdĺž celej dĺžky budovy. Celková šírka otvorov dva metre bola dostupná pre 1 000 nosníc. Hala je riešená pre chov 1 000 produkčných nosníc.



Figure 3 Otvor v hale do výbehu (zatvorený) – The hole in the hall in free-range (closed) (Foto: Zdechovanová, 2011)

Hustota produkčných nosníc vo výbehu neprekročila 9 nosníc na 1 m² využiteľnej plochy.

Voľný výbeh, ku ktorému mali produkčné nosnice prístup, bol v prvej časti pokrytý hlinou a drobnými kameňkami a v druhej časti trávny porastom, kde bol umiestnený prístrešok. V hlinenom výbehu sa nosnice

Vo výbehu s trávny porastom trávili produkčné nosnice svoj čas hlavne voľným pohybom, pozorovaním okolia a menej častým spásaním trávneho porastu. Vo výbehu mali nosnice k dispozícii krmivo v kruhových krmidlách a vodu vo vedrových napájadlách. Popolili, hrabali a pozorovali okolie. Tieto druhy správania sú ich prirodzenými aktivitami. Produkčné nosnice ich vykonávajú, len ak majú na to vytvorené podmienky.



Figure 4 Voľný prístup nosníc do vonkajšieho výbehu – Free access to the outdoor range hens (Foto: Zdechovanová, 2011)



Figure 5 Bidlá a kvapôčkové napájadlá – The perches and droplet waterholes (Foto: Zdechovanová, 2011)

Bidlá pre produkčné nosnice boli riešené z dreveného materiálu. Boli to úzke drevené látky, ktoré poskytovali šírku 15 cm pre každú produkčnú nosnicu. Bidlá boli umiestnené mimo priestoru nad podstielkovou podlahou v hale. Prízemie bidla bolo riešené z materiálu drôtených ôk, ktorým sa zabránilo vstupu nosníc pod umiestnené bidlá. Nosnice trávili na bidlách svoj čas aj počas dňa, ale viac využívali vyvýšený priestor pod bidlami. Počas dňa sa voľne pohybovali po bidlách a po ploche vyvýšeného priestoru pod bidlami. Počas tmy nosnice odpočívali. Viac ich bolo na bidlách ako na ploche vyvýšeného priestoru

pod bidlami. Najmenej ich odpočívalo počas tmy na podlahe.

V ustajňovacej hale boli hniezda umiestnené pozdĺž pravej strany po vchode do haly. Sú skonštruované z dreveného materiálu. Dvojetážové hniezda sú postavené na vyvýšenom podstavci, uzatvorenom z materiálu drôtených ôk, ktorý zabraňuje pohybu nosníc pod hniezdami. Na každej etáži v rovnakej línii pred hniezdami je bidlo, na ktorom sedeli niektoré nosnice pred a niektoré po znesení vajca. Hniezda v ustajňovacej hale sú riešené tak, že jedno hniezdo je určené pre každých sedem nosníc.



Figure 6 Hniezda – The Nests (Foto: Zdechovanová, 2011)



Figure 7 Znášanie vajec do hniezda – Laying of the eggs in the nest (Foto: Zdechovanová, 2011)

Zber vajec sa realizuje manuálne dvakrát za deň a pri mladšom krdli aj častejšie. Pozberané vajcia sa sústreďujú v ďalšej budove vedľa ustajňovacej budovy, ktorá je vybavená zariadením triedenia, balenia a uskladňovania vajec. Po zbere sa vajcia jemne čistia od mechanických nečistôt a na triediacom stole sa rozdeľujú podľa hmotnosti. Označia sa, balia a krátkodobu sa uchovávajú v chladiacom boxe do vyskladnenia.

Výživa a kŕmenie produkčných nosníc

Krmivo bolo nosniciam podávané manuálne do kruhových krmidiel. Počet krmidiel bol rozmiestnený

v hale tak, aby jednej nosnici bola poskytnutá šírka (priestor pri kŕmidle) najmenej 4 cm. Napájanie nosníc pitnou vodou bolo zabezpečené kvapôčkovými napájadlami, ktoré boli umiestnené pri bidlách a nainštalované napevno rozvodmi.

Jedno napájadlo bolo riešené pre poskytovanie vody 10 nosniciam. Kŕmenie produkčných nosníc bolo *ad libitum*. V prvej fáze znášky (začiatok znášky do 42. týždňa veku nosníc) boli produkčné nosnice kŕmené kŕmnom zmesou práškovvej štruktúry s obsahom dusíkatých látok 165 g a metabolizovateľnej energie 11,5 MJ v jednom kilograme. V druhej fáze znášky (po 42. týždni veku nosníc) sa skrmovala kŕmna zmes so zníženým obsahom dusíkatých látok na 155 g a metabolizovateľnej energie na 11,2 MJ v jednom kilograme. Zároveň v druhej fáze znáškového cyklu sa do kŕmnej zmesi primiešavalo celé zrno ovsu v podiele 5 %.

Táto manipulácia s kŕmením má význam pre nosnice i pre farmára. Znížením dusíkatých látok a metabolizovateľnej energie sa ušetrí náklady na krmivo pre farmára a znížením obsahu dusíkatých látok a metabolizovateľnej energie s prídavkom 5 kg zrna ovsu ku 100 kg kŕmnej zmesi sa zabráni tučneniu nosníc.



Figure 9 Umiestnenie kruhových kŕmidiel v strede ustajňovacej haly – Location of the circular feeders in the middle laying hen hall (Foto: Zdechovanová, 2011)



Figure 10 Zrno ovsu vo vreci – Oats grain in the sack (Foto: Zdechovanová, 2011)

Produkčné ukazovatele nosníc

Priemerná intenzita znášky za celý znáškový cyklus počítaný od pohlavnej dospelosti produkčných nosníc ISA Brown 20 až 21 týždňov veku (asi 145 dni veku nosníc) do 11 až 12 mesiacov znášky, t. j. 50 až 51 týždňov (asi 500 dní od začiatku znášky) bola 84,60 %. Intenzita znášky na farme bola vysoká.

Table 1 Priemerná hmotnosť vajec – Average weight of the eggs

	n	\bar{x}	s	v_k
Hmotnosť vajec¹, g	300	62,30	5,18	8,31

n – počet prípadov – multiplicity, \bar{x} – aritmetický priemer – mean, s – smerodajná odchýlka – standard deviation, v_k – variačný koeficient – coefficient of variation
¹weight of the eggs

Priemerná hmotnosť vajec vo veku produkčných nosníc 42 týždňov bola 62,3 g. Kolísanie hodnôt hmotnosti vajec vyjadrených smerodajnou odchýlkou bolo s = 5,18 g a variačným koeficientom v_k = 8,31 %.

Vybrané ukazovatele chemického zloženia vajec

Table 2 Priemerný obsah sušiny vo vajcovej hmote – Average dry matter contents in egg mass

	n	\bar{x}	s	v_k
Obsah sušiny vo vajcovej hmote¹, g.100 g⁻¹	30	26,21	2,11	8,05

n – počet prípadov – multiplicity, \bar{x} – aritmetický priemer – mean, s – smerodajná odchýlka – standard deviation, v_k – variačný koeficient – coefficient of variation
¹dry matter contents of egg mass

Priemerný obsah sušiny vo vajcovej hmote bol 26,21 g.100 g⁻¹. Kolísanie hodnôt obsahu sušiny vo vajcovej hmote vyjadrených smerodajnou odchýlkou bolo s = 2,11 g.100 g⁻¹ a variačným koeficientom v_k = 8,05 %.

Table 3 Priemerný obsah bielkovín vo vajcovej hmote – Average protein contents in egg mass

	n	\bar{x}	s	v_k
Obsah bielkovín vo vajcovej hmote¹, g.100 g⁻¹	30	12,34	0,29	2,35

n – počet prípadov – multiplicity, \bar{x} – aritmetický priemer – mean, s – smerodajná odchýlka – standard deviation, v_k – variačný koeficient – coefficient of variation
¹protein contents of egg mass

Obsah bielkovín vo vajcovej hmote bol 12,34 g.100 g⁻¹. Kolísanie hodnôt obsahu bielkovín vo vajcovej hmote vyjadrených smerodajnou odchýlkou bolo s = 0,29 g.100 g⁻¹ a variačným koeficientom v_k = 2,35 %.

Table 4 Priemerný obsah tuku vo vajcovej hmote – Average fat contents in egg mass

	n	\bar{x}	s	v_k
Obsah tuku vo vajcovej hmote¹, g.100 g⁻¹	30	11,63	0,57	4,90

n – počet prípadov – multiplicity, \bar{x} – aritmetický priemer – mean, s – smerodajná odchýlka – standard deviation, v_k – variačný koeficient – coefficient of variation
¹fat contents of egg mass

Priemerný obsah tuku vo vajcovej hmote bol 11,63 g.100 g⁻¹. Kolísanie hodnôt obsahu tuku vo vajcovej hmote vyjadrených smerodajnou odchýlkou bolo s = 0,57 g.100 g⁻¹ a variačným koeficientom v_k = 4,90 %.

Table 5 Priemerný obsah cholesterolu vo vajcovom žĺtku – Average cholesterol contents in egg yolk

	n	\bar{x}	s	v_k
Obsah cholesterolu vo vajcovom žĺtku¹, g.100 g⁻¹	30	1,27	0,15	11,81

n – počet prípadov – multiplicity, \bar{x} – aritmetický priemer – mean, s – smerodajná odchýlka – standard deviation, v_k – variačný koeficient – coefficient of variation
¹cholesterol contents of egg yolk

Priemerný obsah cholesterolu vo vajcovom žĺtku bol 1,27 g.100 g⁻¹. Kolísanie hodnôt obsahu cholesterolu vo vajcovom žĺtku vyjadrených smerodajnou odchýlkou bolo s = 0,15 g.100 g⁻¹ a variačným koeficientom v_k = 11,81 %.

DISKUSIA

V Európskej únii prevládal chov produkčných nosníc v systéme konvenčných klietok v uzavretom priestore. Z chovu produkčných nosníc v systéme konvenčných klietok vznikli obavy o welfare, a to v dvoch rovinách: prostredie bez stimulov s obmedzujúcim priestorom v klietke obmedzovalo produkčné nosnice vo vykonávaní ich behaviorálnych potrieb (Mench, 1992; Taylor a Hurník, 1994; Duncan, 1998; Yue a Duncan, 2003) a obmedzený priestor bol hlavnou príčinou obmedzenia voľného prirodzeného pohybu (Appleby et al., 1992; Baxter, 1994). Obavy o sociálne správanie produkčných nosníc chovaných v batériových klietkach vyvolali kritiku a vznikli požiadavky na vykonanie preskúmania ustajňovacích systémov produkčných nosníc (Nicol a Dawkins, 1990; Schwabenbauer, 1999). V Európskej únii bola skúmaná otázka o zákaze chovu v batériovom klietkovom systéme vo všetkých členských krajinách, a to s platnosťou od 1. januára 2012. Do tohto obdobia bola venovaná pozornosť na hodnotenie welfare produkčných nosníc v modifikovanom systéme chovu, a to z hľadiska správania a fyziologických prejavov stresu (Lymbery, 2002; Yue a Duncan 2003). Pre návrh a tvorbu koncepcie sociálneho správania produkčných nosníc sú dôležité poznatky a informácie. Dôležité je určenie priority ukazovateľov. Keďže literárnych poznatkov je nedostatok na vytvorenie modelu, je tu priestor pre ďalšie skúmanie definovania a stanovenia priorít behaviorálnych potrieb produkčných nosníc. V súčasnosti existujúce systémy chovu produkčných nosníc sa vyznačujú určitými pozitívami, ale existujú aj negatíva. Pre systém chovu v uzavretých halách chýbajú podmienky pre prirodzené správanie, ako je hrabanie alebo pozorovanie okolia. V systéme chovu vo výbehu sú nedoriešené podmienky proti predátorom.

Na farme, ktorá bola predmetom nášho výskumu, boli produkčné nosnice chované v systéme s ekologickým zameraním. Ustajňovací priestor bol riešený v hale s podstielkou a kapacitou 1000 produkčných nosníc. Pre produkčné nosnice je používanie podstielky dôležitým ukazovateľom, pretože im slúži na hrabanie, ktoré je pre nich prirodzenou aktivitou. Ustajňovacia hala bola vybavená chovným zariadením a mikroklimatickými podmienkami v zmysle zlepšených životných podmienok. Pre odpočinok nosníc bol dodržaný čas 8 hodín. V hale nosnice mali neobmedzené podmienky pre voľný pohyb. Počas dňa, svetelného svitu sa nosnice voľne pohybovali ku krmidlu, napájadlu, po ploche haly, po bidlách a mali aj voľný prístup do výbehu, ktorý bol súčasťou systému chovu. Počas tmy v hale nosnice odpočívali hlavne sedením na bidle. Tento druh správania produkčných nosníc hybridnej kombinácie *ISA Brown* je porovnateľný so správaním ich divokých predkov, ako uvádzajú aj Appleby et al. (1993), Väisänen a Jensen (2003), podľa ktorých etológia domácich produkčných nosníc je porovnateľná s ich divokými predkami. Vo výbehu prejavovali produkčné nosnice iný druh správania. V časti výbehu s hlineným povrchom trávili produkčné nosnice väčšinu času popolením a hrabaním. V ďalšej časti výbehu s trávnaťm porastom sa nosnice voľne pohybovali, pozorovali okolie a menej často spásali trávny porast. Tieto druhy správania patria medzi prirodzené aktivity produkčných nosníc. Podľa nariadenie vlády Slovenskej republiky č. 736/2002 Z. z. zo dňa 11. decembra 2002, ktorým sa ustanovujú minimálne požiadavky na ochranu nosníc, takto pripravené podmienky pre chov produkčných nosníc sú stimulom. Stimuly v ustajňovacích priestoroch sú aplikované na zabránenie vzniku abnormálneho, náhradného správania. Abnormálne správanie je pre produkčné nosnice škodlivé, ktoré ohrozuje ich zdravie ale aj kvalitu produkcie. Výživa a zabezpečenie fyziologických potrieb produkčných nosníc je dôležitým ukazovateľom pre harmonizáciu vzťahov welfare. Tým, že pre produkčné nosnice sa vyrába kompletná krmná zmes, môže im byť predkladaná *ad libitum*. V hale mali produkčné nosnice neobmedzený prístup ku krmivu. Krmivo bolo predkladané nosniciam v kruhových krmidlách a každý druhý deň manuálne dopĺňané. Pre produkčné nosnice na farmách s ekologickým zameraním sa môže používať iba špeciálne krmivo bez syntetických krmných doplnkov. Existuje nedostatok výrobcov krmív pre ekologické chovy hospodárskych zvierat. Aj na tejto farme chovu produkčných nosníc boli zvýšené náklady na krmiva z dôvodu dovozu krmnej zmesi zo zahraničia. Pre udržanie vysokej znášky sa v chove produkčných nosníc uplatňuje tzv. dvojfázové kŕmenie. Tento druh manipulácie s krmivom sa používa na zabránenie tučneniu produkčných nosníc v druhej fáze znáškového cyklu, t. j. po 42. až 45. týždni ich veku. V prvej fáze znáškového cyklu, kedy je vyššia znáška vajec v porovnaní s druhou fázou znáškového cyklu, sa používala krmná zmes s obsahom dusíkatých látok 165 g a metabolizovateľnej energie 11,5 MJ v jednom kilograme. V druhej fáze znáškového cyklu sa používala krmná zmes so zníženým obsahom dusíkatých látok na 155 g a metabolizovateľnej energie 11,2 MJ v jednom kilograme. Počas druhej fázy znáškového cyklu sa do krmnej zmesi pridávalo zrno ovsa, ktoré sa vyznačuje vyšším obsahom

vlákniny v porovnaní s pšeniciou alebo kukuricou, ktoré tvoria základ kŕmnej zmesi pre produkčné nosnice. Produkčné nosnice chované na ekologickej farme, ktoré boli objektom skúmania sa vyznačujú vysokou intenzitou znášky. Za celý znáškový cyklus nad 11 mesiacov dosiahli znášku 84,60 %. Nosnice hybridnej kombinácie *ISA Brown* dosahujú podľa producenta pomerne vysokú znášku, 295 ks vajec do veku 500 dní od počiatočného stavu 145 dní veku, čo podľa našich prepočtov znamená intenzitu znášky 83,10 %. Poznatky potvrdené vo výskume podľa **Pérez-Bonilla et al. (2012a)**, ktorí sledovali intenzitu znášky počas celého znáškového cyklu ale u produkčných nosníc Lohman, bola v priemere 92,5 resp. 89,8 %. Priemerná hmotnosť vajec, ktorá bola zisťovaná na hodnotenej farme vo veku produkčných nosníc 42 týždňov, dosiahla 62,30 g. Podľa **Pérez-Bonilla et al. (2012a)** hmotnosť vajec bola 64,9, resp. 62,4 g alebo podľa **Pérez-Bonilla et al. (2012b)** sledovaná počas celého znáškového cyklu u produkčných nosníc Lohman bola 64,2 resp. 63,0 g pri opakovaní experimentu. Hodnoty vybraných ukazovateľov chemického zloženia vajca, ako je obsah sušiny, bielkovín, tuku a cholesterolu, ktoré sme získali v našom výskume, boli porovnateľné s výsledkami iných autorov (**Beyer a Jensen, 1989; Stadelman a Pratt, 1989; Herron a Fernandez, 2004**).

Z výsledkov dosiahnutých v našom výskume ako aj literárnych poznatkov vyplýva, že oblasť uplatňovania princípov welfare produkčných nosníc je otvorená pre ďalšie výskumné riešenie.

ZÁVER

Obavy o sociálne správanie produkčných nosníc chovaných v batériových klietkach vyvolali kritiku a vznikli požiadavky na vykonanie preskúmania ustajňovacích systémov chovu. Na základe výsledkov výskumu a poznatkov získaných na základe skúsenosti v chovoch produkčných nosníc pristúpila Európska únia ku zákazu používania systému chovu v konvenčných klietkach k 1. januáru 2012. Mnohé otázky zostávajú otvorené pre výskum.

Na základe zhodnotenia uplatňovania princípov welfare na farme produkčných nosníc, ich produkcie a vybraných ukazovateľov chemického zloženia vajec môžeme konštatovať nasledujúce:

- hodnotená farma produkčných nosníc bola ekologicky zameraná,
- na farme sa chovali nosnice hybridnej kombinácie kolorsexingového typu *ISA Brown*,
- ustajňovací priestor na farme bol riešený pre 1 000 kusov,
- ustajňovací priestor bol riešený pre voľný pohyb nosníc v hale a vo výbehu,
- podlaha v ustajňovacej hale bola riešená podstielkou, mechanicky upravenou slamou; jej hygiena bola udržiavaná doplnkovým podstielaním; počas voľného pohybu nosnice hrabali v podstielke, čo je pre nich prirodzená aktivita uspokojovania behaviorálnych potrieb,
- mikroklimatické podmienky (osvetlenie, dĺžka svetelného svitu a intenzita), teplota a vetranie boli v hale riešené v súlade s potrebami nosníc pre ich zlepšené životné podmienky,
- nosnice mali voľný prístup do výbehu počas celého znáškového cyklu; výbeh bol riešený hlinenou plochou,

v ktorej nosnice hlavne hrabali a popolili a plochou s trávnatým porastom, kde sa nosnice voľne pohybovali a preskúmavali okolie,

- vo výbehu bol umiestnený prístrešok, kŕmidlá a napájadlá pre neobmedzený prístup nosníc ku krmivu a vode,

- v ustajňovacej hale boli pozdĺž ľavej strany umiestnené bidlá v súlade s požiadavkami ich konštrukcie pre zlepšené životné podmienky; bidlá využívali nosnice počas dňa na voľný pohyb a za tmy v hale na nich odpočívali,

- v ustajňovacej hale pozdĺž pravej strany boli umiestnené dvojťažové hniezda z dreveného materiálu v súlade s požiadavkami na konštrukciu pre zlepšené životné podmienky,

- v strede ustajňovacej haly a vo výbehoch boli umiestnené kruhové kŕmidlá, ku ktorým mali nosnice neobmedzený prístup pre príjem krmiva; skrmovala sa kompletná kŕmna zmes určená pre produkčné nosnice, ktorá v prvej fáze znáškového cyklu obsahovala v jednom kilograme 165 g dusíkatých látok a 11,5 MJ metabolizovateľnej energie a v druhej fáze znáškového cyklu sa v ich kŕmnej zmesi v jednom kilograme znížil obsah dusíkatých látok na 155 g a metabolizovateľnej energie na 11,2 MJ; počas druhej fázy znáškového cyklu sa do kŕmnej zmesi pridávalo zrno ovsu v podiele 5 %; touto manipuláciou s výživou sa predchádzalo tučeniu nosníc,

- priemerná intenzita znášky počas znáškového cyklu bola 84,60 %,

- priemerná hmotnosť vajec vo veku nosníc 42 týždňov bola 62,30 g,

- priemerný obsah sušiny vo vajciach bol 26,21 g.100 g⁻¹ vajcovej hmoty, priemerný obsah bielkovín bol 12,34 g.100 g⁻¹ vajcovej hmoty, priemerný obsah tuku bol 11,63 g.100 g⁻¹ vajcovej hmoty a priemerný obsah cholesterolu bol 1,27 g.100 g⁻¹ vajcového žltka.

Na základe záverov spracovanej literatúry a výsledkov výskumu odporúčame ďalší výskum v oblasti welfare nosníc určených na produkciu konzumných vajec.

LITERATÚRA

Appleby, M. C., Hughes, B. O., Elson, H. A. 1992. *Poultry Production Systems: Behavior, Management and Welfare*. Wallingford, UK : CAB International.

Appleby, M. C., Smith, S. F., Hughes, B. O. 1993. Nesting, dust bathing and perching by laying hens in cages: Effect of design on behavior and welfare. In *Br. Poult. Sci.*, vol. 34, p. 835-847. <http://dx.doi.org/10.1080/00071669308417644> PMID:8156422

Appleby, M. C. 1998. The Edinburgh modified cage: Effects of group size and space allowance on brown laying hens. *J. Appl. Poult. Resear.*, vol. 7, p. 152-161.

Appleby, M. C., Walker, A. W., Nicol, C. J., Lindberg, A. C., Freire, R., Hughes, B. O., Elson, H. A. 2002. Development of furnished cages for laying hens. *Brit. Poult. Sci.*, vol. 43, p. 489-500. <http://dx.doi.org/10.1080/000716602200004390> PMID:12365505

Baxter, M. R. 1994. The welfare problems of laying hens in battery cages. *Vet. Rec.*, vol. 134, p. 614-619. <http://dx.doi.org/10.1136/vr.134.24.614> PMID:7941260

Beyer, R. S., Jensen, L. S. 1989. Overestimation of the cholesterol content of eggs. *Journal of Agriculture and Food*

- Chemistry, vol. 37, no. 4, p. 917-920. <http://dx.doi.org/10.1021/jf00088a020>
- Board, R. G. 1969. The microbiology of the hen's egg. *Adv. Appl. Microbiol.*, vol. 11, p. 245-281. [http://dx.doi.org/10.1016/S0065-2164\(08\)70612-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0065-2164(08)70612-9)
- Braden, C. R. 2006. *Salmonella enterica* serotype *Enteritidis* and eggs: A national epidemic in the United States. *Clin. Infect. Dis.*, vol. 43, p. 512-517. <http://dx.doi.org/10.1086/505973> PMID:16838242
- CEC. 1999. Council Directive No. 74/1999/EC of 19 July 1999 laying down minimum standards for the protection of laying hens. *Official Journal of the European Communities*, L 203.
- Council of the European Union, 2006. *Council Regulation (EC) No. 1028/2006 of 19 June 2006 on marketing standards for eggs*.
- Daza, A., Mateos, A., Rey, A. I., Ovejero, I., Lopez-Bote, C. J. 2007. Effect of duration of feeding under free-range conditions on production results and carcass and fat quality in Iberian pigs. *Meat Sci.*, vol. 76, p. 411-416. <http://dx.doi.org/10.1016/j.meatsci.2006.10.004> PMID:22060982
- Duncan, I. J. 1998. Thirty years of progress in animal welfare science. *J. Appl. Anim. Welf. Sci.*, vol. 1, p. 151-154.
- Elson, H. A., Croxall, R. A. 2006. European study on the comparative welfare of laying hens in cage and non-cage systems. *Europ. Poult. Sci.*, vol. 70, p. 194-198.
- Elson, H. A., Tauson, R. 2011. Furnished cages for laying hens. *Alternative Systems for Poultry - Health, Welfare and Productivity*. Oxford : CABI.
- European Communities. 2000. European Communities proposal: Animal welfare and trade in agriculture. WTO Committee on Agriculture, Special Session, Paper G/AG/NG/W/19. Geneva. Switzerland: World Trade Organization.
- European Commission, 2003. *Commission Regulation No. 2295/2003/EC of December 23, 2003, introducing detailed rules for implementing Council Regulation No. 1907/1990/EEC on certain marketing standards for eggs*.
- Fredriksson, S., Elwinger, K., Pickova, J. 2006. Fatty acid and carotenoid composition of egg yolk as an effect of microalgae addition to feed formula for laying hens. *Food Chem.*, vol. 99, p. 530-537. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.08.018>
- Halachmi, I. 2000. Designing the optimal robotic milking barn, part 2: Behavior-based simulation. *J. Agric. Eng. Res.*, vol. 77, p. 67-79. <http://dx.doi.org/10.1006/jaer.2000.0563>
- Harman, N. L., Leeds, A. R., Griffin, B. A. 2008. Increased dietary cholesterol does not increase plasma low density lipoprotein when accompanied by an energy-restricted diet and weight loss. *Europ. J. Nutr.*, vol. 47, no. 6, p. 287-293. <http://dx.doi.org/10.1007/s00394-008-0730-y> PMID:18726564
- Harrison, R. 1964. *Animal machines*. London : Stuart.
- Herron, K. L., Fernandez, M. L. 2004. Are the current dietary guidelines regarding egg consumption appropriate? *J. Nutr.*, vol. 134, no. 1, p. 187-190.
- Ingr, I., Simeonová, J. 1983. Rýchle stanovení cholesterolu ve vaječném žloutku Bio-la-testem. *Veterinary Medicine - Czech*, vol. 28, p. 97-104.
- Karadas, F., Wood, N. A. R., Surai, P. F., Sparks, N, H. C. 2005. Tissue specific distribution of carotenoids and vitamin E in tissues of newly hatched chicks from various avian species. *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.*, vol. 140, p. 506-511. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpb.2005.03.002> PMID:15936711
- Koelkebeck, K. W. 1999. What Is Egg Quality and Conserving It? University of Illinois [online]. [cit. 2013-06-14]. Retrieved from the web: <http://www.livestocktrail.illinois.edu/poultrynet/paperDisplay.cfm?ContentID=522>.
- Koelkebeck, K. W., Anderson, K. E. 2007. Molting layers-alternative methods and their effectiveness. *Poult. Sci.*, vol. 86, p. 1260-1264. PMID:17495103
- Kramer, A. 1951. *What is quality and how can it be measured: From a food technology point of view. Market Demand and Product Quality*. Mktg. Res : Workshop Rept., Michigan State College.
- Lymbery, P. 2002. *Laid bare: The case against enriched cages in Europe*. Petersfield, UK : Compassion World Farming.
- Maurice, D. V., Lightsey, S. F., Hsu, K. T., Gaylord, T. G., Reddy, R. V. 1994. Cholesterol in eggs from different species of poultry determined by capillary GLC. *Food Chemistry*, vol. 50, p. 367-372. [http://dx.doi.org/10.1016/0308-8146\(94\)90206-2](http://dx.doi.org/10.1016/0308-8146(94)90206-2)
- Mench, J. A. 1992. The welfare of poultry in modern production systems. *Poult. Sci. Rev.*, vol. 4, p. 107-128.
- Metodický k analytickým laboratořím. 2009. UTB, Zlín.
- Nariadenie vlády Slovenskej republiky č. 736/2002 Z. z. zo dňa 11. decembra 2002, ktorým sa ustanovujú minimálne požiadavky na ochranu nosníc*.
- Nariadenie vlády Slovenskej republiky o ochrane zvierat chovaných na farmárske účely (v znení č. 368/2007 Z. z.)*.
- Naviglio, D., Gallo, M., Le Grottaglie, L., Scala, C., Ferrara, L., Santini, A. 2011. Determination of cholesterol in Italian chicken eggs. *Food Chemistry*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.11.002>
- Nicol, C., Dawkins, M. S. 1990. Homes fit for hens. *New Sci.*, vol. 125, p. 46-51.
- Pandey, N. K., Panda, B., Maitra, D. N., Mahapatra, C. M. 1989. The influence of strain, age and season on cholesterol, vitamin A and fatty acid contents of egg. *Journal of Food Science Technology*, vol. 26, p. 161-163.
- Pérez-Bonilla, A., Jabbour, C., Frikha, M., Mirzaie, S., Garcia, J., Mateos, G. G. 2012a. Effect of crude protein and fat content of diet on productive performance and egg quality traits of brown egg-laying hens with different initial body weight. *Poult. Sci.*, vol. 91, no. 6, p. 1400-1405. <http://dx.doi.org/10.3382/ps.2011-01917>
- Pérez-Bonilla, A., Novoa, S., García, J., Mohiti-Asli, M., Frikha, M., Mateos, G. G. 2012b. Effects of energy concentration of the diet on productive performance and egg quality of brown egg-laying hens differing in initial body weight. *Poult. Sci.*, vol. 91, no. 12, p. 3156-3166. <http://dx.doi.org/10.3382/ps.2012-02526>
- Riad, S. A., Kicka, M. A. M., Osman, M. A., Kamar, G. A. R. 1981. Yolk cholesterol in eggs from various avian species. *Egyptian Journal of Animal Production*, vol. 21, p. 51-55.
- Scientific Veterinary Committee. 1996. Report on the welfare of laying hens. Brussels, Belgium : Commission of the European Communities Directorate-General for Agriculture VI/B/II.2.
- Sherwin, C. M., Richards, G. J., Nicol, C. J. 2010. Comparison of the welfare of layer hens in four housing systems in the UK. *British Poultry Science*, vol. 51, p. 488-499. <http://dx.doi.org/10.1080/00071668.2010.502518> PMID:20924842
- Schwabenbauer, K. 1999. Keeping systems of laying hens in the future. The Commission's Proposal for a Council Directive laying down minimum standards for the protection of laying hens kept in various systems of rearing. *Dtsch.*

Tieraerztl. Wochenschr., vol. 106, p. 157-160. [PMid: 10354646](#)

Spence, J. D., Jenkins, D. J., Davignon, J. 2010. Dietary cholesterol and egg yolks: Not for patients at risk of vascular disease. *Canadian Journal Cardiology*, vol. 26, no. 9, p. 336-339. [http://dx.doi.org/10.1016/S0828-282X\(10\)70456-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0828-282X(10)70456-6) [PMid:21076725](#)

Stadelman, W. J., Pratt, D. E. 1989. Factors influencing composition of the hen's egg. *World's Poult. Sci. J.*, vol. 45, p. 247-266. <http://dx.doi.org/10.1079/WPS19890016>

Surai, P. F., Sparks, N. H. C. 2001. Designer eggs: from improvement of eggs composition to functional food. *Trends Food Sci. Technol.*, vol. 12, p. 7-16. [http://dx.doi.org/10.1016/S0924-2244\(01\)00048-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0924-2244(01)00048-6)

Taylor, A. A., Hurnik, J. F. 1994. The effect of long-term housing in an aviary and battery cages on the physical condition of laying hens: Body weight, feather condition, claw length, foot lesions, and tibia strength. *Poult. Sci.*, vol. 73, p. 268-273. <http://dx.doi.org/10.3382/ps.0730268> [PMid: 7908429](#)

United Egg Producers. 2011. Historic agreement hatched to set National Standard for nation's egg industry [online]. [cit. 2013-03-27]. Retrieved from the web: <http://showbirdbid.proboards.com/thread/2331>.

USDA (United States Department of Agriculture). 1975. Composition of foods raw, processed, prepared. *Agriculture Handbook*, no. 8. Washington DC, USA: Agricultural Research Service. 146 p.

USDA (United States Department of Agriculture). 1976. Composition of foods dairy and egg products: raw, processed and prepared. *Agriculture Handbook*, no. 8-1. Washington DC, USA : Agricultural Research Service.

Väisänen, J., Jensen, P. 2003. Social versus exploration and foraging motivation in young red jungle fowl (*Gallus gallus*) and White Leghorn layers. *Appl. Anim. Behav. Sci.*, vol. 84, p. 139-158. <http://dx.doi.org/10.1016/j.applanim.2003.07.001>

Wolffram, R., Simons, J., Giebel, A., Bongaerts, R. 2002. Impacts of stricter legal standards in the EU for keeping laying hens in battery cages. *World's Poult. Sci. J.*, vol. 58, p. 365-370. <http://dx.doi.org/10.1079/WPS20020029>

Zemková, L., Simeonovová, J., Lichovníková, M., Somerlíková, K. 2007. The effects of housing systems and age of hens on the weight and cholesterol concentration of the egg. *Czech Journal Animal Science*, vol. 52, no. 4, p. 110-115.

Yue, S., Duncan, I. J. H. 2003. Frustrated nesting behavior: Relation to extra-cuticular shell calcium and bone strength in White Leghorn hens. *Br. Poult. Sci.*, vol. 2, p. 175-181. <http://dx.doi.org/10.1080/0007166031000088334> [PMid: 12828201](#)

Acknowledgments:

This work was supported by grant VEGA 1/0007/11.

Contact address:

prof. Ing. Mária Angelovičová, CSc., Slovak University of Agriculture in Nitra, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Department of Food Hygiene and Safety, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovakia, E-mail: maria.angelovicova@gmail.com.

Ing. PhDr. Martin Mellen, PhD., Slovak University of Agriculture in Nitra, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Department of Food Hygiene and Safety, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovakia, E-mail: martin.mellen@gmail.com.

Ing. Jana Zdechovanová, Slovak University of Agriculture in Nitra, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Department of Food Hygiene and Safety, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovakia, E-mail: zdechovanova.janka@gmail.com.

EVALUATION OF ANTHOCYANIN CHANGES IN BLUEBERRIES AND IN BLUEBERRY JAM AFTER THE PROCESSING AND STORAGE

Andrea Mendelová, Ľubomír Mendel, Martina Fikselová, Peter Czako

ABSTRACT

Blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) is worldwide famous as the healthy and desirable fruit. The most valuable nutritional components of fruits are polyphenols, which include anthocyanins. The aim of the study was to assess the content of anthocyanin dyes in selected varieties of blueberry fruit. We evaluated the changes in the content of colorants that occur after treatment for fruit jam and its subsequent storage at 21°C under the light. Varieties Ramcocas, Record, Iranka, Nelson, Pemberton, Jersey and Coville were observed. Content of anthocyanins was determined spectrophotometrically. In fresh fruits anthocyanin content ranged from 9.878 g kg⁻¹ of dry matter (Jersey variety) to 18.555 g kg⁻¹ of dry matter (Nelson variety). After treatment there was found a decrease in the anthocyanins content, in the product's content were determined in the amount 1.645 g kg⁻¹ of dry matter (Jersey variety) to 3.476 g kg⁻¹ of dry matter (variety Ramcocas). The decrease was due to decomposition of anthocyanins at high temperatures in processed products and also by the replacement of dry matter by sucrose in the product. Mean color decrease in blueberry jam was 84.5%. After storage of the product, there were found further degradations of colorants, evaluated at 34.9%. The content of anthocyanin in jam was found to be 1.089 g kg⁻¹ of dry matter (Jersey variety) to 2.199 g kg⁻¹ of dry matter (Ramcocas variety).

Keywords: blueberry; anthocyanin; jam

INTRODUCTION

Blueberries are fruits native to the North America. The different parts of the plants have been used in the treatment, but also in the preparation of foods. As useful plant, the blueberries have started to be cultivated only in the 20th century. In the world the leadership in their growing has USA, in Europe are grown mainly in Germany and Poland. In Slovakia blueberries can be found mainly in the northern regions of Orava and Turiec (Šimala, 2007).

As reported Ochmian et al. (2009) berries of blueberries are unique in appearance, taste and flavoring properties as well as nutritionally important substances. Their important nutritional properties are attributed mainly to phenolic substances (Vollmanová et al., 2009; Krikorian et al., 2010). As reported Burdulis et al. (2007), Riihinen et al. (2008) and Habánová et al. (2013) blueberry is a rich source of polyphenols and antioxidants, including tannins, phenolic acids, flavonols and anthocyanins. Blueberries in comparison with other kinds of small fruits contain a wide range of anthocyanins. In the fruit dominate malvinidin and delphinidin, in lower concentrations are represented peonidin, cyanidin and petunidin. Phenolics of the colorants are attached to the glucoside, galactoside or arabinoside (Nicoue et al., 2007; Scalzo et al., 2009). Fruits are also a good source of fiber, and are very low in fat and sodium. They contain vitamins C and A, iron, magnesium and potassium. These compounds have high antioxidant activity and strongly support the natural defenses of the human body (Petii and Scully, 2009).

For high health-promoting active components are fruit

used in supportive treatment of cardiovascular, neurodegenerative, oncological and other diseases of civilization (Basu et al. 2010; Michalská et al., 2010; Mateos et al., 2012; Navas et al., 2012).

Fresh fruits are characterized by short shelflife. An important part of the production of blueberries is therefore to put them on the market in processed fruit products. Popular product is blueberry jam. Color of the jam is one of the fundamental attributes of the acceptability of the product among consumers (Connor et al, 2002; Ścibisz and Mitek, 2009). In production the primary objective is minimizing the loss of the original content of anthocyanins. It is generally known that anthocyanins are unstable due to processing and storage. The stability is affected by temperature, pH, water activity, presence of carbohydrates and enzymatic activity (Lee and Wrolstad, 2006).

As reported Haffner et al. (2003), Kim and Zakour (2004) among the most important factors that affect the quality of blueberry jam are quality and ripeness of the raw material, product composition, boiling time and method of preservation and also the storage conditions of the finished product.

The aim of the study was to assess the content of anthocyanins in different varieties of blueberry and observing their stability after processing for jam and after its subsequent storage at 21°C under the light.

MATERIAL A METHODOLOGY

In this work, 7 blueberry varieties were evaluated, that originated from research station in Kriva na Orava. The

research station is located at an altitude of 700 m a.s.l., the area has an average annual temperature of 6°C, average annual rainfall is 800–900 mm, the soil is sandy-loam with pH 3.8. Acidic pH is an important factor in the successful cultivation of these crops.

The experiment included early varieties: Ramcocas and Record, medium early varieties: Iranka, Nelson, Pemberton, Jersey and late variety: Coville. Blueberry fruits were harvested at the stage of full coloring. Collecting of fruit was hand made.

Jam was prepared by classic procedure, the product was concentrated by addition of sucrose and boiled at common atmospheric pressure. The addition of sugar was determined by the difference of the required soluble dry matter of the finished product and raw materials. Pectin preparation was used and to adjust the acidity, citric acid was added. Boiling of jam was fast, with a maximum duration of three minutes. The finished product was filled into glass containers. The product was stored for 6 months at 21°C in the light.

The content of anthocyanins was determined spectrophotometrically. Homogenised samples were extracted in ethanol solution with the addition of 0.01% hydrochloric acid. Repeated extraction of samples to complete discoloration went under hot conditions. The content of anthocyanins was then determined by measuring the absorbance of the UV-VIS spectrophotometer Jenway at a wavelength of 543 nm.

Dry matter content of all samples was assessed by gravimetric method. Homogenized samples were dried to constant weight at 105°C in laboratory oven WTC Binder. Analyses were performed in triplicate.

The results were processed by the statistical program Statistica. Effect of variety on the content of anthocyanins was observed by the one-way analysis of variance, the effect of treatment on changes in the content of anthocyanins by two-factor analysis of variance and the differences among varieties were tested by the Fisher test.

RESULTS AND DISCUSSION

The total content of anthocyanins observed in the varieties ranged from 1.932 g kg⁻¹ to 3.945 g kg⁻¹ of fresh matter. Fresh fruit varieties by decreasing values of colorants can be ordered as follows: Ramcocas > Nelson > Coville > Iranka > Pemberton > Record > Jersey.

Our results correspond with the results of the work **Wu et al. (2006)**, who report that the content of anthocyanin in blueberries ranges from 2.5 to 4.95 g kg⁻¹. Similar results reached **Cho et al. (2004)**, who reports the content of anthocyanins in the range of 1.43 to 8.22 g kg⁻¹. The measured values were compared to the average values from 0.45 to 1.25 g kg⁻¹, indicated by **Ścibisz and Mitek (2007)** much higher. **Stevenson and Scalzo (2012)** observed content of anthocyanins in cultural varieties of blueberries grown in different countries e.g. New Zealand, Canada, China, USA, Poland, Italy. They found that the locality of cultivation has extremely great influence on the content of anthocyanins. Four varieties varying widely in reporting parameter, authors identified a variety Duke, in which the colorant content ranged from 1.01–2.16 g kg⁻¹, Elliott (1.52–2.61 g kg⁻¹), Climax (0.99–2.56 g kg⁻¹) and Powderblue (1.65–2.43 g kg⁻¹).

On the basis of the average values of the monitored localities they tried to identify varieties with the highest content of anthocyanin pigments. Among the 10 best performing varieties were included varieties Rubel (2.9 g kg⁻¹), Darrow (2.87 g kg⁻¹), Elliot (2.61 g kg⁻¹), Northland (2.38 g kg⁻¹), Duke (1.89 g kg⁻¹), Jersey (1.85 g kg⁻¹), Caroline Blue (1.54 g kg⁻¹), Nui (1.49 g kg⁻¹), Hortblue Poppins (1.39 g kg⁻¹) and Blue Moon (1.39 g kg⁻¹).

In our work, we used the best variety Jersey, in which we analyzed the content of anthocyanins in the amount of 1.93 g kg⁻¹, the result is comparable with findings of **Stevenson and Scalzo (2012)**.

To objectively comparison of fresh fruit and jam we converted anthocyanins to dry matter content. Dry matter of fresh blueberry fruit was 22.6% (Ramcocas) to 17.8% (Iranka). The highest content of anthocyanins, calculated per the dry matter content was determined at Nelson 18.56 g kg⁻¹ and the lowest was measured at variety Jersey, 9.88 g kg⁻¹.

By decreasing amounts of anthocyanins in fresh fruits calculated per dry matter, varieties can be ordered as follows: Nelson > Ramcocas > Iranka > Pemberton > Coville > Record > Jersey (Fig. 1).

One-way analysis of variance showed that the variety has a statistically significant effect on the anthocyanin content ($P < 0.01$). By use of Fisher's LSD test ($P < 0.05$) were observed relative differences in the content of colorants in different varieties. Fresh fruit varieties created 5 homogeneous groups, which differed in the content of the monitored components (Table 1).

Variety Nelson showed statistically significantly the highest content of anthocyanins and variety Jersey significantly the lowest. Most balanced group of varieties in anthocyanin content was determined group, which consists of variety Coville, Pemberton, Iranka and Ramcocas, among which is found no statistically significant difference in the content of anthocyanins in fresh fruits.

Evaluation of anthocyanin content of blueberry jam showed the highest content in sample from variety Ramcocas 2.294 g kg⁻¹ and the lowest in sample of the variety Jersey 1.127 g kg⁻¹. By decreasing of colorants content in blueberry jam, varieties can be ordered as follows: Ramcocas > Pemberton (1.907 g kg⁻¹) > Nelson (1.815 g kg⁻¹) > Iranka (1.591 g kg⁻¹) > Record (1.524 g kg⁻¹) > Coville (1.154 g kg⁻¹) > Jersey.

Ścibisz and Mitek (2007) monitored the content of anthocyanins in blueberry jam prepared from a variety Bluecop. In the fresh fruit was determined the content of colorants in the amount of 0.946 g kg⁻¹, in jam with high sugar content 0.32 g kg⁻¹, and jam with low sugar and sugar free only 0.28 g kg⁻¹, that are several times lower than the value we found in our work.

Bluecop variety was observed by **Ehlenfeldt and Prior (2001)** who found the content of anthocyanins in jam 1.82 g kg⁻¹, this value is comparable with our findings. **Rdboten et al. (2005)** compared the color of blueberry jam made from fruit of blueberries *Vaccinium myrtillus* L. and *Vaccinium corymbosum* L. of varieties Berkley and Bluecop from northern Norway.

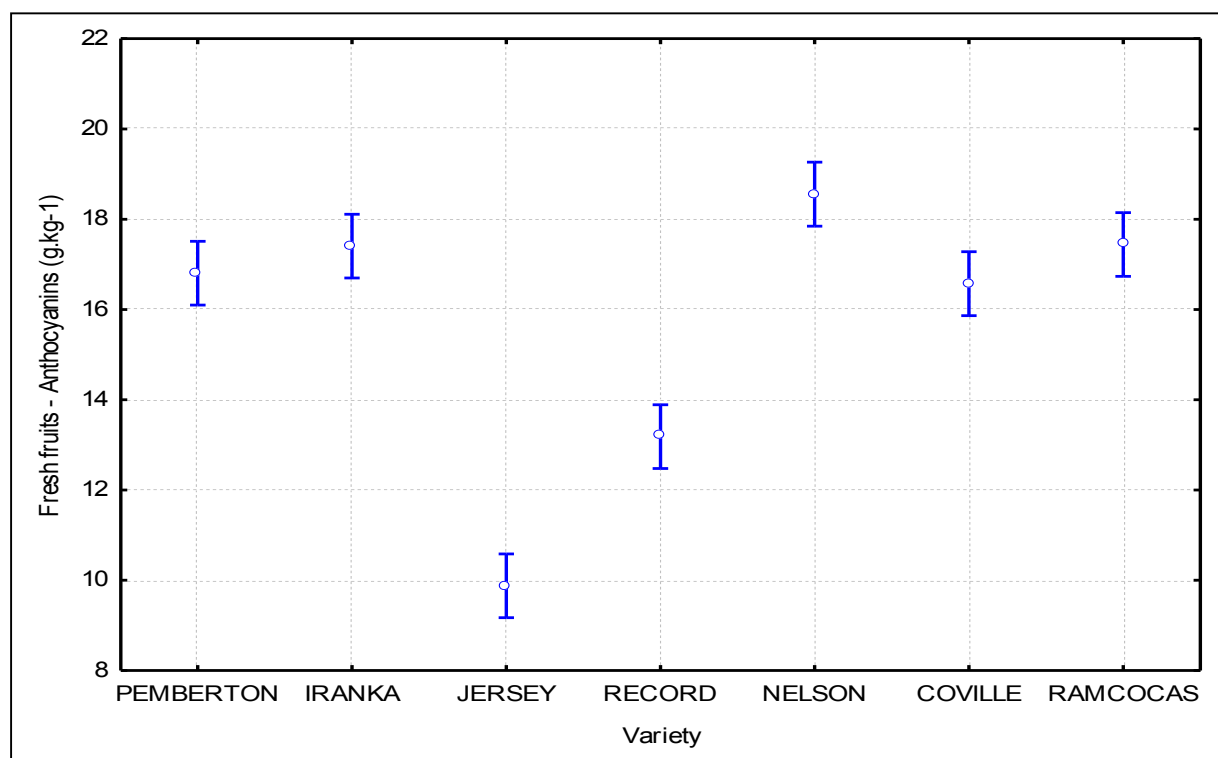


Figure 1 Comparison of average content of anthocyanins (g kg^{-1} dry matter) in fresh blueberry fruits

Table 1 Mean content of anthocyanins (g kg^{-1} dry matter) in fresh blueberry fruits and blueberry jams

Fresh fruit		Jam	
variety	Anthocyanins (g kg^{-1} dry matter)	variety	Anthocyanins (g kg^{-1} dry matter)
Jersey	9.8781 ^a	Jersey	1.6452 ^a
Record	13.1826 ^b	Coville	1.7861 ^b
Coville	16.5724 ^c	Record	2.1616 ^c
Pemberton	16.8033 ^c	Iranka	2.3298 ^d
Iranka	17.4041 ^c	Pemberton	2.6748 ^c
Ramcocas	17.4393 ^c	Nelson	2.8579 ^f
Nelson	18.5553 ^d	Ramcocas	3.4756 ^e

They found a higher color in jams made from fruits of wild blueberries than in cultural varieties of fruits, but also point to the high nutritional and health quality jam made from various types and forms of blueberries.

Schmidt et al. (2005) observed antioxidant activity, polyphenol content and the content of anthocyanins in cultural fruits of large-fruited blueberries (*Vaccinium corymbosum* L.) and in wild fruit (*Vaccinium angustifolium* Ait.) in various products such as frozen fruits, jams, juices, concentrates, dried fruits and freeze dried. In both they found a decrease in selected parameters, in case it was used high temperature at processing technology. Similar findings state Oliveira et al. (2010), who show that the decomposition of anthocyanins is running at 70°C.

Wrolstadt et al. (2005) in their work report decreases of anthocyanins compared blueberry jam to fresh fruit of 81-84%. Similar observations reached Šavikin et al. (2009), who report a decrease in jam anthocyanins up to 85%. Pinto et al. (2007) and Brownmiller et al. (2008) state that anthocyanins are very sensitive to temperature, and the combination of temperature - time can cause a significant loss of colorants in the finished product. Loss of monomeric anthocyanins is mostly result of a consequence of polymers or condensation reactions between anthocyanins and procyanidins in the preparation of jams and also during storage of finished products.

The content of dry matter in the prepared blueberry jam ranged from 63.5 to 71.3%. The lowest values were at Nelson variety and the highest at Pemberton. By

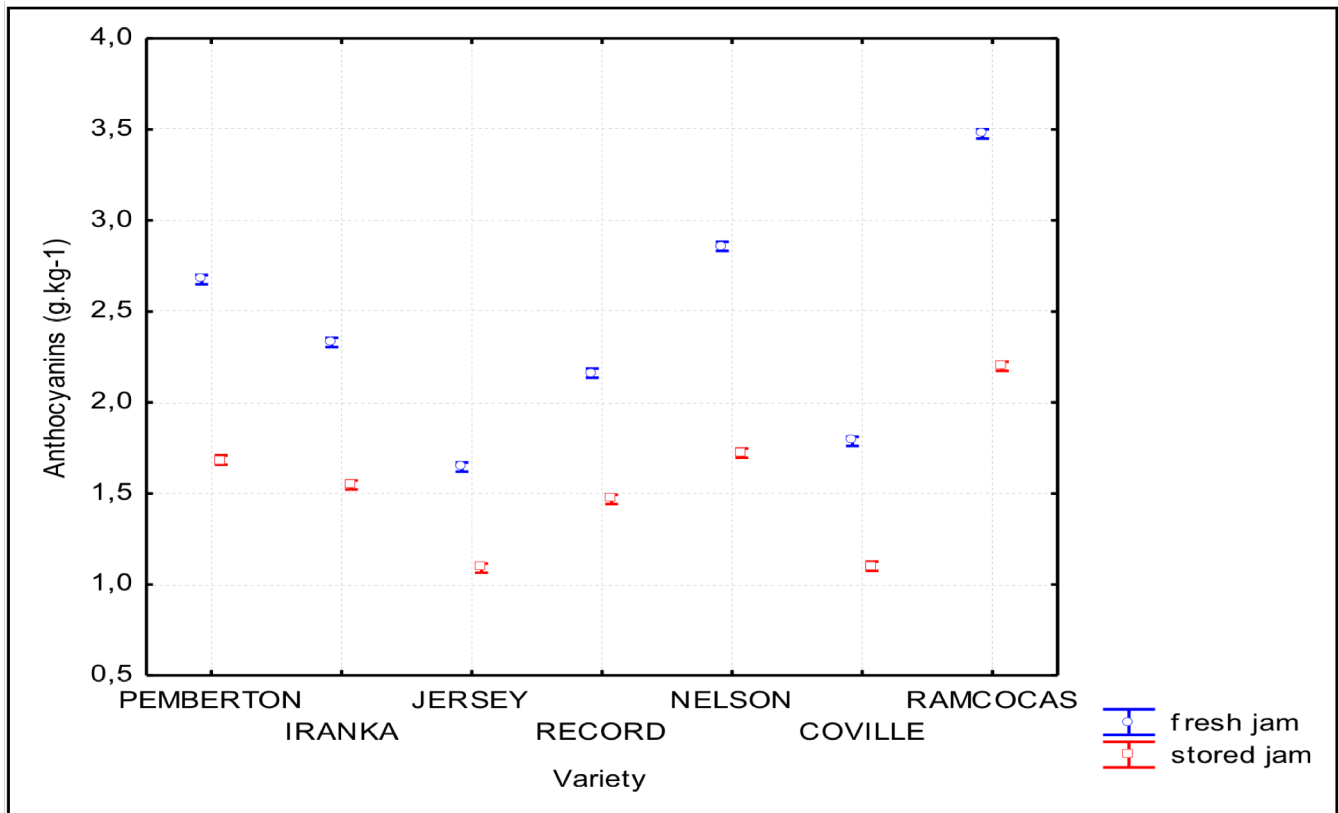


Figure 2 Comparison of mean content of anthocyanins (g kg⁻¹ dry matter) in blueberry jam

Table 2 Statistical significance of the effect of variety and storage on the content of anthocyanins in blueberry jam by the two-factor analysis of variance

Source of variability	Sum of Squares	df	Mean Square	F
A:storage	8.03703	1	8.03703	422.97**
B:variety	9.37793	6	1.56299	82.26**
Error	0.646046	34	0.0190014	
Total	18.061	41		

** statistically significant at P<0.01; df - degree of freedom; n=42

decreasing levels of anthocyanins in jam after a dry matter conversion, observed varieties can be ordered as follows: Ramcocas > Nelson > Pemberton > Iranka > Record > Coville > Jersey (Table 1). By Fisher's LSD test we found that all jams made from different varieties statistically significantly differed in the content of anthocyanins.

The content of dry matter in the prepared blueberry jam ranged from 63.5% to 71.3%. The lowest amount was at Nelson variety and the highest at Pemberton. By decreasing the levels of anthocyanins in jam after a dry matter conversion, we can classify the varieties in the order: Ramcocas> Nelson> Pemberton> Iranka> Record> Coville> Jersey (Table 1). Fisher's LSD test showed that all jams made from different varieties are statistically significantly different in the content of anthocyanins.

The content of anthocyanins in blueberry jam after 6 months of storage ranged from 0.713 g kg⁻¹ of fresh matter in variety Coville to 1.459 g kg⁻¹ in variety Ramcocas. After a dry matter calculation, we determined the content of anthocyanins from 1.089 g kg⁻¹ of dry matter

in the jam of Jersey to 2.199 g kg⁻¹ of dry matter in variety of Ramcocas jams (Figure 2). During storage of jam a further reduction of the content of anthocyanins occurs.

Decrease of anthocyanins in jam after storage ranged from 32.12% in jam of Record variety to 39.77% for variety Nelson. The average decrease of anthocyanins in blueberry jam during storage was 35.93%. Häkkinen et al. (2000) indicate that during the six months of storage jam contained 87% anthocyanins compared to the original amount of anthocyanins, which are higher than the values we found in our work.

Statistical processing of the data obtained on the content of anthocyanins in blueberry jam and blueberry jam after storage showed statistically significant effect of variety from which jam is prepared and storage as well on the content of anthocyanins (Table 2).

Our findings also confirmed Brownmiller et al. (2008), who indicated that in jam the content of anthocyanins during storage decreases. They state that the jam without sugar preserves higher values of anthocyanins than jam with

added sugar. Losses of anthocyanins are smaller in jams stored at low temperatures. Howard et al. (2010) observed changes in the content of flavonoids and antioxidant activity in blueberry jam prepared with sugar and without sugar. The primary treatment caused a significant loss of anthocyanins, polyphenols, chlorogenic acids, but flavonols were relatively well preserved. Jams were then evaluated after 6 months and it was found that jams, stored at 4°C maintained higher levels of anthocyanins, and have less color changes than jams, which were stored at 25°C.

CONCLUSION

Blueberry is valuable fruit crop, highly evaluated for the nutritional and sensory value. In our work, we evaluated the content of anthocyanins in selected varieties of blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) cultivated at the research station in Kriva na Orava. Fruits were evaluated as fresh and also as blueberry jams prepared, which were assessed immediately after treatment and after 6 - month storage at 21°C in the light. Our aim was to study the changes in anthocyanins that occur after processing and during storage. In terms of the content of anthocyanins in fresh fruits we consider the most valuable medium early variety Nelson.

After processing of fruits for jam we found that the products maintained on average 15.5% of colorants. The content of anthocyanins in blueberry jam ranged from 1.645 to 3.476 g kg⁻¹ of dry matter. The highest content was found in the product made from variety Ramcocas. During storage of jam further loss of anthocyanins occurred, the average decrease was evaluated at 35.93%.

REFERENCES

- Basu, A., Rhone, M., Lyons T. J. 2010. Berries: emerging impact on cardiovascular health. *Nutr. Rev.*, vol. 68, no. 3, p. 168-177. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1753-4887.2010.00273.x> PMID:20384847
- Brownmiller, C., Howard, L., Prior, R. 2008. Processing and storage effects on monomeric anthocyanins, percent polymeric color, and antioxidant capacity of processed blueberry products. *Journal Food Science*, vol. 73, no.5, p. H72-H79. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1750-3841.2008.00761.x>
- Burdulis, D., Ivanauskas, L., Diršė, V., Kazlauskas, S., Ražukas, A. 2007. Study of diversity of anthocyanin composition in bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) fruits. *Medicina*, vol. 43, p. 971-977. PMID:18182842
- Connor, A., Luby J., Hancock, J., Berkheimer, S., Hanson, E. 2002. Changes in fruit antioxidant activity among blueberry cultivars during cold-temperature storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 50, p. 893-898. <http://dx.doi.org/10.1021/jf011212y> PMID:11829664
- Ehlenfeldt, M., Prior, R. 2001. Oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and phenolic and anthocyanin concentration in fruit and leaf tissues of highbush blueberry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 49, p. 2222-2227. <http://dx.doi.org/10.1021/jf0013656>
- Habánová, M., Habán, M., Chlebo, P., Schwarzová, M. 2013. Changes of plasma lipids in to the regular consumption of bilberries (*Vaccinium myrtillus* L.). *Potravinarstvo*, vol. 7, no.1, p. 1-6. <http://dx.doi.org/10.5219/233>
- Häkkinen, S., Heinonen, M., Karenlampi, S., Mykkanen, H., Suuskanen, J. 2000. Screening of selected flavonoids and phenolic acids in 19 berries. *Food Research International*, vol. 32, p. 345-353. [http://dx.doi.org/10.1016/S0963-9969\(99\)00095-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0963-9969(99)00095-2)
- Haffner, K., Finstad Bye, M. B., Rosenfeld, H. J., Skrede G. 2003. Color of raspberry jam as influenced by cultivar, temperature and light during storage. *ISHS Acta Horticulturae 628: XXVI International Horticultural Congress: Issues and Advances in Postharvest Horticulture*, p. 829-834.
- Howard, L., Castrodale, Ch., Brownmiller, C., Mauromoustakos, A. 2010. Jam processing and storage effects on blueberry polyphenolics and antioxidant capacity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 58, no. 7, p. 4022-4029. <http://dx.doi.org/10.1021/jf902850h> PMID:20055410
- Cho, M. J., Howard, L. R., Prior, L. R., Clark, J. R. 2004. Flavonoid glycosides and antioxidant capacity of various blackberry, blueberry and red grape genotypes determined by high-performance liquid chromatography/mass spectrometry. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, vol. 84, no. 13, p. 1771-1782. <http://dx.doi.org/10.1002/jsfa.1885>
- Kim D. O., Padila-Zakour O. I. 2004. Jam processing effect on phenolics and antioxidant capacity in anthocyanin-rich fruits: cherry, plum and raspberry. *Journal of Food Science*, vol. 69, no. 9, p. 396-400. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2621.2004.tb09956.x>
- Krikorian, R., Shidler, M. D., Nash, T., Kalt, W., Venqvist-Tymchuk, M., Shukitt-Hale, B., Joseph, A. J. 2010. Blueberry supplementation improves memory in older adults. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 58, no. 7, p. 3996-4000. <http://dx.doi.org/10.1021/jf9029332> PMID: 20047325
- Lee, J., Wrolstad, R. E. 2006. Extraction of Anthocyanins and Polyphenolics from Blueberry Processing Waste. *Journal of Food Science*, vol. 69, no. 7, p. 564-573. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2621.2004.tb13651.x>
- Mateos, A. R., Ishisaka, A., Mawatari, K., Vidal-Diez, A., Spencer, J. P. E., Terao, J. 2012. Blueberry intervention improves vascular reactivity and lowers blood pressure in high-fat-, high-cholesterol-fed rats. *British Journal of Nutrition*, vol. 109, no. 10, p. 1746-1754. <http://dx.doi.org/10.1017/S0007114512003911> PMID: 23046999
- Michalska, M., Gluba, A., Mikhailidis, D. P., Nowak, P., Bielecka-Dabrowa, A., Rysz, J., Banach, M. 2010. The role of polyphenols in cardiovascular disease. *Medical Science Monitor*, vol. 16, no. 5, p. RA110-RA119. PMID: 20424562
- Navas, M., Moreno, A., Bueno, J., Plaza, P., Asuero, G. 2012. Analysis and antioxidant capacity of anthocyanin pigments. Part III: An Introduction to Sample Preparation and Extraction. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, vol. 42, no. 4, p. 284-312. <http://dx.doi.org/10.1080/10408347.2012.680341>
- Nicoué, E. E, Savard S., Belkacemi, K. 2007. Anthocyanins in wild blueberries of Quebec: extraction and identification. *Journal Agriculture and Food Chemistry*, vol. 55, no. 14, p. 5626-5635. <http://dx.doi.org/10.1021/jf0703304> PMID: 17579428
- Ochmian, I., Grajkowski, J., Mikiciuk, G., Ostrowska, K., Chelpiński, P. 2009. Mineral composition of high blueberry leaves and fruits depending on substrate type used for cultivation. *Journal of Elementology*, vol. 14, no. 2, p. 509-516.
- Oliviera, C., Amaro, L. F., Pinho, O., Ferreira, I. M. 2010. Cooked blueberries: anthocyanin and anthocyanidin degradation and their radical-scavenging activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 58, no.16, p. 9006-9012. <http://dx.doi.org/10.1021/jf101923w>

Petti, S., Scully, C. 2009. Polyphenols, oral health and disease: a review. *Journal of Dentistry*, vol. 37, no. 6, p. 413-423. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jdent.2009.02.003>

Pinto, M., Lajolo, F., Genovese, M. 2007. Bioactive compounds and antioxidant capacity of strawberry jams. *Plant Foods Hum. Nutr.*, vol. 62, no. 3, p. 127-131. <http://dx.doi.org/10.1007/s11130-007-0052-x> PMID: 17701363

Riihinen, K., Jaakola, L., Kärenlampi, S., Hohtola, A. 2008. Organ-specific distribution of phenolic compounds in bilberry (*Vaccinium myrtillus*) and 'northblue' blueberry (*Vaccinium corymbosum* x *V. angustifolium*). *Food Chemistry*, vol. 110, no. 1, p. 156-160. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.01.057>,

Rdbotten, M., Martinsen, B., Hans, J., Rosenfeld, L., Haffner, K. 2005. Quality of highbush Blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) and Bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) Jam. *International Journal of Fruit Science*, vol. 5, no. 2, p. 61-71. http://dx.doi.org/10.1300/J492v05n02_07

Šavikin, K., Zdunić, G., Janković, T., Tasić, S., Menković, N., Stević, T., Dordević, B. 2009. Phenolic content and radical scavenging capacity of berries and related jams from certificated area in Serbia. *Plant Foods Human Nutrition*, vol. 64, p. 212-217. <http://dx.doi.org/10.1007/s11130-009-0123-2> PMID: 19468835

Scalzo, J, Currie A, Stephens, J, McGhie T, Alspach, P. The anthocyanin composition of different *Vaccinium*, *Ribes* and *Rubus* genotypes. *BioFactors*, vol. 34, no. 1, p. 13-21. <http://dx.doi.org/10.1002/biof.5520340103> PMID: 19706968

Ścibicz, I., Mitek, M. 2007. The changes of antioxidant properties in highbush blueberries (*Vaccinium corymbosum* L.) during freezing and long-term frozen storage. *Acta Science Polonorum*, vol. 6, no. 4, p. 75-82.

Schmidt, B., Erdman, J., Lila, M. A. 2005. Effects of food processing on blueberry antiproliferation and antioxidant activity. *Journal Food Science*, vol. 70, no. 6, p. s389-s394. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2621.2005.tb11461.x>

Stevenson, D., Scalzo, J. 2012. Anthocyanin composition and content of blueberries from around the world. *Journal of Berry Research*, vol. 2, no. 4, 179-189. <http://dx.doi.org/10.3233/JBR-2012-038>

Šimala, D. 2007. Pestovanie netradičného ovocia. *Roľnícke noviny*, vol. 77, no. 30, p. 11.

Vollmannová, A., Tóth, T., Tomáš, J., Timoracká, M., Melicháčová, S. 2009. Obsah bioaktívnych zložiek vo vybraných odrodách čučoriedky chocholíkatej (*Vaccinium corymbosum* L.). *Acta fytotechnica et zootechnica*, vol. 12, 2009, p. 695-700.

Wrolstadt, R., Durst, R., Lee, J. 2005. Tracking color and pigment changes in anthocyanin products. *Trends Food Sci. Technology*. vol. 16, p. 423-428. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tifs.2005.03.019>

Wu, X., Beecher, G., Holden, J., Haytowitz, D., Gebhardt, S., Prior, R. 2006. Concentrations of anthocyanins in common foods in the United States and estimation of normal consumption. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 54, no. 11, p. 4069-4075. <http://dx.doi.org/10.1021/jf060300i> PMID: 16719536

Acknowledgments:

This work has been supported by the Operational Programme Research and Development of the project "Transfer, use and dissemination of research results of plant genetic resources for food and agriculture" (ITMS: 26220220058), cofinanced from the resources of the European Union Fund for Regional Development.

Contact address:

Ing. Andrea Mendelová, PhD., Slovak University of Agriculture in Nitra, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Department of Plant Processing and Storage, A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovak Republic, E-mail: andrea.mendelova@uniag.sk

Ing. Lubomír Mendel, PhD., Plant Production Research Center Piešťany, Bratislavská 122, 921 68 Piešťany, Slovak Republic, E-mail: mendel@vurv.sk

doc. Ing. Martina Fikselová, PhD., Slovak University of Agriculture in Nitra, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Department of Food Hygiene and Safety, A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovak Republic, E-mail: martina.fikselova@uniag.sk

Ing. Peter Czako, PhD., Slovak University of Agriculture in Nitra, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Department of Plant Processing and Storage, A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovak Republic, E-mail: peter.czako@uniag.sk

CONTENT OF AMINO ACIDS AND MINERALS IN SELECTED SORTS OF LEGUMES

Petra Vojtíšková, Pavel Švec, Stanislav Kráčmar

ABSTRACT

The aim of this study was to determine amino acid composition and mineral content in selected legume samples. All analyses were carried out at the laboratory temperature of 21 ± 2 °C in triplicate. Amino acid composition was determined using the automatic amino acid analyzer AAA 400 with post-column derivatization. To assess the nutritional value of protein, index of essential amino acids (EAAI) was calculated. Minerals were determined using the atomic absorption spectrometer AA 30. All results were statistically evaluated. The highest content of Cys, Glu, Asp, Leu, Lys and Arg was determined in seeds of *G. max*; only the content of Cys and His was lower than 10 g kg^{-1} . The greatest total content of essential amino acids (EAA) was discovered in soybeans, almost 128 g kg^{-1} . The majority (Na, K, Mg, and Ca), trace (Fe, Zn, and Cr) and toxic elements (Pb, Cd) were determined. Legumes were rich in Mg and Ca-mainly *G. max* and *Ph. vulgaris*. The content of Mg in was $2.1 \text{ g } 1000\text{g}^{-1}$ in soybeans and $1.6 \text{ g } 1000\text{g}^{-1}$ in common beans. Also in these two legumes the greatest concentration of toxic Pb was found. Values obtained during the determination of the chemical composition in samples of legumes and buckwheat products can be influenced by many factors, e.g. climatic conditions, location etc.

Keywords: legumes; amino acid; protein; minerals; statistics

INTRODUCTION

Legumes are dry edible seeds of some plants from the family of *Fabaceae*. The nutritional potential of seeds from this group of plants is based on their high level of proteins. Legume seeds are the richest and cheapest alternative sources of protein among all foods of plant origin. Protein content in legume grains ranges from 17 to 40%, being equal to the protein contents of meat (18-25%). However, the legumes also contain antinutritional factors, such as proteinase inhibitors, lectin, raffinose oligosaccharides, saponins, polyphenols and phytate (Urbano et al., 2000; Sandberg, 2002; De Almeida Costa et al., 2006).

Grain legumes are commonly subdivided into pulses which, in addition to protein, store high levels of carbohydrate and low amount of lipids in their dry seeds, and leguminous oilseeds which boast higher lipid, but lower carbohydrate levels than pulses. Pulses also contain high levels of dietary fiber (Michaels, 2004).

Legumes provide a large amount of proteins, carbohydrates, dietary fibre, minerals and water-soluble vitamins in human diets. They can be considered as food with health benefits, but their phytate content can limit the availability of minerals (Frias et al., 2003).

Low digestibility hampers full utilization of pulse protein. Antinutritional factors in pulses also play a major role in restricting dietary utilization in some pulses species. These compounds usually include proteinaceous molecules such as protease inhibitors, and lectins, and also nonproteinaceous compounds such as tannins. Most of the wild relatives of pulses contain toxins and antimetabolites. Tannins can form strong cross-linked complexes with dietary proteins and enzymes (Michaels, 2004).

Incorporation of leguminous seeds into the human diet in developing countries can offer protective effects against chronic diseases. Legumes contain a number of bioactive substances including phenolics that can diminish protein digestibility and mineral bioavailability (Chung et al., 1998; Sandberg, 2002). On the other hand, phenolic compounds such as flavonoids, phenolic acids, lignans and tannins have antioxidant properties. They are very important from the nutritional and technological point of view (Amarowicz & Pegg, 2008).

Grain legumes are used as pulses with cereals, grown in both tropical and temperate regions of the globe. They enhance the protein content of cereal-based diets and may improve the nutritional status of the cereal-based diets. Cereals are deficient in lysine. Legumes contain adequate amounts of lysine, but are deficient in S-containing amino acids, methionine and cysteine (Tharanathan & Mahadevamma, 2003; Iqbal et al., 2006).

Minerals are essential nutrients for human well-being and they play a vital role in the effective functioning of the body activity. Currently, mineral malnutrition is considered to be one of the most serious global challenges for mankind (Copenhagen Consensus, 2004). Over three billion people suffer from micronutrient malnutrition worldwide, leading to poor health, anaemia, lower productivity, increased morbidity, and mortality rates. The most prevalent micronutrient deficiencies are Fe, Zn and I, which occur particularly among children and women in developing countries. Phytic acid chelating essential minerals such as Fe, Zn and Ca can have serious negative impact on the utilization of mineral nutrients and lead to malnutrition in humans. Now, breeding for staple micronutrient-enriched food crops with low phytic acid

content is considered as a cost-effective and promising approach to alleviate malnutrition and other related health problems (WHO, 2002; Welch & Graham, 2004; Liu et al., 2005; Tang et al., 2008; Chatzav et al., 2010; Wang et al., 2011).

Minerals are important for various physiological functions in the human body. In many metabolic processes in the human body, many minerals have an irreplaceable role. Regular supply of minerals in appropriate amounts is very important for the body. The surplus and deficiency can have very serious consequences. The proportions of individual elements can greatly influence the final effect in the body (Turek, 2007).

The aim of this study was to determine content of minerals and amino acid composition in selected sorts of legumes.

MATERIAL AND METHODOLOGY

In this study selected legume samples, common beans (*Phaseolus vulgaris*), peas (*Pisum sativum*), soybeans (*Glycine max*) and lentil (*Lens esculenta*), were used for the analysis. All legume samples were purchased in the trade network.

SAMPLE PREPARATION

Samples were packaged in consumer wrapping. A package of dry samples was ground to a fine powder and sieved through 1 mm mesh. After 24 hours of resting, the powder was poured into sample containers and subsequently, particular analyses were performed. They were realized according to the Official Journal of the European Union (Commission Regulation, 2009). All analyses were carried out at the laboratory temperature of 21 ± 2 °C in triplicate. All used reagents were of the analytical grade, they were from the company PENTA, Chrudim, Czech Republic, unless stated otherwise.

AMINO ACIDS

Before determination of total amino acid composition, amino acids were released from proteins and peptides by acid hydrolysis (6 mol L⁻¹ HCl, 115 °C, 23 h). Sulfur amino acids (cysteine and methionine) were, prior to acid hydrolysis, oxidized by mixture of formic acid and hydrogen peroxide (9:1; 6 ± 2 °C, 16h), because acid hydrolysis would cause their degradation. After hydrolysis, HCl was evaporated on vacuum evaporator RVO 400 (INGOS, Prague, CZ) to the consistency of syrup, the residue was dissolved with sodium citrate buffer (pH 2.2) and filtered through 0.45 µm filter (Millipore, USA) before analysis. Amino acids were analyzed by ion-exchange liquid chromatography on an automatic amino acid analyzer AAA 400 (INGOS, Prague, CZ) with post-column ninhydrin derivatization and spectrophotometric detection (440 nm for proline and 570 nm for other amino acids) (Buňka et al., 2004; Lazárková et al., 2011). Chromatographic column 250x4 mm (Polymer AAA 8u; ion exchanger Ostion LG ANB) was used.

Cysteine was determined as cysteic acid, methionine as methioninsulfone. Sodium system is faster, but does not allow separation of amides (asparagine, glutamine) (Anonym, 2007).

To assess the nutritional value of protein, index of essential amino acids (EAAI) was calculated. As reference file, egg white protein was chosen and to compare, the standard protein designated by WHO/FAO was used (Table 1).

Essential Amino Acid Index is a geometric mean of ratios of essential amino acids expressed in percentage in studied protein food to the same standard amino acids in egg protein. EAAI provides more accurate data than the amino acid score (Kráčmar et al., 1981).

Table 1 Content of essential amino acids in standard (FAO/WHO) and egg protein (Velíšek, 1999; Dvořáčková et al., 2011)

Amino acid	FAO/WHO (g 16gN ⁻¹)	Egg protein (%)
Val	5.0	7.3
Leu	7.0	8.7
Ile	4.0	6.6
Met + Cys	3.5	5.7
Thr	4.0	5.1
Lys	5.4	6.9
Phe + Tyr	6.1	9.8

MINERAL ELEMENTS

Samples (0.3 to 0.5±0.01g) were decomposed in a microwave device Ethos SEL (Milestone, Sorisole, Italy) using concentrated HNO₃ (5 ml conc. HNO₃ + 5 ml of deionised H₂O) at a temperature of 210 °C for 30 min. The final was transferred into 25 ml volumetric flasks after cooling to 80 °C. Flasks were refilled to the mark after cooling to a room temperature. Mineralisation solutions were processed on the atomic absorption spectrometer AA 30 (Varian A.G., Australia).

Na, K, Ca, Mg, Fe, Zn and Cu were determined by flame AAS (acetylene-air). Strontium nitrate at a concentration of 1000 mg L⁻¹ was used as a spectral buffer to suppress the emission in the case of Ca, Mg, Cu, Fe, Zn, Ca and Mg were measured in absorption mode while Na and K in emission mode. Pb, Cd and Cr were measured in absorption mode with electrothermal atomization in the graphite cuvette. For protection, the N₂ gas was elected in a purity of 5.0. A matrix modifier (10 g L⁻¹ solution NH₄H₂PO₄ + 10 g L⁻¹ solution of Mg (NO₃)₂ (Sigma Aldrich, USA) and a deuterium lamp background correction was used in the case of Pb and Cd. A 10 g L⁻¹ solution of ascorbic acid (reduced formation of CrO₂Cl₂) was selected as a matrix modifier for Cr determination. Evaluation of concentration in all elements was performed by the calibration curve method and the integration of peak area.

STATISTICAL EVALUATION

All results were statistically evaluated using the variation statistics (ANOVA). Correlation matrices and regression functions were calculated according to Snedecor and Cochran (1967) using the statistical package Unistat, v. 5.5 (Unistat Ltd., England, UK).

RESULTS AND DISCUSSION

AMINO ACIDS

Amino acid composition was determined using the analyzer AAA 400 with post-column derivatization.

In total, 17 amino acids (glycine, alanine, valine, leucine, isoleucine, serine, threonine, aspartic acid, glutamic acid, lysine, arginine, histidine, phenylalanine, tyrosine, proline, methionine and cysteine) were determined. Tryptophan was not determined, because it is destroyed during acid hydrolysis and requires alkaline hydrolysis.

As can be seen from **Table 2 and 3**, all studied samples contain all 17 amino acids (AA). The highest content of Cys, Glu, Asp, Leu, Lys and Arg was determined in all

legumes. The greatest concentration of almost all amino acids was discovered in soybeans; only the content of Cys and His was lower than 10 g kg⁻¹. **Jezierny et al. (2010)** reported the amino acid composition of *P. sativum* in their study. Values for almost all studied amino acids were higher than those in this experiment; only for Met they presented a value of 2.2 g kg⁻¹ DW which is lower than the one in the experiment and value for Cys (3.5 g kg⁻¹) which is close to the value in the study (3.6 g kg⁻¹).

Table 2 Amino acid composition of *G. max* and *P. sativum* (mean±S.D.) in g kg⁻¹ DW

AA	<i>G. max</i>			<i>P. sativum</i>		
		%CV			%CV	
Cys	6.6 ± 0.55	8.0	3.6 ± 0.02	1.0		
Glu	51.9 ± 4.11	8.0	22.0 ± 2.68	12.0		
Asp	33.5 ± 1.22	4.0	16.0 ± 1.66	10.0		
Tyr	10.1 ± 0.42	4.0	4.3 ± 0.42	10.0		
Ser	14.1 ± 0.81	6.0	6.1 ± 0.71	12.0		
Pro	16.7 ± 1.79	11.0	5.8 ± 0.76	13.0		
Gly	12.6 ± 0.96	8.0	6.3 ± 0.65	10.0		
Ala	12.7 ± 0.94	7.0	6.1 ± 0.68	11.0		
Val	15.5 ± 1.47	10.0	7.2 ± 0.73	10.0		
Leu	23.1 ± 1.29	6.0	10.4 ± 0.79	8.0		
Ile	14.7 ± 1.12	8.0	6.4 ± 0.50	8.0		
Thr	11.1 ± 0.72	6.0	5.1 ± 0.57	11.0		
Met	28.6 ± 2.18	8.0	8.2 ± 1.16	14.0		
Lys	18.9 ± 1.82	10.0	10.4 ± 1.01	10.0		
Phe	16.0 ± 1.05	7.0	7.5 ± 0.68	9.0		
His	7.9 ± 0.51	6.0	4.0 ± 0.41	10.0		
Arg	27.4 ± 2.29	8.0	12.5 ± 0.94	7.0		

%CV - Coefficient of Variation; DW - Dry Weight; S.D.- Standard Deviation

Table 3 Amino acid composition of *Ph. vulgaris* and *L. esculenta* (mean±S.D.) in g kg⁻¹ DW

AA	<i>Ph. vulgaris</i>		<i>L. esculenta</i>	
		%CV		%CV
Cys	2.8 ± 0.02	1.0	2.6 ± 0.09	3.0
Glu	23.1 ± 0.52	2.0	24.7 ± 1.07	4.0
Asp	20.1 ± 0.12	1.0	17.9 ± 0.15	1.0
Tyr	5.3 ± 0.22	4.0	4.5 ± 0.25	6.0
Ser	9.1 ± 0.18	2.0	7.4 ± 0.16	2.0
Pro	6.6 ± 0.49	7.0	6.9 ± 0.05	1.0
Gly	6.9 ± 0.16	2.0	6.7 ± 0.22	3.0
Ala	7.0 ± 0.16	2.0	6.9 ± 0.23	3.0
Val	9.6 ± 0.25	3.0	8.6 ± 0.02	0.0
Leu	13.9 ± 0.65	5.0	12.2 ± 0.40	3.0
Ile	8.3 ± 0.29	3.0	7.5 ± 0.13	2.0
Thr	7.4 ± 0.02	0.0	5.7 ± 0.08	1.0
Met	6.3 ± 0.51	8.0	4.1 ± 0.13	3.0
Lys	12.0 ± 0.96	8.0	11.6 ± 0.88	8.0
Phe	10.3 ± 0.75	7.0	9.0 ± 0.32	4.0
His	5.2 ± 0.26	5.0	4.7 ± 0.11	2.0
Arg	13.4 ± 0.56	4.0	14.9 ± 0.66	4.0

%CV - Coefficient of Variation; DW - Dry Weight; S.D.- Standard Deviation

The evaluation of total essential amino acids (EAA) content (**Table 4**) in individual samples was also performed. All legume samples contained more than 50 g kg⁻¹ of EAA.

Protein quality of studied samples was evaluated by the essential amino acid index (EAAI). Calculated values are presented in **Table 4**.

This method of evaluation is more objective than using chemical score assessment, because it includes all essential amino acids. **Kráčmar et al. (1981)** stated that chemical evaluation of protein quality is only an approximate expression of their real quality as it disregards the digestibility, the influence of inhibitors and other factors that determine the actual use of essential amino acids in the body.

Table 4 Content of essential amino acids (EAA) and essential amino acid index (EAAI)

	Σ EAA (g kg ⁻¹)	EAAI (%)
<i>G. max</i>	127.8	19.9
<i>P. sativum</i>	55.1	12.3
<i>Ph. vulgaris</i>	67.7	15.0
<i>L. esculenta</i>	58.9	12.9

MINERALS

Minerals were determined on the atomic absorption spectrometer AA 30. The majority (Na, K, Mg, Ca), trace (Fe, Zn, Cr) and toxic elements (Pb, Cd) were determined.

A quantity of minerals in lentil and peas was studied by **Iqbal et al. (2006)** who reported contents of Fe and Zn as 3.1 and 4.4 mg 100 g⁻¹, resp. in lentil and 2.3 and 3.2 mg 100 g⁻¹, respectively in peas. **Table 5** and **Table 6** present content of minerals in legume samples. Values for peas and lentil are higher than those reported by **Iqbal et al. (2006)**. From these results, it can be concluded that legumes are rich in Mg and Ca, mainly soybeans and common beans. Also in these two legumes the greatest concentration of toxic Pb was found.

Table 5 Content of minerals in *G. max* and *P. sativum* (mean±S.D.) in 1000 g of DW

		<i>G. max</i>	<i>P. sativum</i>
Pb	µg	422.0 ± 4.22	146.0 ± 1.46
Cd	µg	78.0 ± 0.78	27.0 ± 0.27
Cr	µg	347.0 ± 3.46	405.0 ± 4.05
Zn	mg	40.7 ± 0.40	23.8 ± 0.23
Cu	mg	12.9 ± 0.12	4.4 ± 0.04
Na	mg	3.7 ± 0.04	22.4 ± 0.22
Fe	mg	70.2 ± 0.70	40.6 ± 0.40
Ca	mg	1807.3 ± 9.04	688.4 ± 3.44
Mg	g	2.1 ± 0.02	1.2 ± 0.01
K	g	17.3 ± 0.17	9.8 ± 0.10

DW - Dry Weight; S.D.- Standard Deviation

Table 6 Content of minerals in *Ph. vulgaris* and *L. esculenta* (mean±S.D.) in 1000 g of DW

		<i>Ph. vulgaris</i>	<i>L. esculenta</i>
Pb	µg	447.0 ± 4.47	166.0 ± 1.64
Cd	µg	30.0 ± 0.30	21.0 ± 0.21
Cr	µg	365.0 ± 3.64	286.0 ± 2.85
Zn	mg	32.1 ± 0.32	28.2 ± 0.28
Cu	mg	7.5 ± 0.07	7.1 ± 0.07
Na	mg	3.0 ± 0.03	8.8 ± 0.08
Fe	mg	76.9 ± 0.77	78.3 ± 0.78
Ca	mg	1718.3 ± 8.59	695.5 ± 3.48
Mg	g	1.6 ± 0.02	1.1 ± 0.01
K	g	14.8 ± 0.15	9.4 ± 0.09

DW - Dry Weight; S.D.- Standard Deviation

CONCLUSION

Legumes, due to the high content of proteins, can be used instead of animal proteins, particularly in developing countries, where the lack of meat is frequent.

Legumes contained all seventeen amino acids. All legume samples were rich in Cys, Glu, Asp, Leu, Lys and Arg. Results from the experiment showed that legumes contained more than 50 g kg⁻¹ of essential amino acids (EAA).

The study proved that legumes are rich in K, Mg and Ca. The highest content of K and Mg was found in *G. max*, 17.3 and 2.1 g 1000 g⁻¹, respectively. Also the amount of Ca was significant. Its level was the greatest in *G. max* and *Ph. vulgaris*, 1807 and 1718 mg 1000 g⁻¹, respectively.

Values obtained during the determination of the chemical composition in samples of legumes and buckwheat products can be influenced by many factors, e.g. climatic conditions, location, type of soil, different varieties of plants, irrigation, type of soil and used fertilizers, different crop period, using different, modified methods of determination, chemicals from different producers, etc.

REFERENCES

- Amarowicz, R., Pegg, R. B. 2008. Legumes as a source of natural antioxidants. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, vol. 110, no. 10, p. 865-878. <http://dx.doi.org/10.1002/ejlt.200800114>
- Automatický analyzátor aminokyselin AAA400. 2007. Příručka uživatele. Praha: INGOS, p. 13-22.
- Buňka, F., Hrabě, J., Kráčmar, S. 2004. The effect of sterilisation on amino acid contents in processed cheese. *Int. Dairy J.*, vol. 14, no. 9, p. 829-831. <http://dx.doi.org/10.1016/j.idairyj.2004.02.008>
- Chatzav, M., Peleg, Z., Ozturk, L., Yazici, A., Fahima, T., Cakmak, I., Saranga, Y. 2010. Genetic diversity for grain nutrients in wild emmer wheat: potential for wheat improvement. *Annals of Botany*, vol. 105, no. 7, p. 1211-1220. <http://dx.doi.org/10.1093/aob/mcq024> PMID: 20202969
- Chung, K., Wong, T. Y., Wei, C., Huang, Y. W., Lin, Y. 1998. Tannins and human health: A review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, vol. 38, no. 6, p. 421-464. <http://dx.doi.org/10.1080/10408699891274273> PMID: 9759559
- Commission Regulation (EC) No. 152/2009 of January 17, 2009 laying down the methods of sampling and analysis for the official control of feed. p. L 54/12-L 54/19. ISSN 1725-2555.
- COPENHAGEN CONSENSUS, 2004. [online] [cit. 2012-19-03] Available at: <http://www.copenhagenconsensus.com>.
- De Almeida Costa, G. E., Da Silva Queiroz-Monici, K., Pissini Machado Reis, S. M., De Oliveira, A. C. 2006. Chemical composition, dietary fibre and resistant starch contents of raw and cooked pea, common bean, chickpea and legumes. *Food Chem.*, vol. 94, no. 3, p. 327-330. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.11.020>
- Dvořáčková, J., Doležal, P., Hladký, J., Vyskočil, I. 2011. *Cvičebnice – hodnocení výživné hodnoty krmiv. Multimediální prezentace*. Mendelova univerzita v Brně [online] [cit. 2012-28-03]. Available at: http://web2.mendelu.cz/af_222_multitext/cvicebnice/index.php.
- Frias, J., Doblado, R., Antezana, J. R., Vidal-Valverde, C. 2003. Inositol phosphate degradation by the action of phytase enzyme in legume seeds. *Food Chem.*, vol. 81, no. 2, p. 233-239. [http://dx.doi.org/10.1016/S0308-8146\(02\)00417-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0308-8146(02)00417-X)
- Iqbal, A., Khalil, I. A., Ateeq, N., Khan, M. S. 2006. Nutritional quality of important food legumes. *Food Chem.*, vol. 97, no. 2, p. 331-335. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.05.011>
- Jezierny, D., Mosenthin, R., Bauer, E. 2010. The use of grain legumes as a protein source in pig nutrition: A review.

Anim. Feed Sci. Tech., vol. 157, no. 3-4, p. 111-128.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2010.03.001>

Kráčmar, S. et al. 1981. *Výživa hospodářských zvířat. Návody do cvičení*. Vydání první. Brno: Vysoká škola zemědělská., 121 p.

Lazárková, Z., Buňka, F., Buňková, L., Holář, F., Kráčmar, S., Hrabě, J. 2011. The effect of different heat sterilization regimes on the quality of canned cheese. *J. Food Process. Eng.*, vol. 34, p. 1860-1878.

<http://dx.doi.org/10.1111/j.1745-4530.2009.00376.x>

Liu Z. H., Cheng, F. M., Cheng, W. D., Zhang, G. P. 2005. Positional variations in phytic acid and protein within a panicle of japonica rice. *J. Cereal Sci.*, vol. 41, p. 297-303. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcs.2004.09.010>

Michaels, T. E. 2004. Pulses, overview. *Encyclopedia of Grain Science*. USA: Elsevier, Ltd., p. 494-501. <http://dx.doi.org/10.1016/B0-12-765490-9/00134-8>

Sandberg, A. S. 2002. Bioavailability of minerals in legumes. *Br. J. Nutr.*, vol. 88, no. 3, p. S281-S285 <http://dx.doi.org/10.1079/BJN/2002718> PMID: 12498628

Snedecor, G. W., Cochran, W. G. 1967. *Statistical Methods*, 6th ed. Iowa: Iowa State University Press. p. 579.

Tang, J. W., Zou, C. Q., He, Z. H., Shi, R. L., Ortiz-Monasterion, I., Qu, Y. Y., Zhang, Y. 2008. Mineral element distributions in milling fractions of Chinese wheats. *J. Cereal Sci.*, vol. 48, no. 3, p. 821-828. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcs.2008.06.008>

Tharanathan, R. N., Mahadevamma, S. 2003. Grain legumes-a boon to human nutrition. *Trends Food Sci. Technol.*, vol. 14, no. 12, p. 507-518. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tifs.2003.07.002>

Turek, B. 2007. Minerální látky ve výživě. *Výživa a potraviny*, vol. 62, no. 6, p. 160-161.

Urbano, G., Lopez-Jurado, M., Aranda, P., Vidal-Valverde, C., Tenorio, E., Porres, J. 2000. The role of phytic acid in legumes: Antinutrient or beneficial function? *J. Physiol. Biochem.*, vol. 56, no. 3, p. 283-294. <http://dx.doi.org/10.1007/BF03179796> PMID: 11198165

Velišek, J. 1999. *Chemie potravin I*. Vydání první. Tábor: OSSIS, 352 s. ISBN 80-902391-3-7.

Wang, K. M., Wu, J. G. W., Li, G., Zhang, D. P., Yang, Z. W., Shi, CH. H. 2011. Distribution of phytic acid and mineral elements in three *indica* rice (*Oryza sativa* L.) cultivars. *J. Cereal Sci.*, vol. 54, no. 1, p. 116-121. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcs.2011.03.002>

Welch, R. M., Graham, R. D. 2004. Breeding for micronutrients in staple food crops from a human nutrition perspective. *J. Exp. Bot.*, vol. 55, no. 396, p. 353-364. <http://dx.doi.org/10.1093/jxb/erh064> PMID: 14739261

WHO, 2002. Reducing Risks, Promoting Healthy Life. The world health report 2002. Geneva, Switzerland: World Health Organization. Available at: <http://www.who.int/whr/2002/en/>

Acknowledgments:

This work was kindly supported by the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic (Grant No. MSM 7088352101).

Contact address:

Ing. Petra Vojtíšková, Ph.D., Tomas Bata University in Zlín, Faculty of Technology, Department of Food Analysis and Chemistry, nám. T. G. Masaryka 275, 762 72 Zlín, Czech Republic, E-mail: VojtiskovaPetra@seznam.cz.

Ing. Pavel Švec, Mendel University in Brno, Faculty of Agronomy, Department of Chemistry and Biochemistry, Zemědělská 1, 613 00 Brno, Czech Republic, E-mail: pavel.svec@mendelu.cz.

prof. Ing. Stanislav Kráčmar, DrSc., Tomas Bata University in Zlín, Faculty of Technology, Department of Food Analysis and Chemistry, nám. T. G. Masaryka 275, 762 72 Zlín, Czech Republic, E-mail: kracmar@ft.utb.cz

EFFECT OF DRYING TEMPERATURE ON LYCOPENE CONTENT OF PROCESSED TOMATOES

Andrea Mendelová, Lubomír Mendel, Martina Fikselová, Peter Czako

ABSTRACT

Recently it has been increasing interest worldwide in the production of dehydrated tomato products, which are used in food industry and in pharmacy. An important indicator of the quality of products, beside the microbiological stability is health safety and lycopene content. The aim of this work was to evaluate the effect of drying temperature on changes of the content of lycopene in selected varieties of tomato. Drying was performed at 45 °C, 70 °C and 90 °C. Varieties of Darina F1, Denár, Kecskeméty, Orange, Paulína F1, Šejk F1 were used. Tomatoes were processed into dried slices with the dry matter content of 80-85%. Content of lycopene was determined spectrophotometrically. The content of lycopene in fresh tomatoes ranged from 63.378 mg 100 g⁻¹ of dry matter (Orange) to 302.37 mg 100 g⁻¹ of dry matter (Šejk F1). After drying at all temperatures, content of lycopene decreased on average of 64.48 to 68.3%. The most significant changes were found at temperature of 90 °C. Based on the results the most appropriate temperature for drying among the monitored temperatures was at 70 °C, in this case the content of lycopene in the product ranged from 12.839 mg 100 g⁻¹ dry matter (Orange) to 115.9 mg 100 g⁻¹ of dry matter.

Keywords: tomato; lycopene; drying; processing; color of product

INTRODUCTION

As it is reported by several authors (**Dorais et al., 2008; Huang et al., 2010**) traditional tomato products are tomato puree, ketchup or tomato juice, etc. These products are characterized by high amount of carotenoids and their good bioavailability in humans. Recently, tomatoes have also been used for the production of dried products, which are further processed into various types of high quality vegetable oils or as a raw material in the production of instant foods or food supplements.

For drying are the most suitable tomato varieties for industrial processing. Desired are tomatoes in the form of plum fruit having higher content of dry matter (**Greensmith, 1998**). The basic objective of drying is to remove water from the material and the consequent limitation of microbial activity, longer shelflife and significant reducing of the volume of finished products (**Lewicki and Porzecka-Pawlak, 2005**). As state **Celma et al., (2009)** the most widely used for drying are conventional hot air dryers that transfer heat to the products using hot air. At drying currently used are techniques of osmotic dehydration and combination of osmotic dehydration and microwave drying.

Contreras et al., (2008) indicate that dried tomato products have main attributes of quality - nutritional value, acceptability, usability and safety of products. **Cernisev (2010)** states that the most important quality parameters that determine the acceptance of dried tomatoes by consumers are their color and flavor. Today's modern technologies aim is to minimize chemical degradation reactions, maximize the retention of nutrients and at the

same time to minimize energy consumption and to produce quality products. Dried tomato slices or powder could be characterized by an intensely sweet taste, delicious tomato flavor and dark red coloring (**Hui, 2008**). Coloring of tomatoes is determined especially by lycopene content. Lycopene belongs to the carotenoid natural colorants, tomatoes and products made from them have characteristic red color (**Acton, 2012**). Processing conditions such as high temperature, long duration of exposure and the presence of oxygen shown to contribute to increased degradation of lycopene (**Predy, 2012**). In the fresh tomatoes the lycopene is present in the form of all-trans isomers, which have lower bioavailability than its cis-configuration. During the heat treatment is transformed from all-trans-form to cis-form. Processing can therefore increase the bioavailability of lycopene (**Lockwood, 2007**). Short heat treatment of tomatoes leads to an increased yield of lycopene, as there is a cell disruption and release of extracellular matrix. High temperature combined with a long exposure time showed an opposite effect on carotenoids (**Dris and Jain, 2004; Dorais et al., 2008**).

The stability of colorants in dehydrated tomato products during storage is affected by temperature, presence of oxygen, water activity and texture of the product. By dehydration of the final moisture of 20%, with a water activity 0.69 and storage at 18 °C is possible to eliminate the loss of carotenoids (**Bidlack and Rodriguez, 2011**).

The aim of this work was to evaluate the content of lycopene in selected tomato varieties in the stage of technological maturity. To process tomatoes subsequently

by drying at three different temperatures into the dried tomato slices and to analyze the effect of temperature on the content of lycopene changes.

MATERIAL A METHODOLOGY

In this work we analyzed 6 varieties of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) as it follows: Darina F1, Denár, Kecskeméty, Orange, Paulína F1 and Šejk F1. Varieties Denár, Kecskeméty and Šejk F1 are primarily intended for industrial use. Paulína variety is recommended for processing or for direct consumption. Varieties Darina F1 and Orange are intended for direct consumption.

Samples of tomato were cultivated in the Botanical Garden of SUA in Nitra. Nitra area is characterised as very warm agro-climatic area and very dry sub-region. The average annual temperature of the area is 9-10 °C, average annual rainfall is 584.5 mm and the average rainfall for the growing season is 287.5 mm. In terms of soil characteristics, it is a glue fluvisol, formed on alluvial to calcareous sediments. Tomato fruits were harvested at the stage of technological maturity. The fruits were fully colored with a characteristic taste and aroma. Samples were processed by drying at 45 °C, 70 °C and 90 °C. Drying was performed after cutting the fruit to a thickness of 3 mm at air oven Concept SO 1020. The dryer is equipped with thermostat and temperature was continuously checked during drying by laboratory thermometer as well. Samples were dried to a residual moisture content of 15-20%. Time of drying was depending on the temperature: at 90 °C 10 hours, 16 hours at 70 °C and 24 hours at 45 °C. Fresh fruits were homogenized before analyzing by kitchen hand blender Bosh MSM 67 PF at least three minutes, dried slices were processed by the mill Bravo B-4090.

Lycopene content was determined spectrophotometrically by the device Jenway UV-VIS according to the methodology given by the Slovak Technical Standard 12136 - "Determination of total carotenoids and individual carotenoid fractions". Homogenized samples of fruit were extracted in acetone and then carotenoids were collected in petroleum solution. Lycopene content was determined by measuring absorbance at a wavelength of 470 nm.

The results were processed by the statistical program Statistica. Effect of variety and drying temperature on lycopene content was tested by one- and two-factor analysis of variance and Fisher's LSD test.

RESULTS AND DISCUSSION

Lycopene content of fresh tomato fruit was determined in the amounts of 1.68 -10.53 mg 100 g⁻¹ of fresh matter. The lowest content of lycopene was observed at variety of orange color Orange, in whose in large quantities β-carotene is synthesized at the expense of lycopene. Lycopene content in fresh matter of tomato fruits decreased in the order: Kecskeméty > Šejk F1 (8.99 mg 100 g⁻¹) > Denár (7.92 mg 100 g⁻¹) > Darina F1 (7.39 mg 100 g⁻¹) > Paulína F1 (6.14 mg 100 g⁻¹) > Orange.

Lycopene content in tomato is observed by number of studies and authors. **Sharma and Le Maguer (1996)** determined in fresh tomato fruits originating from Canada lycopene content in the amount of 5.4 mg 100 g⁻¹. **Martínez-Valverde et al., (2002)** found in various

commercial varieties of Spanish tomato lycopene content at 1.8-6.5 mg 100 g⁻¹. **Toor et al., (2006)** indicate that lycopene in three commercial varieties (Excell, Tradiro, Flavourine) of tomato reaches the amount of 2.7 to 4.7 mg 100 g⁻¹ in fresh matter. **Mendelová et al., (2012)** monitored the content of lycopene in tomato varieties for industrial processing and their found lycopene content from 4.11 to 6.11 mg 100 g⁻¹.

Rajoria et al., (2010) indicate lycopene as an important nutrient compound which is represented by 80% of all pigments contained in tomatoes. In our samples lycopene was represented by percentage of 28.95 to 96.64% of total carotenoids. In the variety of Kecskeméty lycopene had the largest portion of total carotenoids.

The dry matter content among monitored varieties ranged from 2.65% in Orange variety to 4.55% in Denar variety. Lycopene content after a dry matter conversion ranged from 63.38 to 302.37 mg 100 g⁻¹ of dry matter. We found statistically significant effect of variety on the lycopene content. By the Fisher's LSD test were observed relative differences in the content of lycopene among monitored varieties. Varieties created 5 homogeneous groups, which differed in the content of lycopene (Table 1).

Kuti and Konuru (2005); García-Valverde et al., (2013) observed the total content of carotenoids, lycopene and β-carotene and state that content of these components is statistically significantly affected not only by degree of maturity, but also by variety and locality of cultivation.

Vadivambal and Jayson (2007) state, that drying by hot air causes decomposition of a lot of components due to long process of drying and high temperatures used. Based on our analyses of lycopene content we can confirm these findings.

Although the content of lycopene in fresh matter of dried tomatoes was higher than that of the fresh fruits, lycopene content after conversion to 100% dry matter decreased. At dried tomatoes under the actual moisture, content of lycopene was the highest at drying temperatures of 45 °C and 90 °C detected in the dried slices of variety Paulína (79.455 mg 100 g⁻¹ of fresh matter 87.718 mg 100 g⁻¹ of fresh matter). At drying temperature of 70 °C lycopene content was the highest at variety Kecskeméty (90.4 mg 100 g⁻¹). The lowest lycopene content was found in Orange variety at all drying temperatures.

Abano et al., (2011) observed lycopene content in tomato fruits and dried tomatoes at 50, 60, 70 and 80 °C. In the fresh fruit content was found to be only 2.96 mg 100 g⁻¹, which is lower than the value we found in our work. The dried samples showed lycopene content from 59.10 mg 100 g⁻¹ of fresh matter to 65.28 mg 100 g⁻¹ of fresh matter. These values are comparable with our results for samples of Šejk F1 a Darina F1. **Takeoka et al., (2001)** in his work found lycopene content at dried tomatoes in the amount of 82.90 mg 100 g⁻¹, which is comparable with our findings at sample of Kecskeméty dried at 70 °C.

To assess changes in lycopene content after drying, we compared the content of lycopene converted per 100% dry matter (Figure 2). The highest content of lycopene in tomato fruits dried at 45 °C was at Paulína variety (99.194 mg 100 g⁻¹ dry matter) and the lowest in Orange variety (9.74 mg 100 g⁻¹ dry matter). The highest content of lycopene at drying temperature of 70 °C was found at variety Kecskeméty (115.898 mg 100 g⁻¹ dry matter) and

the lowest at Orange variety (12.829 mg 100 g⁻¹ dry matter). At 90 °C was the highest carotenoid content in

variety Paulína F1 (101.879 mg 100 g⁻¹ dry matter) and the lowest in Orange variety (8.517 mg 100 g⁻¹ dry matter).

Table 1 Mean content of lycopene (mg 100 g⁻¹ of dry matter) in fresh tomato fruits and homogeneous groups by the Fisher's LSD test

Variety	Mean	Homogeneous group
Orange	63.3778	a
Denár	173.756	b
Paulína F1	176.883	b
Darina F1	208.201	c
Kecskeméty	264.641	d
Šejk F1	302.365	e

Note: means indicated by the same letter are insignificantly different at p < 0.05

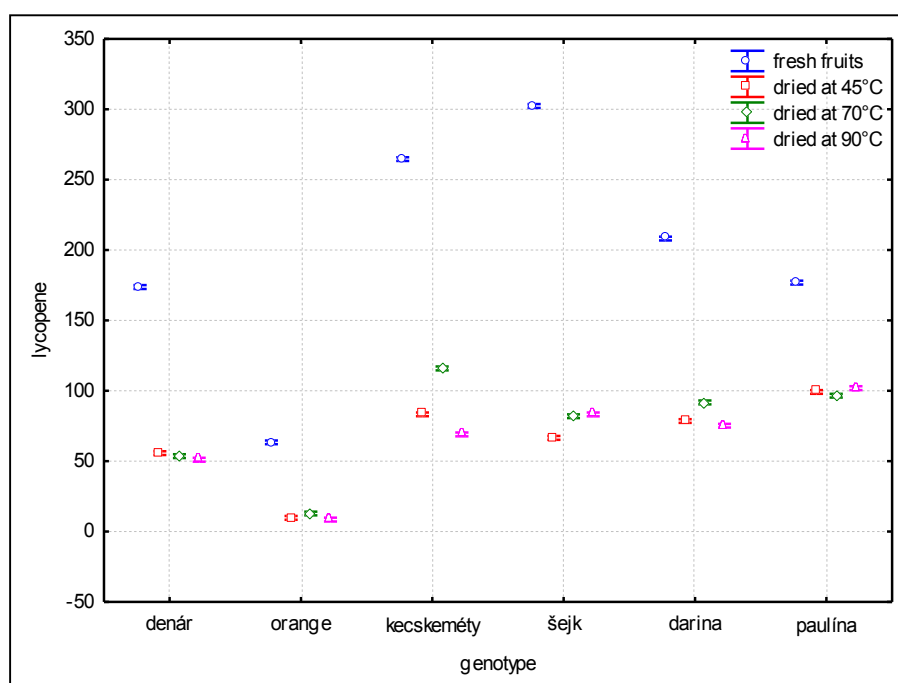


Fig. 1 Mean content of lycopene (mg 100 g⁻¹ of dry matter) in fresh tomato fruits and tomatoes dried at different temperatures

Table 2 Mean lycopene content (mg 100 g⁻¹ of dry matter) in dried tomatoes and homogeneous groups by the Fisher's LSD test

Variety	Mean at 45 °C		Variety	Mean at 70 °C		Variety	Mean at 90 °C
Orange	9.74627	a	Orange	12.8285	a	Orange	8.51704
Denár	55.7197	b	Denár	53.6053	b	Denár	51.0525
Šejk F1	66.5526	c	Šejk F1	81.9546	c	Kecskeméty	69.0464
Darina F1	78.5503	d	Darina F1	91.7592	d	Darina F1	75.2438
Kecskeméty	83.2921	e	Paulína F1	96.5348	e	Šejk F1	83.2331
Paulína F1	99.1944	f	Kecskeméty	115.898	f	Paulína F1	101.879

Note: means indicated by the same letter are insignificantly different at p < 0.05

At all regimes of drying statistically significantly the lowest lycopene content was determined at variety Orange. At drying temperatures of 45 °C and 90 °C was significantly the highest lycopene content at sample Paulina F1 and at 70 °C in the sample Kecskemeti (Table 2).

Based on the measured contents of lycopene as the most suitable temperature for drying in terms of retention of lycopene, as in the case of carotenoids appeared temperature of 70 °C, that was confirmed by the Fisher's LSD test.

It (Table 4) was confirmed statistically significantly that the most appropriate in terms of retention lycopene is drying at temperature 70 °C. At a given temperature, the average content of carotenoids in fruits was 75.43 mg 100 g⁻¹ dry matter, and was significantly higher than the content of lycopene at drying temperatures of 45 °C and 90 °C. Differences in the content of lycopene at

drying temperature of 45 °C and 90 °C were minimal and statistically insignificant. Clearly the highest lycopene content was at fresh tomatoes. Decrease of lycopene content at drying observed Zaroni et al., (1998); Shi et al., (1999); Laveli et al., (1999), who performed experiments with drying of tomatoes at temperatures of 55 °C to 110 °C. Davoodi et al., (2007) indicate that the percentage of lycopene retention is increased when the fruits before drying tomatoes are treated with potassium disulphite and calcium chloride. As reported Zaroni et al., (1998) at heat treatment of tomatoes by drying at 60-110 °C, a drying process takes 10 hours or more. The whole technology is performed in the presence of oxygen, which is reflected not only in the degradation colors of fruit, but also decreases the nutritional quality.

Table 4 Mean lycopene content (mg 100 g⁻¹ of dry matter) in fresh tomato fruits and dried tomatoes

Drying temperature	Mean	Homogeneous groups
90 °C	64.8287	a
45 °C	65.5092	a
70 °C	75.430	b
Fresh fruits	198.204	c

Note: means indicated by the same letter are insignificantly different at p<0.05

CONCLUSION

Production of dried tomato products such as finished products or as an intermediate in the production of dehydrated products, spice mixtures, or in the manufacture of dietary supplements based on lycopene have recently met with great interest of the food manufacturers, pharmacists and professionals and the general public. An important indicator of the quality of these products is their color, which is closely related to keeping the content of carotene pigment - lycopene. In this work, we investigated the effect of drying temperature on lycopene content in dried tomato slices. We tested six varieties of tomato and drying was performed in a hot air oven at 45 °C, 70 °C and 90 °C.

The highest content of lycopene was found to be at fresh fruits of variety Šejk F1 302.365 mg 100 g⁻¹ dry matter. After drying at all observed temperatures there was a decrease of lycopene content on average of 64.48% to 68.3%. The highest content of lycopene in dried slices (115.898 mg 100 g⁻¹ dry matter) was measured at variety of Kecskemeti dried at 70 °C. Crucial to the quality of the final products are variety and processing technology, in particular the temperature at which tomatoes are dried. Based on the results, temperature of 70 °C was determined as the most appropriate of the monitored temperatures for the production of dried tomatoes.

REFERENCES

Abano, E. E., Ma, H., Qu, W. 2011. Influence of air temperature on the drying kinetics and quality of tomato

slices. *Journal of Food Processing & Technology*. vol. 2, no. 5, p. 2-9. <http://dx.doi.org/10.4172/2157-7110.1000123>

Acton, Q. A. 2012. *Cyclohexanes: Advances in research and application*. Atlanta: Scholarly Editions. 84 p. ISBN 978-1-4649-3193-2.

Bidlack, W. R., Rodriguez, R. L. 2011. *Nutritional genomics: The impact of dietary regulation of gene function on human disease*. USA: CRC Press. 448 s. ISBN 978-1-439-84452-6.

Celma, A. R., Cuadros, F., López-Rodríguez, F. 2009. Characterisation of industrial tomato by-products from infrared drying process. *Food and Bioproducts Processing*. vol. 87, no. 4, p. 282-291. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fbp.2008.12.003>

Cernisev, S. 2010. Effects of conventional and multistage drying processing on non-enzymatic browning in tomato. *Journal of Food Engineering*. vol. 96, no. 1, p. 114-118. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2009.07.002>

Contreras, C., Martin, M. E., Chiralt, A., Martínez-Navarrete, N. 2008. Influence of microwave application on drying kinetics, and optical mechanical properties of apple and strawberry. *Journal of Food Engineering*. vol. 88, no. 1, p. 55-64. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2008.01.014>

Davoodi, M. G., Vijayanand, P., Kulkarni, S. G., Ramana, K. V. R. 2007. Effect of different pre-treatments and dehydration methods on quality characteristics and storage stability of tomato powder. *Food Science and Technology*. vol. 40, no. 10, p. 1832-1840. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2006.12.004>

Dorais, M., Ehret, D. L., Papadopoulos, A. P. 2008. Tomato (*Solanum lycopersicum*) health components: from the seed to the consumer. *Phytochemistry Reviews*, vol. 7, p. 231-250. <http://dx.doi.org/10.1007/s11101-007-9085-x>

- Dris, R. - Jain, S. M. 2004. *Production practices and quality assessment of food crops*. Netherlands: Kluwer Academic Publisher, 295 p. ISBN 978-1-402-01698-1.
- García-Valverde, V., Navarro-González, I., García-Alonso, J., Periago, J. M. 2013. Antioxidant bioactive compounds in selected industrial processing and fresh consumption tomato cultivars. *Food Bioprocess Technology*. vol. 6, p. 391-402. <http://dx.doi.org/10.1007/s11947-011-0687-3>
- Greensmith, M. 1998. *Practical dehydration*. Suffolk: Woodhead Publishing. 274 p. ISBN 978-1-85573-394-7 <http://dx.doi.org/10.1533/9781855736566>
- Huang, X. Y., Liu, Y. W., Di, D. L., Liu, J. X., Li, Ch. 2010. An improved LC-DAD method for simultaneous determination of lutein, *b*-carotene and lycopene in tomato and its products. *Chromatographia*, vol. 45, no. 71, p. 331-334 <http://dx.doi.org/10.1365/s10337-009-1417-0>
- Hui, Y. H. 2008. *Food biochemistry and food processing*. USA: John Wiley & Sons. 769 p. ISBN 978-0-470-27634-1.
- Kuti, J. O., Konuru, H. B. 2005. Effects of genotype and cultivation environment on lycopene content in red-ripe tomatoes. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. vol. 85, no. 12, p. 2021-2026. <http://dx.doi.org/10.1002/jsfa.2205>
- Lavelli, V., Hippeli, S., Peri, C., Elstner, E. F. 1999. Evaluation of radical scavenging activity of fresh and air-dried tomatoes by three model reactions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 47, no.9, p. 3826-3831 <http://dx.doi.org/10.1021/jf981372i> PMID: 10552729
- Lewicki, P. P., Porzecka-Pawlak, R. 2005. Effect of osmotic dewatering on apple tissue structure. *Journal of Food Engineering*, vol. 66, no. 1, p. 43-50. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2004.02.032>
- Lockwood, B. 2007. *Nutraceuticals: A guide for healthcare professionals*. Padstow: Pharmaceutical Press. 426 p. ISBN 978-0-85369-659-9.
- Martínez-Valverde, I., Periago, M. J., Provan, G., Chesson, A. 2002. Phenolic compounds, lycopene and antioxidant activity in commercial varieties of tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Journal of the Science of Food and Agriculture*. vol. 82, no. 3, 2002, p. 323-330. <http://dx.doi.org/10.1002/jsfa.1035>
- Mendelová, A., Andrejiová, A., Solgajová, M., Kozelová, D., Mareček, J. 2012. Analysis of carotenoids and lycopene in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) and their retention in tomato juice. *Potravinarstvo*, vol. 6, no. 2, p. 36-38. <http://dx.doi.org/10.5219/195>
- Preedy, V. R. 2012. *Vitamin A and carotenoids: Chemistry, analysis, function and effects*. United Kingdom: Royal society of chemistry. 583 p. ISBN 978-1-849-73368-7.
- Rajoria, A., Kumar, J., Chauhan, A. K. 2010. Antioxidative and anticarcinogenic role of lycopene in human health. *Journal of Dairying, Foods and Home Sciences*, vol. 29, no. 3-4, p.157-165.
- Sharma, S. K., Le Maguer, M. 1996. Lycopene in tomatoes and tomato pulp fractions. *Italian Journal of Food Science*, vol. 8, no. 2, p. 107-113.
- Shi, J., Le Maguer, M., Kakuda, Y., Liptay, A., Kiekamp, F. 1999. Lycopene degradation and isomerisation in tomato dehydration. *Food Research International*. vol. 32, no. 1, p. 15-21. [http://dx.doi.org/10.1016/S0963-9969\(99\)00059-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0963-9969(99)00059-9)
- Takeoka, G. R., Dao, L., Flessa, S., Gillespie, D. M., Jewell W. T., Huebner, B., Bertow, D., Susan E. E. 2001. Processing effects on lycopene content and antioxidant activity of tomatoes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. vol. 49, no. 8, p. 3713-3717. <http://dx.doi.org/10.1021/jf0102721>
- Toor, R. K., Savage, G. P., Lister, C. E. 2006. Seasonal variations in the antioxidant composition of greenhouse-grown tomatoes. *Journal of Food Composition and Analysis*. vol. 19, no. 1, p. 1-10. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfca.2004.11.008>
- Vadivambal, R., Jayson, D. S. 2007. Changes in quality of microwave-treated agricultural products - a review. *Biosystems engineering*. vol. 98, no. 1, p. 1-16. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biosystemseng.2007.06.006>
- Zanoni, B., Peri, C., Nani, R., Lavelli, V. 1998. Oxidative heat damage of tomato halves as affected by drying. *Food Research International*. vol. 31, no. 5, p. 395-394. [http://dx.doi.org/10.1016/S0963-9969\(98\)00102-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0963-9969(98)00102-1)

Acknowledgments:

This work was co-funded by European Community under project no 26220220180: Building Research Centre „AgroBioTech" and KEGA 015 SPU-4/2011.

Contact address:

Ing. Andrea Mendelová, PhD., Slovak University of Agriculture in Nitra, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Department of Plant Processing and Storage, A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovak Republic, E-mail: andrea.mendelova@uniag.sk

Ing. Lubomír Mendel, PhD., Plant Production Research Center Piešťany, Bratislavská 122, 921 68 Piešťany, Slovak Republic, E-mail: mendel@vurv.sk

doc. Ing. Martina Fikselová, PhD., Slovak University of Agriculture in Nitra, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Department of Food Hygiene and Safety, A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovak Republic, E-mail: martina.fikselova@uniag.sk

Ing. Peter Czako, PhD., Slovak University of Agriculture in Nitra, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Department of Plant Processing and Storage, A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovak Republic, E-mail: peter.czako@uniag.sk



QUALITY AND AVAILABILITY OF ORGANIC FOODS BY SLOVAK CONSUMERS

Dagmar Kozelová, Vladimír Vietoris, Martina Fikselová

ABSTRACT

The increasing consumer demand for organic products caused that the organic food market has expanded in all continents of the world. Organic foods represent a specific segment of the food market. Currently land area farmed organically in Slovakia represents 9% of the total agricultural land. In this work we identified organic foods purchase by Slovak consumers, the availability, reasons of purchase and quality assortment of organic foods at the Slovak market. Questionnaire survey involved 271 respondents. The Hierarchical multiple factor analysis was used for the segregation and classification of consumers into representative groups. The group of respondents was based on algorithms divided into three groups. In the first group of respondents, prevalent are responses that assortment is not sufficient and no answer, in the second group think that organic food assortment is not sufficient, and in the third group of respondents also dominates opinion that is not sufficient. At the question of organic food quality in all three groups is prevalent opinion that it is rather high, in the first group nearly the third of respondents considered the quality of organic foods as rather low, in the second group of respondents is rate: „rather low“ response and „rather high“ almost equal. In the third group of respondents strongly dominated response that the quality of organic food is rather high. Regarding the availability of organic products at the Slovak market, 16% of respondents considered it to be sufficient, 54% of consumers considered assortment as not enough available for all. We also analyzed the reasons of buying organic food. 42% of respondents reported that the main reason for buying organic food is a concern for the environment and landscape, 33% of respondents state it is a pleasure and the opportunity to try something unusual, 11% reported confidence in the quality of organic food and 7% their health care. Environmental education in the family since childhood and the opinions of friends significantly influence consumers when buying food and organic food. We assume that, organic food will be processed minimally in the future. Consumer demand for organic food we recommend to increase by increased support of the direct sales, informing about quality of organic foods and their beneficial effects on the human body at basic and secondary schools, organizing of excursions to organic farms and processing companies.

Keywords: organic food; consumer behavior; reasons of purchase; quality; availability

INTRODUCTION

Currently land area farmed organically in Slovakia represents 9% of the total agricultural land. The main goal of organic agriculture is to optimize the health and productivity of dependent communities: soil life, plants, animals and humans (Mulero et al., 2010). Competitiveness in the agriculture and food sectors and the impact of globalization on the food market is discussed by Bielik & Rajčániová (2004). Production of agricultural products and farming as an industry of the national economy plays an important role in the economic base of rural areas of Slovakia (Fáziková & Hamada, 2011). Schwarczová et al. (2010) analyzed knowledge and skills of farmers and experts in organic agriculture.

As defined in the Act of the National Council of the Slovak Republic No. 152/1995 on food, organic food is produced from raw materials coming from organic farming - the plant production, which uses special crop rotation, green fertilization, organic manure, mechanical and

biological methods of plant protection; and the animal production which uses feed coming exclusively from organic crop production and simultaneously uses special veterinary care.

The aim of this work was to evaluate slovak respondent opinions on reasons of organic foods purchase, the quality and product assortment availability of organic foods at the Slovak market.

MATERIAL A METHODOLOGY

Consumer opinions about purchase of organic foods and their preferences and shopping behaviors were obtained by using a questionnaire technique. The survey was performed from December 2010 till March 2011. 271 respondents attended, of which 73% are women and 27% men.

In our survey, 271 respondents participated in the following age structure: category 18 to 30 years is 28% of the respondents, the second age category from 31 to 40

years is 48% of the respondents, the third category of age 41 to 50 years represented 11% of respondents, the fourth category of 51 to 60 years represented 12% respondents, the fifth age group above 61 years is 1% of respondents. By education dominated respondents with secondary education by 63%, followed by respondents with the university education 32% and 5% of respondents had only basic education.

Agglomerative hierarchical clustering on the contingency tables derived from the dataset by the method of Agnes R (Agglomerative Nesting) has been used to highlight the structure (similarities of the responses), R Development Core Team (2011). The Hierarchical multiple factor analysis (HMFA), which is a part of a specialized R package for work with questionnaires EnquireR (R Development Core Team 2011) was used for the segregation and classification of consumers into representative groups. The group of respondents was based on algorithms divided into 3 groups.

RESULTS AND DISCUSSION

Our results show that assortment of organic products at the Slovak market was by 9% of respondents considered as sufficient, 55% of respondents think is not sufficient and 36% of respondents can not judge it. In the first group of respondents, prevalent are responses that assortment is not sufficient and no answer, in the second group think that organic food assortment is not sufficient, and the third group of respondents also dominates opinion that is not sufficient (Fig. 1). Consumer preferences for organic food were analyzed by several authors. **Padel & Foster (2005)** state that in the decision-making process consumer comprehensively evaluates motives and barriers to buying organic food.

We also analyzed the reasons of buying organic food. 42% of respondents reported that the main reason for buying organic food is a concern for the environment and landscape, 33% of respondents state it is a pleasure and the opportunity to try something unusual, 11% reported confidence in the quality of organic food and 7% their health care.

One important factor when deciding to buy organic food is the knowledge of the product by customers (**Verbeke, 2008**). The strongest reason for buying organic food for Romanian respondents is also health care. This reason was presented by 42% of respondents. The second most important reason for 25% of respondents is their own health problems. The third is concern about the environment (16%) and the fourth is a vegetarian diet (15%). Two percent of respondents buy organic products randomly (**Potclan, 2012**). Reasons of Chinese consumers to buy organic food were examined by **Shiji et al., (2010)** and were found to be strongly influenced by factors such as income funds, the level of trust in organic food, the rate of acceptance of organic food prices and consumer concerns about own health, and only slightly influenced by factors such as consumer age, education level and interest in environmental protection.

We monitored sources where consumers receive information about organic food as well. We found that the most frequently used source of information about organic food is for 33% of the respondents internet. One fifth of respondents reported professional journals and books. TV

is information for 16% of respondents, leaflets and brochures 15% of respondents, from newspapers, friends and colleagues take information 8% of respondents.

Research of products and origin of organic foods offered at the Slovak market in three retail chains and specialized stores was performed by **Abrhan (2011)**. Most of organic food came from the countries of the European Union (98%). Outside the EU, the stores with organic products have only coffee and bananas from Ecuador. The largest share of the market was for the Czech Republic (28%), followed by Italy (24%), Slovakia (22%), Germany and Poland consistently with an 8% share. The Czech Republic had the largest portion (beef, ketchup, pasta, rice and spelt breads, oatmeal, flaxseed oil, teas) **Abrhan (2011)**.

Availability of organic products at the Slovak market considered 16% of respondents to be sufficient, 54% of organic food consider it as not enough available for all consumers and 30% of respondents to this question could not reply. In the second and third group of respondents think that organic foods are not available for all respondents (Fig. 2).

At the question of organic food quality in all three groups is prevalent opinion that it is rather high, in the first group nearly the third of respondents considered the quality of organic foods as rather low, in the second group of respondents is rate: „rather low“ response and „rather high“ almost equal. In the third group of respondents strongly dominated response that the quality of organic food is rather high (Fig. 3).

Quality of organic foods and their derived products were analyzed by several authors. Complex analysis of organic and conventionally grown oranges made **Turra et al. (2006)**, who confirmed that for the processing of orange juices are more preferable ones from an environmental management system because of the higher content of vitamin C. **Frančáková et al. (2012)** state that different varieties of apples and juices are rich source of polyphenols and antioxidant active substances from organic production, so these contain nutritionally important substances in higher amounts.

The quality and safety of raw cow's milk is important for dairy processing companies and consumers of milk products. The content of fat, protein and solids-non-fat are the main indicators used for technological purposes (**Zajác et al., 2012**). Milk quality from organic and conventional production was also compared. Higher content of fat (4.23 g/100g) and protein (3.41 g/100g) in organic milk in comparison to conventional milk (4.11 g/100g, resp. 3.39 g/100g) were found. Conventionally produced milk had significantly lower heat resistance. Better heat stability of organic milk and higher content of calcium correspond with higher technological quality (**Čuboň et al., 2008**).

Microbiological analysis of the quality of eggs from organic and conventional farming of laying hens was done by **Kačániová et al., (2006)**. Occurrence of microorganism groups on the surface of egg shells was compared. The number of coliform bacteria (including *Escherichia coli*), lactobacilli and number of mesophilic and aerobic sporulating microorganisms in organic farming is lower than in conventional farming. The number of enterococci and fungi is lower in conventional breeding.

The research of O'Donovan and McCarthy (2002) states that consumers consider organic meat to be better compared to conventional meat in terms of quality, safety, labeling, production methods, and nutritional value.

Winemakers who decided to produce organic wines must comply with the rules of organic production in accordance

with the relevant legislation. Significant differences in the evaluation of the quality of the resulting wines coming from conventional growing compared to organic are not known (Kirsanov et al., 2012; Vietoris et al., 2011).

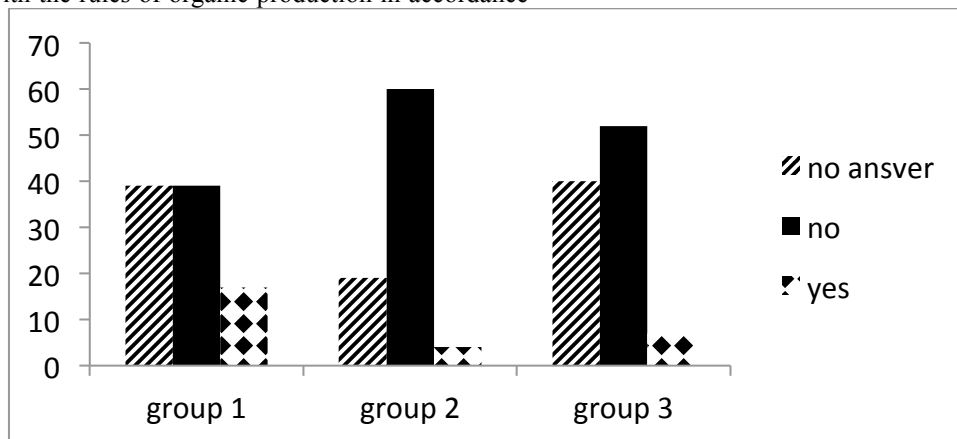


Figure 1 Barplot of question : Is assortment of organic products at the Slovak market sufficient?

1: no answer, 2: no, 3: yes

Source: Own research and processing

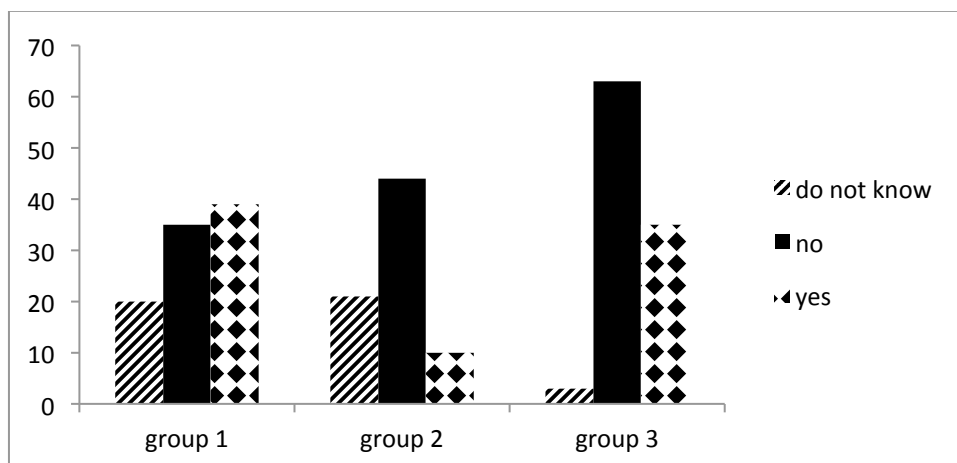


Figure 2 Barplot of question : Are organic foods available at the Slovak market for all consumers?

1: do not know, 2: no, 3: yes

Source: Own research and processing

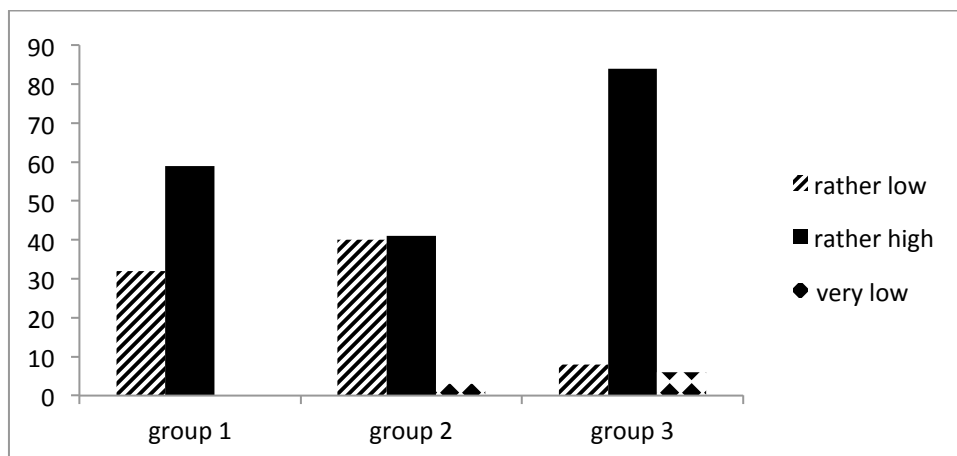


Figure 3 Barplot of question : Quality of organic foods at the Slovak market

1: rather low, 2: rather high, 3: very low

Source: Own research and processing.

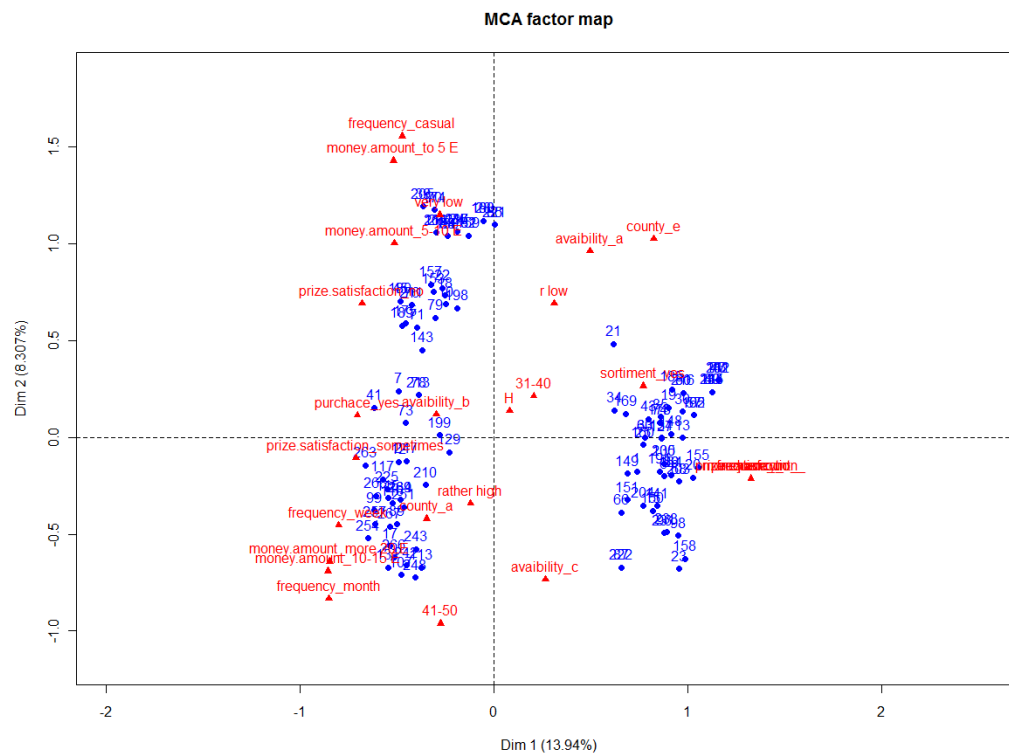


Figure 4 HMFA map of individual respondent positions and response categories
Source: Own research and processing.

Environmental education in the family since childhood and the opinions of friends significantly affect consumers when buying food and organic food. Social factors influencing buying behavior are external influences such as the reference group, or family. Their views on consumer food choices were processed and subsequently led to the decision to buy a particular product. Slovak consumers are significantly interested in the consumption of organic products, and it is expected to be increased (Kozelová et al., 2011; Turňová, 2011).

In the structure of purchased organic food at the Slovak market respondents prefer cereal products (26%), fresh and processed vegetables (24%), fresh and processed fruits (15%). Followed by 10% of dried legumes and eggs (10%), 7% of respondents buy milk and dairy products, potatoes by 5%, 3% of meat and meat products.

Matysik-Pejas and Szafranská (2009) consider as the most common forms of organic food distribution in Poland direct farm sale, sale from farm to specialized shops, conventional processing establishments, marketplace and to organic processing establishments. Farms located either in the county with the highest concentration of organic farming or in the vicinity of cities reach the best return on sales.

Several analyzes of consumer buying behavior show that organic food are bought mostly by consumers of higher education (Aguirre, 2007).

The interesting results found Kolačkovská (2012), with 317 views of Slovak consumers aimed at organic nutrition of children examined whether there are differences

between the two groups of respondents, a group that has and a group that does not have pre-school aged children in their household. In the group, which has the pre-school age children in households consume four times more organic. In the group, which consisted of no pre-school age children, up to 28% no organic food was consumed. Respondents who have the preschool children at home and have lower monthly income are even so willing to respect the needs of children and to buy organic food and to introduce them at home.

CONCLUSION

By analyzing the behavior of Slovak consumers at the market with organic products were created three groups of respondents. In all three groups of respondents generated, prevalent was secondary education, while the second and the third group consisted of more than the third of respondents with a university education. In all three groups of respondents is opinion that organic food quality is rather high.

Availability of organic products at the Slovak market considered 16% of respondents to be sufficient, 54% of organic food consider it as not enough available for all consumers. Survey of consumer opinions on the quality and availability of food offered at the Slovak market with organic products shows that all respondents knew the term "organic", but only 65% respondents purchases organic food. The most frequently are bought cereal products (26%), fresh and processed fruits and vegetables (24%), fresh and processed fruits (15%). Followed by 10% of

dried legumes and eggs also by 10%, 7% of respondents buy milk and dairy products, potatoes 5%, meat and meat products 3%. The mostly respondents (42%) buy organic food because of environmental reasons and (33%) enjoyment, the opportunity to try something new.

REFERENCES

- Abrhan, K. 2011. *Ekologická poľnohospodárska výroba a kvalita biopotravin na slovenskom trhu. Bakalárska práca.* Nitra : SPU, 39 p.
- Act of the National Council of the Slovak Republic no. 152/1995 on food, organic food and food produced from raw materials coming from organic farming.* (accessed 10/05/2013).
- Aguires, J. A., 2007. The farmer's market organic consumer of Costa Rica. *British Food Journal.* vol. 109, no. 2, p. 145-154. <http://dx.doi.org/10.1108/00070700710725509>
- Bielik, P., Rajčániová, M. 2004. Competitiveness analysis of agricultural enterprises in Slovakia. *Agricultural Economics.* vol. 50, no. 12, p. 556-560.
- Čuboň, J., Foltys, V., Haščík, P., Ubrežiová, I., Kráčmar, S. 2008. The raw milk quality from organic and conventional agriculture. *Acta univ. agric. et silvic. Mendel. Brun.*, vol. LVI, no. 5, p. 25-30.
- Fáziková, M., Hamada, M. 2011. Determinants of knowledge economy in agricultural enterprises. *Agrarian perspectives.* Praha: Czech University of Life Sciences, 2011, p. 23-30. ISBN 978-80-213-2196-0.
- Frančáková, H., Bojňanská, T., Ivanišová, E., Mendelová, A., Vietoris, V., Solgajová, M., Dráb, Š., Tokár, M. 2012. Benefits and risks of apple juices enriched with herbal extracts. *Xenobiotics.* Rzeszów: Wydawnictwo Uniwersytetu Rzeszowskiego, p. 305-312. ISBN 978-83-7338-785-0
- Kačániová, M., Čuboň, J., Haščík, P., Pavličová, S., Sudzinová, J. 2006. Mikrobiologická kvalita vajec z ekologického a konvenčného chovu nosníc. *Aktuálne problémy riešené v agrokomplexe: zborník z XI. medzinárodného vedeckého seminára, Nitra 10. november 2006.* Nitra: Slovenská poľnohospodárska univerzita, p. 361-367. ISBN 80-8069-799-X.
- Kirsanov, D., Mednova, O., Vietoris, V., Kilmartin, P. A., Legin, A. 2012. Towards reliable estimation of an "electronic tongue" predictive ability from PLS regression models in wine analysis, *Talanta.* vol. 90, p. 109-116. <http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2012.01.010> PMID: 22340124
- Kolačková, J. 2012. *Biopotraviny vo výžive detí a analýza ich spotreby v rodinách a v materských školách v okrese Zvolen.* Bakalárska práca. Nitra : SPU, 70 p.
- Kozelová, D., Mura, L., Matejková, E. Lopašovský, E., Vietoris, V., Mendelová, A., Bezáková, M., Chreneková M. 2011. Organic products, consumer behavior on market and european organic product market situation. *Potravinárstvo.* vol. 5, no. 3, p. 20-25. <http://dx.doi.org/10.5219/96>
- Matysik-Pejas, R., Szafranska, M., 2009. Preferencie a požiadavky poľských spotrebiteľov na ekologické produkty. Horská, E. et al. 2009. *Európsky spotrebiteľ a spotrebiteľské správanie.* Nitra : SPU, p. 189, ISBN 978-80-552-0318-8.
- Mulero, J., Pardo, F. Zafrilla, P., 2010. Antioxidant activity and phenolic composition of organic and conventional grapes and wines, *Journal of Food Composition and Analysis,* vol. 23, no 6, p. 569-574 <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfca.2010.05.001>
- O'Donovan, P., Mc Carthy, M., 2002. Irish consumer preference for organic meat. *British Food Journal.* vol. 104, no. 2-4, p. 353-370. http://dx.doi.org/10.1108/0007070_0210425778
- Padel, S., Foster, C. 2005. Exploring the gap between attitudes and behaviour - Understanding why consumers buy or do not buy organic food. *British Food Journal.* vol. 107, no. 8, p. 606-625. <http://dx.doi.org/10.1108/00070700510611002>
- Potclan, J. E. 2012. *Ekologická poľnohospodárska výroba a spotreba biopotravin na trhu v Rumunsku. Bakalárska práca.* Nitra : SPU, 38 p.
- R Development Core Team, (2011). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, Available at: <http://www.R-project.org/>.
- Schwarczová, L., Schwarcz, P., Bandlerová, A., Marišová, E., 2010. Analysis of knowledge and skills of farmers and experts in organic agriculture in Slovak Republic and selected EU countries. *Agricultura Transgenica y calidad alimentaria, analisis de derecho comparado,* Universidad de Castilla, Ediciones de la Universidad de Castilla, p. 565, ISBN: 978-84-8427-849-8.
- Shijiu, Y., Chen, M., Du, L., Wu, L. 2010. Consumers' purchase intention of organic food in China. *Journal of the Science of Food and Agriculture,* vol. 90, no. 8, p. 1361-1367. <http://dx.doi.org/10.1002/jsfa.3936> PMID: 20474056
- Turňová, Z. 2011. *Bezpečnosť a dostupnosť biopotravin z pohľadu spotrebiteľa. Bakalárska práca.* Nitra : SPU, 33 s.
- Turra, C., Fernandes, M., Bacchi, M., Tagliaferro, F., Franca, E., 2006. Differences between elemental composition of orange juices and leaves from organic and conventional production systems. *Radioanalytical and Nuclear Chemistry.* vol. 27, no. 1, p. 203-208. <http://dx.doi.org/10.1007/s10967-006-0329-9>
- Verbeke, W. 2008. Impact of communication on consumers' food choices. *Proceedings of the Nutrition Society.* vol. 67, no. 3, 2008, p. 281-288, ISSN 00296651.
- Vietoris, V., Kirsanov, D., Zajác, P., Čapla, J., Legin, A. 2011. Taste profile comparison Slovak Blaufränkisch wines estimated by potentiometric multisensor system and sensory panel. *9th Pangborn sensory science symposium* : 4 - 8 September 2011, Toronto, Canada. New York : Elsevier Scientific Publishing Company, 2011.
- Zajác, P., Tomáška, M., Murárová, A., Čapla, J., Čurlej, J. 2012. Quality and safety of raw cow's milk in Slovakia in 2011. *Potravinárstvo,* vol. 6, no. 2, p. 64-73. <http://dx.doi.org/10.5219/189>

Contact address:

Dagmar Kozelová, 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.

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

Martina Fikselová, 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: martina.fikselova@uniag.sk.



STUDY OF ANTIOXIDANT ACTIVITY OF NATURAL FOOD SUPPLEMENTS

Tetyana Lozova

ABSTRACT

This article describes the results of a study of antioxidant activity of natural food supplements suggested for use in flour confectionery production. Oxidation rate of the model substance - cumene - was measured using a volumetric unit. Diagram of absorbed oxygen amount as a function of time (ΔH_{O_2} over t) was built by measuring time in minutes and absorbed oxygen volume in cm^3 . This diagram was subsequently used to graphically determine the oxidation rate as the slope ratio of the line in specified coordinates. Afterwards, the oxidation rate was measured at a different initiation rate (different azobisisobutyronitrile solution volume), while all other parameters of the experiment remained unaltered. On the basis of the resulting data, diagrams of oxidation rate as a function of initiation rate were built for all investigated substances (both extracts and powders). The study revealed that apian products, including pollen and propolis, as well as kidney bean powder and phytosupplements (leaves of leather bergenia, lime blossom, heartsease, wild chamomile, pepper mint, bog rosemary, and elderflowers), possessed high antioxidant activity. According to the research data, the highest activity was detected in propolis 0.482·20 pollen 0.802 and powdered forms of pepper mint 1.066 leather bergenia leaves 0.937 heartsease 0.385 lime blossom 0.331 and kidney beans 0.323. Relatively lower antioxidant activity was found in powdered bog rosemary 0.242 elderflowers 0.238 and wild chamomile 0.212. (Introduction of the investigated supplements will allow inhibiting oxidation processes in the lipide fraction of foodstuffs, including flour confectionery, to ensure stability of their qualitative characteristics over a longer period).

Keywords: antioxidant activity; chain free-radical oxidation; alternative raw materials; natural food supplements; apian products

INTRODUCTION

Nutrition is one of the dominant factors that have a significant impact on human health. This said, the healthy nutrition industry was established with the aim of producing prophylactic (functional) food products. The main trend in the development of such products is to reduce artificial supplement content by introducing natural polynutrient complexes of plant or animal origin. Use of apian products and medical/technical raw materials proves to be a promising approach to the development of new types of functional foodstuffs. Such natural supplements will enrich food, including flower confectionery, with biologically active compounds while inhibiting oxidation processes. The role of free radicals in triggering pathological changes in the human body has been known for a long time. Free radical particles, generated by biochemical processes occurring in the body, initiate oxidation processes that eventually result in damage to genetic material T-cells and cause various deceases. The free radical oxidation process is considered to be one of the reasons behind aging (Ivanova & Karyakina, 2011).

Theoretical and practical aspects of the identification of antioxidant activity in certain supplements have been covered in the works published by several researchers.

In this study, data on antioxidant activity of drupaceous fruit (cherry, plum, peach apricot, nectarine) obtained using the DPPH, ABTS, FRAP and TBARS methods were summarized. Further presented were the results of studies of antioxidant activity in drupaceous fruit as compared to other fruit (raspberry, apple, mango etc.), which were followed by a discussion of the examples of practical application of drupaceous fruit as oxidation inhibitors in meat products (Makarova & Zuzina, 2011).

It was determined that extracts from raw unshelled sesame seeds were most effective in terms of protection of oils against oxidation. They can be used as a source of natural antioxidants in vegetable oil production (Konsoula & Liakopoulou - Kyriakides, 2010).

Subsequently, the antioxidant activity of methanonic extract of Kotschyi var. Persica, as well as its fatty acid profile, was examined. Antioxidant activity of methanonic extract was evaluated using gas chromatography methods. The IC₃₀ value was 37.09 $\mu g/mL$. It has been shown that the extract inhibits oxidation with linoleic acid by 65.22% in a β -carotene/linoleic acid system. The total phenol content and total antioxidant activity amounted to 36.52 mg of gallic acid equivalent and 74.93 mg of ascorbic acid equivalent, respectively. The primary fatty acid in the studied sample was C 18:3 ω 3 (α -linolenic

acid). It was demonstrated that this material could be used as a natural food supplement (Zengin et al., 2011).

Furthermore, it was shown that fruit and vegetables rich in polyphenols possessed antioxidant properties and were an important source of bioactive compounds and dietary fibers (Hervert - Hernandez et al., 2011, Müller et al., 2010). Natural antioxidants found in fruit, vegetables and legumes help maintain the vascular system in healthy condition (Wanget al., 2011).

Antioxidant activity studies showed that extracts with a high content of anthocyanidins obtained from *Bactrisguineensis* fruit, as well as anthocyanins from Camarosa strawberry, dried cranberry, rosemary leaves (DRL) and thyme leaves (DTL), could be used in the food industry as an effective antioxidant material (Osorio et al., 2011, Cerezo et al., 2010, Nieto et al., 2011, Ramalho & Jorge, 2008). Additionally demonstrated was the antiradical action of phenol components and anthocyanins in Myrtaceae fruit (Reunertson et al., 2008).

It was also proven that methanonic extracts obtained from Sicilian red grape pomace with removed stems possessed high antioxidant activity. The highest activity was discovered in the sample with the highest content of anthocyanins that had a free catechol group in their structure (Giuseppe et al., 2007). Very high antioxidant activity was also identified in mashed unpeeled apples with an addition of 5% rhubarb juice due to large phenol compound content (Oszmiański & Wojdyło, 2008). However, scientific data show that the problem of identifying and exploring antioxidant activity of natural plant raw materials has remained generally under-investigated, giving relevance to our studies, the results of which are described in this article.

MATERIAL A METHODOLOGY

Oxidation rate of the model substance - cumene - was measured using a volumetric unit. 3 ml of cumene (isopropylbenzene) were introduced into a 10 ml reactor using a pipette. After that, either the investigated extract (0.2 ml) or powdered inhibitor substance (100 mg) was placed in the reactor. 0.1-0.5 cm³ of the initiator solution (azobisisobutyronitrile) in *o*-xylene with the concentration of 0.1 mol/dm³ were introduced into the same reactor using a 0.5 cm³ measuring pipette. Since the mixture volume in the reactor (according to the accepted methodology) should always be 5 cm³, a 5 cm³ pipette was used to draw the necessary amount of *o*-xylene (solvent) so that the volume of all substances in the reactor would be 5 cm³, and transfer it to the reactor. Temperature during all measurements reached 74 °C. An oxygen absorption measurement unit was employed (Fig. 1).

Temperature-controlled burette (6) was filled with oxygen. To do that, valve (3) was opened to connect the system to the atmosphere while valve (5) was closed, and leveling vessel (7) was lifted until the liquid level in burette (6) reached the upper mark. After that valve (3) was closed, and the burette was filled with oxygen through the valve (5), while vessel (7) was lowered until the liquid level in vessel (7) reached the lower mark of the burette. Reactor (1) and burette (6) were connected to each other through three-way valve (4) and to the atmosphere through valve (3).

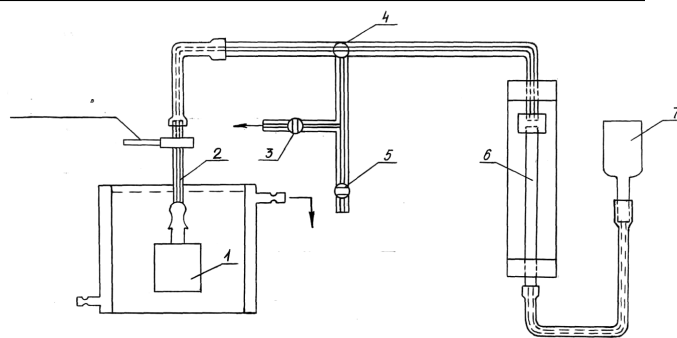


Fig. 1 Oxygen absorption measurement unit: 1 - reactor; 2 - glass capillary tube; 3, 5 - one-way valves; 4 - three-way valve; 6 - measuring burette; 7 - leveling vessel

The reaction mixture was ventilated with oxygen for 1.0 minute through a capillary tube inserted into reactor (1). Reactor (1) was immersed into a thermostat, where temperature set by the experimenter was maintained with the accuracy of ± 0.1 °C, and shaken with the frequency of approximately 50 cycles per second to ensure oxygenation of the reaction mixture in the process of mixing. A stopwatch was activated at the same time. The reactor was thermostatically controlled for approximately 12-15 minutes (but always for the same period). After warming up the reactor, burette (6) and reactor (1) were disconnected from the atmosphere using three-way valve (4), but left connected to each other, and measurement of oxygen absorption by cumene started by periodically measuring liquid levels in burette (6) and leveling vessel (7) and recording the values on minute-by-minute basis. The liquid meniscus progression speed in the measuring burette was proportional to the rate of oxygen absorption by cumene. Diagram of absorbed oxygen amount as a function of time (ΔH_{O_2} over t) was built by measuring time in minutes and absorbed oxygen volume in cm³. This diagram was then used to graphically determine the oxidation rate as the slope ratio of the line in the specified coordinates. After that the oxidation rate was measured at a different initiation rate (different azobisisobutyronitrile solution volume), while all other parameters of the experiment remained unaltered. On the basis of the resulting data, diagrams of oxidation rate as a function of initiation rate were built for all investigated substances (extracts or powders).

In the unit shown in Figure 1, the amount of absorbed oxygen is proportional to the sealing liquid column height measured in mm. The initiation rate is proportional to the volume of introduced initiator in ml. To convert the reaction rate expressed in mm/minute into mol/l×sec, the result is multiplied by the coefficient of the unit used to conduct the study: 1 cat. mark = 2.323×10^{-7} mol O₂ unit coefficient = $K=7.667 \times 10^{-7}$ mol/L×sec. To convert the ml for 0.1 M azobisisobutyronitrile initiator solution into initiation rate, the X-axis readings on the diagram of oxidation rate as a function of initiation rate should be multiplied by the coefficient: 1.647×10^{-7} mol/L×s.

RESULTS AND DISCUSSION

Experimental results are shown in the Fig. 2 - Fig. 11.

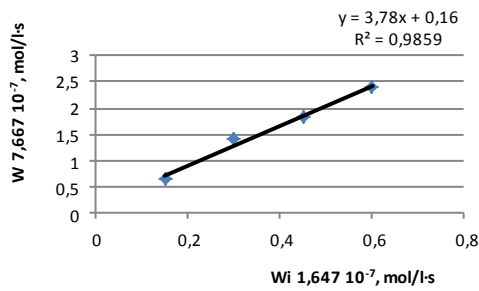


Fig. 2 Oxidation rate as a function of initiation rate of Propolis

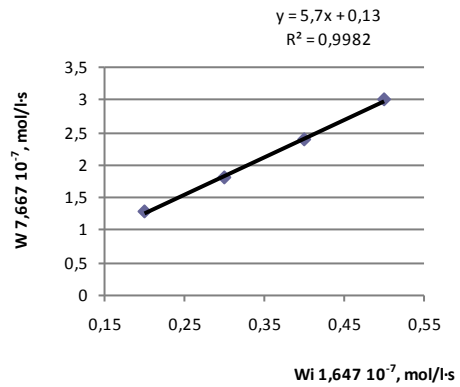


Fig. 6 Oxidation rate as a function of initiation rate of Lime blossom powder

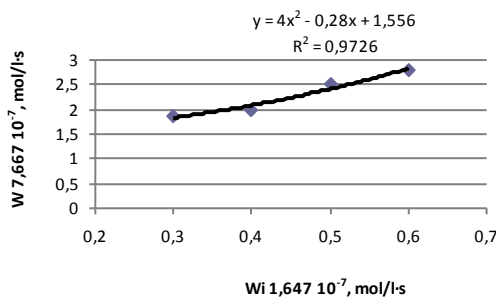


Fig. 3 Oxidation rate as a function of initiation rate of Mint powder

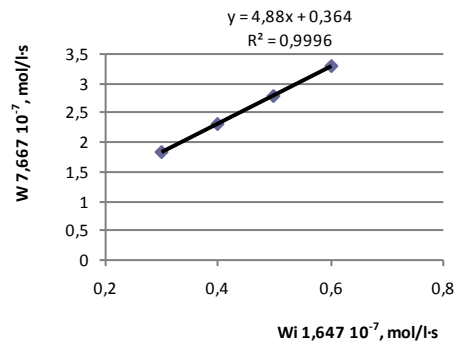


Fig. 7 Oxidation rate as a function of initiation rate of Heartsease powder

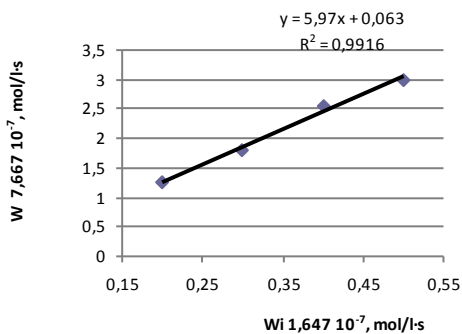


Fig. 4 Oxidation rate as a function of initiation rate of Kidney bean powder

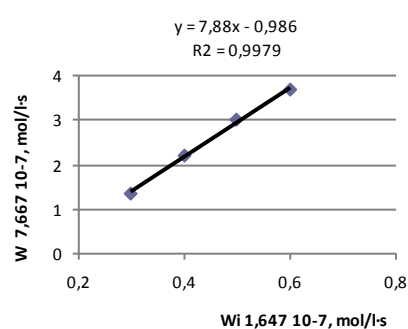


Fig. 8 Oxidation rate as a function of initiation rate of Elderflower powder

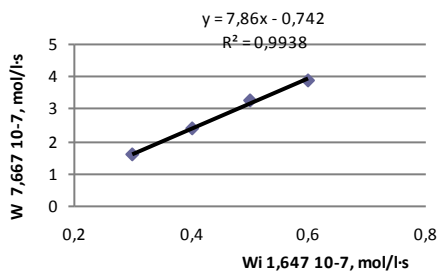


Fig. 5 Oxidation rate as a function of initiation rate of Rosemary powder

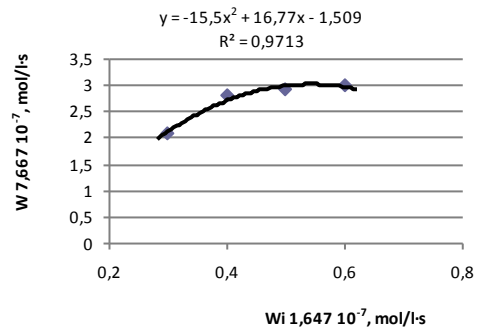


Fig. 9 Oxidation rate as a function of initiation rate of Wild chamomile flower powder

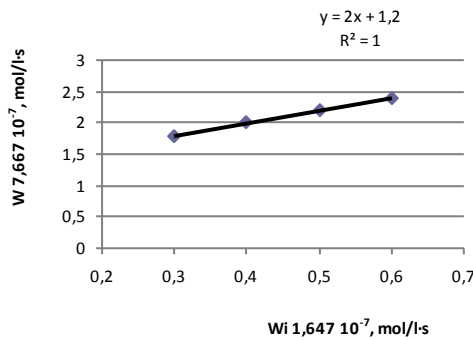


Fig. 10 Oxidation rate as a function of initiation rate of Bergenia leaves powder

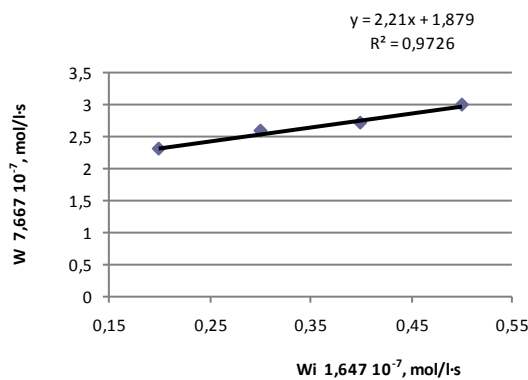


Fig. 11 Oxidation rate as a function of initiation rate of Pollen

It is known that the nature of substance oxidation, i.e. presence (or absence) of inhibitors in the system, can be determined on the basis of the dependency between the rate of chain free-radical oxidation of organic substances (in our case, this is model substance - cumene or fat) and the initiation rate. For instance, the following dependency applies to systems with no inhibitors:

$V_{O_2} = (k_2/k_6^{0.5}) \cdot [RH] \cdot V_i^{0.5} = \alpha \cdot V_i^{0.5}$, that is, if we oxidize the model substance with addition of a certain amount of an extract or powder-like substance at different initiation rates, determine the oxidation rates, and then build a diagram in the $V_{O_2} - V_i^{0.5}$ coordinate system, and the experimental points form a straight line as a result, this will mean that there are no inhibitors in the system. The inclination of the resulting straight line is:

$\alpha = (k_2/k_6^{0.5}) \cdot [RH]$. In the presence of inhibitors (i.e., if our extract or powder contain substances with antioxidant properties), the dependency between the oxidation rate and the initiation rate obeys the following equation:

$V_{O_2} = (k_2 \cdot [RH] / k_7 \cdot f \cdot n \cdot [InH]) \cdot V_i = \alpha \cdot V_i$. In this case, if we oxidize the substance at different initiation rates and then build a diagram in the $V_{O_2} - V_i$ coordinate system, and the experimental points form a straight line as a result, this will indicate the presence of inhibitors in the system.

The results of the experimental study were processed on a personal computer using the Microsoft Excel environment. The following steps were performed to build the model: initial data collection and preprocessing; generation of a list of factors and their logical analysis; regression function specification; regression function

evaluation; model adequacy verification; model parameter interpretation; forecasting of unknown values of the dependent variable. The simplest equation that can be used to characterize the dependency between the two variables is a straight line equation that describes a relation between the variables, where any change of the independent variable by a constant value results in a change of the dependent variable by another constant value. A parabolic equation was also employed. The model accuracy was evaluated using determination coefficient R^2 which established consistency between the resulting regression equation and the empirical data. This coefficient ranges from 0 to 1, and the closer it is to 1, the more accurate the model is. The regression models that we built can be considered adequate. For instance, determination coefficient value $R^2 = 0.97$ for the "Pollen" antioxidant shows that 97% of the total variation is due to changes in the factorial attribute, i.e. the initiation rate. The resulting regression models allow forecasting the oxidation rate at a specified initiation rate. For example, the equation for the "Pollen" antioxidant is $y = 2.21x + 1.879$. To forecast the oxidation rate at the initiation rate of, for instance, $0.36 \cdot 10^7$ mol/l·s, let us insert the value of $x = 0.36 \cdot 10^7 \cdot 1.647 \cdot 10^{-7} = 0.6$ into the equation. The resulting value is $y = 3.205$. Taking into account the transformation coefficient of $7.667 \cdot 10^{-7}$, we now determine the oxidation rate: $W = 3.205 / 7.667 \cdot 10^{-7} = 0.418 \cdot 10^7$ mol/l·s.

The line slope ratio is $\alpha = (k_2 \cdot [RH] / k_7 \cdot f \cdot n \cdot [InH])$, where: k_2 is chain extension rate constant; k_7 - chain interruption rate constant; $[InH]$ - molar concentration of the inhibitor (Table 1). Based on the experimental data (tg α) and with known $[RH]$, one can determine the value of $k_2 / k_7 \cdot f \cdot n \cdot [InH]$, and then, based on known k_2 (from reference data), determine $k_7 \cdot f \cdot n \cdot [InH]$. After that, k_7 can be evaluated. This value serves as a measure of the substance's antioxidant activity. The larger it is, the higher the antioxidant properties of the supplement are. Dimension of quantity $K_7 \times f \times n \times [InH] = [l/mol \times s] [mol/l] = [1/s]$. As shown by the results of the study, antioxidant activity of the used types of natural food supplements is relatively pronounced. However, this property is most strongly exhibited by apian products (propolis - 0.482 · 20; pollen - 0.802). High antioxidant activity was found in pepper mint powder - 1.656, bergenia leaves powder - 0.937, heartsease flower powder - 0.385; small-leaved lime powder - 0.331; and kidney bean powder - 0.323. Relatively lower antioxidant activity was demonstrated by powdered forms of bog rosemary - 0.242, elderflowers - 0.238, and wild chamomile - 0.212.

The results of the study were widely discussed at international research-to-practice conference *Commodity Science and Commercial Business: Professional Development, Research and Innovation* held at Kyiv National University of Trade and Economics (Lozova, 2009), as well as international research-to-practice conference *Environment and Human Health* held at Uzhhorod National University (Lozova, 2008). In the course of discussion, it was shown that this method for determination of antioxidant activity was equivalent to a range of other methods usually applied to analyze the antioxidant properties of supplements based on the peroxide, benzidine or thiobarbituric number.

Table 1 Results of the antioxidant activity study

Antioxidant	$tg\alpha$; (mm/min)/ml	$tg\alpha = (k_2 \cdot [RH] / k_7 \cdot f \cdot n \cdot [InH])$.	$K_7 \times f \times n \times [InH]$
Pollen	2.335	10.977	0.802
Elderflower powder	7.867	36.985	0.238
Bergenia leaves powder	2.000	9.403	0.937
Heartsease flower powder	4.867	22.881	0.385
Small-leaved lime blossom powder	5.667	26.642	0.331
Bog rosemary powder	7.733	36.355	0.242
Kidney bean powder	5.800	27.267	0.323
Pepper mint powder	1.132	5.321	1.656
Wild chamomile flower powder	8.833	41.526	0.212
Propolis 5% in xylene	3.889	18.282	0.482×20

CONCLUSION

The results of the study show that introduction of the investigated supplements will allow inhibiting oxidation processes in the lipids fraction of foodstuffs, including flour confectionery, to ensure stability of their qualitative characteristics over a longer period. The best effect can be achieved by using propolis, pollen, powdered forms of pepper mint, leather bergenia, heartsease flowers, small-leaved lime blossom, and kidney beans. Application of the investigated natural food supplements in cake baking is protected under Patent of Ukraine No. 71041 (composition of cake with filling) (Lozova, 2012).

REFERENCES

- Cerezo, A., Cuevas, E. 2010. Isolation, identification, and antioxidant activity of anthocyanin compounds in Camarosa strawberry. *Food Chem.*, vol. 123, no. 3, p. 574-582. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.04.073>
- Giuseppe, R., Agatino, R., Carmello D. 2007. Polyphenol constituents and antioxidant activity of grape pomace extracts from five Sicilian red grape cultivars. *Food Chem.*, vol. 100, no. 1, p. 203-210. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.09.041>
- Hervert-Hernandez, D., Garsia, O., Rosado, J. 2011. The contribution of fruit to dietary intake of polyphenols and antioxidant capacity in Mexican rural diet: Importance of fruit and vegetable variety. *Food Res. Int.*, vol. 44, no. 5, p. 1182-1189. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2010.09.021>
- Ivanova, V. D., Karyakina, N. M. 2011. Study of the effect of extracts from alternative plant raw materials on qualitative parameters of icecream. *Food Science and Technology*, no. 2, p. 55-59.
- Konsoula, Z., Lilakopoulou-Kyriakides, M. 2010. Effect of endogenous antioxidants of sesame seeds and sesame oil to the thermal stability of edible vegetable oils. *LWT - Food Sci. and Technol.*, vol. 43, no. 9, p. 1379-1386. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2013.08.010>
- Leusink, G., Kitts, D., Yaghmaee, P. 2010. Retention of antioxidant capacity of vacuum microwave dried cranberry. *Food Sci.*, vol. 75, no. 3, p. 311-316. [PMid:20492285](http://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20492285/)
- Lozova, T. M. 2008. Application of biologically active supplements in fat stabilization. Environment and Human Health: Proceedings of the International Research-to-Practice Conference, Uzhhorod, Uzhhorod National University, Slovak University of Agriculture in Nitra, p. 276-279.
- Lozova, T. M. 2009. Application of a spectrophotometric analysis method for investigation of oxidation processes in fats. Commodity Science and Commercial Business: Professional Development, Research and Innovation, International Research-to-Practice Conference, Kyiv, p. 127-129.
- Makarova, N. V., Zuzina, A. V. 2011. Flavonoid content and antioxidant activity of apples. News of Institutes of Higher Education. *Food Technology*, no. 2-3, p. 27-29.
- Müller, L., Gnoyke S., Popken, A., Böhm V. 2010. Antioxidant capacity and related parameters of different fruit formulations. *LWT - Food Sci. And Technol.*, vol. 43, no. 6, p. 992-999. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2010.02.004>
- Nieto, G., Huvaere, K., Skibsted, L. 2011. Antioxidant activity of rosemary and thyme by-products and synergism with added antioxidant in a liposome system. *Food Res. and Technol.*, vol. 233, no. 1, p. 11-18. <http://dx.doi.org/10.1007/s00217-011-1486-9>
- Osorio, C., Carriazo, José G., Almanza, O. 2011. Antioxidant activity of corozo (*Bactris guneensis*) fruit by electron paramagnetic resonance (EPR) spectroscopy. *Eur. Food Res. and Technol.*, vol. 233, no. 1, p. 103-108. <http://dx.doi.org/10.1007/s00217-011-1499-4>
- Oszmiański, J., Wojduło A. 2008. Polyphenol content and antioxidative activity in apple purées with rhubarb juice supplement. *Int. J. Food Sci. and Technol.*, vol. 43, no. 3, p. 501-509. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2621.2006.01481.x>
- Ramalho, V., Jorge, N. 2008. Antioxidant action of Rosemary extract in soybean oil submitted to thermoxidation. *Grasas y aceites*, vol. 59, no. 2, p. 128-131. <http://dx.doi.org/10.3989/gya.2008.v59.i2.500>
- Reynertson, K., Yang, H., Jiang, B. 2008. Quantitative analysis of antiradical phenolic constituents from fourteen edible Myrtaceae fruit. *Food Chem.*, vol. 109, no. 4, p. 883-890. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.01.021> [PMid:21340048](http://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21340048/)
- Wang, S., Melnyk, J. P., Rong, T. 2011. How natural dietary antioxidants in fruit, vegetables and legumes promote vascular health. *Food Res. Int.*, vol. 44, no. 1, p. 14-22. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2010.09.028>
- Zengin, G., Guler, G., Cakmar, Y. 2011. Antioxidant capacity and fatty acid profile of *Centaurea kotschyi* (Boiss. & Heldr.) Hayek var. *Persica* (Boiss.). Wagenitz from Turkey. *Grasas y aceites*, vol. 62, no. 1, p. 90-95. <http://dx.doi.org/10.3989/gya.056010>

Contact address:

Tetyana Lozova, Lviv Academy of Commerce, Commodity and Commercial Sciences Faculty, Department of commodity food products, St. T.-Baranovskoho, 10, 79005, Lviv, Ukraine, E-mail: lozovatm@gmail.com

TEXTURAL PROPERTIES OF SELECTED SLOVAK COW AND SHEEP PRODUCTS MEASURED BY TEXTUROMETER

Mária Angelovičová, Mária Angelovičová ml.

ABSTRACT

Sensorial assessment of selected brands of Slovak cow and sheep products, produced on farm with self-production of cow and sheep milk, was realized. The farm is situated in the North of east Slovakia. Breeding of dairy cows and sheep was realized under conditions applying animal welfare, where feedstuff was provided from self-production. By means of texture analyzer (*Texture Analyser TA.XT Plus*), textural properties (*hardness, springiness, cohesiveness and chewiness*) of sheep feta cheese, smoked sheep cheese, unsmoked cow cheese strings, smoked cow cheese sticks, pickled sheep feta cheese and spicy pickled sheep feta cheese, were assessed. Texture analyzer is used for texture measurement and assessment of physical properties of products, as well as for material testing by means of pressure and pull tests. Textural properties were assessed, when strength, distance and time were recorded and projected by means of fully integrated Texture Exponent 32-bit software. The measurement was realized by test, when analyzer arm with selected sensor moved down, penetrated and compressed food product and moved to default position thereafter. Statistically significant differences ($p < 0.05$) were detected at *hardness* by means of statistical results evaluation obtained from texturometer measurement of cow and sheep products samples. Sheep feta cheese was compared to smoked sheep cheese, unsmoked cow cheese strings, smoked cow cheese sticks, pickled sheep feta cheese and spicy pickled sheep feta cheese. Statistically significant differences ($p < 0.05$) were confirmed, when we compared smoked sheep cheese to spicy pickled sheep feta cheese, when we compared unsmoked cow cheese strings to pickled sheep feta cheese and spicy pickled sheep feta cheese and by comparison of smoked cow cheese sticks to pickled sheep feta cheese and spicy pickled sheep feta cheese. Statistically significant differences ($p < 0.05$) were confirmed at *springiness*, when we compared sheep feta cheese to unsmoked cow cheese strings, smoked cow cheese sticks, pickled sheep feta cheese and spicy pickled sheep feta cheese and by comparison of smoked sheep cheese to unsmoked cow cheese strings, smoked cow cheese sticks, pickled sheep feta cheese and spicy pickled sheep feta cheese. Statistically significant differences ($p < 0.05$) were confirmed at *cohesiveness*, when we compared sheep feta cheese to smoked sheep cheese, when we compared smoked sheep cheese to smoked cow cheese sticks and pickled sheep feta cheese, by comparison of smoked sheep cheese to spicy pickled sheep feta cheese and by comparison of unsmoked cow cheese strings to smoked cow cheese sticks. Differences at *chewiness* were statistically significant ($p < 0.05$), when we compared sheep feta cheese to smoked sheep cheese, unsmoked cow cheese strings, smoked cow cheese sticks, pickled sheep feta cheese and spicy pickled sheep feta cheese, when we compared smoked sheep cheese to spicy pickled sheep feta cheese, by comparison of unsmoked cow cheese strings to pickled sheep feta cheese and spicy pickled sheep feta cheese and by comparison of smoked cow cheese sticks to pickled sheep feta cheese and spicy pickled sheep feta cheese. Based on obtained analysis results were confirmed, that selected brands of cow and sheep products are characterized by different textural properties. These properties make assessed brands of Slovak cow and sheep product specific, which needs to make provision at quality assessment.

Keywords: Slovak product; cow cheese; sheep cheese; texturometer; textural property

INTRODUCTION

Cow milk is rich in nutrients, especially calcium, phosphorus, potassium, magnesium, iodine, zinc, carotenoids and A, D, E vitamins. Lysine, Tyrosine, Phenylalanine, Leucine and Glutamic acid belong among favourable amino acids in proteins (Havlová et al., 1993). Cow milk belongs to the most important kinds of milk, considering worldwide market production and economic importance (Březina a Jelínek, 1990). Cow milk contains approximately 3.14% of proteins (Xin et al., 2006).

Wheyish proteins create nearly 20% (Madureira et al., 2007) and caseins create 80% (Wal, 1998) of total content of proteins. Zajác et al., (2012) were analysed 24 460 of cow milk samples in Slovakia in 2011. Authors found that 75.42% of samples had a fat content >3.6 g/100g, 79.91% of samples had protein content >3.2 g/100g. Sheep milk has significantly higher protein content and more milk fat compared to cow milk. An average milk composition contains 5.5% of protein, 7% of fat, 5% of sugar and 0.9% of ash material. Sheep milk is richer in B vitamin compare

to cow milk (Špánik, 1992). Sheep milk quality requirements are set out in STN 57 05 10 Sheep milk, which came into force in May 1995, in Codex Alimentarius, 6th head - Milk and milk products, which came into force in 2000 (Špánik, 2003) and in Regulation of the Government of the Slovak Republic No. 312 of 9 July 2003. Píknová et al. (2002) focus on fact, that sheep and goat milk is more expensive and richer in nutrients compared to cow milk. Although a production of sheep and goat milk is seasonal, a counterfeiting of sheep and goat cheeses occurred (with non-declared addition of cow milk component). Within the aim of Sandwich ELISA method optimisation used to detect sheep milk and its products counterfeiting under laboratory conditions, Zeleňáková et al., (2010) detected different cow milk additives. The analysis results shows, that for better examination of lower concentrations, it is necessary to specify suitable dilution of various cow milk concentrations in relation of their heat treatment and further technological processing. Optimisation of ELISA tests, used to detect cow milk in sheep milk and its products, requires further laboratory studies to discover quality, reliable and economically effective method for standard utilization. Cow milk contains allergenic protein; therefore, cow milk belongs to food allergens causing allergies, which especially occur during infancy (Wal, 2001, 2004; Fiocchi, 2011). A cross allergy between cow, sheep and goat is caused by α -Casein similarity. 85% of α -Casein amino acids of selected kinds of milks are identical (Spurgin et al., 1997; Wal, 2004). Many production systems are used at cheese production, which can cause protein modification. A segregation of wheyish fraction can occur as well. Allergenic potential of cheeses and other milk products have not been assessed properly. It is known, based on clinical practice experiences that allergic reaction caused by cheese occurs at individuals allergic to cow milk. Similarly, bakery products, chocolate and sausages with milk protein additive caused many allergic reactions. These products preserved

allergenicity even though milk protein have been processed by means of different technological procedures (Fiocchi et al., 2004).

Consumers preferences on basic foodstuff (milk and cheeses included) are summarized in complex studies from 1960-1970. In this period, the food research was focused on consumer research in relation of social aspect, whereby some general principles were developed related to consumer acceptance and deprecation of food as well as developmental work direction (Szczesniak a Kleyn, 1963; Szczesniak a Kahn, 1971; Szczesniak, 1971, 1972). Food textural properties belong among the basic factors effecting food quality and safety.

The general principles of food textural properties adopted based on selected methods conclusions from 1960-1970, are applied to this day. This type of study requires repetition and reassessment. It is necessary to learn about consumer preferences on textural properties considering changes in life style and eating habits, their assessment in food industry and their selling aspect (Szczesniak, 1990). Many progressive results about food texture were obtained by means of interdisciplinary research (Szczesniak, 1975). The beginning of this type research is connected to the work of George W. Scott Blair originated based on cooperation in the field of physical chemistry/ rheology and psychology, food industry, medicine, sociology and physiotherapy afterwards. Cooperation is extended in the field of programming and mathematical-statistical modelling (Szczesniak, 2002). Nowadays, textural properties of foodstuff and foodstuff materials are often assessed by means of specialized multi-purpose analyzers. Best-known analyzers, used for this kind of assessment, are Texturometer TA.XT Plus and Texturometer TA.XT Express, designed for pressure and pull tests. These devices have wide variety of measuring adapters (extensions), which enable to assess different materials as well as wrapping materials (Mathevon et al., 1995).

Table 1 Percentage and content of individual proteins from a total content of cow milk proteins (Wal, 1998)

Wheyish proteins (20%)	β -lactoglobulin	10%	3 - 4 g.l ⁻¹
	α -lactalbumin	5%	1 - 1.5 g.l ⁻¹
	immunoglobulin	3%	0.8 - 1.0 g.l ⁻¹
	serum albumin	1%	0.1 - 0.4 g.l ⁻¹
	lactoferrin	traces	0.09 g.l ⁻¹
Caseins (80%)	α -casein _{s1}	32%	12 - 15 g.l ⁻¹
	α -casein _{s2}	10%	3 - 4 g.l ⁻¹
	β - casein	28%	9 - 11 g.l ⁻¹
	κ - casein	10%	3 - 4 g.l ⁻¹

MATERIAL AND METHODS

The object of our study was Slovak foodstuff produced from raw cow and sheep milk: sheep feta cheese, smoked sheep cheese, unsmoked cow cheese strings, smoked cow cheese sticks, pickled sheep feta cheese and spicy pickled sheep feta cheese. Products were obtained from farm, which produces them and is focused on cow and sheep breeding. The farm is situated in the North of east Slovakia. The farm was established in 1999 and is focused

on dairy cows, beef cattle and sheep breeding. On farm, there are 35 pieces of Slovak Spotted Cattle, which is used for both meat and milk production and 28 pieces of Charolais cattle used only for meat production. There are 5 pieces of Holstein cattle (dairy cows), which milk production is used for final products production. The farm has been focused on Lacaune sheep breeding since 2012. Nowadays on farm, there are 650 dairying sheep, which

production is further processed to final products from raw sheep milk.

Properties monitored by means of texturometer and measurement procedure

These properties were assessed by means of texturometer: hardness, springiness, cohesiveness and chewiness.

Methodical working procedure of texturometer

Textural properties were assessed according to procedures described by Alfaig et al. (2013) and Lyon and Lyon (1990). We modified the preparation of the samples and adapted to the samples sheep and cow cheese products. The texture profile analysis was performed on cheese samples, with TA-XT Plus Texture Analyzer (Stable Micro System, Surrey, UK). From each type of cheese ten samples were tested and the tested sample dimensions were 10×10×10 mm. The samples were examined using a Stable Micro Systems Type version 5.0, 9.0). A three-inch diameter compression plate was installed to the 25 kg load cell of the analyzer. A 5-kg weight was used to calibrate the 25 kg load cell prior to analysis and the setting was adjusted at a pretest speed of 5 mm/s, a test speed of 10 mm/s and a posttest speed of 5 mm/s. All samples were compressed twice to 50% of their original height using a cylindrical-shaped piston, 38 mm in diameter and the measurements were made at ambient temperature. The obtained texture profiles were used to measure the instrumental hardness, springiness, cohesiveness, and chewiness of the cheese samples. Hardness is the force needed for the 1st compression H1. Springiness (D2/D1) is the ratio between the distance or time of contact for the 2nd compression (D2) to the distance or time of contact for the 1st compression (D1).

Statistical analysis

Results were prepared by means of calculations based on these variables: μ - mean (average value), σ - standard deviation, c_v - coefficient of variation.

Differences between individual groups were tested by means of Scheffe's test at significance level 0.05 in SAS system program, version 8.1.

RESULTS

Statistically significant differences ($p < 0.05$) of hardness were between: sheep feta cheese and smoked sheep cheese, unsmoked cow cheese strings, smoked cow cheese sticks, pickled sheep feta cheese, spicy pickled sheep feta cheese, respectively; pickled sheep feta cheese and smoked sheep cheese, smoked cow cheese sticks, respectively; spicy pickled sheep feta cheese and smoked sheep cheese, unsmoked cow cheese strings, smoked cow cheese sticks, respectively.

Values of cow and sheep products hardness ranged from 0.25 (unsmoked cow cheese strings) to 4.77 (sheep feta cheese). Low values of hardness, 0.28 and 0.78 were detected at smoked cow cheese sticks and smoked sheep cheese; higher values 1.41 and 2.1 were detected at pickled sheep feta cheese and spicy pickled sheep feta cheese. Based on statistical characteristic results was detected, that the lowest value variation were at sheep feta cheese expressed by coefficient of variation $c_v = 17.19\%$ and the

highest value variation expressed by coefficient of variation $c_v = 46.64\%$ were at smoked cow cheese sticks. Based on statistical assessment of hardness differences between cow and sheep products, statistical significance ($p < 0.05$) was detected between sheep feta cheese and smoked sheep cheese, between sheep feta cheese and unsmoked cow cheese strings, between sheep feta cheese and smoked cow cheese sticks, between sheep feta cheese and pickled sheep feta cheese, sheep feta cheese and spicy pickled sheep feta cheese, smoked sheep cheese and spicy pickled sheep feta cheese, between unsmoked cow cheese strings and pickled sheep feta cheese, between unsmoked cow cheese strings and spicy pickled sheep feta cheese, between smoked cow cheese sticks and pickled sheep feta cheese and between smoked cow cheese sticks and spicy pickled sheep feta cheese.

Springiness of cow and sheep products

Statistically significant differences ($p < 0.05$) of springiness were between: sheep feta cheese and unsmoked cow cheese strings, smoked cow cheese sticks, pickled sheep feta cheese, spicy pickled sheep feta cheese, respectively; smoked sheep cheese and unsmoked cow cheese strings, smoked cow cheese sticks, pickled sheep feta cheese, spicy pickled sheep feta cheese, respectively. Measured values of cow and sheep products springiness ranged from 0.62 (spicy pickled sheep feta cheese) to 0.75 (smoked sheep cheese). Measured values of cow and sheep products were relatively balanced. Higher value as mean minimal value was detected at pickled sheep feta cheese (0.63), smoked cow cheese sticks or unsmoked cow cheese strings (0.65); springiness of sheep feta cheese (0.72) was close to the value of smoked sheep cheese (0.72). Relatively balanced sheep and cow products springiness values were supported by coefficient of variation results, which values ranged from $c_v = 2.39\%$ (smoked sheep cheese) to $c_v = 8.50\%$ (spicy pickled sheep feta cheese). Based on statistical assessment of springiness differences between cow and sheep products, statistical significance ($p < 0.05$) was detected between sheep feta cheese and unsmoked cow cheese strings, between sheep feta cheese and smoked cow cheese sticks, between sheep feta cheese and pickled sheep feta cheese, between sheep feta cheese and spicy pickled sheep feta cheese, between smoked sheep cheese and unsmoked cow cheese strings, between smoked sheep cheese and smoked cow cheese sticks, between smoked sheep cheese and pickled sheep feta cheese and between smoked sheep cheese and spicy pickled sheep feta cheese.

Statistically significant differences ($p < 0.05$) of cohesiveness were between: sheep feta cheese and smoked sheep cheese; smoked sheep cheese and smoked cow cheese sticks, pickled sheep feta cheese, spicy pickled sheep feta cheese, respectively; unsmoked cow cheese strings and smoked cow cheese sticks.

The assessment of cow and sheep products cohesiveness measurement detected, that springiness values ranged from 0.76 (smoked cow cheese sticks) to 0.87 (smoked sheep cheese). Cohesiveness values of other measured cow and sheep products were 0.8 (sheep feta cheese, pickled sheep feta cheese and spicy pickled sheep feta cheese) and 0.83 (unsmoked cow cheese strings). Statistical characteristic results present, that cohesiveness value variation of cow

and sheep products was relatively low, which is supported by coefficient of variation results from $cv = 1.07\%$ (smoked sheep cheese) to $cv = 6.08\%$ (smoked cow cheese sticks). Based on statistical assessment of cohesiveness differences between cow and sheep products, statistical significance ($p < 0.05$) was detected between sheep feta cheese and smoked sheep cheese, between smoked sheep cheese and smoked cow cheese sticks, between smoked sheep cheese and pickled sheep feta cheese, between smoked sheep cheese and spicy pickled sheep feta cheese and between unsmoked cow cheese strings and smoked cow cheese sticks.

Statistically significant differences ($p < 0.05$) of chewiness were between: sheep feta cheese and smoked sheep cheese, unsmoked cow cheese strings, smoked cow cheese sticks, pickled sheep feta cheese, spicy pickled sheep feta cheese, respectively; smoked sheep cheese and spicy pickled sheep feta cheese; unsmoked cow cheese strings and pickled sheep feta cheese, spicy pickled sheep feta cheese, respectively; smoked cow cheese sticks and pickled sheep feta cheese, spicy pickled sheep feta cheese, respectively.

Based on statistical assessment results of cow and sheep products chewiness was detected, that the highest value was at sheep feta cheese (2.78) and the lowest value was at

unsmoked cow cheese strings, resp. smoked cow cheese sticks (0.13, 0.14, respectively). The values of chewiness of other measured cow and sheep products were 0.52 (smoked sheep cheese), resp. 0.72 (pickled sheep feta cheese) and 1.05 (spicy pickled sheep feta cheese). The variation of chewiness values of cow and sheep products were supported by results of statistical characteristic values. The values of coefficient of variation ranged from $cv = 18.55\%$ (smoked sheep cheese) to $cv = 54.99\%$ (smoked cow cheese sticks). Based on statistical assessment of chewiness differences between cow and sheep products, statistical significance ($p < 0.05$) was detected between sheep feta cheese and smoked sheep cheese, between sheep feta cheese and unsmoked cow cheese strings, between sheep feta cheese and smoked cow cheese sticks, sheep feta cheese and pickled sheep feta cheese, between sheep feta cheese and spicy pickled sheep feta cheese, between smoked sheep cheese and spicy pickled sheep feta cheese, between unsmoked cow cheese strings and pickled sheep feta cheese, between unsmoked cow cheese strings and spicy pickled sheep feta cheese, between smoked cow cheese sticks and pickled sheep feta cheese and between smoked cow cheese sticks and spicy pickled sheep feta cheese.

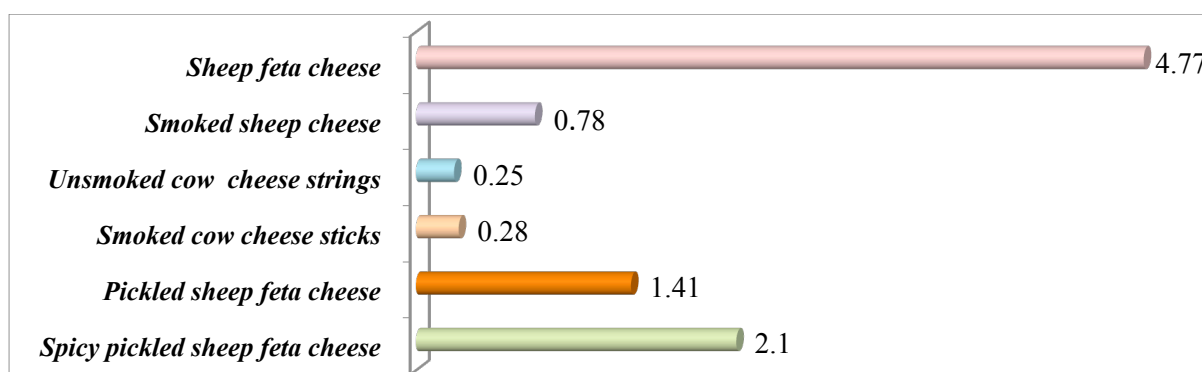


Figure 1 Mean value of cow and sheep products hardness (kg)

Table 2 The results of the statistical characteristics of hardness of cow and sheep products

Sheep and cow products	σ (kg)	c_v (%)
Sheep feta cheese	0.82	17.19
Smoked sheep cheese	0.17	21.90
Unsmoked cow cheese strings	0.06	23.10
Smoked cow cheese sticks	0.13	46.64
Pickled sheep feta cheese	0.36	25.38
Spicy pickled sheep feta cheese	0.71	33.82

σ - standard deviation, c_v - coefficient of variation

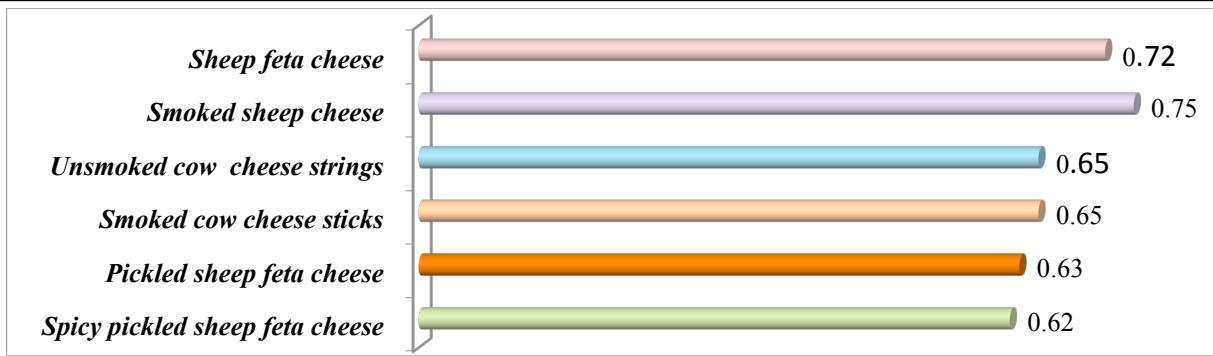


Figure 2 Mean value of cow and sheep products springiness (kg)

Table 3 The results of the statistical characteristics of springiness of cow and sheep products

Sheep and cow products	σ (kg)	c_v (%)
Sheep feta cheese	0.02	3.29
Smoked sheep cheese	0.02	2.39
Unsmoked cow cheese strings	0.02	3.26
Smoked cow cheese sticks	0.05	7.17
Pickled sheep feta cheese	0.05	7.92
Spicy pickled sheep feta cheese	0.05	8.50

σ - standard deviation , c_v - coefficient of variation

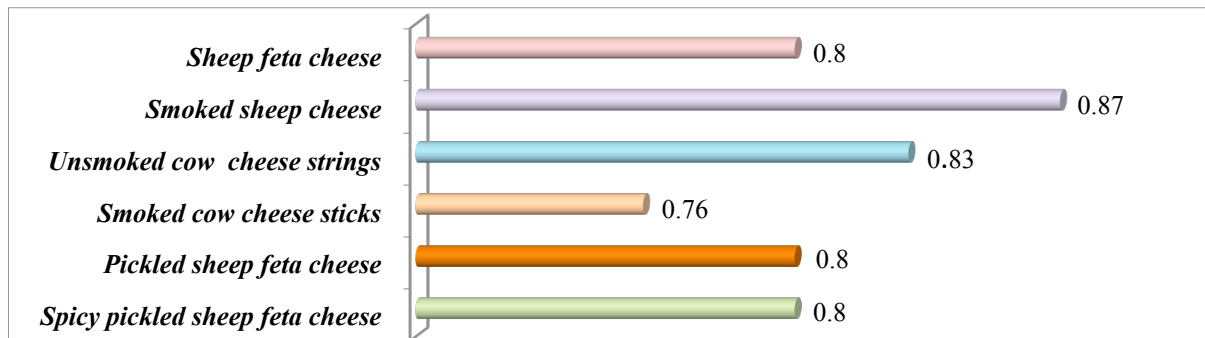


Figure 3 Mean value of cow and sheep products cohesiveness (kg)

Table 4 The results of the statistical properties of cohesiveness of cow and sheep products

Sheep and cow products	σ (kg)	c_v (%)
Sheep feta cheese	0.04	5.07
Smoked sheep cheese	0.01	1.07
Unsmoked cow cheese strings	0.04	4.99
Smoked cow cheese sticks	0.05	6.08
Pickled sheep feta cheese	0.03	3.84
Spicy pickled sheep feta cheese	0.02	2.53

σ - standard deviation, c_v - coefficient of variation

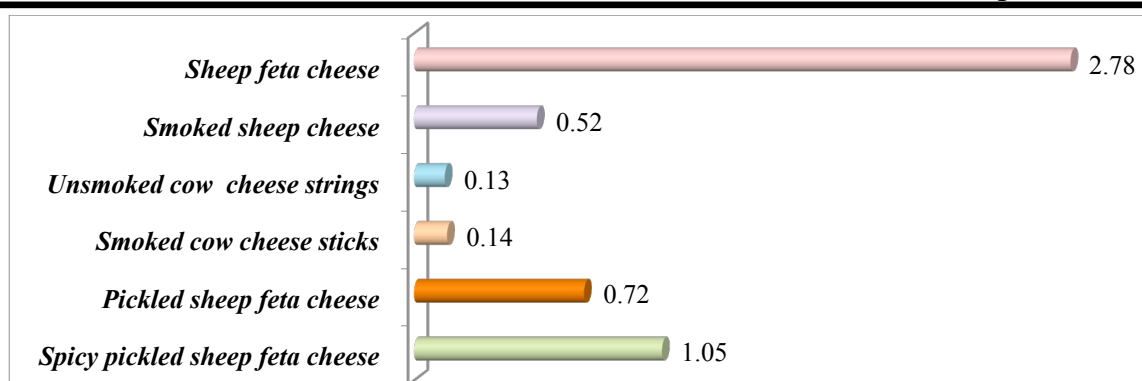


Figure 4 Mean value of cow and sheep products cohesiveness (kg)

Table 5 The results of the statistical characteristics of chewiness of cow and sheep products

Sheep and cow products	σ (kg)	c_v (%)
Sheep feta cheese	0.55	19.90
Smoked sheep cheese	0.10	18.55
Unsmoked cow cheese strings	0.03	23.10
Smoked cow cheese sticks	0.08	54.99
Pickled sheep feta cheese	0.22	29.95
Spicy pickled sheep feta cheese	0.39	37.10

σ - standard deviation, c_v - coefficient of variation

DISCUSSION

According to **Kopáček (2009)**, cheeses maturing in salt brine belong to the oldest cheeses in the world. Feta cheese belongs to these kinds of cheeses. **Ridgway (2001)** points out, that original feta cheese never turns yellow and for consumer is available in soft and hard springiness. This kind of cheese was awarded with stamp of originality in 2002, i.e. has a protected origin. Textural property results, obtained by measurement of feta cheese samples demonstrate, that sheep feta cheese achieve the highest values of hardness and chewiness assessment. Statistically significant differences ($p < 0.05$) at hardness and chewiness were confirmed, when we compare sheep feta cheese to smoked sheep cheese, unsmoked cow cheese strings, smoked cow cheese sticks and pickled sheep feta cheese. The smoked cheeses are produced from fresh sheep milk, which is sulphurized and accrued cheese curd is left to drain away. Sliced pieces of cheese curd are placed in salt brine. Official Journal of the European Union contains **Commission Regulation (EU) No. 930/2010**, entering a name in the register of traditional specialities guaranteed „Ověř saláňický úděný syr“. Textural property results, obtained by measurement of smoked sheep cheese samples demonstrate, that smoked sheep cheese achieve the highest values of springiness and cohesiveness compared to other samples of cow and sheep milk products. This textural property of smoked sheep cheese was statistically significant ($p < 0.05$) compared to unsmoked cow cheese strings, smoked cow sticks, pickled sheep feta cheese and spicy pickled sheep feta cheese. Statistical significance ($p < 0.05$) was confirmed at cohesiveness assessment of smoked sheep cheese compare to smoked cow cheese sticks, pickled sheep feta cheese and spicy pickled sheep feta cheese. Steamed cheeses are produced from unpasteurized sheep or cow milk, when cheese with necessary level of culturing (pH 4.8 - 5.5) is

crumbled and processed by steam. Cheese steaming is realized according to methodical procedure in water under temperature of 75 - 90 °C. Cheese curd gains a plastic springiness, which enables to pull cheese strings (**Březina et al., 2001**). These strings are produced in smoked and unsmoked form. The pickled cheeses are produced from sheep, goat and cow milk, as well as their combination. Pickled cheeses are known as pickled unskimmed and skimmed white cheeses produced according to traditional procedure (**Drake et al., 1996**), but can be produced from fresh, soft, semi-hard, hard cheeses, as well as from cheeses with molds on the rind or throughout and steamed cheeses. Results of cow and sheep milk products assessment demonstrate, that pickled sheep feta cheese and spicy pickled sheep feta cheese have the second highest values of hardness (spicy pickled sheep feta cheese), respectively the third highest ones (pickled sheep feta cheese) after sheep feta cheese. Cohesiveness values of these cheeses were equal to sheep feta cheese values and have the second highest values of chewiness (spicy pickled sheep feta cheese), respectively the third highest ones (pickled sheep feta cheese) after sheep feta cheese. These results will benefit an extension of information in the field of food quality and food safety assessment. Much literature information from the field of textural properties assessment came from 1960-1970. **Szczesniak (1990)** recommended to learn about consumer preferences on textural properties considering changes in life style and eating habits, their assessment in food industry and their selling aspect.

CONCLUSION

Milk and milk products have a key position in human nutrition. Cow milk, as well as sheep milk is used for milk products production, where cheeses create an important part of a production. Texture Analyser assessment of cow

and sheep milk products demonstrates these textural property results:

- the highest value of *hardness* was detected at sheep feta cheese (4.77), the lowest value was at pickled sheep feta cheese (1.41); statistically significant differences ($p < 0.05$) of cow and sheep products were confirmed at hardness, when we compared sheep feta cheese to smoked sheep cheese, between sheep feta cheese and unsmoked cow cheese strings, between sheep feta cheese and smoked cow cheese sticks, between sheep feta cheese and pickled sheep feta cheese; sheep feta cheese and spicy pickled sheep feta cheese, smoked sheep cheese and spicy pickled sheep feta cheese, between unsmoked cow cheese strings and pickled sheep feta cheese, between unsmoked cow cheese strings and spicy pickled sheep feta cheese, between smoked cow cheese sticks to pickled sheep feta cheese and between smoked cow cheese sticks to spicy pickled sheep feta cheese,

- the highest value of *springiness* was detected at smoked sheep cheese (0.75), the lowest value was at spicy pickled sheep feta cheese (0.62); statistically significant differences ($p < 0.05$) of cow and sheep products were confirmed at springiness, when we compared sheep feta cheese to unsmoked cow cheese strings, between sheep feta cheese and smoked cow cheese sticks, between sheep feta cheese and pickled sheep feta cheese, between sheep feta cheese and spicy pickled sheep feta cheese, between smoked sheep cheese and unsmoked cow cheese strings, between smoked sheep cheese and smoked cow cheese sticks, between smoked sheep cheese and pickled sheep feta cheese and between smoked sheep cheese and spicy pickled sheep feta cheese,

- the highest value of *cohesiveness* was detected at smoked sheep cheese (0.87), the lowest value was at smoked cow cheese sticks (0.76); statistically significant differences ($p < 0.05$) of cow and sheep products were confirmed at cohesiveness, when we compared sheep feta cheese and smoked sheep cheese, between smoked sheep cheese and smoked cow cheese sticks, between smoked sheep cheese and pickled sheep feta cheese, between smoked sheep cheese and spicy pickled sheep feta cheese and between unsmoked cow cheese strings and smoked cow cheese sticks,

- the highest value of *chewiness* was detected at sheep feta cheese (2.78), the lowest value was at unsmoked cow cheese strings, resp. smoked cow cheese sticks (0.13, 0.14, respectively); statistically significant differences ($p < 0.05$) of cow and sheep products were confirmed at *chewiness*, when we compared sheep feta cheese and smoked sheep cheese, between sheep feta cheese and unsmoked cow cheese strings, between sheep feta cheese and smoked cow cheese sticks, sheep feta cheese and pickled sheep feta cheese, between sheep feta cheese and spicy pickled sheep feta cheese, between smoked sheep cheese and spicy pickled sheep feta cheese, between unsmoked cow cheese strings and pickled sheep feta cheese, between unsmoked cow cheese strings and spicy pickled sheep feta cheese, between smoked cow cheese sticks and pickled sheep feta cheese and between smoked cow cheese sticks and spicy pickled sheep feta cheese.

REFERENCES

- Alfaig, E., Angelovičová, M., Král, M., Vietoris V., Židek R. 2013. Effect of probiotics and thyme essential oil on the texture of cooked chicken breast meat. *Acta Sci. Pol., Technol. Aliment.*, vol. 12, no. 4, p. 379-384.
- Březina, P., Jelínek, J. 1990. *Chemistry and Technology of Milk*. Praha : VŠCHT, CzS. redaction VN-MON. 325 p. ISBN 80-7080-075-5.
- Březina, P., Jelínek, J. 1990. *Chemistry and Technology of milk*, 2nd part. 1st Ed. Praha : MON. 1990. 166 p. ISBN 80-7080-075-5.
- Commission Regulation (EU) No. 930/2010 of 18 October 2010 entering a name in the register of traditional specialities guaranteed [Ovčí salašnický údený syr] [TSG].
- Drake, M. A., Bolyston, T. D., Swanson, B. G. 1996. Fat mimetics in low-fat Cheddar cheese. *Journal of Food Science*, vol. 61, p. 1267-1271. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2621.1996.tb10976.x>
- Fiocchi, A., Decet, E., Mirri, G. P., Travaini, M., Riva, E. 2004. Clinical tolerance of processed foods. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*, vol. 93, (Suppl. 3), S38-S46. [http://dx.doi.org/10.1016/S1081-1206\(10\)61731-0](http://dx.doi.org/10.1016/S1081-1206(10)61731-0)
- Fiocchi, A., Bouygue, G. R., Albarini, M., Restani, P. 2011. Molecular diagnosis of cow's milk allergy. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology*, vol. 11, p. 216-221. <http://dx.doi.org/10.1097/ACI.0b013e32834694ef> PMID: 21505327
- Havlová, J., Jičinská, E., Hrabová, H. 1993. Microbiological methods in quality control of milk and dairy products. Praha : Institute of Agricultural and Food Information. 1993, p. 98-180.
- Kopáček, J. 2009. European cheeses with a protected designation. *Food Review*, vol. 4, 2009, p. 61-64.
- Lyon B. G., Lyon C. E. 1990. Texture profile of broiler pectoral major as influenced by post-mortem deboning time and heat method. *Poultry Science*. vol. 69, no. 2, p. 329-340. <http://dx.doi.org/10.3382/ps.0690329>
- Madureira, A. R., Pereira, C. I., Gomes, A. M. P., Pintado, M. E., Malcata, F. X. 2007. Bovine whey proteins - overview on their main biological properties. *Food Research International*, vol. 40, p. 1197-1211. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2007.07.005>
- Mathevon, E., Mioche, L., Brown, W. E., Culioli, J. 1995. Texture analysis of beef cooked at various temperatures by mechanical measurements, sensory assessments and electromyography. *Journal of Texture Studies*, vol. 26, p. 175-192. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1745-4603.1995.tb00792.x>
- Piknová, L., Krahulcová, J., Kuchta, T. 2002. Proof of milk component in the sheep and goat cheeses by polymerase chain reaction. *Bulletin of the food research*, vol. 41, no. 3, p. 163-167.
- Regulation of the Slovak Republic, amending and supplementing Government Ordinance of the Slovak Republic no. 312/2003 C. l. the health conditions for the production and placing on the market of raw milk, heat-treated milk and milk products.
- Ridgwayová, J. 2001. *Cheese: A Guide to the world of cheese*. 1st ed. Praha : Fortuna Print, 2001. 288 p. ISBN 80-86144-65-8.
- Spuergin, P., Walter, M., Schiltz, E., Deichmann, K., Forster, J., Mueller, H. 1997. Allergenicity of alpha-caseins from cow, sheep and goat. *Allergy*, vol. 52, no. 3, p. 293-298. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1398-9995.1997.tb00993.x> PMID: 9140519

Szczesniak, A. S., Kleyn, D. H. 1963. Consumer awareness of texture and other food attributes. *Food Technology*, vol. 17, p. 74-77.

Szczesniak, A. S., Kahn, E. E. 1971. Consumer awareness of and attitudes to food texture I: Adults. *Journal of Texture Studies*, vol. 2, p. 280-295. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1745-4603.1971.tb01005.x>

Szczesniak, A. S. 1972. Consumer awareness of and attitudes to food texture II. Children and teenagers. *Journal of Texture Studies*, vol. 3, p. 206-217. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1745-4603.1972.tb00624.x>

Szczesniak, A. S. 1975. General Foods texture profile revisited - ten years perspective. *Journal of Texture Studies*, vol. 6, p. 5-17. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1745-4603.1975.tb01114.x>

Szczesniak, A. S. 1990. Texture: is it an overlooked food attribute? *Food Technology*, vol. 44, no. 9, p. 86-95.

Szczesniak, A. S. 2002. Texture is a sensory property. *Food Quality and Preference*, vol. 13, p. 215-225. [http://dx.doi.org/10.1016/S0950-3293\(01\)00039-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0950-3293(01)00039-8)

STN 57 0510. *Sheep milk*. Bratislava: SÚTN, 1995.

Špánik, J. 1992. Quality of sheep milk. *Sheep and goat milk - production, processing and sales in a market economy*. Trenčín : Sheep Res. Institut, 1992, p. 37.

Špánik, J. 2003. Quality of sheep milk. *Breeding of sheep and goats*, vol. 23, no. 1, p. 31-32.

Wal, J. M. 1998. Cow's milk allergens. *Allergy*, vol. 53, p. 1013-1022. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1398-9995.1998.tb03811.x> PMID: 9860234

Wal, J. M. 2001. Structure and function of milk allergens. *Allergy*, vol. 56, p. 35-38. PMID: 11298005

Wal, J. M. 2004. Bovine milk allergenicity. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*, vol. 93, (Suppl. 3), S2-S11. [http://dx.doi.org/10.1016/S1081-1206\(10\)61726-7](http://dx.doi.org/10.1016/S1081-1206(10)61726-7)

Xin, Q., Ling, H. Z., Long, T. J., Zh, Y. 2006. The rapid determination of fat and protein content in fresh raw milk using the laser light scattering technology. *Optics and Lasers in Engineering*, vol. 44, p. 858-869. <http://dx.doi.org/10.1016/j.optlaseng.2005.02.007>

Zajác, P., Tomáška, M., Murárová, A., Čapla, J., Čurlej, J. 2012. Quality and safety of raw cow's milk in Slovakia in 2011. *Potravinarstvo*, vol. 6, no. 2, p. 64-73. <http://dx.doi.org/10.5219/189>

Zeleňáková, L., Židek, R., Čanigová, M., Paulov, J., Gallisová, T. 2010. Evaluation of ELISA method to detection of cow β -lactoglobulin in sheep milk and sheep milk products. *Potravinarstvo*, vol. 4, no. 4, p. 80-84. <http://dx.doi.org/10.5219/78>

Acknowledgments:

This work was supported by grant VEGA 1/0007/11.

Contact address:

prof. Ing. Mária Angelovičová, Ph.D., Slovak University of Agriculture in Nitra, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Department of Food Hygiene and Safety, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovakia, E-mail: maria.angelovicova@uniag.sk.

Ing. Mária Angelovičová, PhD., Slovak University of Agriculture in Nitra, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Department of Food Hygiene and Safety, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovakia, E-mail: maria.angelovicova@gmail.com.

THE CHANGES OF THE POLYPHENOL CONTENT AND ANTIOXIDANT ACTIVITY IN POTATO TUBERS (*SOLANUM TUBEROSUM* L.) DUE TO NITROGEN FERTILIZATION

*Janette Musilová, Jaromír Lachman, Judita Bystrická,
Zuzana Poláková, Peter Kováčik, Diana Hrabovská*

ABSTRACT

Cultivar is one of the most important internal factors affecting polyphenol concentration in the plants. However, influence of the grown locality, climate conditions and way of cultivation belong to important external factors. In our experiment the influence of different nitrogen doses (0 - 40 - 80 - 120 - 160 - 240 kg N.ha⁻¹) applied in the form of Vermikompost on the total polyphenol content and derived total antioxidant activity in cv. Sorento were investigated. While in the 1st - 5th variants the determined polyphenol content in dry mater of potato tubers decreased from 399.2 to 70.40 mg.kg⁻¹, in the 6th variant that was twice higher in comparison to the 5th variants (135.6 mg.kg⁻¹). The statistically significant differences in values of total polyphenol content between variants (polynomial function of 2nd degree) were confirmed. The study also confirmed a strong statistical correlation between the content of polyphenols and the content of antioxidant activity has been confirmed (sign. F: 3.24E⁻¹⁰). The highest value of antioxidant activity was observed in the first variant. From the first to the fifth variant (7.62 - 4.84%), the value of antioxidant activity was decreasing and in the sixth variant this value increased to 6.31%.

Keywords: potato; polyphenol; antioxidant activity; nitrogen fertilization

INTRODUCTION

The polyphenols are the most abundant antioxidants in the human diet (Bystrická et al., 2010). Polyphenols are divided into two main groups: phenolic acids and flavonoids, which create from 1/3 to 2/3 of all antioxidants (Tapiero et al., 2002). Polyphenolic substances have a wide range of physiologically beneficial effects. Polyphenols are the most widespread group of plant secondary metabolites plants that can be the most important part of defence system of plants against pests and diseases (Mazid et al., 2001; Modrianský et al., 2003). It is known that phenolic substances are involved in maintenance of redox status of cell and its response to cold, UV radiation, the injury and the effect of pathogens (Lukaszewicz et al., 2004).

Potato tubers are, due to consumption rate, one of the major sources of antioxidant compounds in human diet. Compounds with antioxidant activity have the capability to inactivate free radicals, which negatively influence biologically important compounds (lipids, proteins and nucleic acids) (Hejtmánková et al., 2009). Although potato tubers contain a number of phenolic compounds, their content is relatively low (5 - 30 mg.100 g⁻¹ FM). There are found both in the free-form and the bound-form. Phenolic compounds are located mainly in the peel; there the content of phenolics is about ten times higher than that in the flesh. Some substances are detected only in peel. But for example, the largest content of tyrosine (monobasic phenol) is found in inside the tuber, while its small

concentration in the outer layer of tube (Lister and Munro, 2000).

Flavonoids are one of the most important groups of phenolic compounds. This group consists of diverse groups of plant metabolites, including chalcones, aurones, flavanones, isoflavones, flavones, flavonols, leucoanthocyanidins, catechins and anthocyanidins. This group consist of more than 4500 compounds and the large number of derivates providing substitution of hydrogen atoms by hydroxyl, methoxyl and other groups in different positions of basic structures (Đuračková et al., 1999; Klejdus et al., 2003). Colour of potato varieties is determined by flavonoids and anthocyanins that are found as acylated glycosides with *p*-coumaric acid or non-acylated glycosides. They are present mainly in the vacuolar membranes in the periderm, especially in tissues of transgenic potato tubers (Lachman and Hamouz, 2008).

Phenolic acids and their derivatives exhibit effects of primary antioxidants. The activity depends on the number of hydroxyl groups in the molecule. Generally, antioxidant derivatives of cinnamic acid and *o*-diphenols (for example caffeic and chlorogenic acid) are more active. Also other types of derivatives, such as amides and glycosides are active. Chlorogenic acid can constitute 90% of the total content of polyphenolic substances in potato tubers. In fresh potatoes the content of chlorogenic acid is around 100 - 200 mg.kg⁻¹ and its content gradually decreases from the edge to the centre of potato tuber. The most important component of potato tubers is amino acid L-tyrosine

(Lachman et al., 2005; Shahidi and Naczk, 2004; Velíšek, 2002). Caffeic acid and other phenolic compounds are present in smaller contents. The content of amino acid tyrosine is represented by 770 - 3900 mg.kg⁻¹, followed by caffeic acid, scopolin, chlorogenic, ferulic and cryptochlorogenic acids. Some polyphenols are present only in lesser levels such as neochlorogenic acid, *p*-coumaric acid, sinapic and 3,4-dicaffeoyl-quinic acids. Only in small levels of 3,5-dicaffeoyl-quinic acid, scopoletin, *trans*-feruloylputrescine were found in potatoes (Lachman and Hamouz, 2005). Phenolic acids, such as chlorogenic acid, caffeic acid, protocatechuic acid and *p*-coumaric acid amongst several others have been identified in purple- and red-fleshed potatoes and contribute to the antioxidant activity in potatoes (Vreugdenhil et al., 2007).

MATERIAL AND METHODOLOGY

Fertilizer and chemicals

Fertilizer: Vermikompost - composition (mg.kg⁻¹ dry matter): N-NH₄⁺: 536.8, N-NO₃⁻: 977.1, N_{an}: 1513.9 (determined in H₂O extract), P: 2817.0, K: 11949.0, Ca: 7846.0, Mg: 3268 (determined by Mehlich III method); C_{ox}: 16.86%, organic compounds: 33.43%

Chemicals for analyses: Folin-Ciocalteu reagent (KGaA Darmstadt, MERCK Germany), 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical (SIGMA-Aldrich Chemie, GmbH, Germany), ethanol (SIGMA-Aldrich Chemie, GmbH, Germany), gallic acid - monohydrate (PENTA, Czech Republic), L-ascorbic acid p.a. (Merci, Ltd., Slovakia), conc. sulphuric acid, p.a. (Merci, Ltd., Slovakia), ammonium molybdate, p.a. (Merci, Ltd., Slovakia) and antimonyl-potassium tartarate, p.a. (Merci, Ltd., Slovakia).

Plant material

Medium early potato cultivar Sorento was used in field trials. The potatoes were grown in loam soil. The experimental field 120 m x 250 m was divided into six parcels for different variants. In the first variant fertilizers were not applied and it was the control variant. In variants 2 - 6 the granulated Vermicompost in graded doses 3.3 - 6.6 - 9.9 - 13.2 - 19.8 t.ha⁻¹ was applied one time before the planting. These doses represented 40 - 80 - 120 - 160 - 240 kg N.ha⁻¹ (the content of N in the Vermicompost = 1.22%). Potatoes were planted on the 27th April 2012 and were manually harvested at the stage of full maturity on the 5th October 2012. During the vegetation period the plants were treated three times irrigated by dose 35 L.m⁻² (35 mm). Samples were taken from different variants oh four replications each 5, 20, 35 and 50-metres. All potato samples were taken with the soil.

Locality. Locality Veľká Čalomija (cadastre: Veľká Čalomija, district: Veľký Krtíš, South Slovakia) is characterised by slight, dry climate, with the average rainfall of 450 mm per m²; average atmosphere temperature in period May - September: 13 - 20 °C; average relative atmosphere moisture: ca 74% (in winter: 73 - 83%, in summer: 62 - 71%). According to the VÚPOP (Soil Science and Conservation Research Institute) the soils in this locality are characterised as potentially arable, with a deep humus horizon (24 - 30 cm), a small till middle phytomass production (till 10 - 12 t.ha⁻¹) and less

suitable for potato production (production potential for potatoes: 13.8 - 17.4 t.ha⁻¹).

Analysis

Soil. In soil samples agrochemical parameters (content of organic carbon and content of humus, values of active and exchange soil reaction) were determined. These parameters were determined according to the method of Fiala et al., (1999).

The contents of available macronutrients nutrients and micronutrients were determined according to the method of Mehlich. The Mehlich III soil extractant and SOP was used for extracting Ca, Mg, P and K from soil samples. The flame atomic absorption spectrometer AAS Varian AASpectr DUO 240FS/240Z/UltrAA equipped with a D2 lamp background correction system, using an air - acetylene flame (Varian, Ltd., Mulgrave, Australia) was used for the determination of macroelements Ca, Mg, and K as output analytical method and P was determined spectrophotometrically using spectrophotometer UV-VIS 1800 (Shimadzu, Kyoto, Japan) at $\lambda = 666$ nm with ascorbic acid after 2 h standing and colouring.

Plant material. The content of N in potato tubers was determined by Kjeldahl method, the content of P spectrophotometrically, and K, Ca, Mg by AAS method, as described previously. Samples of fresh matter were prepared by homogenisation of all potato tubers from individual containers and consequently lyophilized. The potato samples were incinerated in the Nabertherm muffle furnace MARS X Press Microwave Oven (CEM, Matthews, USA) at 200 °C and dissolved ash was diluted to a certain volume with redistilled water. The mixture was heated in a digestion block according to the following sequence: 20 - 175 °C/15 min, 175 °C/15 min, 175 - 80°C/20 min. Minerals concentrations were determined on a dry weight basis as mg.kg⁻¹.

The total content of polyphenols (TP) in extracts of lyophilized samples (without peels) with 80% ethanol was determined by the modified method of Lachman et al., (2006) using Folin-Ciocalteu reagent at $\lambda = 765$ nm. Content of total polyphenols was expressed as the content of gallic acid and was calculated on dry mater.

Antioxidant activity (AOA) was determined using 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl which in ethanol solution is in colourless stable radical form. Its reduction is manifested by the change of colour of solution and is measured spectrophotometrically. Gallic acid was used as the standard and on its equivalent particular values of AOA samples were calculated (Brand-Williams et al., 1995).

Statistics

To examine the impact of nitrogen application on the production of polyphenols and antioxidant activity the regression and correlation analysis (Microsoft Excel) was used.

RESULTS AND DISCUSSION

Potatoes do not have special land and climatic requirements. Typical lands for potatoes are light or medium soils with a permeable underclass. Sandy land is also suitable but it has to contain 8 - 10% clay particles and more than 2% of humus. The content of humus in the

soil (Hum. = 1.56%) was determined on the basis of the content of organic carbon ($C_{ox} = 0.91\%$). Suitability of land for potatoes is associated with the soil reaction. High and stable yields of potatoes are achieved in the weakly acidic soils (pH 6.7). There determined values of active soil reaction (pH/H₂O) in the examined soil ranged in interval from 6.83 to 8.17 and exchange soil reaction (pH/KCl) from 5.35 to 7.14. Investigated soil is characterized by medium supply of phosphorus (P = 66.90 mg.kg⁻¹), good supply of potassium (K = 210.8 mg.kg⁻¹) and a high supply of magnesium (Mg = 260.4 mg.kg⁻¹). The results of soil analysis (average values from all sampling sites) are presented in Table 1.

The content of macroelements in dry matter (DM) of potato tubers is presented in Table 2. Minerals make up about 1.1% of the total weight of tubers (Vreugdenhil et al., 2007). The average consumption of potatoes (300 g) provides at about 21% of iron, 9.6% of phosphorus, 3.4% of calcium and 80% of potassium of recommended daily dose. It means that potassium with the content around 1.7 - 2.02% in dry weight is the most important element of potato tuber, followed by phosphorus which is located in different forms and different contents of the inorganic compounds (12 - 39%) and in starch (20 - 48%). The determined values of P, K, Ca and Mg contents are comparable with results of many authors (Vreugdenhil et al., 2007; USDA, 2009 a.o.). Only the content of sodium was reduced. The authors present the sodium content in the range of 70 to 280 mg.kg⁻¹ FM.

The average values of TP and AOA at different doses of nitrogen applied to the soil are presented in Table 3. It appears that graded nitrogen doses application can decrease the formation of polyphenolic compounds and relating antioxidant activity to a certain N concentration in the soil. The total content of polyphenol determined in dry mass of the potato tubers decreased from 399.3 mg.kg⁻¹

(0 kg N.ha⁻¹) to 70.40 mg.kg⁻¹ (160 kg N.ha⁻¹). But after application of 240 kg N.ha⁻¹ the total content of polyphenol steeply increased 1.93 times than in the previous variant (Table 3). The same tendency was observed in obtained values of the total antioxidant activity because from the second to the fifth variant the values of AOA decreased by 2.5% - 36.7%, while in the 6th variant (240 kg N.ha⁻¹) the AOA value increased by 30.28% compared with the control variant.

Polynomial function of the second degree was used to examine the correlation between TP content and different nitrogen applied to the soil:

($y = 0.0112x^2 - 3.9443x + 426.38$; significance $F = 3.852E^{-11}$) (Figure 1). This regression model explains the variability of TP to 66%.

Total content of polyphenol (TP) in potatoes is mainly influenced by the cultivar (André et al., 2009; Lachman et al., 2008a, 2008b). Conditions of potato cultivation are the second factor influencing polyphenolic levels in potatoes (Reddivari et al., 2007). Contrary to our results Lugasi et al., (1999) indicated only minimal influence of the cultivar and no effect of different doses of nitrogen fertilization (0; 75; 150; 225 and 300 kg.ha⁻¹) on the examined characteristics. Contrarily, in another study use of NPK fertilizers in the amount of 120 kg.ha⁻¹ decreased phenolic compound content in potato tubers (Lachman et al., 2006). These findings correlate with the results of our experiments. Although not all polyphenolic compounds are characterized as antioxidants, the strong statistical significance (significance $F = 3.24E^{-10}$) between TP and AOA was confirmed. The regression coefficient is statistically significant and the line explains the variability for 58% of the AOA (Figure 2). Increasing of AOA around 0.007% depends on increasing of TP in potato tubers.

Table 1 Agrochemical characteristics of the soil and nutrient content in soil (mg kg⁻¹ DM)

	pH		C_{ox} (%)	Hum. (%)	N			P	K	Ca	Mg
	KCl	H ₂ O			NH ₄ ⁺	NO ₃ ⁻	N _{an}				
average	6.23	7.41	0.91	1.57	5.90	6.25	12.15	66.90	210.8	2309.8	260.4
STDEV	0.402	0.302	0.163	0.280	0.989	1.203	2.188	32.48	57.28	696.5	56.71

Notice: C_{ox} - organic carbon; Hum. - humus;

Table 2 The content of macroelements in potato tubers (mg kg⁻¹ DM)

N-rout		0 kg.ha ⁻¹	40 kg.ha ⁻¹	80 kg.ha ⁻¹	120 kg.ha ⁻¹	160 kg.ha ⁻¹	240 kg.ha ⁻¹
P	average	510.4	505.6	440.5	506.1	471.7	455.5
	STDEV	61.57	27.64	39.83	55.86	33.35	51.53
K	average	5726	5270	3967	4693	4506	4294
	STDEV	267.6	152.1	343.5	227.4	318.6	485.8
Ca	average	54.40	46.85	41.52	49.27	38.59	45.41
	STDEV	5.476	0.144	12.37	7.762	2.723	5.141
Mg	average	177.7	167.6	144.8	157.4	169.1	149.0
	STDEV	12.46	2.103	10.37	15.90	11.96	16.86

Table 3 Total polyphenol content (TP, mg.kg⁻¹ DM) and antioxidant activity (AOA, %) in potato tubers

variant	1	2	3	4	5	6
TP	399.2	331.1	187.5	97.34	70.40	135.6
AOA	7.615	7.422	5.380	6.293	4.844	6.311

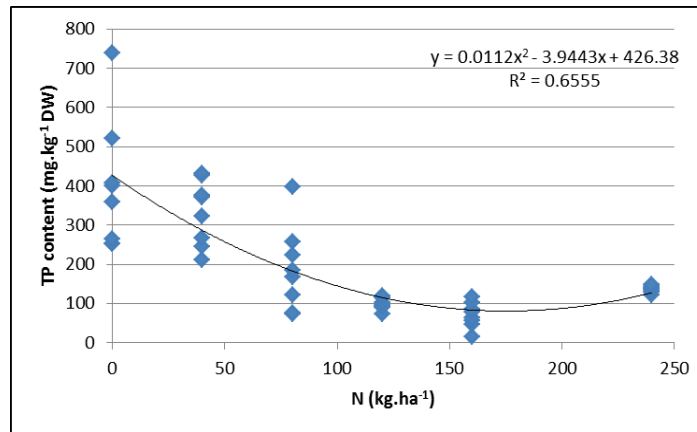


Figure 1 Total polyphenol content (TP, mg.kg⁻¹ DM) in potato tubers in relationship to amount of N (kg.ha⁻¹) applied into the soil

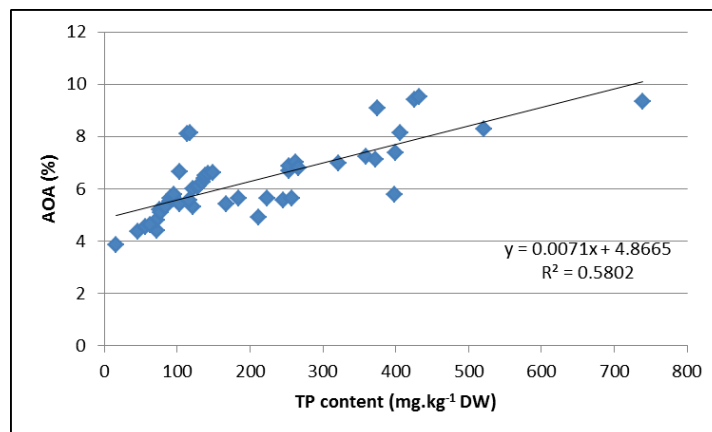


Figure 2 Total antioxidant activity (AOA, %) in relationship to the total polyphenol content (TP, mg.kg⁻¹ DM) in potato tubers

Lachman et al., (2008a, 2008b) and Lugasi et al., (1999) confirmed a strong positive correlation between AOA and TP in potato tubers. André et al., (2009) confirmed a positive or the negative correlation between the antioxidant active substances content and other compounds in the potato tuber and Rumbaoa et al., (2009) found the negative correlation between the TP content and EC₅₀ values for DPPH radical scavenging activity in potato tubers, indicating direct contribution of phenolics to this activity.

Obtained results in this study are in agreement with studies related to organic and conventional way of cultivation of other crops. Phenolic and hydrophilic antioxidant profiles of organically and conventionally produced tomato juices demonstrated statistically higher levels ($P < 0.05$) for organic tomato juices (Vallverdú-Queralt et al., 2012). This increase corresponded not only with increasing contents of soil organic matter accumulating in organic plots but also with reduced manure application rates once soils in the organic systems had reached equilibrium levels of organic matter. Principal component analysis documented that phenolic compounds

and hydrophilic antioxidant capacity were responsible for the differentiation between organically and conventionally produced tomato juices. Comparison of mineral nutrient, chicken manure and grass-clover mulch used for tomato grooving showed that the mean total phenolic and ascorbic acid content of tomatoes treated with chicken manure and grass-clover mulch was 17.6% and 29% higher, respectively, than the tomatoes grown with in mineral nutrient solutions (Toor et al., 2006). The antioxidant activity in the ammonium treated plants was 14% lower compared with other variants. However, a two-years study examining of the concentration of various forms of ferulic acid in wheat grown under comparable organic and conventional conditions has shown that the combination of NPK, fertilizers do not significantly the ferulic acid concentration, on the other hand the year (climate conditions) significantly influenced the soluble conjugated ferulic acid content in all fungicide treated varieties (Gasztonyi et al., 2011). Likewise a negative effect of nitrogen amount on the concentration of anthocyanins and flavanols in the grape peels (increasing the amount of nitrogen from 120 kg.ha⁻¹ N to 180 kg.ha⁻¹ N using urea)

resulted in a lesser concentration of polyphenols (Cavaliere et al., 2010). Interesting results were obtained during the study of wheat winter cultivars related to N applications in soil (Cartelat et al., 2005). The average content of phenolics in wheat leaves was highly correlated with N concentration in leaves. The average content of polyphenols decreased with the increased application of N to the field, irrespective of the growth stage, the cultivar and the year of experiment. Similar results were found for tomato plants under N limitation period by measuring the leaf concentration of chlorogenic acid, quercetin and kaempferol glycosides and anthocyanins (Larbat et al., 2012). Each N-limitation period resulted in an up-regulation of the phenolic biosynthetic pathway and consequently in an increase in the leaf phenolic concentration and an up-regulation of the related genes. Also in another study, the effects of long-term nitrogen deficiency on growth, phenolic content and activity of phenylalanine ammonia lyase (PAL; EC 4.3.1.5.) were investigated in the leaves, inflorescences and roots of yarrow (*Achillea collina* Becker ex Rchb.) grown in hydroponics (Giorgi et al., 2009). Nitrogen starvation decreased plant growth and the leaves' total nitrogen, amino acids, proteins, chlorophylls and carotenoids contents, indicating that the primary metabolism was considerably limited under low nitrogen availability. However, the content of total phenolics and the antioxidant capacity were higher in leaves and roots of nitrogen-starved plants in comparison to control plants. Nitrogen starvation significantly increased the contents of chlorogenic acid, 3,5 and 4,5-di-O-caffeoyl quinic acids as well as the PAL activity. Unlike the previous, the results for organically and integrated produced orange concerning the total phenol, the total *o*-diphenol and the total flavonoid concentration of the juice were obtained, where neither hesperidin nor narirutin differentiated significantly (Roussos, 2011). However, β -carotene concentration was detected in higher concentration in organically produced fruit ($0.43 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$). Juice extracted from both integrated and organically produced fruits exhibited similar antioxidant capacity values (based on 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl and ferric reducing/antioxidant power assays), while correlation analysis revealed the significant contribution of phenolic compounds to antioxidant capacity ($r = 0.75 - 0.86$). Also in two years field experiments the concentration of phenolic compounds in carrot depending on nitrogen fertilization [$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ and $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$] with and without foliar fertilization have been reported (Smoleń and Sady, 2009). Surprisingly, control plants, both with or without foliar nutrition, contained the lowest content of phenolic compounds. However, foliar nutrition led to a marked decline in the concentration of polyphenolic compounds in plants fertilized $35 + 35$ and $105 + 105 \text{ kg N}\cdot\text{ha}^{-1}$. In the storage roots from all nitrogen treatments a notably higher concentration of phenolic compounds than in the control plants was found. However, obtained results for total phenolics in carrot roots may be affected by relative high reducing sugars content ($1.0 - 5.8\%$) (Baranski et al., 2012) and using non-specific reagent. Antioxidant activity in carrots is also influenced by the content of other antioxidants like carotenoids and ascorbic acid (Kotíková et al., 2011).

An overview of recent research of Stefanelli et al., (2010) it is notable that the lowest N application rate resulted in the highest flavonoid content. Low or even zero N applications resulted in the highest content of phenolic compounds in grapes, Chinese cabbage, broccoli heads, apple, basil, pak choi, lettuce, tomato, olives, and strawberries. Also study of the influence of nitrogen fertilization on the content of phenolic compounds in walnut kernels revealed that N fertilization had a significant negative effect on the phenolic compounds content (Verardo et al., 2013). Polyphenol concentration declined as N availability increased in olives, diminishing the resulting oil quality. Tomato fruit antioxidant capacity and vitamin C content were the highest with N as chicken manure or grass/clover mulch compared with nitrate (NO_3^-)/ammonium (NH_4^+) fertilizers (Toor and Savage, 2006). Organic fertilizers such as codahumus 20, mixed compost, sheep manure with mixed compost and codahumus 20 may be better fertilizer combinations that enhance tomato quality and antioxidant activity (Riahi and Hdider, 2013). In comparison of using mineral NPK fertilizer, organic fertilizer (chicken manure) and bioorganic-fertilizer composed of a mixture 50% *Azotobacter chroococcum* and 50% *Bacillus megaterium* it was indicated in broccoli cultivars that there is a good margin for enhancing antioxidant compounds in broccoli for economic production using organic fertilization (Naguib et al., 2012). Phenylalanine ammonia-lyase (PAL) is a key enzyme under low N supply or deficiency, which increased activity under N stress increases phenolic compounds and in addition, furthermore releases nitrogen from phenylalanine, thereby providing N for redistribution.

CONCLUSION

Analysis of the potatoes grown under the same climatic conditions and using different doses of nitrogen confirmed their effect on the formation of polyphenolic compounds. Higher doses of N significantly reduced the formation of polyphenols. Their content was from the second to the fifth variant by 17.06%, 53.04, 75.62 resp. 82.37% lower than the content of TP in the first (control) variant. After application of Vermicompost in the amount of $240 \text{ kg N}\cdot\text{ha}^{-1}$ the TP content was even by 1.9 higher than after application of Vermicompost in the amount ($160 \text{ kg N}\cdot\text{ha}^{-1}$). The strong statistical relationship between TP and AOA ($y = 0.0071x + 4.8665$; significance $F = 3.21\text{E}^{-10}$) was confirmed. Also the values of AOA decreased from the second to the fifth variant. In N-rate $160 \text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}$ the determined AOA was about 36.39% lower than that in N-rate $0 \text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}$. In N-rate $240 \text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}$, the AOA has increased from 4.844% ($160 \text{ kg N}\cdot\text{ha}^{-1}$) to 6.311% ($\Delta = +30.28\%$).

In potato tubers also the content of macroelements was determined, which in different variants ranged in intervals $28.25 - 58.21 \text{ mg Na}\cdot\text{kg}^{-1} \text{ DM}$; $440.46 - 510.41 \text{ mg P}\cdot\text{kg}^{-1} \text{ DM}$; $3967.38 - 5725.59 \text{ mg K}\cdot\text{kg}^{-1} \text{ DM}$; $41.52 - 54.40 \text{ mg Ca}\cdot\text{kg}^{-1} \text{ DM}$; $144.81 - 177.68 \text{ mg Mg}\cdot\text{kg}^{-1} \text{ DM}$ and $28.25 - 58.21 \text{ mg N}\cdot\text{kg}^{-1} \text{ DM}$. No statistically significant differences between Na, P, K, Ca, Mg and N contents in potato tubers and the amount of applied N into the soil were confirmed.

While the above study indicated that increased generally resulted in lower polyphenolic content, there should be

attempting to identify an optimal N application rate that strikes a balance where yield is maintained and phenolic content is optimised.

REFERENCES

- André, C. M., Oufir, M., Hoffmann, L., Hausman, J. F., Rogez, H., Larondelle, Y., Evers, D. 2009. Influence of environment and genotype on polyphenol compounds and in vitro antioxidant capacity of native Andean potatoes (*Solanum tuberosum* L.). *J. Food Comp. Anal.*, vol. 22, no. 6, p. 517-524. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfca.2008.11.010>
- Baranski, R., Allender, C., Klimek-Chodacka, M. 2012. Towards better tasting and more nutritious carrots: Carotenoid and sugar content variation in carrot genetic resources. *Food Res. Int.*, vol. 47, no. 2, p. 182-187. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2011.05.006>
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., Berset, C. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm. - Wiss. Technol.*, vol. 28, no. 1, p. 25-30. [http://dx.doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5)
- Bystrická, J., Vollmannová, A., Margitanová, E., Čičová, I. 2010. Dynamics of polyphenolic formation in different plant parts and different growth phases of selected buckwheat cultivars. *Acta Agric. Slov.*, vol. 95, no. 3, p. 225-229. <http://dx.doi.org/10.2478/v10014-010-0014-0>
- Cartelat, A., Cerovic, Z. G., Goulas, Y., Meyer, S., Lelarge, C., Prioul, J.-L., Barbotin, A., Jeuffroy, M.-H., Gate, P., Agati, G., Moya, I. 2005. Optically assessed contents of leaf polyphenolics and chlorophyll as indicators of nitrogen deficiency in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Field Crops Res.*, vol. 91, no. 1, p. 35-49. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fcr.2004.05.002>
- Cavaliere, C., Foglia, P., Marini, F., Samperi, R., Antonacci, D., Laganà, A. 2010. The interactive effects of irrigation, nitrogen fertilisation rate, delayed harvest and storage on the polyphenol content in red grape (*Vitis vinifera*) berries: A factorial experimental design. *Food Chem.*, vol. 122, no. 4, p. 1176-1184. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.03.112>
- Ďuračková, Z., Bergendi, E., Čársky, J. 1999. *Free Radicals and Antioxidants in Medicine (II)* (in Slovak) : Slovak Academic Press, Bratislava, 315 p. ISBN 80-88909-11-6.
- Fiala, K., Kobza, J., Matúšková, I., Makovníková, J., Barančíková, G., Houšková, B., Pechová, B., Búrik, B., Brečková, V., Litavec, T., Chromaničová, A., Varádievová, D. 1999. *Obligatory Methods for Soil Analyses. Partial Monitoring System - Soil* (in Slovak). Soil Science and Conservation Research Institute (VÚPOP), Bratislava, 142 pp.
- Gasztonyi, M. N., Farkas, R. T., Berki, M., Petróczi, I. M. 2011. Content of phenols in wheat as affected by varietal and agricultural factors. *J. Food Comp. Anal.*, vol. 24, no. 6, p. 785-789. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfca.2011.04.011>
- Giorgi, A., Mingozzi, M., Madeo, M., Speranza, G., Cocucci, M. 2009. Effect of nitrogen starvation on the phenolic metabolism and antioxidant properties of yarrow (*Achillea collina* Becker ex Rchb). *Food Chem.*, vol. 11, no. 1, p. 204-211. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.09.039>
- Hejtmánková, K., Pivec, V., Trnková, E., Hamouz, K., Lachman, J. 2009. Quality of coloured varieties of potatoes. *Czech J. Food Sci.*, vol. 27: S310-S313. Available at: <http://www.agriculturejournals.cz/publicFiles/07823.pdf>
- Klejduš, B., Štěrbová, D., Stratil, P., Kubáň, V. 2003. Identification and characterization of isoflavones in plant material by HPLC-DAD-MS tandem. *Chem. Listy*, vol. 97, no. 7, p. 530-539.
- Kotíková, Z., Lachman, J., Hejtmánková, A., Hejtmánková, K. 2011. Determination of antioxidant activity and antioxidant content in tomato varieties and evaluation of mutual interactions between antioxidants. *LWT - Food Sci. Technol.*, vol. 44, no. 8, p.1703-1710. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2011.03.015>
- Lachman, J., Hamouz, K. 2005. Red and purple coloured potatoes as a significant antioxidant source in human nutrition - a review. *Plant Soil Environ.*, vol. 51, no. 11, p. 477-482. Available at: <http://www.agriculturejournals.cz/publicFiles/51036.pdf>
- Lachman, J., Hamouz, K. 2008. Chapter 1. Antioxidants and Antioxidant Activity of Red, Purple and Yellow-Coloured Potatoes Affected by Main Extrinsic and Intrinsic Factors. *Food Chemistry Research Developments*. Ed. Papadopoulos, K. N., Nova Science Publishers, Hauppauge, N.Y., p. 29-74.
- Lachman, J., Hamouz, K., Orsák, M. 2005. Red and purple potatoes - a significant antioxidant source in human nutrition. *Chem. Listy*, vol. 99, no. 7, p. 474-482. Available at: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2005_07_474-482.pdf
- Lachman, J., Hamouz, K., Čepl, J., Pivec, V., Šulc, M., Dvořák, P. 2006. The effect of selected factors on polyphenol content and antioxidant activity in potato tubers. *Chem. Listy*, vol. 100, no. 7, p. 522-527. Available at: http://www.vscht.cz/chem_listy/docs/full/2006_07_522-527.pdf
- Lachman, J., Hamouz, K., Orsák, M., Pivec, V., Dvořák, P. 2008a. The influence of flesh colour and growing locality on polyphenolic content and antioxidant activity in potatoes. *Sci. Hortic.*, vol. 117, no. 2, p. 109-114. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scienta.2008.03.030>
- Lachman, J., Hamouz, K., Šulc, M., Orsák, M., Dvořák, P. 2008b. Differences in phenolic content and antioxidant activity in yellow and purple-fleshed potatoes grown in the Czech Republic. *Plant, Soil Environ.*, vol. 54, no. 1, p. 1-6. Available at: <http://www.agriculturejournals.cz/publicFiles/00566.pdf>
- Larbat, R., Olsen, K. M., Slimestad, R., Løvdal, T., Bénard, C., Verheul, M., Bourgaud, F., Robin, C., Lillo, C. 2012. Influence of repeated short-term nitrogen limitations on leaf phenolics metabolism in tomato. *Phytochemistry*, vol. 77, p. 119-128. <http://dx.doi.org/10.1016/j.phytochem.2012.02.004> PMID: 22414312
- Lister, C. E., Munro, J. 2000. *Nutrition and health qualities of potatoes - a future focus*. Crop & Food Res. Conf. Rep., vol. 143, 14-15.
- Lugasi, A., Al Meida, D. P. F., Dworschak, E. 1999. Chlorogenic acid content and antioxidant properties of potato tubers as related to nitrogen fertilisation. *Acta Aliment.*, vol. 28, no. 2, p. 83-195. <http://dx.doi.org/10.1556/AAlim.28.1999.2.7>
- Lukaszewicz, M., Matysiak-Kata, I., Skala, J., Fecka, I., Cisowski, W., Szopa, J. 2004. Antioxidant capacity manipulation in transgenic potato tuber by changes in phenolic compounds content. *J. Agric. Food Chem.*, vol. 52, no. 6, p. 1526-1533. <http://dx.doi.org/10.1021/jf034482k> PMID: 15030206
- Mazid, M., Khan, T. A., Mohammad, F. 2001. Role of secondary metabolites in defense mechanisms of plants. *Biol. Med.*, vol. 3, no. 2, p. 232-249.
- Modrianský, M., Valentová, K., Příkrylová, V., Walterová, D. 2003. Natural substances in the prevention of gastrointestinal diseases. *Chem. Listy*, vol. 97, no. 7, p. 540-547.

- Reddivari, L., Hale, A.L., Miller, J. C. Jr. 2007. Genotype, Location, and Year Influence Antioxidant Activity, Carotenoid Content, Phenolic Content, and Composition in Specialty Potatoes. *J. Agric. Food Chem.*, vol. 55, no. 20, p. 8073-8079. <http://dx.doi.org/10.1021/jf071543w> PMID: 17760413
- Naguib, A. E - M. M., Farouk, K. E. B., Zeinab A. S., Hanaa, H. A. E. B., Hanaa, F. A., Gaafar, A. A. 2012. Enhancement of phenolics, flavonoids and glucosinolates of broccoli (*Brassica oleracea*, var. *italica*) as antioxidants in response to organic and bio-organic fertilizers. *J. Saudi Soc. Agric. Sci.*, vol. 11, no. 2, p. 135-142. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jssas.2012.03.001>
- Riahi, A., Hdidier, C. 2013. Bioactive compounds and antioxidant activity of organically grown tomato (*Solanum lycopersicum* L.) cultivars as affected by fertilization. *Sci. Hortic.*, vol. 151, p. 90-96. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scienta.2012.12.009>
- Roussos, P. A. 2011. Phytochemicals and antioxidant capacity of orange (*Citrus sinensis* L. *Osbeck* cv. *Salustiana*) juice produced under organic and integrated farming system in Greece. *Sci. Hortic.*, vol. 129, no. 2, p. 253-258. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scienta.2011.03.040>
- Rumbaoa, R. G. O., Cornago, D. F., Geronimo, I. M. 2009. Phenolic content and antioxidant capacity of Philippine potato (*Solanum tuberosum*) tubers. *J. Food Comp. Anal.*, vol. 22, no. 6, p. 546-550. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfca.2008.11.004>
- Shahidi, F., Naczki, M. 2004. *Phenolics in Food and Nutraceuticals*. CRC Press LLC. p. 186-188. ISBN 978-1-58716-138-4. PMID: 15499245
- Smoleń, S., Sady, W. 2009. The effect of various nitrogen fertilization and foliar nutrition regimes on the concentrations of sugars, carotenoids and phenolic compounds in carrot (*Daucus carota* L.). *Sci. Hortic.*, vol. 120, no. 3, p. 315-324. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scienta.2008.11.029>
- Stefanelli, D., Goodwin, I., Jones, R. 2010. Minimal nitrogen and water use in horticulture: Effects on quality and content of selected nutrients. *Food Res. Int.*, vol. 43, no. 7, p. 1833-1843. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2010.04.022>
- Tapiero, H., Tew, K. D., Nguyen, Ba G., Mathe, G. 2002. Polyphenols: do they play a role in the prevention of human pathologies? *Biomed. Pharmacother.*, vol. 56, no. 4, p. 200-207. [http://dx.doi.org/10.1016/S0753-3322\(02\)00178-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0753-3322(02)00178-6)
- Toor, R. K., Savage, G. P. 2006. Changes in major antioxidant components of tomatoes during post-harvest storage. *Food Chem.*, vol. 99, no. 4, p. 724-727. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.08.049>
- Toor, R. K., Savage, G. P., Heeb, A. 2006. Influence of different types of fertilisers on the major antioxidant components of tomatoes. *J. Food Comp. Anal.*, vol. 19, no. 1, p. 20-27. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfca.2005.03.003>
- USDA National Nutrient Database for Standard Reference, 2009, http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/cgi-bin/list_nut_edit.pl
- Valverdú - Queralto, A., Medina - Remón, A., Casals - Ribes, I. 2012. Is there any difference between the phenolic content of organic and conventional tomato juices? *Food Chem.*, vol. 130, no. 1, p. 222-227. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.07.017>
- Verardo, V., Riciputi, Y., Sorrenti, G., Ornaghi, P., Marangoni, B., Caboni, M. F. 2013. Effect of nitrogen fertilisation rates on the content of fatty acids, sterols, tocopherols and phenolic compounds, and on the oxidative stability of walnuts. *LWT - Food Sci. Technol.*, vol. 50, no. 2, p. 732-738.
- Vreugdenhil, D., Bradshaw, J., Gebhardt, Ch., Govers, F., MacKerron, D. K. L., Taylor, M. A., Ros, H. A. 2007. *Potato Biology and Biotechnology*. Advances and Perspectives. Elsevier, Amsterdam, 823 p. ISBN-13: 978-0-444-51018-1

Acknowledgments:

The work was supported by grants VEGA 1/0456/12, VEGA 1/0724/12 of Slovak Republic, NAZV QI101A184 of the Ministry of Agriculture of the Czech Republic and APVV SK-CZ-0102-11.

Contact address:

Janette Musilová, Department of Chemistry, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Slovak University of Agriculture in Nitra, Slovak Republic, E-mail: janette.musilova@uniag.sk

Jaromír Lachman, Department of Chemistry, Faculty of Agrobiological, Food and Natural Resources, Czech University of Life Sciences Prague, Czech Republic, E-mail: lachman@af.czu.cz

Judita Bystrická, Department of Chemistry, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Slovak University of Agriculture in Nitra, Slovak Republic, E-mail: judita.bystricka@centum.sk

Zuzana Poláková, Department of Statistics and Operation Research, Faculty of Economics and Management, Slovak University of Agriculture in Nitra, Slovak Republic, E-mail: Zuzana.Polakova@uniag.sk

Peter Kováčik, Department of Agrochemistry and Plant Nutrition, Faculty of Agrobiological, Food and Natural Resources, Slovak University of Agriculture in Nitra, Slovak Republic, E-mail: peter.kovacik@uniag.sk

Diana Hrabovská, Department of Chemistry, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Slovak University of Agriculture in Nitra, Slovak Republic, E-mail: jonasovadiana@azet.sk

EVALUATION OF DIET QUALITY INDICATORS IN ADULTS

Katarína Fatrcová-Šramková

ABSTRACT

Several indices evaluate the quality of diet. The indices are based on nutrient requirements and dietary guidelines for the prevention of chronic diseases (to reduce the risk of chronic diseases). The Healthy Eating Index, Healthy Diet Indicator, and Diet Quality Index consist of components, which represent different aspects of a healthy diet. The indicators of diet quality are based on dietary intake data from 24-hour dietary recalls.

The aim of the research was to evaluate the nutrition of adults according to the selected criteria of three diet quality indicators: Healthy Eating Index, Healthy Diet Indicator, Diet Quality Index. 234 nutrition daily records were evaluated (from 78 probands per 3 days). Nutritional intake and blood biochemical parameters were defined in 56 females and 22 men (72% and 28% respectively) aged from 24 to 62 years. The nutritional software Alimenta 4.3e (Food Research Institute, Bratislava, Slovakia, 2004) was used to calculate the nutrient intake. The evaluation of nutrition intake was focused on four parameters/recommendations of the Healthy Eating Index (to reduce total fat intake to 30% or less of energy, to reduce saturated fatty acid intake to less than 10% of energy, to reduce cholesterol intake to less than 300 mg daily, to limit total daily intake of sodium to 2400 mg or less), on five parameters/recommendations of the Healthy Diet Indicator (saturated fatty acids 0-10% of energy intake, polyunsaturated fatty acids 3-7% of energy intake, protein 10-15% of energy intake, dietary fiber 27-40 g, cholesterol 0-300 mg), on five parameters/recommendations of the Diet Quality Index (to reduce total fat intake to 30% or less of energy, to reduce saturated fatty acid intake to less than 10% of energy, to reduce cholesterol intake to less than 300 mg daily, to limit total daily intake of sodium to 2400 mg or less, to maintain adequate calcium intake – approximately Recommended Dietary Allowance levels, i.e. \geq RDA). Blood samples from peripheral blood were taken after all-night starvation and then analyzed by using Refflotron (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany). The data from nutritional intake and biochemical parameters were analyzed using t-test and chi-quadrat-test.

The normal cholesterolaemia occurred in 47% (the first group Without risk), and 53% of the examined participants (the second group Risk) were classified with risky cholesterol values (5 mmol.l⁻¹ and more). Among the subjects with hypercholesterolaemia they had 27% higher values of triglycerides (1.9 mmol.l⁻¹ and more), while in the rest of set there were only 14% characterized with hypertriacylglycerolaemia. The probands with the negative high cholesterol level in blood had significantly higher triacylglycerolaemia ($P < 0.001$) and the age of ($P < 0.05$).

In case of Healthy Eating Index the most participants met the criterion only for one recommendation (41%), and fifth of volunteers fulfilled two recommendation altogether. Taking into account all parameters the probands met cholesterol in diet (56%) best, less saturated fat (35%), total fat (24%), and at least sodium intake (9%). Within Healthy Diet Indicator there were recorded fulfillments: for cholesterol in 56%, for saturated fatty acids in 35%, for protein in 32%, for fiber in 22%, and for polyunsaturated fatty acids in 17%. From five criteria there was met only one recommendation of 36% of subjects, 17% achieved two fulfillments, and other 17% three ones. Evaluation of Diet Quality Index recorded that the following order of recommendation fulfillment was obtained: cholesterol (56 %) > calcium (44 %) > saturated fat (35 %) > total fat (24 %) > natrium (9 %). Only one fulfillment reached 37 %, two recommendations met 27 %, and three 14 %.

From all three considered indicators the recommendation for cholesterol intake was met most (by 56% probands), worst for total fat (24%), fiber (22%), polyunsaturated fat (17%), and natrium (9%).

In conclusion, this study demonstrated higher saturated fat, polyunsaturated fatty acids, fiber, and significantly higher calcium intake ($P < 0.05$) in the examined participants with normal cholesterolaemia in comparison with the group of risk cholesterol.

Keywords: Healthy Eating Index; Healthy Diet Indicator; Diet Quality Index; health nutrition; diet quality; adults

ÚVOD

Na posudzovanie zdravého stravovania sa využívajú viaceré indexy, resp. indikátory stravy: Index zdravého

stravovania (HEI), Indikátor zdravej stravy (HDI) a Index kvality stravovania (DQI).

Index zdravého stravovania (HEI, Healthy Eating Index) hodnotí kvalitu stravy, posudzuje druh a kvantitu

konzumovanej potravy, pričom vyjadruje compliance s nutričnými odporúčaniami pre rôzne živiny a potravinové skupiny (Gibson, 2005). Index zaviedlo Americké ministerstvo poľnohospodárstva (USDA, U.S. Department of Agriculture), Centrum pre nutričnú politiku a podporu (Kennedy et al., 1995). Index bol vytvorený s cieľom poskytnúť nový prostriedok na posúdenie plnenia nutričných cieľov. Bol prvým a jednoduchým modelom na monitorovanie zmien v stravovacích zvyklostiach. Index meria, do akej miery je strava v súlade s nutričnými odporúčaniami a s potravinovou pyramídou (Variyam et al., 1998). Je zložený z desiatich komponentov, ktoré reprezentujú rôzne aspekty stravy:

1.-5. Päť základných skupín potravinovej pyramídy (Food Guide Pyramid): cereálie (chlieb, obilniny, ryža a cestoviny), zelenina, ovocie, mlieko (mlieko, jogurty a syry) a mäso (mäso, hydina, ryby, strukoviny, vajcia a orechy)

6. Tuky (% z celkového príjmu energie)

7. Surované (nasýtené) tuky (% z celkového príjmu energie)

8. Cholesterol

9. Sodík

10. Pestrosť stravy (Basiotis et al., 2002).

Pre každý komponent indexu sa pri bodovom hodnotení prideluje maximálne skóre 10 a minimálne skóre 0. Celkové maximálne HEI skóre je 100. Vysoké skóre komponentu znamená, že príjem sa približuje odporúčaniam, nízke skóre indikuje horšie dodržiavanie odporúčaného rozsahu alebo množstva. V prípade hodnotenia potravinových skupín maximálne bodové skóre znamená naplnenie/prekročenie odporúčaného počtu porcií podľa potravinovej pyramídy (USDA, 1996). Potravinová pyramída znázorňuje nutričné odporúčania pre Američanov (Dietary Guidelines Advisory Committee, 2000), typy a množstvo konzumovaných potravín s cieľom zabezpečiť zdravú stravu. Pestrosť stravy bola samostatne zakomponovaná do indexu preto, že nutričné odporúčania pre Američanov, potravinová pyramída a Národný výskumný výbor pre výživu a zdravie zdôraznili význam pestrosti stravy (National Research Council, 1989; USDA, 1996; Dietary Guidelines Advisory Committee, 2000). Deskriptory pre HEI skóre, ktoré určilo USDA, uvádza Gibson (2005): pod 51 bodov zlé stravovanie, 51-80 bodov sú potrebné zmeny v stravovaní, nad 80 bodov dobré stravovanie.

Prvýkrát bol HEI vypočítaný v roku 1995 s použitím údajov z rokov 1989-90 (USDA, 1995). Vychádzal z dvojdných potravinových záznamov a 24-hodinových nutričných protokolov 7500 jedincov vo veku dva roky a viac (Gibson, 2005). Následne bolo hodnotenie stravovania podľa HEI aktualizované (Bowman et al., 1998, Basiotis et al., 2002). Výpočty HEI-skóre a ich aplikácie detailnejšie uvádzajú Kennedy et al., (1995) a Bowman et al., (1998). V roku 1998 HEI skóre záviselo od veku: bolo najvyššie (74,4) u detí vo veku 2 až 3 roky a signifikantne nižšie (68,0) u detí vo veku 7 až 9 rokov (Carlson et al., 2001). Pre roky 1999-2000 bola priemerná hodnota HEI skóre pre americkú populáciu 63,8 (Basiotis et al., 2002). Dubois et al., (2000) použili HEI na zhodnotenie kvality stravy na základe Kanadskej nutričnej správy, Quebec 1990 (Health Canada, 1990). HEI index bol neskôr revidovaný, revízia HEI vychádzala z nových

nutričných odporúčaní pre americkú populáciu v roku 2005 a z odporúčaní Moja pyramída (My Pyramid) (Britten et al., 2006). HEI-2005, ktorý je zložený z 12 komponentov, je určený na nutričný monitoring, intervenciu a výskum (Guenther et al., 2006).

Indikátor zdravej stravy (HDI, Healthy Diet Indicator) je založený na nutričných zásadách pre prevenciu chronických ochorení, ktoré definovalo WHO v roku 1996. Pozostáva z deviatich zložiek, pričom v rámci indikátora HDI nie je zahrnutý príjem tuku a celkových sacharidov. K ďalším modifikáciám v porovnaní s pôvodným HEI patrilo vylúčenie soli kvôli limitácii primeraného príjmu soli na základe údajov o konzumácii potravín a náhrada komponentu „voľné cukry“ mono- a disacharidmi. Pre každé z deviatich kritérií sa prideluje skóre (0, 1 bod). Kritériami HDI sú živiny alebo potravinové skupiny (Huijbregts et al., 1997):

1. Surované (nasýtené) mastné kyseliny – SFA (% energie príjmu)
2. Polynenasýtené mastné kyseliny – PUFA (% energie)
3. Bielkoviny (% energie)
4. Komplexné sacharidy (% energie)
5. Potravinová vláknina (g)
6. Ovocie a zelenina (g)
7. Strukoviny, orechy a semená (g)
8. Mono- a disacharidy (% energie)
9. Cholesterol (mg)

Index kvality stravovania (DQI, Diet Quality Index) vychádza z 8 amerických nutričných a zdravotných odporúčaní. Obsahuje schému, v ktorej sú prvé tri nutričné a zdravotné odporúčania (č. 1-3) zamerané na lipidy (celkový tuk, surované mastné kyseliny, cholesterol). Odporúčania pre sacharidy predstavujú ďalšie dve kritéria indexu, pričom č. 4 sa týka porcií zeleniny a ovocia, č. 5 porcií obilnín a strukovín. Do indexu je zahrnuté kritérium pre bielkoviny, vápnik a sodík. V indexe DQI nebolo zohľadnené odporúčanie pre používanie suplementov, konzum alkoholu, príjem fluoridov a vyvážený príjem potravín s fyzickou aktivitou na udržanie primeranej telesnej hmotnosti. Výsledok celkového skóre môže byť v rozsahu od 0 (výborné stravovanie) do 16 bodov (zlé stravovanie). Odporúčania DQI sú zamerané na živiny alebo potravinové skupiny (Patterson et al., 1994):

1. Znížiť celkový príjem tukov na 30 % energetického príjmu alebo menej.
2. Znížiť surované (nasýtené) mastné kyseliny na menej ako 10 % energetického príjmu.
3. Znížiť príjem cholesterolu na menej ako 300 mg denne.
4. Konzumovať päť alebo viac porcií zeleniny a ovocia denne.
5. Zvýšiť príjem škrobov a iných komplexných sacharidov na 6 alebo viac porcií chleba, cereálií a strukovín denne.
6. Udržiavať príjem bielkovín na menej ako dvojnásobok RDA (Recommended Dietary Allowance; odporúčaná výživová dávka).
7. Obmedzovať celkový denný príjem sodíka na 2400 mg alebo menej
8. Udržiavať adekvátny príjem vápnika (približne na úrovni RDA).

Skóre ukazovateľov zdravej stravy sa vypočítava ako súčet bodového hodnotenia jednotlivých komponentov. Kvalitou výživy a potravinových zdrojov sa zaoberajú mnohé práce, z domácich napr. Kačániová et al., (2011),

Mareček et al., (2011), Haščík et al., (2011), Dudriková et al., (2012).

Cieľom práce bolo zhodnotiť stravovanie dospelých osôb pomocou ukazovateľov kvality stravovania: Indexu zdravého stravovania (HEI), Indikátora zdravej stravy (HDI), Indexu kvality stravovania (DQI) a vybrané kritéria stravovania porovnať v skupinách probandov s rôznou cholesterológiou.

MATERIÁL A METÓDY

Do súboru bolo zaradených 78 probandov, z toho 56 žien a 22 mužov (72 % a 28 %). Priemerný vek bol $43,09 \pm 10,43$ rokov, probandi boli vo veku 24-62 rokov. Vek bol vypočítaný z dátumu narodenia a dátumu vyšetrenia. Stravovanie probandov bolo vyhodnotené použitím 24-hod. nutričných protokolov, ktoré vyšskolení probandi vyplnili za 3 dni a ktoré boli analyzované v nutričnom softvare Alimenta 4.3e (Výskumný ústav potravinársky Bratislava, Infobus, 2004). Zo spracovaných 234 stravovacích záznamov boli vypočítané priemerné hodnoty z 3 denných protokolov. Z výstupov nutričného softwaru boli ďalej vyhodnocované parametre, ktoré sú súčasťou troch indexov, resp. indikátorov, poukazujúcich na správnosť výživy. Predmetom záujmu boli 4 parametre v rámci Indexu zdravého stravovania – HEI (z pôvodných 10 podľa **Kennedyho et al., 1995**), ďalej 5 parametrov HDI – Indikátora zdravej stravy (z pôvodných 9 podľa **Huijbregtsa et al., 1997**) a 5 parametrov DQI – Indexu kvality stravovania (z pôvodných 8 podľa **Pattersona et al., 1994**). Vybrané parametre sú uvedené v tab. 1-3.

U probandov boli zisťované hladiny krvných parametrov (celkový cholesterol, triacylglyceroly) po odbere periférnej krvi s použitím prístroja Reflotron (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) na princípe suchej chémie v rámci biochemického skríningu krvného séra.

Súbor bol rozdelený do dvoch skupín podľa cholesterémie (tab. 4): prvú skupinu „Bez rizika“ tvorili probandi s hladinou cholesterolu v norme (t.j. bez kardiovaskulárneho rizika) s hodnotami menej ako 5 mmol.l^{-1} , druhú skupinu „Riziko“ tvorili probandi s cholesterológiou zodpovedajúcou riziku (5 mmol.l^{-1} a viac). Zároveň bola u probandov posudzovaná aj triglyceridémia, pričom normu predstavovali hodnoty triacylglycerolov menej ako $1,9 \text{ mmol.l}^{-1}$ (**Avdičová et al., 2000**). Na štatistické zhodnotenie bol použitý nepárový t-test a chí-kvadrát test.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Na základe hodnotenia cholesterémie sa 47 % probandov nevyznačovalo kardiovaskulárnym rizikom a zvyšok súboru (53 %) mal naopak hodnoty 5 mmol.l^{-1} a viac, t.j. rizikovo vysoké. Priemerné hladiny cholesterolu, triacylglycerolov, ako aj vek uvádza tab. 4. Porovnanie skupín s rôznou hladinou cholesterolu poukazuje na to, že v skupine s rizikom podľa cholesterolu má až 27 % osôb aj vysokú triglyceridémiu, zatiaľ čo skupina bez rizika zahŕňa 14 % probandov s vyššími (hraničnými alebo rizikovými) hodnotami triacylglycerolov v krvi. Navyše skupina s nepriaznivo vysokým cholesterolom v krvi má okrem vyššej priemernej cholesterémie i triacylglycerolémie ($P < 0,001$) aj preukazne vyšší vek ($P < 0,05$).

Index zdravého stravovania (HEI)

HEI poukázal na to, že probandi s vysokou cholesterológiou (skupina Riziko) vo väčšej miere rizikovo nespĺnili odporúčanie príjmu cholesterolu ako aj sodíka v strave (tab. 6). Skupina s prospešne nižším cholesterolom v krvi (skupina Bez rizika) sa vyznačovala naopak častejším splnením kritéria pre príjem cholesterolu (o 11 % viac) ako aj tukov (o 10 % viac probandov). Opačná situácia bola pri splnení nasaturovaných mastných kyselín (SFA) a sodíka.

V prípade hodnotenia SFA sa zo skupiny s rizikovým cholesterolom vyznačovalo splnením kritéria preukazne ($P < 0,001$) viac probandov (s rozdielom 40 %) a nespĺnením (hodnotením v strednom pásme) naopak menej osôb (rozdiel 37 %). Odporúčanie pre SFA nespĺnilo alebo dokonca rizikovo nespĺnilo paradoxne viac probandov s nižším cholesterolom v krvi ako s vyšším (86 % *versus* 46 %). Lepšie dodržiavanie SFA odporúčaní pri vysokom cholesterolu môže poukazovať na dodržiavanie diétnych odporúčaní na základe možných lekárskeho vyšetrení.

V analyzovanom súbore boli najviac dodržané odporúčania pre obsah cholesterolu v strave (u viac ako polovice súboru), SFA (v prípade viac ako tretiny), menej pre príjem celkového tuku (u viac ako pätiny) a sodíka (9 %). Rizikovým nespĺnením odporúčania sa súbor vyznačoval najmä pri príjme sodíka (42 %) a cholesterolu (22 %), menej pri tukoch a SFA.

Z posúdenia súčasného plnenia kritérií vyplýva, že najväčšia časť súboru splnila zo všetkých štyroch parametrov HEI (tab. 9) len jedno odporúčanie (41 %) a pätina súboru dosiahla súčasne dve splnenia. Ani jedno splnenie nedosiahla menej ako tretina probandov, čo možno hodnotiť negatívne.

Dosiahnuté priemerné hodnoty parametrov HEI uvádza tab. 7. Podľa tab. 8 boli najlepšie (najvyššie) bodové hodnotenia dosiahnuté pre celý súbor v poradí: cholesterol > SFA > celkový tuk > sodík. Poradie sa odlišovalo medzi skupinami, v prvej skupine s nižšou cholesterológiou boli odlišnosti v poradí pri dvoch parametroch, v druhej skupine s vyšším krvným cholesterolom až pri troch parametroch.

Kritéria HEI pre tuk, SFA a cholesterol sú zhodné s Odporúčanými výživovými dávkami SR (**Vestník MZ SR, 1997; Kajabu et al., 1999**). **Drewnowski et al., (2009)** v štúdiu s meraním kvality stravovania a kardiovaskulárnymi rizikovými faktormi uvádzajú, že existuje málo údajov o tom, že priaznivé skóre HEI súvisí s lepšími zdravotnými ukazovateľmi. Dve rozsiahle kohortové štúdie ale zistili, že HEI skóre bolo v slabšej asociácii s nižším rizikom kardiovaskulárných chorôb u mužov (**McCullough et al., 2000a**) a naopak skóre nebolo v asociácii so zníženým rizikom chronických chorôb (**McCullough et al., 2000b**). Nebola zistená ani žiadna asociácia s rizikom rakoviny. **Kennedy et al., (1995)** potvrdili vysokú koreláciu so živinami. Podľa autorov **Drewnowski et al., (2009)** analýzy stravovania 2200 mužov a 2881 žien vo veku 35-61 rokov z Francúzska zistili príjem 37 % energie z tukov, 16 % z SFA a 16,9 % z bielikov. Len 0,9 % žien malo stravu s obsahom menej ako 10 % SFA a len 4,3 % s menej ako 30 % tuku.

Tabuľka 1 Index zdravého stravovania (HEI) – vybrané parametre

Table 1 Healthy Eating Index (HEI) – selected parameters

Komponent ¹	Interval hodnotenia ⁷	Kritériá pre max. hodnotenie 10 b ⁸	Kritériá pre min. hodnotenie 0 b ¹³
<i>Výživové odporúčania²</i>			
1. celkový tuk ³	0 – 10	30 % energie alebo menej ⁹	45 % alebo viac energie ¹⁴
2. nasýtený tuk ⁴	0 – 10	menej ako 10 % energie ¹⁰	15 % alebo viac energie ¹⁵
3. cholesterol ⁵	0 – 10	300 mg alebo menej ¹¹	450 mg alebo viac ¹⁶
4. sodík ⁶	0 – 10	2400 mg alebo menej ¹²	4800 mg alebo menej ¹⁷

¹component, ²nutrition recommendations, ³total fat, ⁴saturated fat, ⁵cholesterol, ⁶sodium, ⁷interval of evaluation, ⁸criteria for maximum score of 10, ⁹30% or less of energy, ¹⁰less than 10% of energy, ¹¹less than 300mg, ¹²2400mg or less, ¹³criteria for minimum score of 0, ¹⁴45% or more of energy, ¹⁵15% or more of energy, ¹⁶greater than or equal to 450 mg, ¹⁷greater than or equal 4800 mg

Tabuľka 2 Indikátor zdravej stravy (HDI) – vybrané parametre

Table 2 Healthy Diet Indicator (HDI) – selected parameters

Živina ¹	Skóre ⁷	Kritériá ⁸
1. Surované (nasýtené) mastné kyseliny (% energetického príjmu) ²	0 1	> 10 % 0 – 10 %
2. Polynenasýtené mastné kyseliny (% energetického príjmu) ³	0 1	< 3 % alebo > 7 % ⁹ 3 – 7 %
3. Bielkoviny (% energetického príjmu) ⁴	0 1	< 10 % alebo > 15 % ¹⁰ 10 – 15 %
4. Potravinová vláknina (g) ⁵	0 1	< 27 alebo > 40 ¹¹ 27 – 40
5. Cholesterol (mg) ⁶	0 1	> 300 0 – 300

¹nutrient, ²saturated fatty acids (% of energy intake), ³polyunsaturated fatty acids (% of energy intake), ⁴protein (% of energy intake), ⁵dietary fiber (g), ⁶cholesterol (mg), ⁷score, ⁸criteria, ⁹< 3% or > 7%, ¹⁰< 10% or > 15%, ¹¹< 27 or > 40

Tabuľka 3 Index kvality stravovania (DQI) – vybrané parametre

Table 3 Diet Quality Index (DQI) – selected parameters

Živina alebo potravinová skupina ¹	Skóre ⁷	Kritériá ⁸
1. Znížiť celkový príjem tukov na 30 % energetického príjmu alebo menej ²	0 1 2	≤ 30 % 30 – 40 % > 40 %
2. Znížiť surované (nasýtené) mastné kyseliny na menej ako 10 % energetického príjmu ³	0 1 2	≤ 10 % 10 – 13 % > 13 %
3. Znížiť príjem cholesterolu na menej ako 300 mg denne ⁴	0 1 2	≤ 300 mg 300 – 400 mg > 400 mg
4. Obmedzovať celkový denný príjem sodíka na 2400 mg alebo menej ⁵	0 1 2	≤ 2400 mg 2400 – 3400 mg > 3400 mg
5. Udržiavať adekvátny príjem vápnika (približne na úrovni OVD) ⁶	0 1 2	≥ OVD ⁹ 66 – 100 % OVD ¹⁰ ≤ 66 % OVD ¹¹

OVD – odporúčaná výživová dávka, RDA – Recommended Dietary Allowance

¹nutrient or food group, ²reduce total fat intake to 30% or less of energy, ³reduce saturated fatty acid intake to less than 10% of energy, ⁴reduce cholesterol intake to less than 300 mg daily, ⁵limit total daily intake of sodium to 2400 mg or less, ⁶maintain adequate calcium intake (approximately RDA levels), ⁷score, ⁸criteria, ⁹≥ RDA, ¹⁰66 – 100 % RDA, ¹¹≤ 66 % RDA

Tabuľka 4 Parametre v skupinách probandov

Table 4 Parameters in groups of probands

Parameter ¹	Bez rizika ¹⁰	Riziko ¹¹	Spolu ¹²
n	37	41	78
%	47	53	100
Vek (roky)² priemer ± SD ³ minimum ⁴ maximum ⁵ medián ⁶ modus ⁷	40,00 ± 10,75 24,00 58,00 40,00 25,00	45,88 ± 9,41 * 26,00 62,00 46,00 57,00	43,09 ± 10,43 24,00 62,00 44,00 57,00
Cholesterol (mmol.l⁻¹)⁸ priemer ± SD ³ minimum ⁴ maximum ⁵ medián ⁶ modus ⁷	4,23 ± 0,59 2,78 4,96 4,37 4,54	6,01 ± 0,95 *** 5,00 8,89 5,76 5,95	5,16 ± 1,19 2,78 8,89 5,09 5,95
Triacylglyceroly (mmol.l⁻¹)⁹ priemer ± SD ³ minimum ⁴ maximum ⁵ medián ⁶ modus ⁷	1,27 ± 0,51 0,68 3,15 1,13 0,70	1,86 ± 0,79 *** 0,87 3,81 1,66 1,84	1,58 ± 0,73 0,68 3,81 1,42 0,70

SD – smerodajná odchýlka – standard deviation, Bez rizika – cholesterol menej ako 5 mmol.l⁻¹, Riziko – cholesterol 5 mmol.l⁻¹ a viac, * P < 0,05, *** P < 0,001

¹parameter, ²age (years), ³average ± SD, ⁴minimum, ⁵maximum, ⁶median, ⁷modus, ⁸cholesterol (mmol.l⁻¹), ⁹triglycerides (mmol.l⁻¹), ¹⁰without risk (cholesterol less than 5 mmol.l⁻¹), ¹¹risk (cholesterol 5 mmol.l⁻¹ or more), ¹²total

Tabuľka 5 Triacylglycerolémia

Table 5 Triacylglycerolaemia

Triacylglyceroly (mmol.l ⁻¹) ¹		Bez rizika ⁵		Riziko ⁶		Spolu ⁷	
		n	%	n	%	n	%
normálne ²	< 1,90	32	86	30	73	62	79
hraničné ³	1,90-2,29	4	11	1	2	5	6
rizikové ⁴	≥ 2,30	1	3	10	25	11	15

¹triglycerides (mmol.l⁻¹), ²normal, ³boundary, ⁴risk, ⁵without risk, ⁶risk, ⁷total

Tabuľka 6 Zhodnotenie plnenia kritérií HEI v súbore (%)

Table 6 Evaluation of HEI criteria fulfillment in set (%)

	Tuky ⁴	SFA ⁵	Cholesterol ⁶	Sodík ⁷
	Spolu⁸			
RN ¹	9	6	22	42
N ²	67	59	22	49
S ³	24	35	56	9
	Bez rizika⁹			
RN ¹	11	8	16	38
N ²	59	78	22	54
S ³	30	14	62	8
	Riziko¹⁰			
RN ¹	7	5	27	46
N ²	73	41	22	44
S ³	20	54 ***	51	10

*** P < 0,001

¹rizikové nesplnenie (Body 0) – risk nonfulfillment (Points 0), ²nesplnenie (Body 0,1-9,9) – nonfulfillment (Points 0,1-9,9),

³splnenie (Body 10) – fulfillment (Points 10), ⁴fat, ⁵saturované (nasýtené) mastné kyseliny – saturated fatty acids,

⁶cholesterol, ⁷sodium, ⁸total, ⁹without risk, ¹⁰risk

Tabuľka 7 Priemerné hodnoty vybraných parametrov HEI

Table 7 Average values of selected HEI parameters

	Celkový tuk (%)⁴	SFA (%)⁵	Cholesterol (mg)⁶	Sodík (mg)⁷
Spolu¹	34,49 ± 7,25	11,11 ± 3,03	326,95 ± 196,32	4963,13 ± 2725,57
Bez rizika²	34,57 ± 8,24	12,38 ± 2,59	309,44 ± 197,40	4729,26 ± 2155,43
Riziko³	34,41 ± 6,34	9,96 ± 2,96	342,75 ± 196,42	5174,19 ± 3165,88

¹total, ²without risk, ³risk, ⁴total fat (%), ⁵saturated fatty acids (%), ⁶cholesterol (mg), ⁷sodium (mg)

Tabuľka 8 Zhodnotenie vybraných parametrov HEI (v bodoch)

Table 8 Evaluation of selected HEI parameters (in points)

	Celkový tuk⁴	SFA⁵	Cholesterol⁶	Sodík⁷
Spolu¹	6,34 ± 3,46	6,38 ± 3,67	6,75 ± 4,32	3,45 ± 3,78
Bez rizika²	6,02 ± 3,71	4,88 ± 3,54	7,09 ± 4,23	3,68 ± 3,84
Riziko³	6,64 ± 3,24	7,74 ± 3,28	6,44 ± 4,44	3,24 ± 3,77

¹total, ²without risk, ³risk, ⁴total fat, ⁵saturated fatty acids, ⁶cholesterol, ⁷sodium

Tabuľka 9 Počet splnených odporúčaní v súbore (%)

Table 9 Number of filled recommendations in set (%)

Počet splnení¹	HEI²			HDI⁶			DQI⁷		
	Spolu³	BR⁴	R⁵	Spolu³	BR⁴	R⁵	Spolu³	BR⁴	R⁵
0	30	24	20	25	27	8	18	5	12
1	41	46	46	36	46	34	37	41	41
2	20	24	20	17	16	24	27	30	29
3	6	3	10	17	11	24	14	21	10
4	3	3	4	3	0	5	3	3	5
5	-	-	-	2	0	5	1	0	3

¹number of fulfillments, ²Index zdravého stravovania – Healthy Eating Index, ³total, ⁴Bez rizika – Without risk, ⁵Riziko – Risk, ⁶Indikátor zdravej stravy – Healthy Diet Indicator, ⁷Index kvality stravovania – Diet Quality Index

Tabuľka 10 Zhodnotenie plnenia kritérií HDI v súbore (%)

Table 10 Evaluation of HDI criteria fulfillment in set (%)

	SFA³	PUFA⁴	Bielkoviny⁵	Vláknina⁶	Cholesterol⁷
	Spolu⁸				
S¹	35	17	32	22	56
N²	65	83	68	78	44
	Bez rizika⁹				
S¹	14	8	27	8	62
N²	86	92	73	92	38
	Riziko¹⁰				
S¹	54 ***	24	37	34	51
N²	46	76	63	66	49

¹spĺnenie (Body 1) – fulfillment (Points 1), ²nesplnenie (Body 0) – nonfulfillment (Points 0), ³saturované (nasýtené) mastné kyseliny – saturated fatty acids, ⁴polynenasýtené mastné kyseliny – polyunsaturated fatty acids, ⁵protein, ⁶fiber, ⁷cholesterol, ⁸total, ⁹without risk, ¹⁰risk

Tabuľka 11 Priemerné hodnoty vybraných parametrov HDI

Table 11 Average values of selected HDI parameters

	SFA (%) ⁴	PUFA (%) ⁵	Bielkoviny (%) ⁶	Potravinová vláknina (g) ⁷	Cholesterol (mg) ⁸
Spolu ¹	11,11 ± 3,03	15,94 ± 8,52	13,11 ± 4,87	21,30 ± 11,35	326,95 ± 196,32
Bez rizika ²	12,38 ± 2,59	20,56 ± 7,62	12,67 ± 5,20	16,10 ± 8,23	309,44 ± 197,40
Riziko ³	9,96 ± 2,96	11,76 ± 7,06	13,52 ± 4,58	25,99 ± 11,80	342,75 ± 196,42

¹total, ²without risk, ³risk, ⁴saturované (nasýtené) mastné kyseliny (%) – saturated fatty acids (%), ⁵polynenasýtené mastné kyseliny (%) – polyunsaturated fatty acids (%), ⁶protein (%), ⁷dietary fiber (g), ⁸cholesterol (mg)

Tabuľka 12 Zhodnotenie vybraných parametrov HDI (v bodoch)

Table 12 Evaluation of selected HDI parameters (in points)

	SFA ⁴	PUFA ⁵	Bielkoviny ⁶	Vláknina ⁷	Cholesterol ⁸
Spolu ¹	0,35 ± 0,48	0,17 ± 0,38	0,32 ± 0,47	0,22 ± 0,42	0,56 ± 0,50
Bez rizika ²	0,14 ± 0,35	0,08 ± 0,28	0,27 ± 0,45	0,08 ± 0,28	0,62 ± 0,49
Riziko ³	0,54 ± 0,50	0,24 ± 0,43	0,37 ± 0,49	0,34 ± 0,48	0,51 ± 0,51

¹total, ²without risk, ³risk, ⁴saturované (nasýtené) mastné kyseliny – saturated fatty acids, ⁵polynenasýtené mastné kyseliny – polyunsaturated fatty acids, ⁶protein, ⁷fiber, ⁸cholesterol

Tabuľka 13 DQI - Zhodnotenie plnenia kritérií DQI v súbore (%)

Table 13 Evaluation of DQI criteria fulfillment in set (%)

	Tuky ⁴	SFA ⁵	Cholesterol ⁶	Sodík ⁷	Vápnik ⁸
	Spolu⁹				
S ¹	24	35	56	9	44
N ²	52	33	14	22	23
RN ³	24	32	30	69	33
	Bez rizika¹⁰				
S ¹	30	14	62	8	62
N ²	40	41	8	24	24
RN ³	30	45 *	30	68	14
	Riziko¹¹				
S ¹	20	54 ***	51	10	27
N ²	60	26	20	20	22
RN ³	20	20	29	70	51

* P < 0,05, *** P < 0,001

¹spĺnenie (Body 0) – fulfillment (Points 0), ²nesplnenie (Body 1) – nonfulfillment (Points 1), ³rizikové nesplnenie (Body 2) – risk nonfulfillment (Points 2), ⁴fat, ⁵saturované (nasýtené) mastné kyseliny – saturated fatty acids, ⁶cholesterol, ⁷natrium, ⁸calcium, ⁹total, ¹⁰without risk, ¹¹risk

Tabuľka 14 Priemerné hodnoty vybraných parametrov DQI

Table 14 Average values of selected DQI parameters

	Tuky (%) ⁴	SFA (%) ⁵	Cholesterol (mg) ⁶	Sodík (mg) ⁷	Vápnik (%) ⁸
Spolu ¹	34,49 ± 7,25	11,11 ± 3,03	326,95 ± 196,32	4963,13 ± 2725,57	106,90 ± 78,74
Bez rizika ²	34,57 ± 8,24	12,38 ± 2,59	309,44 ± 197,40	4729,26 ± 2155,43	130,48 ± 81,37
Riziko ³	34,41 ± 6,34	9,96 ± 2,96	342,75 ± 196,42	5174,19 ± 3165,88	85,63 ± 70,69

¹total, ²without risk, ³risk, ⁴fat (%), ⁵saturované (nasýtené) mastné kyseliny (%) – saturated fatty acids (%), ⁶cholesterol (mg), ⁷natrium (mg), ⁸calcium (%)

Tabuľka 15 Zhodnotenie vybraných parametrov DQI (v bodoch)

Table 15 Evaluation of selected DQI parameters (in points)

	Tuky ⁴	SFA ⁵	Cholesterol ⁶	Sodík ⁷	Vápnik ⁸
Spolu ¹	1,00 ± 0,70	0,97 ± 0,82	0,73 ± 0,89	1,60 ± 0,65	0,90 ± 0,88
Bez rizika ²	1,00 ± 0,78	1,32 ± 0,71	0,68 ± 0,91	1,59 ± 0,64	0,51 ± 0,73
Riziko ³	1,00 ± 0,63	0,66 ± 0,79	0,78 ± 0,88	1,61 ± 0,67	1,24 ± 0,86

¹total, ²without risk, ³risk, ⁴fat, ⁵saturované (nasýtené) mastné kyseliny – saturated fatty acids, ⁶cholesterol, ⁷natrium, ⁸calcium

Tabuľka 16 Porovnanie plnenia odporúčaní podľa indexov

Table 16 Comparison of recommendations fulfilment according to indices

Poradie ¹	HEI ²	HDI ⁷	DQI ¹¹
1.	Cholesterol ³	Cholesterol ³	Cholesterol ³
2.	SFA ⁴	SFA ⁴	Vápnik ¹²
3.	Tuky ⁵	Bielkoviny ⁸	SFA ⁴
4.	Sodík ⁶	Vláknina ⁹	Tuky ⁵
5.	-	PUFA ¹⁰	Sodík ⁶

¹order, ²Index zdravého stravovania – Healthy Eating Index, ³cholesterol, ⁴saturované (nasýtené) mastné kyseliny – saturated fatty acids, ⁵fat, ⁶natrium, ⁷Indikátor zdravej stravy – Healthy Diet Indicator, ⁸protein, ⁹fiber, ¹⁰polynenasýtené mastné kyseliny – polyunsaturated fatty acids, ¹¹Index kvality stravovania – Diet Quality Index, ¹²calcium

Autori uvádzajú, že zatiaľ nie je dostatočné množstvo štúdií kvalitatívnych indexov stravovania, plazmatických biomarkerov a vybraných faktorov životného štýlu (Dubois et al., 2000, Fung et al., 2005, Fogli-Cawley et al., 2007), najmä v Európskej únii. V Európskej únii porovnateľné merania kvality stravovania zahŕňa Stredomorský kvalitatívny index stravovania (Med-DQI, Mediterranean Diet Quality Index a Eurodiet-kvalitatívny index. Ďalšie štúdie sú potrebné na zistenie, či vyššie skóre indexu súvisí s lepšími profilmi biomarkerov a so zníženým rizikom chronických chorôb. V niektorých štúdiách bolo skóre HEI slabým prediktorom plazmatických lipidov. V štúdiu Hann et al., (2001) nemalo skóre HEI súvislosť s profilmi plazmatických lipidov u žien alebo u mužov, aj keď strava s vysokým skóre HEI pozitívne korelovala s plazmatickou koncentráciou karotenoidov a vitamínu C, čo indikuje zdravšie stravovanie. Triacylglyceroly boli v norme a menej ako polovica mala zvýšenú cholesterolemiiu.

HEI bol predmetom aj predchádzajúcej štúdie (Fatrčová-Šramková, 2010). Indexom HEI, HDI, DQI, ako aj ďalšími indexami ako MDS – skóre stredozemného stravovania (Mediterranean Diet Score), MedDietScore sa zaoberali Kourlaba a Panagiotakos (2009).

Indikátor zdravej stravy (HDI)

V rámci indexu HDI bolo pri nižšej cholesterolemii v krvi pozorované výraznejšie plnenie kritéria len v prípade príjmu cholesterolu stravou (s rozdielom 11 % medzi porovnávanými skupinami) (tab. 10). Pri ostatných parametroch lepšie plnili odporúčania probandi s vyššou cholesterolemiiou, dokonca v prípade SFA aj preukazne ($P < 0,001$).

Celkovo bolo v súbore najlepšie splnené nutričné odporúčanie pri príjme cholesterolu (u viac ako polovice), ďalej SFA a bielkovín (zakaždým u približne tretiny

súboru), vlákniny (cca u pätiny) a najmenej (17 %) dodržiavalo odporúčaný príjem polynenasýtených mastných kyselín (PUFA).

Najväčší podiel súboru naplnil zo všetkých piatich parametrov HDI (tab. 9) len jedno odporúčanie (36 %) a po 17 % jedincov dosiahlo súčasne dve splnenia a tri splnenia. Štvrtina súboru nedosiahla žiadne splnenie, čo je negatívne zistenie.

Statisticky významný rozdiel bol medzi skupinami s rôznou hladinou krvného cholesterolu potvrdený v prípade 0-1 splnení, resp. 2-5 splnení ($P < 0,01$), pričom aspoň dve odporúčania naplnilo stravovanie 27 % *versus* 58 % osôb a to v prospech rizikovej skupiny.

Najlepšie (najvyššie) bodové hodnotenie HDI bolo v súbore zaznamenané v poradí: cholesterol > SFA > bielkoviny > vláknina > PUFA (tab. 12). Medzi skupinami sa poradie odlišovalo s výnimkou štvrtého miesta, na ktorom sa zhodne umiestnila vláknina v oboch skupinách ako aj pri hodnotení celého súboru. Priemerné hodnoty v skupinách i celom súbore znázorňuje tab. 11.

Podľa práce autorov Huijbregts et al., (1997) bol v súvislosti s HDI indexom pozorovaný inverzný vzťah s mortalitou.

Index kvality stravovania (DQI)

V pozorovanom súbore bolo zistené najvýraznejšie splnenie odporúčaní pri cholesterole (u viac ako polovice probandov) a najslabšie pri sodíku (u 9 %) (tab. 13). Celkové poradie plnenia kritérií DQI bolo nasledovné: cholesterol > vápnik > SFA > tuky > sodík.

Podľa posúdenia DQI v skupinách s rôznym cholesterolom (nižšia, t.j. normová *versus* vyššia, t.j. riziková hladina v krvi) zodpovedali rizikovému nespĺneniu vo väčšej miere probandi s nižším cholesterolom pri odporúčaniach SFA (45 %) ($P < 0,05$), tukov a cholesterolu (po 30 %), zatiaľ čo pri rizikovo

nesplnenom sodíku a vápniku prevažovali probandi s vyšším cholesterolem.

Pri nižšej cholesterolemii bolo zaznamenané lepšie plnenie kritérií v prípade príjmu cholesterolu a vápnika (zakaždým u takmer dvoch tretín súboru) a tukov v strave (u takmer tretiny súboru). Naopak odporúčanie SFA a sodíka lepšie plnili probandi s vyššou cholesterolemii. Splnenie SFA-odporúčaní bolo vysoko preukazné, a to v prospech skupiny s vyššou cholesterolemii (54 % verzus 14 %, t.j. s rozdielom 40 %).

Väčší podiel jedincov s rizikovými hodnotami cholesterolu v krvi, ktorí mali dodržané odporúčania pre príjem tukov, cholesterolu a SFA, môže byť dôsledkom aplikovania diétnych opatrení na základe možného predchádzajúceho lekárskeho vyšetrenia probandov, pričom sledovanie lekárskeho vyšetrenia a prípadnej farmakologickej terapie nebolo predmetom skúmania.

Plnenie viacerých kritérií DQI súčasne ukázalo, že väčšina súboru neplní paralelne viac odporúčaní v svojom stravovaní, keďže najväčšia časť súboru (37 %) zodpovedá plneniu len jedného kritéria (tab. 9). Viac ako štvrtina súboru plní dve kritéria súčasne a 14 % tri kritéria. Všetkých päť odporúčaní dodržalo v strave len 1 %, zatiaľ čo žiadne odporúčanie DQI nedodržalo až 18 % súboru.

Priemerné hodnoty parametrov DQI sú uvedené v tab. 14. Z metodiky indexov vyplýva, že najlepšie hodnotenie indexu je v prípade HEI a HDI pri dosiahnutí najvyššieho bodového skóre a naopak v prípade DQI najnižšie, keďže pri DQI sú body v rámci hodnotenia pridelované systémom „trestných bodov“. Hodnotenie DQI za celý súbor sa zhoršuje, čiže bodové skóre sa zvyšuje v poradí: cholesterol < vápnik < SFA < tuky < sodík (tab. 15). Porovnanie skupín ukázalo rozdiely v poradí, zhoda bola dosiahnutá len pri 1. mieste s vápnikom a pri 5. mieste s SFA. Uvedené umiestnenie zhodne dosiahli celý súbor aj probandi s nižšou cholesterolemiiou.

Vzájomné porovnanie plnení odporúčaní v rámci troch indexov znázorňuje pre celý súbor najlepšie výsledky pri príjme cholesterolu, SFA a vápnika, najhoršie pri tukoch, sodíku, vláknine a PUFA (tab. 16).

DQI index odráža kvalitu stravy (Patterson et al., 1994). Seymour et al. (2003) potvrdili koreláciu s celkovou a kardiovaskulárnou mortalitou, pričom nebola zistená asociácia s mortalitou na nádorové choroby.

Komparácia nastavených kritérií medzi použitými tromi indexami/indikátormi zdravého stravovania ukázala, že z kritérií vyskytujúcich sa opakovane v jednotlivých indexoch nie je úplná zhoda len v prípade jedného kritéria. Týmto je percentuálny podiel celkového tuku v strave, pre ktorý splnenie kritéria znamená dosiahnutie obsahu menej ako 10 % v prípade HEI, zatiaľ čo v prípade ostatných dvoch indexov (HDI, DQI) splnenie predstavuje hodnoty 10 % a menej. Táto diskrepancia však v našom súbore nespôsobilá nezrovnalosti, nakoľko hraničnú hodnotu obsahu SFA presne 10 % nedosiahol žiaden proband.

V rámci parametrov všetkých troch ukazovateľov zdravého stravovania (HEI, HDI, DQI) boli rozdiely medzi zistenými hodnotami príjmu v porovnávaných skupinách jedincov nepreukazné ($P \geq 0,05$) pri celkovom tuku, cholesterole, sodíku a bielkovinách v strave. Pri vláknine, PUFA, ale aj SFA bol ich príjem v priemere vysoko preukazne vyšší v skupine bez rizika ($P < 0,001$) a v tejto skupine s priaznivejšou cholesterolemiiou bolo preukazne

vyššie aj priemerné percentuálne krytie odporúčanej výživovej dávky pre vápnik ($P < 0,05$).

Na základe výsledkov o príjme SFA je potrebné redukovať ich príjem aj u probandov s cholesterolemiiou v pásme normy a dbať na dodržiavanie nutričných odporúčaní vhodne aplikovaných v každodennej stravovacej praxi. U tých jedincov, ktorí majú rizikové hodnoty cholesterolu v krvi, je nutné ešte prísnejšie kontrolovanie cholesterolemie a pravidelný skríning za súčasného dodržiavania nutričných odporúčaní.

ZÁVER

Stravovanie dospelých osôb bolo zhodnotené s použitím vybraných kritérií troch ukazovateľov zdravej stravy. Hodnotenie kvality stravovania ukázalo, že v súbore bol najviac splnený príjem cholesterolu (u 56 % probandov), najmenej sodíka (9 %), PUFA (17 %), vlákniny (22 %) a tuku (24 %).

Cholesterolemiiu malo v norme 47 % probandov. Probandi s nepriaznivo vysokým cholesterolom v krvi mali aj preukazne vyššiu triacylglycerolemiiu ($P < 0,001$) a aj vek ($P < 0,05$). U probandov s cholesterolemiiou v norme bol vyšší príjem SFA, PUFA, vlákniny a preukazne vyšší príjem vápnika ($P < 0,05$). Je potrebný ďalší výskum zhodnotenia indexov, resp. ukazovateľov kvality stravy, a to najmä v európskych podmienkach.

LITERATÚRA

- Avdíčová, M., Dobiášová, V., Gerová, Z. 2000. *Metodická príručka pre prácu v poradniach zdravia*. Bratislava : Ministerstvo zdravotníctva. 57 s. ISBN 80-7159-125-4.
- Basiotis, P. P., Carlson, A., Gerrior, S. A., Juan, W. Y., Lino, M. 2002. *The Healthy Eating Index: 1999-2000*. Washington DC : U.S. Department for Agriculture, Center for Nutrition Policy and Promotion. CNPP-12. Available at: www.cnpp.usda.gov.
- Britten, P., Marcoe, K., Yamini, S., Davis, C. 2006. Development of Food Intake Patterns for the MyPyramid Food Guidance System. *Journal of Nutrition Education and Behavior*, vol. 38, no. 6S, p. S78-S92. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jneb.2006.08.007> PMID: 17116598
- Bowman, S. A., Lino, M., Gerrior, S. A., Basiotis, P. P. 1998. *The Healthy Eating Index: 1994-96*. U.S. Department of Agriculture, Center for Nutrition Policy and Promotion. CNPP-5.
- Carlson, A., Lino, M., Gerrior, S., Basiotis, P. P. 2001. Report card on the diet quality of children ages 2 to 9. In *Nutrition Insight 25*. Washington DC : Center for Nutrition Policy and Promotion, USDA. www.cnpp.usda.gov.
- Dietary Guidelines Advisory Committee, 2000. *Report of the Dietary Guidelines Advisory Committee on the Dietary Guidelines for Americans, 2000*. U.S. Department of Agriculture, Agricultural Research Service.
- Drewnowski, A., Fiddler, E. C., Dauchet, L., Galan, P., Hercberg, S. 2009. Diet quality measures and cardiovascular risk factors in France: applying the Healthy Eating Index to the SU.VI.MAX study. *Journal of the American College of Nutrition*, vol. 28, no. 1, p. 22-29. <http://dx.doi.org/10.1080/07315724.2009.10719757> PMID: 19571156
- Dubois, L., Girard, M., Bergeron, N. 2000. The choice of a diet quality indicator to evaluate the nutritional health of populations. *Public Health Nutrition*, vol. 3, no. 3, p. 357-365. <http://dx.doi.org/10.1017/S136898000000409> PMID: 10979155

- Dudriková, E., Fatrcová-Šramková, K., Lovayová, V. 2012. Porovnanie konzumácie hydiny a rýb oproti konzumácii červeného mäsa u vysokoškolských študentov. *Hygiena alimentorum XXXIII*. Košice : Univerzita veterinárskeho lekárskeho fakulty, s. 201-204. ISBN 978-80-7148-063-1
- Fatrcová-Šramková, K. 2010. Components of the Healthy Eating Index in nutrition of adult females. *Potravinárstvo*, vol. 4, no. 4, p. 73-79. <http://dx.doi.org/10.5219/106>
- Fogli-Cawley, J. J., Dwyer, J. T., Saltzman, E., McCullough, M. L., Troy, L. M., Meiggs, J. B., Jacques, P. F. 2007. The 2005 Dietary Guidelines for Americans and risk of the metabolic syndrome. *American Journal of Clinical Nutrition*, vol. 86, p. 1193-1201. [PMid: 17921402](http://dx.doi.org/10.1093/ajcn/86.5.1193)
- Fung, T. T., McCullough, M. L., Newby, P. K., Manson, J. E., Meigs, J. B., Rifai, N., Willett, W. C., Hu, F. B. 2005. Diet quality scores and plasma concentrations of markers of inflammation and endothelial dysfunction. *American Journal of Clinical Nutrition*, vol. 82, p. 163-173. [PMid: 16002815](http://dx.doi.org/10.1093/ajcn/82.2.163)
- Gibson, R. S. 2005. *Principles of Nutritional Assessment*. 2nd ed. Oxford : Oxford University Press. 908 p. ISBN 978-0-19-517169-3.
- Guenther, P. M., Krebs-Smith, S. M., Reedy, J., Britten, P., Juan, W. Y., Lino, M., Carlson, A., Hiza, H. A., Basiotis, P. P. 2006. *Healthy Eating Index-2005*. U.S. Department of Agriculture, Center for Nutrition Policy and Promotion. CNPP-Fatc Sheet No. 1, December 2006. Available at: <http://www.cnpp.usda.gov/Publications/HEI/healthyeatingindex2005factsheet.pdf>
- Hann, C. S., Rock, C. L., King, I., Drewnowski, A. 2001. Validation of the Healthy Eating Index with use of plasma biomarkers in a clinical sample of women. *American Journal of Clinical Nutrition*, vol. 74, no. 4, p. 479-486. [PMid: 11566646](http://dx.doi.org/10.1093/ajcn/74.4.479)
- Haščík, P., Elimam, I. E., Bobko, M., Kačániová, M., Pochop, J., Garlík, J., Kročko, M., Čuboň, J., Vavrišínová, K., Arpášová, H., Capcarová, M., Benczová, M. 2011. Oxidative stability of chicken meat after pollen extract application in their diet. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, vol. 1, no. 1, p. 70-82.
- Health Canada, 1990. *Nutrition recommendations: Report of the Scientific Review Committee*. Ottawa : Minister of Supplies and Services Canada.
- Huijbregts, P., Feskens, E., Rasanen, L., Fidanza, F., Nissinen, A., Menotti, A., Kromhout, D. 1997. Dietary pattern and 20 year mortality in elderly men in Finland, Italy, and the Netherlands: longitudinal cohort study. *British Medical Journal*, vol. 315, no. 7099, p. 13-17. [PMid: 9233319](http://dx.doi.org/10.1136/bmj.315.7099.13)
- Kačániová, M., Juráček, M., Chlebo, R., Kňazovická, V., Kádasi Horáková, M., Kunová, S., Lejková, J., Haščík, P., Mareček, J., Šimko, M. 2011. Mycobiota and mycotoxins in bee pollen collected from different areas of Slovakia. *Journal of Environmental Science and Health B*, vol. 46, no. 7, p. 623-629. [PMid: 21749250](http://dx.doi.org/10.1080/10812239.2011.600000)
- Kajaba, I., Šimončíč, R., Ginter, E., Ondrejka, J., Trusková, I., Kaláč, J., Bzdúch, V. 1999. Odporúčané výživové dávky pre obyvateľstvo Slovenska (8. revízia OVD). *Výživa a zdravie*, vol. 44, no. 2, s. 25-29.
- Kennedy, E. T., Ohls, J., Carlson, S., Fleming, K. 1995. The Healthy Eating Index: design and applications. *Journal of the American Dietetic Association*, vol. 95, no. 10, p. 1103-1108. [http://dx.doi.org/10.1016/S0002-8223\(95\)00300-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0002-8223(95)00300-2)
- Kourlaba, G., Panagiotakos, D. B. 2009. Dietary quality indices and human health: A review. *Maturitas*, vol. 62, no. 1, p. 1-8. <http://dx.doi.org/10.1016/j.maturitas.2008.11.021> [PMid: 19128905](http://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19128905/)
- Mareček, J., Mocko, K., Ivanišová, E., Lišková, M., Mendelová, A. 2011. Enzymatic and antioxidant activity characteristic of the varieties *Triticum aestivum* L. and *Triticum durum* L. *Chemické listy*, vol. 105, spec. iss. S, p. 1040.
- McCullough, M. L., Feskanich, D., Rimm, E. B., Giovannucci, E. L., Ascherio, A., Variyam, J. N., Spiegelman, D., Stampfer, M. J., Willett, W. C. 2000a. Adherence to the Dietary Guidelines for Americans and risk of major chronic disease in men. *American Journal of Clinical Nutrition*, vol. 72, p. 1223-1231. [PMid: 11063453](http://dx.doi.org/10.1093/ajcn/72.5.1223)
- McCullough, M. L., Feskanich, D., Stampfer, M. J., Rosner, B. A., Hu, F. B., Hunter, D. J., Variyam, J. N., Colditz, G. A., Willett, W. C. 2000b. Adherence to the Dietary Guidelines for Americans and risk of major chronic disease in women. *American Journal of Clinical Nutrition*, vol. 72, p. 1214-1222. [PMid: 11063452](http://dx.doi.org/10.1093/ajcn/72.5.1214)
- National Research Council, Committee on Diet and Health, Food and Nutrition Board, 1989. *Diet and Health: Implications for Reducing Chronic Disease Risk*. Washington, DC: National Academy Press.
- Patterson, R. E., Haines, P. S., Popkin, B. M. 1994. Diet quality index : capturing a multidimensional behavior. *Journal of the American Dietetic Association*, vol. 94, no. 1, p. 57-64. [http://dx.doi.org/10.1016/0002-8223\(94\)92042-7](http://dx.doi.org/10.1016/0002-8223(94)92042-7)
- Seymour, J. D., Calle, E. E., Flagg, E. W., Coates, R. J., Ford, E. S., Thun, M. J. 2003. Diet Quality Index as a predictor of short-term mortality in the American Cancer Society Cancer Prevention Study II Nutrition Cohort. *American Journal of Epidemiology*, vol. 157, no. 11, p. 980-988. <http://dx.doi.org/10.1093/aje/kwg077> [PMid: 12777361](http://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12777361/)
- USDA, 1995. *The Healthy Eating Index*. U.S. Department of Agriculture, Center for Nutrition Policy and Promotion. CNPP-1.
- USDA, 1996. *The Food Guide Pyramid*. U.S. Department of Agriculture, Center for Nutrition Policy and Promotion. Home and Garden Bulletin Number 252.
- Variyam, J. N., Blaylock, J., Smallwood, D., Basiotis, P. P. 1998. *USDA's Healthy Eating Index and Nutrition Information*. Technical Bulletin No. 1866, April 1998.
- Vestník MZ SR*, roč. 45, čiastka 7-8, zo dňa 28. apríla 1997.

Acknowledgments:

This work was supported by project KEGA 025SPU-4/2012.

Contact address:

Katarína Fatrcová-Šramková, Slovak University of Agriculture in Nitra, Faculty of Agrobiological Sciences and Food Resources, Department of Human Nutrition, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovakia, E-mail: katarina.sramkova@gmail.com.

OCCURRENCE OF ANTIBIOTIC RESISTANT ENTEROCOCCI ON SKIN OF TEATS AND TEAT CUPS OF MILKING MACHINE

Anna Krebs-Artimová, Viera Ducková, Miroslav Kročko

ABSTRACT

The aim of this study was to investigate the occurrence of enterococci in conditions of farmhouse production and antibiotic resistance of 49 strains isolated from skin of teats and 50 strains isolated from teat cups of milking machine. The samples for enumeration and isolation of enterococci were cultured on selective diagnostic Slanetz-Bartley agar. The isolates were phenotypically identified at the species level with EN-COCCUS test. Susceptibilities of isolated enterococci to antibiotic (vancomycin 30 µg/disc, ampicillin 10 µg/disc, erythromycin 15 µg/disc, gentamicin 120 µg/disc, teicoplanin 30 µg/disc and tetracycline 30 µg/disc) were tested using the disc diffusion method. The counts of enterococci from teats reached the average value $2.77 \log_{10} \text{ cfu.ml}^{-1}$ and from teat cups of milking machine average value $2.85 \log_{10} \text{ cfu.ml}^{-1}$. The dominant species isolated from teats (41%) and also from teat cups (36%) were representatives of *E. group III* - *E. durans*, *E. hirae*, *E. faecalis asaccharolytic var.* The isolates of enterococci obtained from teats showed resistance to tetracycline (4%), erythromycin (4%) and intermediary resistance to tetracycline (8%), erythromycin (25%) and to vancomycin (8%). The isolates of enterococci obtained from teat cups showed resistance to tetracycline (2%) and intermediary resistance to erythromycin (20%) and to vancomycin (6%). No resistance to the antibiotic teicoplanin, ampicillin and gentamicin was found. The most of the isolates of enterococci were sensitive to the tested antibiotics.

Keywords: enterococci; antibiotic resistance; teat; teat cup

INTRODUCTION

The bacteria of the genus *Enterococcus*, also known as “enterococci”, are part of the environmental, food and clinical microbiology. Depending on the strains, they are considered as indicators of faecal contamination, spoilage, or potentially pathogenic organisms, but they have also positive effects (production of aromatic compounds, bacteriocins, etc.).

Enterococci are Gram-positive, facultative anaerobic bacteria. The majority of *Enterococcus* species is capable of growth at 10 and 45 °C, in 6.5% sodium chloride, at pH 9.6 and can survive heating at 60 °C for 30 min (Hardie, Whiley, 1997).

These microorganisms are frequently associated with many foods from animal (dairy and meat products) and vegetable origins (Franz et al., 2003; Giraffa, 2003; Todorov, Dicks, 2005; Dal Bello et al., 2010; Fabianová et al., 2010). The reason for the prevalence of enterococci in dairy products has long been considered as a result of unhygienic conditions during the production and processing of milk. However, their presence in foods has often been shown to be unrelated with direct faecal contamination (Giraffa, 2003; Elmosmelany et al., 2009). In general, microbial contamination of raw milk occurs from three main sources: from within the udder, from the exterior of the udder, and from the surface of milk handling and storage equipment (Bramley, McKinnon, 1990; McKinnon et al., 1990; Jayarao, Wolfgang, 2003; Lavová et al., 2011; Čanigová et al., 2012).

Enterococcus spp. are used as indicator bacteria for the development of antibiotic resistance (Danish Integrated Antimicrobial Resistance Monitoring and Research Programme - DANMAP, 2003), and provide accurate information on previous antibiotic treatment of the animals (Centers for Disease Control and Prevention - CDC, 2002). Enterococci are known to acquire antibiotic resistance with relative ease and to be able to spread these resistance genes to other species (Kühn et al., 2000). However, there is little information about the prevalence and epidemiology of antibiotic resistance of enterococci outside of the hospital setting, including dairy farms (Giraffa, 2003; Nam et al., 2010).

With this in mind, the objectives of the present study were: (1) enumeration and isolation of enterococci from skin of teats and from teat cups of milking machine; (2) determination of the species distribution and the antibiotic resistance of the enterococci isolated from teats and teat cups.

MATERIAL AND METHODOLOGY

Enumeration and isolation of enterococci

Swabs from teat skin and teat cups were taken by sterile tampons moistened in sterile saline solution in two different dairy farms with various hygienic conditions. Swab of teat was performed from teat surface after its cleaning before milking and swab of teat cup before installing milking machine to udder. Decimal dilutions of the samples were plated on Slanetz-Bartley selective agar

(Biokar Diagnostic, France) and incubated at 37 ± 1 °C for 48 ± 2 h. The counts of colonies with enterococcal morphology were enumerated after incubation. The typical colonies of enterococci were randomly selected from plates for isolation, from skin of teats (n=58) and from teat cups of milking machine (n=59).

Phenotypic identification

The genus *Enterococcus* was confirmed microscopically after Gram staining, using the catalase test with 3% H₂O₂, pyrrolidonylamidase test – PYRA test (Lachema, Czech Republic), bile-esculin test on bile, esculin and azid agar (Biokar Diagnostic, France) in 49 isolates from teats and 50 isolates from teat cups. The isolates of enterococci were phenotypically identified at the species level with EN-COCCUS test (Lachema, Czech Republic).

Determination of antibiotic resistance

The strains of enterococci were tested for antibiotic resistance on Mueller-Hinton agar (HiMedia, India) by the standard disc diffusion method (CLSI, 2011). The discs of therapeutically used antibiotics vancomycin (30 µg/disc), ampicillin (10 µg/disc), erythromycin (15 µg/disc), gentamicin (120 µg/disc), teicoplanin (30 µg/disc) and tetracycline (30 µg/disc) (HiMedia, India) were added on prepared inoculated plates with tested enterococcal strain, and then were incubated at 37 ± 1 °C. The sizes of zones were measured after 14 - 19 hours. The isolates were classified as susceptible, intermediate resistant or resistant.

RESULTS AND DISCUSSION

The counts of enterococci from teats reached the average value $2.77 \log_{10}$ cfu.ml⁻¹ and from teat cups of milking machine average value $2.85 \log_{10}$ cfu.ml⁻¹. The results of enterococci counts are shown in Table 1. Significant fluctuation of enterococci is probably related with differences in hygiene of udder and milking machines on farms. **Kagkli et al. (2007)** also confirmed the presence of enterococci in teat rinse with average value $1.50 \log_{10}$ cfu.ml⁻¹. This result shows that wrong sanitation of the udder and the milking machines is the major source of enterococci in raw milk. The cleanliness of cow can also affect the efficiency of cow preparation before milking, where dirty cows can double cow preparation time (**Reneau, Bey, 2007**). The cleanliness of the udder and teats can be influenced by several factors, including

transition from summer grazing to winter housing (housed cows being dirtier than grazing cows) (**Ellis et al., 2007**), faecal consistency (where increasingly fluid faecal consistency correlated with dirtier cows), frequency of bedding change and quality of bedding (**Ward et al., 2002**), and stage of lactation (**Reneau et al., 2005**). **Monsallier et al. (2012)** researched microbial flora on teat skins of 96 cows from 16 farms, which were sampled before washing and during milking. The counts of enterococci were at a level below $3 \log_{10}$ cfu.ml⁻¹. The authors noted that cleanliness of dairy cows reflects farming practices and influences the counts of microbial flora on teat skin. It offered prospects to better control teat microbial balance taking into account the milking hygiene practices, the parturition and the type of animal housing.

A total number of 99 enterococci isolates were collected. The results of species distribution are shown in Figures 1 and 2. The dominant species isolated from skin of teats (n=20) (Figure 1) and also from teat cups (n=18) (Figure 2) were representatives of *E. group III* - *E. durans*, *E. hirae*, *E. faecalis asaccharolytic var.* **Kagkli et al. (2007)** isolated *E. casseliflavus*, *L. mucosae*, *L. brevis*, *Aerococcus* sp. from the cow teats and in the case of some strains of enterococci, the origin from bovine faeces was confirmed. This is implying that cross-contamination from faeces to teats occurs. Other studies examined prevalence of enterococci isolated from faecal and environmental samples of dairy cattle. The highest percentage of enterococci strains were *E. hirae* 49.2%, *E. faecalis* 14.2%, *E. faecium* 13.4% and *E. casseliflavus* 10.4% isolated from faecal samples (**Jackson et al., 2010**). **Pradhan et al. (2009)** found the high prevalence of *Enterococcus* spp. (75 to 100%) isolated from environmental samples what indicate, they were ubiquitous throughout the farm environment.

Antibiotic resistance profiles of total enterococci isolated from skin of teats are shown in Figure 3. Isolates showed small resistance to two antibiotics. Of 49 isolates of enterococci, 4% of them were resistant to tetracycline and 4% of them were resistant to erythromycin. Intermediary resistance to tetracycline 8%, to erythromycin 25% and to vancomycin 8% was found. No resistance to the antibiotic teicoplanin, ampicillin and gentamicin was found. **Ma et al. (2006)** isolated *Enterococcus* spp. (n=271) from environmental (n=56), human (n=16) and dairy cows samples (n=199). Samples collected from dairy cows were

Table 1 Counts of enterococci (\log_{10} cfu.ml⁻¹) on skin of teat (n=58) and teat cups of milking machine (n=59)

	Skin of teat	Teat cups of milking machine
X_g	2.77	2.85
X_{min}	2	2
X_{max}	5.31	5.24
S_x	0.78	0.74

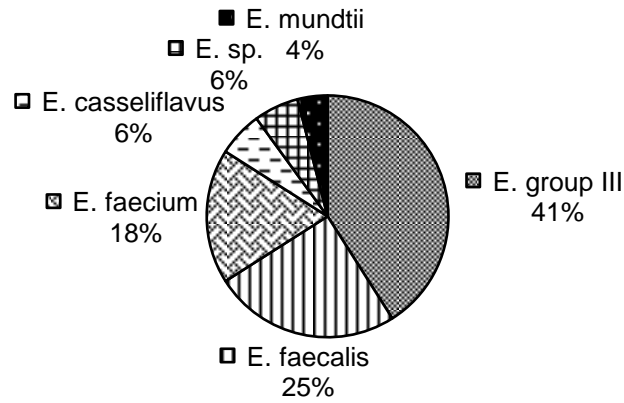


Figure 1 Distribution of species *Enterococcus* (n=49) isolated from skin of teats

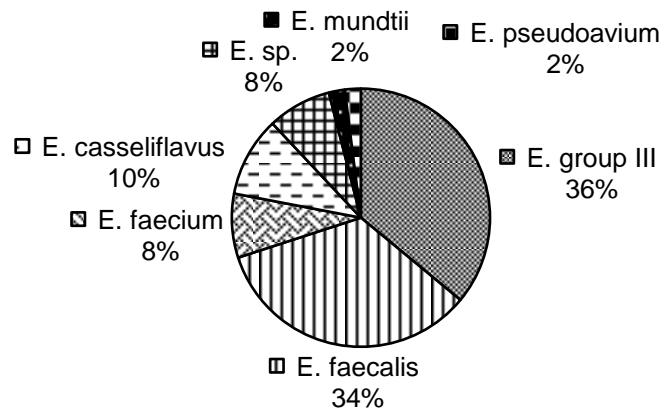


Figure 2 Distribution of species *Enterococcus* (n=50) isolated from teat cups of milking machine

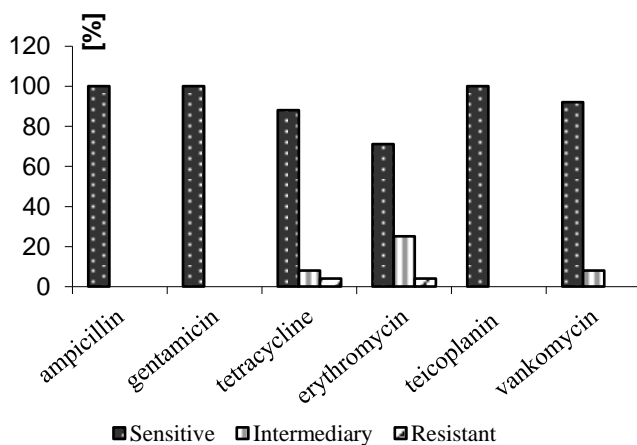


Figure 3 Antibiotic resistance profiles of enterococci isolated from skin of teats

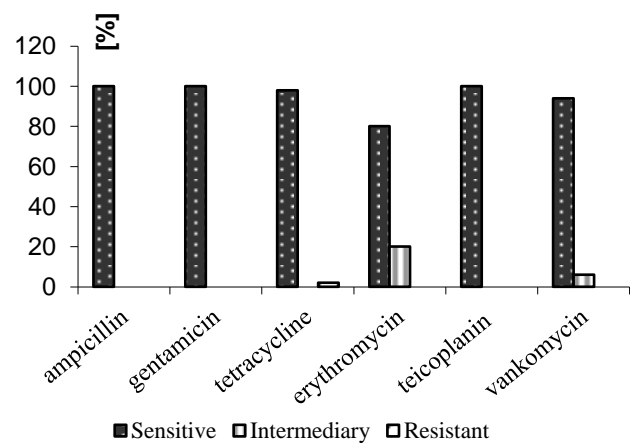


Figure 4 Antibiotic resistance profiles of enterococci isolated from teat cups

From the tested antibiotics, the highest levels of intermediary resistance had enterococci to tetracycline, erythromycin and vancomycin. One of the most widely used antibiotics combinations for dry cow treatment and prevention of mastitis is tetracycline and erythromycin.

In contrast, none resistant isolates to the antibiotic teicoplanin, ampicillin and gentamicin was found. In the case that the results of our research would be evaluated by older NCCLS requirements (e.g. from the year 1999), the proportion of resistant isolates would be higher.

Based on our or other authors' results, we do not support the unwarranted using of antibiotics in veterinary medicine because they are important driving force for selection of antibiotic resistant bacteria.

CONCLUSION

The results of this study show that there are high counts of enterococci in surface of cow udder and milking equipment. Besides fact that these enterococci can cause diseases of the mammary gland - mastitis, they may be also transmitted via milk and dairy products to the food chain of humans. Risk of enterococci for humans consist in the possible transfer of antibiotic resistance genes to other bacteria, including bacteria that are pathogenic to humans.

The relationship between the isolates of enterococci in the studied samples and tested antibiotics is not very clear and needs more investigation for better regulation strategies of safe using of antibiotics in farms.

REFERENCES

Bramley, A. J., McKinnon, C. H. 1990. The microbiology of raw milk. *Dairy Microbiology*, vol. 1, no. 1, p. 163-208.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). 2002. *Staphylococcus aureus* resistant to vancomycin – United States. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, vol. 51, no. 26, p. 565-567. [PMid:12139181](http://dx.doi.org/10.1181/12139181)

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2011. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-First Informational Supplement. *Clinical and Laboratory Standards Institute*, vol. 31, no. 1, p. 82-87.

Čanigová, M., Ducková, V., Kročko, M., Račková, J., Bezeková, J. 2012. Enterococci and their ability to form a biofilm. *Potravinarstvo*, vol. 6, no. 2, p. 15-18. <http://dx.doi.org/10.5219/200>

Dal Bello, B., Rantsiou, K., Bellio, A., Zeppa, G., Ambrosoli, R., Civera, T., Cocolin, L. 2010. Microbial ecology of artisanal products from North West of Italy and antimicrobial activity of the autochthonous populations. *LWT - Food Science and Technology*, vol. 43, no. 7, p. 1151-1159. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2010.03.008>

Danish Integrated Antimicrobial Resistance Monitoring and Research Programme (DANMAP). 2003. Use of Antimicrobial Agents and Occurrence of Antimicrobial Resistance in Bacteria from Food Animals, Foods and Humans in Denmark. *DANMAP*, Soborg, Denmark.

Ellis, K. A., Innocent, G. T., Mihm, M., Cripps, P., Mclean, W. G., Howard, C. W., Grove-White, D. 2007. Dairy cow cleanliness and milk quality on organic and conventional farms in the UK. *Journal of Dairy Research*, vol. 74, no. 3, p. 302-310. <http://dx.doi.org/10.1017/S002202990700249X> [PMid:17451622](http://dx.doi.org/10.1017/S002202990700249X)

Elmosmelany, A. M., Keefe, G. P., Dohoo, I. R., Jayarao, B. M. 2009. Risk factors for bacteriological quality of bulk tank milk in Prince Edward Island dairy herds. Part 2: Bacteria

count-specific risk factors. *Journal of Dairy Science*, vol. 92, no. 6, p. 2644-2652. <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2008-1813> [PMid:19447997](http://dx.doi.org/10.3168/jds.2008-1813)

Fabianová, J., Ducková, V., Čanigová, M., Kročko, M. 2010. Presence of enterococci in cow milk and their antibiotic resistance. *Potravinarstvo*, vol. 4, no. 2, p. 17-21. <http://dx.doi.org/10.5219/45>

Franz, C. M. A. P., Stiles, M. E., Schleifer, K. H., Holzaphel, W. H. 2003. Enterococci in foods - a conundrum for food safety. *International Journal of Food Microbiology*, vol. 88, no. 2-3, p. 105-122. [http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1605\(03\)00174-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1605(03)00174-0)

Giraffa, G. 2003. Functionality of enterococci in dairy products. *International Journal of Food Microbiology*, vol. 88, no. 2-3, p. 215-222. [http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1605\(03\)00183-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1605(03)00183-1)

Hardie, J. M., Whiley, R. A. 1997. Classification and overview of the genera *Streptococcus* and *Enterococcus*. *Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement*, vol. 83, no. S1, p. 1S-11S. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2672.83.s1.1.x>

Jackson, C. R., Lombard, J. E., Dargatz, D. A., Fedorka-Cray, P. J. 2010. Prevalence, species distribution and antimicrobial resistance of enterococci isolated from US dairy cattle. *Letters in Applied Microbiology*, vol. 52, no. 1, p. 41-48. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1472-765X.2010.02964.x> [PMid:21114506](http://dx.doi.org/10.1111/j.1472-765X.2010.02964.x)

Jayarao, B. M., Wolfgang, D. R. 2003. Bulk-tank milk analysis. A useful tool for improving milk quality and herd udder health. *Veterinary Clinics of North America.: Food Animal Practice*, vol. 19, no. 1, p. 75-92. [http://dx.doi.org/10.1016/S0749-0720\(02\)00075-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0749-0720(02)00075-0)

Kagkli, D. M., Vancanneyt, M., Hill, C., Vandamme, P., Coga, T. M. 2007. *Enterococcus* and *Lactobacillus* contamination of raw milk in a farm dairy environment. *International Journal of Food Microbiology*, vol. 114, no. 2, p. 243-251. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.09.016> [PMid:17189657](http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.09.016)

Kühm, S., Iversen, A., Burman, L. G., Olsson-Liljequist, B., Franklin, A., Finn, M., Aarestrub, F., Seyfarth, A. M., Blanch, A. R., Taylor, H., Caplin, J., Moreno, M. O., Dominguez, L., Möllby, R. 2000. Epidemiology and ecology of enterococci, with special reference to antibiotic resistant strains, in animals, humans and the environments. *International Journal of Antimicrobial Agents*, vol. 14, no. 4, p. 337-342. [http://dx.doi.org/10.1016/S0924-8579\(00\)00146-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0924-8579(00)00146-1)

Lavová, M., Ducková, V., Čanigová, M., Kročko, M. 2011. Enterococci and their ability live out activity of sanitation detergents. *Potravinarstvo*, vol. 5, no. 4, p. 42-44. <http://dx.doi.org/10.5219/166>

Ma, Y. P., Chang, S. K., Chou, C. C. 2006. Characterization of bacterial susceptibility isolates in sixteen dairy farms in Taiwan. *Journal of Dairy Science*, vol. 89, no. 12, p. 4573-4582. [http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(06\)72507-3](http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(06)72507-3)

McKinnon, C. H., Rowlands, G. J., Bramley, A. J. 1990. The effect of udder preparation before milking and contamination from the milking plant on bacterial numbers in bulk milk of eight dairy herds. *Journal of Dairy Research*, vol. 57, no. 3, p. 307-318. <http://dx.doi.org/10.1017/S0022029900026959> [PMid:2401758](http://dx.doi.org/10.1017/S0022029900026959)

Monsallier, F., Verdier-Metz, I., Agabriel, C., Martin, B., Montel, M. CH. 2012. Variability of microbial teat skin flora in relation to farming practices and individual dairy cow characteristics. *Dairy Science & Technology*, vol. 92, no. 3, p. 265-278. <http://dx.doi.org/10.1007/s13594-012-0064-7>

Nam, H. M., Lim, S. K., Moon, J. S., Kang, H. M., Kim, J. M., Jang, K. C., Kim, J. M., Kang, M. I., Joo, Y. S., Jung, S. C. 2010. Antimicrobial Resistance of Enterococci Isolated from Mastitic Bovine Milk Samples in Korea. *Zoonoses Public Health*, vol. 57, no. 7-8, p. 59-64. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1863-2378.2009.01307.x> PMID: 20042062

National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). 1999. Performance standards for antimicrobial disc and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals. Approved Standard M31 – A. NCCLS. 86 p.

Pradhan, A. K., Van Kessel, J. S., Karns, J. S., Wolfgang, D. R., Hovingh, E., Nelen, K. A., Smith, J. M., Whitlock, R. H., Fyock, T., Ladely, S., Fedorka-Cray, P. J., Schukken, Y. H. 2009. Dynamics of endemic infectious diseases of animal and human importance on three dairy herds in the northeastern United States. *Journal of Dairy Science*, vol. 92, no. 4, p. 1811-1825. <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2008-1486> PMID: 19307664

Reneau, J. K., Bey, R. F. 2007. Milk Quality and Free Stall Bedding Management. *National Mastitis Council. Reg. Mtg. Proc.*, Visalia, California. Natl. Mastitis Council Inc., Madison, WI, 2007, p. 10-17.

Reneau, J. K., Seykora, A. J., Heins, B. J., Endres, M. I., Farnsworth, R. J., Bey, R. F. 2005. Association between hygiene scores and somatic cell scores in dairy cattle. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, vol. 227, no. 8, p. 1297-1301. <http://dx.doi.org/10.2460/javma.2005.227.1297> PMID: 16266020

Todorov, S. D., Dicks, L. M. T. 2005. Characterization of bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from spoiled black olives. *Journal of Basic Microbiology*, vol. 45,

no. 4, p. 312-322. <http://dx.doi.org/10.1002/jobm.200410532> PMID: 16028203

Ward, W. R., Hughes, J. W., Faull, W. B., Cripps, P. J., Sutherland, J. P., Sutherst, J. E. 2002. Observational study of temperature, moisture, pH and bacteria in straw bedding, and faecal consistency, cleanliness and mastitis in cows in four dairy herds. *Veterinary Record*, vol. 151, no. 7, p. 199-206. <http://dx.doi.org/10.1136/vr.151.7.199> PMID: 12211391

Acknowledgements:

This work was supported by the VEGA grants from the Ministry of Education, Science, Research and Sport of the Slovak Republic, grant No. 1/0679/13 and ITMS grant No. 26220220180.

Contact address:

Ing. Anna Krebs Artimová, Slovak University of Agriculture in Nitra, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Department of Evaluation and Processing Animal Products, Trieda Andreja Hlinku 2, 949 01 Nitra, Slovakia, E-mail: artimovaanna@centrum.sk

Ing. Viera Ducková, PhD. Slovak University of Agriculture in Nitra, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Department of Evaluation and Processing Animal Products, Trieda Andreja Hlinku 2, 949 01 Nitra, Slovakia, E-mail: viera.duckova@post.sk

Ing. Miroslav Kročko, PhD. Slovak University of Agriculture in Nitra, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Department of Evaluation and Processing Animal Products, Trieda Andreja Hlinku 2, 949 01 Nitra, Slovakia, E-mail: mirokrocko@yahoo.com

COMPARISON OF THE SENSITIVITY OF DETERMINING SOYBEAN ALLERGENS BY ELISA METHOD AND SYBR GREEN I

Jozef Golian, Ľubomír Belej, Radoslav Židek, Jozef Trandžík, Jozef Čapla, Peter Zajác

ABSTRACT

The aim of this study was to compare the suitability of two methods for detecting defatted soybean powder; SYBR Green I Real-time PCR and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Analysis of 20 artificially contaminated samples prepared by simple dilution with wheat flour revealed that both techniques were able to detect defatted soybean powder, although there were significant differences between the two methods. Wheat flour contamination with defatted soybean powder was detected in samples 1-5, (0.012 %; 120 mg.kg⁻¹), but not in samples with lower contamination with soybean powder samples 6-20 using SYBR Green I real-time PCR. Samples 1-10 could not be quantified by ELISA as the absorbance values were greater than the detection limit, and while samples 11-20 were measured, only the values of samples 16, 17 and 18 were within the guaranteed quantification range specified by the ELISA kit manufacturer. Defatted soybean powder contamination was detected in samples 19 and 20, but absorbance values were highly similar to those of the negative control sample.

Keywords: ELISA; PCR; soybean; allergen; SYBR Green I

INTRODUCTION

Allergic reactions to foods are an important medical problem throughout the industrialized world. The occurrence of food allergy appears to be strongly influenced by genetic background of an individual, but the basis of the genetic predisposition to food allergy has not been differentiated from that for atopy in general. In addition, genetic susceptibility alone does not explain the prevalence of food allergy satisfactorily, it is important to consider the importance of environmental influences (external, maternal, and gastrointestinal environment) and interactions between the host and the environment (Dreskin, 2006).

Food allergy is characterized by acute reactions such as the oral allergy syndrome, urticaria, angioedema, vomiting, diarrhea, dyspnea, allergic asthma, bronchospasm, dermatitis, edema, eczema, rhinitis and even anaphylactic shock (Flinterman et al., 2006). Anaphylaxis is a serious, rapid-onset, allergic reaction that may cause death. Severe anaphylaxis is characterised by life-threatening upper airway obstruction, bronchospasm and/or hypotension. Anaphylaxis in children is most often caused by food (Brown et al., 2006). Delayed reactions such as flare up of eczema may occur, but are less frequently reported (Heine et al., 2002, Novembre a Vierucci, 2001).

Many tests for the detection of soy proteins in foods have been described in the literature. Their efficiency depends mostly on the type of food product and detection tool. Six methods were compared using eight food products by Pedersen et al., (2008).

A sandwich ELISA aimed at native soy proteins had the lowest detection limit, but only in a limited number of products. PCR methods have different detection limits, but are useful for all products. Their advantages also include simultaneous detection of genetically-modified (GM) products and sensitivity for highly processed food (Zhang et al., 2007). Using of well defined DNA based markers in species identification is a very useful tool for PCR and restriction cleavage based methods for food and foodstuffs analyses (Žiarovská et al., 2013) and (Žiarovská and Poláčková, 2012).

MATERIAL AND METHODOLOGY

Detection of defatted soybean powder frequently used for commercial food production has been performed using two methodologies, Elisa method and SYBR Green qPCR method. SYBR Green qPCR method detect DNA that is resistant to food processing, whereas ELISA methods detect soy protein and also permit quantitation. The two general approaches were used for analysis of artificially contaminated samples prepared by simple dilution by wheat flour (Table 1). Sample one was prepared as a combination of 1 g of defatted soybean powder with 1 g of wheat flour that was then homogenized by vortexing. The next sample was prepared as combination of 1 g of the previous sample and 1 g of wheat flour, and this procedure was repeated until preparing all of 20 samples. Laboratory analysis of the samples was performed using two detection methods: ELISA (standard) and SYBR Green I real-time PCR.

ELISA method

Soy flour was quantified using the Veratox For Soy Flour Allergen Test (Neogen Corp., Lansing, MI, USA). Samples were prepared according to accepted sampling techniques (Neogen food allergen handbook). This involved preheating samples to 60 °C by immersing the bottle containing the extraction solution in a water bath. The samples (1 g) were transferred into 50 mL plastic tubes, together with an extraction additive (0.2 g). The extraction solution (25 mL) was poured into plastic sample tubes that were capped and shaken in a water bath at 60 °C for 15 min. After extraction, the plastic tubes were removed from the bath and material was settled for 5 min before the next step. The extracts were filtered by pouring at least 5 mL through a filter and the filtrates as the samples were collected. The liquid lying above a solid residue after crystallization, precipitation, centrifugation, or other process. The filtrate was used as the samples. The extracts were cooled to room temperature (18-30 °C) prior to analysis.

Twenty red-marked mixing wells for samples and five red-marked wells for controls were removed and placed in the well holder. An equal number of antibody-coated wells were removed and the strip was placed in the well holder. Control and sample extracts (150 µL) were transferred to the red-marked mixing wells using a new pipette tip for each sample. The controls and sample extracts (100 µL) were transferred to the antibody-coated wells using a 12-channel pipette, then wells were mixed in the well holder for 20 s before being incubated for 10 min at room temperature. The content of the well was emptied, and each antibody well was washed using a wash bottle filled with wash buffer, then the solution was discarded. This procedure was repeated 5 times and then the wells were inverted and tapped out on a paper towel to remove the washing solution. The wells were incubated for 10 min at room temperature, then washed with the wash buffer solution as described previously. Conjugate from the green-labeled bottle (100 µL) was transferred into the wells using a 12-channel pipette, and then the well holder was mixed for 20 s and incubated for 10 min at room temperature. The red stop solution from the red-labeled bottle (100 µL) was transferred into all the wells using a 12-channel pipette, then samples were mixed in the well holder for 20 s. The bottoms of the wells were wiped and the absorbance at 650 nm was measured using a Stat Fax 321 Plus microwell reader (Awareness Technology, Palm City, FL).

SYBR Green I real-time PCR

Primers were designed in accordance with **Tengel et al. (2001)**. Primers:

LE1 (5'-GACGCTATTGTGACCTCCTC-3')

LE2 (5'GAAAGTGTCAAGCTTAACAGCGACG-3')

amplified a 318 bp stretch of the soybean (*Glycine max*) lectin gene. Reactions consisted of 12.5 µL of 2x SYBR Green I Hot Start Real-Time PCR Mix (Ecoli Ltd., Bratislava, Slovakia), 500nM of each primer and 2 µL of template DNA at a final concentration of 50 ng.µL⁻¹. The reaction solution was supplemented with double distilled water to a total volume of 25 µL. PCR conditions consisted of a single pre-denaturation step at 95 °C for 1 min, followed by 40 cycles of the profile: 15 s at 95 °C; 20 s at

60 °C; 25 s at 72 °C; 2 s at 82 °C followed by measurement of fluorescence. Final extension was performed at 72 °C for 5 min. The melting curve of PCR products was determined by heating samples to 95 °C, then immediately cooling to 65 °C for 15 s. Samples were heated at a rate of 0.1 °C/s and with each change in temperature of one tenth of a degree the fluorescence was linear. PCR reactions were performed in a LightCycler 1.5 capillary cycler using v4.05 software (Roche).

Table 1 Contamination of wheat flour by defatted soybean powder

Soybean contamination		
sample	%	mg.kg ⁻¹
1	50	-
2	25	-
3	12.50	-
4	6.25	-
5	3.13	-
6	1.56	-
7	0.78	-
8	0.39	-
9	0.20	-
10	0.10	-
11	0.050	488.30
12	0.024	244.10
13	0.012	122.10
14	0.0061	61.0
15	0.0031	30.50
16	0,0015	15.30
17	0.0008	7.60
18	0.0004	3.80
19	0.0002	1.90
20	0.0001	1.0

RESULTS AND DISCUSSION

Two different experimental approaches were used to analyze 20 samples of wheat flour that were intentionally contaminated with defatted soybean powder in amounts ranging from 50% to 0.0001% (Table 2).

Results obtained using the ELISA method

In accordance with the range of the assay described by the manufacturer, the ELISA was capable of measuring soy contamination in the range of 2.5 to 25 ppm (mg.kg⁻¹) of soy protein. We obtained a correlation coefficient (R2) value of 0.999, which is evidence of the linearity of the assay. Results obtained using the ELISA method are presented in Table 2.

For samples 1-10, the percentage of actual contamination with defatted soy flour could not be quantified since the absorbance values were greater than the detection limit of the assay. Samples 11-20 were successfully quantified, but only the measured values of samples 16, 17 and 18 can be considered correct. These correspond to the values 15.30 ppm, 4.90 ppm and 3.20 ppm of soy protein that are within the guaranteed range of the kit as indicated by the manufacturer. The measured values of samples 15 (30.10 ppm) and 19 (0.90 ppm) were outside of the guaranteed range of quantification and should be disregarded due to significant differences between the measured values and the maximum and minimum limits of the kit. The reported lower limit of the assay is greater than the value of 1 ppm defined by **Koppelman et al., (2004)**. They detected soy in following test materials: native soybean meal, soy protein isolate, soy protein concentrate, and textured soy flakes with using sandwich and inhibition ELISAs. A competition ELISA format resulted in a sensitive test with a detection limit of 0.02 g/ml, corresponding to 0.4 (mg.kg⁻¹) 0.4 ppm) in food samples.

Espineira et al. (2010) used an experimental approach similar to ours to determine the detection sensitivity of DNA-targeted methods (end-point PCR and TaqMan real-time PCR) with comparison to reference values for soy protein obtained using an ELISA, and they reported a much higher detection limit of ~5000 g.kg⁻¹. This value indicates a comparatively lower sensitivity of the ELISA relative to the range of 2.5 mg.kg⁻¹ - 25 mg.kg⁻¹ that was validated experimentally in the present study. The values reported herein are close to the manufacturers' guaranteed lower limit of quantification. They are also comparable to those of **L'Hocine et al. (2007)**, who evaluated the effectiveness of commercially-available ELISA kits for the detection of soy in selected food commodities and achieved detection limits of ~2 ppm and <1 ppm with two different assays.

Green I real-time PCR method

As shown in Figure 1, the fluorescent signals obtained by SYBR Green real-time qPCR generated smooth curves that were positively correlated with the cycle number and the concentration of defatted soy flour in the range of 0.78% to 0.0004%. The contamination of 0.10% soy in the sample was the threshold cycle at which the fluorescence intensity exceeded the level of non-specific background.

Samples with contamination of 0.0061% to 0.0004% soy flour showed only very small differences in threshold

cycle value in excess of the non-specific background reactions, as well as minimal differences in the shape of the fluorescence curves. For these reasons, it was not possible to determine with precision the threshold of the number of cycles for the various samples by carrying out an assessment of the fluorescent curves, nor was it possible to clearly distinguish the individual exponential and linear phases of the curves.

Table 2 Result of detection by ELISA and SYBR GREEN I (+ positive detection - impossible to detect)

Soybean contamination			ELISA	SYBR Green I
sample	%	mg.kg ⁻¹	mg.kg ⁻¹	
1	50	-	Out of detection limit	+
2	25	-		+
3	12.50	-		+
4	6.25	-		+
5	3.13	-		+
6	1.56	-		-
7	0.78	-		-
8	0.39	-		-
9	0.20	-		-
10	0.10	-		-
11	0.050	488.30	756.90	-
12	0,024	244,10	251.30	-
13	0.012	122.10	86.30	-
14	0.0061	61.0	43.10	-
15	0.0031	30.50	30.10	-
16	0.0015	15.30	15.30	-
17	0.0008	7.60	4.90	-
18	0.0004	3.80	3.20	-
19	0.0002	1.90	0.90	-
20	0.0001	1.0	0.60	-

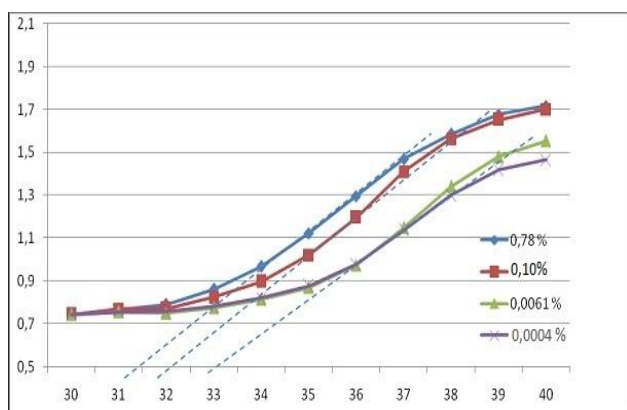


Figure 1 The curve of fluorescence in samples with different concentrations of defatted soy flour

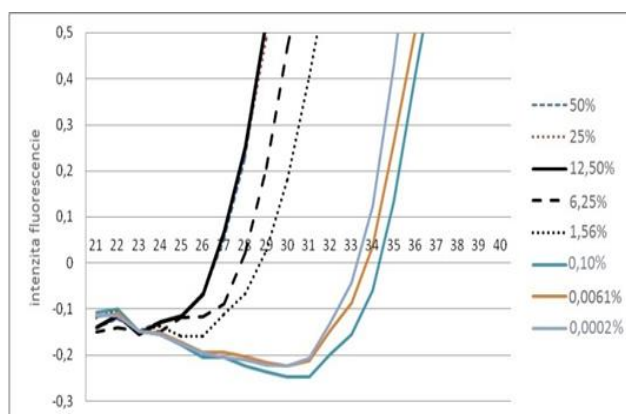


Figure 3 The Analysis of the increase in fluorescence in samples with different concentrations of defatted soy flour

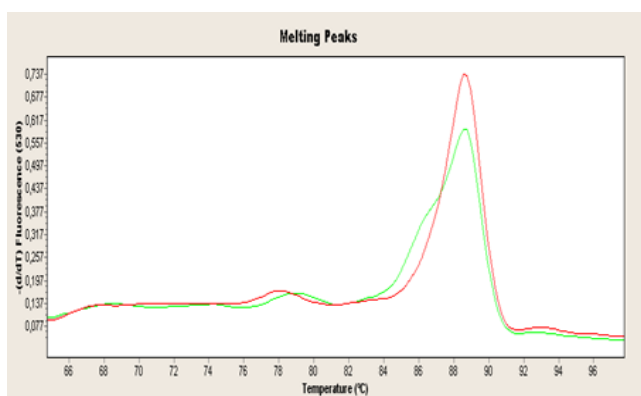


Figure 2 Melting curve of PCR products for samples with a concentration of 0.78% (green line) and 0.10% (red line) defatted soy flour

Melting curve analysis showed that the PCR product obtained in the 0.10% defatted soy flour sample consisted of a single discrete fragment with a melting point of 88.5 °C (Figure 2).

Moreover, from the figure it is apparent there was little difference in fluorescence (melting peaks) between samples, a finding that points to the specificity of the selected primers and the amplification of only one DNA fragment specific for soybean.

Analysis of the increase in fluorescence (Figure 3) shows comparable values for samples containing 50%, 25% and 12.50% soybean flour.

These samples were, therefore, not used as a basis for constructing the calibration curve since the course of their fluorescence curves was not a direct reflection of the amount of soy in the sample. Furthermore, it was not possible to discriminate differences in the various stages of the fluorescence curves of the PCR products. Similar results were obtained at relatively low proportions of soybean, including 0.10%, 0.0061% and 0.0002%. For these samples, changes in the fluorescence curves were noted during the transition from the linear to the exponential phase, but subsequent melting curve analysis and agarose gel electrophoresis of the PCR products confirmed these were non-specific. Similarly, in evaluating the fluorescence curves of samples with 0.10% and 0.0002% soybean flour it was noted that the curve of the 0.0002% sample was above background (but still non-

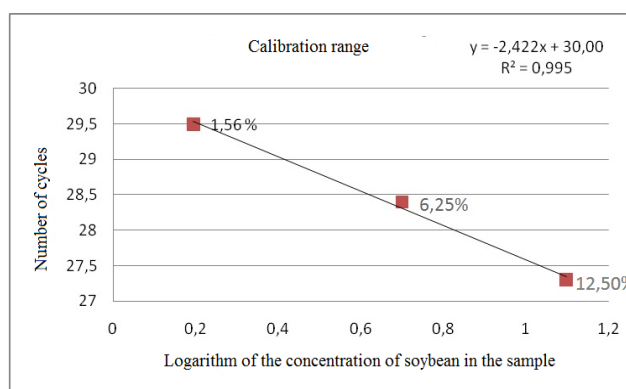


Figure 4 The calibration range for detection of defatted soy flour

specific), although this was not the case for the 0.10% sample. Analysis of the curves proved the relationship between fluorescence intensity and the linear phase of PCR amplification, but only in samples composed of 12.50%, 6.25% and 1.56% soybean.

As shown in Figure 4, in the range of 1.56% - 12.50% soybean flour it was possible to quantify the presence of soy by linear regression with high reliability ($R^2 = 0.995$). Samples outside this range could not be quantified due to the non-linear relationship between fluorescence intensity and analyte concentration, or due to the non-specificity of the PCR product obtained. The sensitivity range of our assay was lower than that reported by **Karudapuram a Batey (2008)**, who used a real-time qPCR protocol for detection and quantification of GM soybeans. The authors achieved a linear range extending from 0.5% - 5% GM soy standard, with a correlation coefficient of 0.992.

Hernández et al., (2003), developed a melting curve-based SYBR Green I multiplex qPCR assay to detect GM soybean that achieved a sensitivity of 0.10% and was comparable to our methodological approach.

Wang, & Fang (2005), performed a quantitative analysis of samples with 20%, 10%, 5% and 1% containing GM soya and 5% - of GM soya using standard multiplex real-time PCR with SYBR Green I with a correlation coefficient of 0.9683.

CONCLUSION

We were able to detect the presence of defatted soybean powder in artificially contaminated samples using both analytical methods. Contamination of wheat flour with defatted soybean powder was detected up to sample 5 (0.012 %; 122 mg.kg⁻¹) using a SYBR Green I real-time PCR method, but not in more dilute samples 6-20. The soy content of samples 1-10 could not be quantified by ELISA because the absorbance values were above the detection limit. Samples 11-20 were quantified, but only the values obtained for samples 16, 17 and 18 were within the guaranteed quantification range of the ELISA manufacturer. We detected defatted soybean powder contamination in samples 19 and 20, but the absorbance values were highly similar to those of the negative control sample.

REFERENCES

- Brown, S. G. A., Mullins, R. J., Gold, M. S. 2006. Anaphylaxis: diagnosis and management. *The Medical Journal of Australia*, vol. 185, p. 283-289. [PMid:16948628](https://doi.org/10.1007/s11882-006-0012-9)
- Dreskin, S. C. 2006. Genetics of food allergy. *Current Allergy and Asthma Reports*, vol. 6, no. 1, p. 58-64. [http://dx.doi.org/10.1007/s11882-006-0012-9](https://doi.org/10.1007/s11882-006-0012-9) [PMid:16476197](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16476197/)
- Espineira, M., Herrero, B., Vieites, J. M., Santaclara, F. J. 2010. Validation of end-point and real-time PCR methods for the rapid detection of soy allergen in processed products. *Food Additives and Contaminants*, vol. 27, no. 4, p. 426-432. [http://dx.doi.org/10.1080/19440040903493777](https://doi.org/10.1080/19440040903493777) [PMid:20178017](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20178017/)
- Flinterman, A. E., Knulst, A. C., Meijer, Y., Bruijnzeel-Koomen, C. A. F. M., Pasmans, S. G. M. A. 2006. Acute allergic reactions in children with AEDS after prolonged cow's milk elimination diets. *Allergy*, vol. 61, no. 3, p. 370-374. [http://dx.doi.org/10.1111/j.1398-9995.2006.01018.x](https://doi.org/10.1111/j.1398-9995.2006.01018.x) [PMid:16436148](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16436148/)
- Hernández, M., Rodríguez-Lázaro, D., Esteve, T., Prat, S., Pla, M. 2003. Development of melting temperature-based SYBR Green I polymerase chain reaction methods for multiplex genetically modified organism detection. *Analytical Biochemistry*, vol. 323, no. 2, p. 164-170. [http://dx.doi.org/10.1016/j.ab.2003.07.015](https://doi.org/10.1016/j.ab.2003.07.015) [PMid:14656521](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14656521/)
- Heine, R. G., Elsayed, S., Hosking, C. S., Hill, D. J. 2002. Cow's milk allergy in infancy. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology*, vol. 2, no. 3, p. 217-225. [http://dx.doi.org/10.1097/00130832-200206000-00011](https://doi.org/10.1097/00130832-200206000-00011) [PMid:12045418](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12045418/)
- L'Hocine, L., Boye, J.I., Munyana, C. 2007. Detection and quantification of soy allergens in food: study of two commercial enzyme-linked immunosorbent assays. *Journal of Food Science*, vol. 72, no. 3, p. C145-153. [http://dx.doi.org/10.1111/j.1750-3841.2007.00298.x](https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2007.00298.x) [PMid:17995793](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17995793/)
- Karudapuram, S., Batey, D. 2008. Detection of Genetically Modified Soybean Detection of Genetically Modified Soybean in Processed Foods Using Real-Time Quantitative PCR with SYBR Green I Dye on the DNA Engine Opticon® 2 System. In Application note, vol. 1, 2008, no. 1, Bio – Rad, MJ Research, Inc.
- Koppelman, S. J., Lakemond, C. M., Vlooswijk, R., Hefle, S. L. 2004. Detection of soy proteins in processed foods: literature overview and new experimental work. *Journal of AOAC International*, vol. 87, no. 6, p. 1398-1407 [PMid:15675452](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15675452/)
- Novembre, E., Vierucci, A. 2001. Milk allergy/intolerance and atopic dermatitis in infancy and childhood. *Allergy*, vol. 56, no. S67, p. 105-108 [http://dx.doi.org/10.1111/j.1398-9995.2001.00931.x](https://doi.org/10.1111/j.1398-9995.2001.00931.x) [PMid:11298023](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11298023/)
- Pedersen, M. H., Holzhauser, T., Bisson, C., Conti, A., Jensen, L. B., Skov, P. S., Poulsen, L. K. 2008. Soybean allergen detection methods - A comparison study. *Molecular Nutrition and Food Research*, vol. 52, no. 12, p. 1486-1496 [http://dx.doi.org/10.1002/mnfr.200700394](https://doi.org/10.1002/mnfr.200700394)
- Tengel, C., Schüßler, P., Setzke, E., Balles, J., Sprenger-Haußels, M. 2001. PCR-based detection of genetically modified soybean and maize in raw and highly processed foodstuffs. *BioTechniques*, vol. 31, no. 2, p. 426-429. [PMid:11515380](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11515380/)
- Wang W. Y., Fang T. J. 2005. Development of multiplex and quantitative PCR assay to detect genetically modified roundup ready soybean in foods. *Journal of Food and Drug Analysis*, 13, p. 132-138
- Zhang, M., Gao, X., Yu, Y., Ao, J., Qin, J., Yao, Y. Li, Q. 2007. Detection of Roundup Ready soy in highly processed products by triplex nested PCR. *Food Control*, vol. 18, no. 10, p. 1277-1281. [http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2006.09.001](https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2006.09.001)
- Žiarovská, J., Fernández, E., Millela, L. 2013. A revised ITS nucleotide sequence gives a specificity for smallanthus sonchifolius (Poepp. and Endl.) and its products identification. *Genetika*. vol. 45, no. 1, p. 217-226. [http://dx.doi.org/10.2298/GENSRR1301217Z](https://doi.org/10.2298/GENSRR1301217Z)
- Žiarovská, J., Poláčeková P. 2012 Efficiency of real-time PCR for 18S rRNA amplification of Sorbus domestica, L.. *Potravinarstvo*. vol. 6, no. 3, p. 47-49. [http://dx.doi.org/10.5219/203](https://doi.org/10.5219/203)

Acknowledgements:

This work was supported by grant VEGA 1/1074/11.

Contact address:

prof. Ing. Jozef Golian, Dr., Slovak University of Agriculture in Nitra, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Department of Hygiene and Food Safety, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovakia, E-mail: jozef.golian@uniag.sk.

Ing. Lubomir Belej PhD., Slovak University of Agriculture in Nitra, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Department of Hygiene and Food Safety, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovakia, E-mail: xbelej@uniag.sk.

doc. Ing. Radoslav Židek PhD., Slovak University of Agriculture in Nitra, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Department of Hygiene and Food Safety, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra Slovakia, E-mail: radoslav.zidek@uniag.sk.

doc. Ing. Jozef Trandžik, PhD., Constantin the Philosopher University in Nitra, Faculty of Natural Sciences, Nábr. Mládeže 91, 949 01 Nitra, Slovakia, E-mail: jtrandzik@ukf.sk

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

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

THE EFFECT OF INDIVIDUAL PHOSPHATE EMULSIFYING SALTS AND THEIR SELECTED BINARY MIXTURES ON HARDNESS OF PROCESSED CHEESE SPREADS

Gabriela Nagyová, František Buňka, Richardos Nikolaos Salek, Michaela Černíková, Helena Bačová, Stanislav Kráčmar

ABSTRACT

The aim of this work was to observe the effects of emulsifying salts composed of trisodium citrate and sodium phosphates with different chain length (disodium phosphate (DSP), tetrasodium diphosphate (TSPP), pentasodium triphosphate (PSTP) and sodium salts of polyphosphates with 5 different mean length ($n \approx 5, 9, 13, 20, 28$)) on hardness of processed cheese spreads. Hardness of processed cheese spreads with selected binary mixtures of the above mentioned salts were also studied. Measurements were performed after 2, 9 and 30 days of storage at 6 °C. Hardness of processed cheese increased with increase in chain length of individually used phosphates. Majority of applied binary mixtures of emulsifying salts had not significant influence on hardness changes in processed cheese spreads. On the other hand, a combination of phosphates salts (DSP with TSPP) was found, which had specific effect on hardness of processed cheese spreads. Textural properties of samples with trisodium citrate were similar compared to samples with DSP.

Keywords: emulsifying salt; processed cheese spread; hardness; optical density

INTRODUCTION

Processed cheese are dairy products made by heating cheese, emulsifying salts, butter and water until a homogenous mass is formed. Wide range of dairy products (cream, anhydrous milk fat, curd, milk powder, whey powder, caseinates, etc.) and non-dairy ingredients and additives (hydrocolloids, colouring, sensory active mixtures etc.) could be used during processed cheese production (Carić & Kaláb, 1997; Lee et al., 2004; Shirashoji et al., 2010). The production of processed cheese is composed of this six steps: i) ingredients formation (with respect to the desired parameters of the final product) ii) ingredients cleaning, milling and cutting iii) blending all ingredients in melting device iv) the melting process (melting temperature between 85-105 °C with a dwell time of several minutes) v) packaging vi) cooling and storing (Kapoor & Metzger, 2008).

In processed cheese matrix, fat emulsion and water binding provide proteins. In natural cheese, caseins do not possess their emulsifying properties, because they are bound in three-dimensional calcium bond matrix. Therefore emulsifying salts are used during processed cheese production. They are capable of exchanging ions and from insoluble calcium paracaseinate more soluble sodium paracaseinate is created, which possesses emulsifying and stabilization function in processed cheese matrix (Kapoor & Metzger, 2008; Cunha & Vuitto, 2010). Emulsifying salts are able to change textural properties of processed cheese during cooling and storing process. It is a complex of interactions including calcium bridges, disulphide bridges, hydrophobic interactions,

electrostatic interactions, hydrogen bonds, calcium-phosphate complexes etc. (Lee et al., 2004; Shirashoji et al., 2006; Dimitreli & Thomereis, 2008; Kapoor & Metzger, 2008).

The ability to exchange ions and form three-dimensional structure during cooling is different for individual emulsifying salts and decreases in following order: polyphosphates > triphosphates > diphosphates > monophosphates \approx citrates (Abdel-Hamid, 2010; Sádliková et al. 2010; Buňka et al. 2013).

El-Barky et al. (2011) declares that citrates have higher ability to exchange ions than monophosphates. Longer phosphates lead to a higher dispersion of casein due to more intensive ability of ion exchange. The more dispersed casein are, the more these proteins show their emulsifying and hydrating properties and stabilize oil and water present in the mixture. The increasing range of the hydration process of proteins and emulsifying fats leads to an increase in the intensity of interactions in the melt and crosslinking casein, resulting in processed cheese with higher hardness (Mizuno & Lucey, 2005; Shirashoji et al., 2010; Bayarii et al., 2012).

Emulsifying salts in their binary mixtures have different properties and effect on processed cheese. Weiserová et al. (2011) and Kalliappan & Lucey (2011) declared that there exist a specific ratio between monophosphates and diphosphates (1:1-3:4) that strongly supports gel-formation and therefore the processed cheese has the highest hardness value. Polyphosphates in binary mixtures are supposed to inhibit gel formation. Polyphosphates are

strong bind to complexes with caseins and increase the intensity of negative charge on casein chain. It leads to increase in repulsive force between caseins and gel formation (especially hydrophobic interactions) is weakened (Lee & Klostermeyer, 2001; Mizuno & Lucey, 2005).

Over the past few years a number of studies have been published (e. g. Awad et al., 2002; Weiserová et al., 2011; Buňka et al., 2012; 2013) where the influence of individual or binary and ternary mixtures of emulsifying salts on processed cheese textural properties was described. But these works are limited on phosphate emulsifying salts including polyphosphate with mean-length $n \approx 20$. Sodium salts of polyphosphate with different chain length are supposed to be practised. Intensity of ion exchange and therefore casein dispersion could be influenced with different length of polyphosphate chain. Effect of citrate and phosphate salts on pH values is not in previously literature described. The role of individual polyphosphate with different chain length or their binary mixtures with trisodium citrate, disodium phosphate, tetrasodium diphosphate and pentasodium triphosphate on casein dispersion has not been published before.

The aim of this work was to describe the influence of individual emulsifying salts composed of citrates and phosphates with different chain length and their selected binary mixtures on hardness of processed cheese spreads. The second aim of this work was to study the effects of individual and selected binary mixtures of emulsifying salts on optical density in the model milk system dispersion.

MATERIAL AND METHODOLOGY

Processed cheese production

Model samples of processed cheese spread ($\approx 40\%$ w/w dry matter content, $\approx 50\%$ w/w fat in dry matter content) were produced from Dutch-type cheese blocks ($\approx 50\%$ w/w dry matter content and $\approx 30\%$ w/w fat in dry matter content, 7-week maturity), butter ($\approx 82\%$ w/w dry matter content and $\approx 80\%$ w/w fat content), water and emulsifying salts (Fosfa, Břeclav-Poštorná, Czech Republic). Added emulsifying salts were trisodium citrate (TSC), disodium phosphate (DSP), tetrasodium diphosphate (TSPP), pentasodium triphosphate (PSTP) and five sodium salts of polyphosphate (POLY_{xx}) with different medium-length ($n \approx 5, 9, 13, 20$ and 28 ; signed POLY05, POLY09, POLY13, POLY20 and POLY28, respectively). Binary mixtures of emulsifying salts composed of DSP:TSPP, DSP:PSTP; DSP:POLY_{xx} (POLY05, POLY09, POLY13, POLY20 and POLY28), TSPP: POLY_{xx} (POLY05, POLY09, POLY13, POLY20 and POLY28), TSPP:PSTP, PSTP:POLY_{xx} (POLY05, POLY09, POLY13, POLY20 and POLY28), TSC: DSP, TSC:TSPP; TSC:PSTP, TSC:POLY20. The total applied concentration of emulsifying salts was 3% (w/w) and the added amount was calculated on total weight of the melt.

For model processed cheese production Vorwerk Thermomix TM 31-1 (Vorwerk & Co. GmbH, Wuppertal, Germany) was used. The melting temperature was $90\text{ }^\circ\text{C}$ and was kept for 1 minute.

The same procedure was used in the work by Lee et al. (2004), Buňka et al. (2012; 2013) and Lee et al. (2013). The hot melt was put into polypropylene cups of cylindrical shape (52 mm in diameter; 50 mm high) and sealed with aluminium lids. Samples were cooled on temperature $6 \pm 2\text{ }^\circ\text{C}$ during 2 hours after production and kept at this temperature until analyses started.

Model milk dispersion samples preparation

Model samples of milk dispersion were prepared from skim milk powder (Moravia Lacto PLC, Jihlava, Czech Republic) and deionized water in an amount corresponding with 5% (w/v) solution. The mixture was carefully stirred for 1 hour and dissolved by $22 \pm 1\text{ }^\circ\text{C}$ and then the sodium azide (0.2% (w/v)) was added. Then pH of the solution was adjusted to 5.80 ± 0.01 using 1 mol/L or 0.1 mol/L HCl. Emulsifying salts were added after 18 hours of stirring by $22 \pm 1\text{ }^\circ\text{C}$. Applied concentration was 0.3% (w/v) and composed of trisodium citrate (TSC), disodium phosphate (DSP), tetrasodium diphosphate (TSPP), pentasodium triphosphate (PSTP) and five sodium salts of polyphosphate (POLY_{xx}) with different medium-length ($n \approx 5, 9, 13, 20$ and 28 ; signed POLY05, POLY09, POLY13, POLY20 and POLY28, respectively). Binary mixtures were created from DSP:TSPP; DSP:POLY_{xx} (POLY05, POLY09, POLY13, POLY20 and POLY28); TSPP:POLY_{xx} (POLY05, POLY09, POLY13, POLY20 and POLY28); TSC: DSP; TSC:TSPP and TSC:POLY20. After 10 minutes of mixing the pH of the solution was adjusted again on 5.80 ± 0.01 using 1 mol/L or 0.1 mol/L HCl. The mixture was finally stirred for 50 minutes at $22 \pm 1\text{ }^\circ\text{C}$. Optical density was measured at wave length 700 nm (UV VIS Spectrofotometer, UV Mini 1240, Germany) according to Kalliappan & Lucey (2011). The results were expressed with respect to the optical density of the milk system without emulsifying salts addition where the pH was adjusted to 5.80 ± 0.01 after 18 hours of storage. All samples were measured three times.

Chemical analysis

Dry matter content (according to ISO 5534 (2004)) was measured in processed cheese samples. On the other hand, pH (puncture pH meter with glass electrode, Malaysia) was investigated only in processed cheese and also in milk dispersion. All the samples were measured three times.

Hardness analysis

Hardness of processed cheese samples was measured using TA.XT.plus texture analyser (Stable Micro Systems Ltd., Godalming, UK) with 20 mm diameter cylindrical probe (strain of deformation 25% , a probe speed 2 mm/s) (Weiserová et al., 2011; Bayarii et al., 2012; Cunha et al., 2013). All the samples were measured three times.

Statistical analysis

The results of chemical analysis and optical density were evaluated using non-parametrical analysis of variance by Kruskal-Wallis and Wilcoxon test (Unistat® 5.5 software, unistat, London, UK). The significance level used in the test was 0.05 .

RESULTS AND DISCUSSION

Results of chemical analysis

Dry matter content was measured in each processed cheese sample after 2, 9 and 30 storage days. Because the dry matter content is an important parameter, which can influence processed cheese textural properties; it is necessary to detect it in order to ensure the comparability of the individual samples (Lee et al., 2004).

The pH values of samples for individual applied emulsifying salts are shown in Table 1. The highest pH-values have samples with shorter phosphates (DSP, TSPP, PSTP) and with trisodium citrate. After 30 storage days at 6 ± 1 °C a slight increase in pH (range from 0.10 to 0.20) was found ($P < 0.05$).

Values of pH of processed cheese with binary mixtures are summarized in Table 2. Values of pH of samples decrease with increase in chain length. After 30-day storage, the results were the highest ($P < 0.05$; compared samples with the same mixture of emulsifying salts).

Results of hardness of processed cheese spreads

The lowest hardness values of processed cheese spreads were measured after 2 storage days with trisodium citrate addition and then the results increase with increasing chain length of phosphate emulsifying salts (DSP < TSPP < PSTP < POLY05 < POLY09 < POLY13 < POLY20 < POLY28) as can be seen in Figure 1. Slightly higher values were found for each sample after 30 storage days at 6 ± 1 °C but the trend stayed unchanged.

Majority of binary mixtures of emulsifying salts did not significantly influenced hardness of processed cheese spreads (Figure 2) and an increasing hardness with increasing phosphate chain length was measured only in a not substantial intensity. Two samples were the exception of phenomena described higher. The first one was the binary mixture of DSP and TSPP which significantly reached hardness values. Opposite situation (smaller values in comparison with the others) was in binary mixture TSC:DSP. For each sample of binary mixture an increase of hardness after 30 storage days was measured.

Results of skim milk dispergation

An intensity of optical density decreased with increasing chain length of phosphate emulsifying salts and the highest results were measured for samples including trisodium citrate as can be seen in Figure 3. When polyphosphates were included in to binary mixtures of emulsifying salts, optical density of model dispersal was decreased (Figure 4). Phosphates with longer chain length have bigger ability to exchange calcium and sodium ions and therefore were their optical density results lower. The results of optical density influence ability of emulsifying salts disperse casein what can in finally impact change hardness values of processed cheese spreads (an intensively casein dispersion leads to lower values of skim milk dispersion optical density and higher results of processed cheese spreads hardness).

Table 1 Influence of processed cheese pH values on citrates and phosphates with different chain length addition* after 2 storage days

Emulsifying salts	pH value
DSP	6.48 \pm 0,02
TSPP	6.42 \pm 0,03
PSTP	6.41 \pm 0,02
TSC	6.39 \pm 0,02
POLY05	5.95 \pm 0,02
POLY09	5.44 \pm 0,02
POLY13	5.38 \pm 0,03
POLY20	5.36 \pm 0,02
POLY28	5.35 \pm 0,02

* pH values mentioned like values average \pm standard deviation.

Table 2 Influence of processed cheese values on binary mixtures of emulsifying salts addition* after 2 storage days

Binary mixtures	pH value
DSP:TSPP	6.08 \pm 0.01
DSP:POLY05	6.05 \pm 0.01
DSP:POLY09	5.99 \pm 0.01
DSP:POLY13	5.81 \pm 0.02
DSP:POLY20	5.80 \pm 0.02
DSP:POLY28	5.79 \pm 0.02
TSPP:PSTP	6.08 \pm 0.02
TSPP:POLY05	6.02 \pm 0.01
TSPP:POLY09	5.88 \pm 0.02
TSPP:POLY13	5.80 \pm 0.01
TSPP:POLY20	5.79 \pm 0.02
TSPP:POLY28	5.74 \pm 0.01
PSTP:POLY05	5.81 \pm 0.02
PSTP:POLY09	5.80 \pm 0.02
PSTP:POLY13	5.79 \pm 0.01
PSTP:POLY20	5.72 \pm 0.02
PSTP:POLY28	5.70 \pm 0.01
TSC:DSP	6.08 \pm 0.01
TSC:TSPP	6.02 \pm 0.02
TSC:PSTP	5.80 \pm 0.02
TSC:POLY20	5.70 \pm 0.01

* pH values mentioned like values average \pm standard deviation

Discussion

When individual polyphosphate salts are added, it could be seen, that with increase in number of phosphate atoms in chain length the pH-values of processed cheese decreases (Table 1). This phenomenon can be explained by the amount of hydrogen atoms, which can be released into the melt. Polyphosphates have higher amount of these atoms and therefore could decrease pH more intensive (Remy, 1961; Nagyová et al., 2012). The same phenomenon (decrease of pH with increase in chain length) was found likewise in binary mixtures (Table 2).

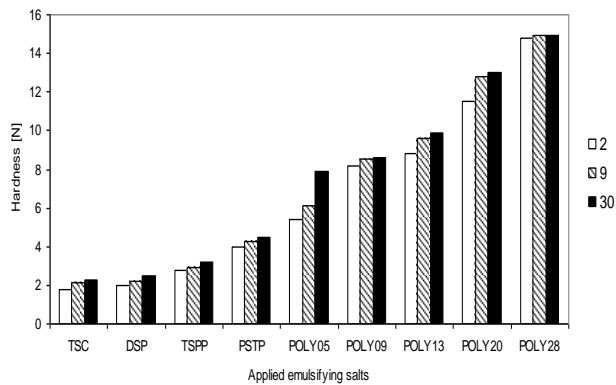


Figure 1 Influence of processed cheese hardness [N] on citrate and phosphates with different chain length addition

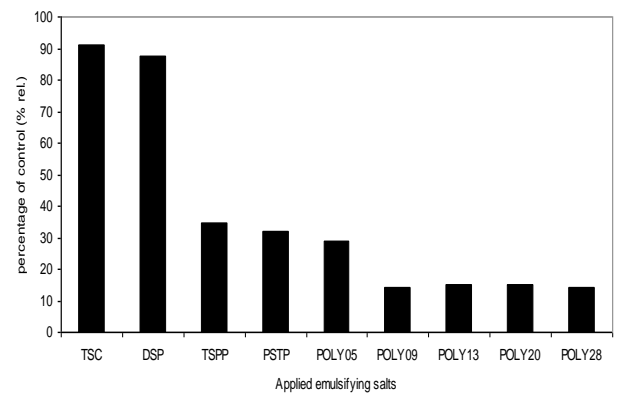


Figure 3 Influence of optical density (samples expressed with respect to optical density of the milk system without emulsifying salts addition) on citrate and phosphates with different chain length addition

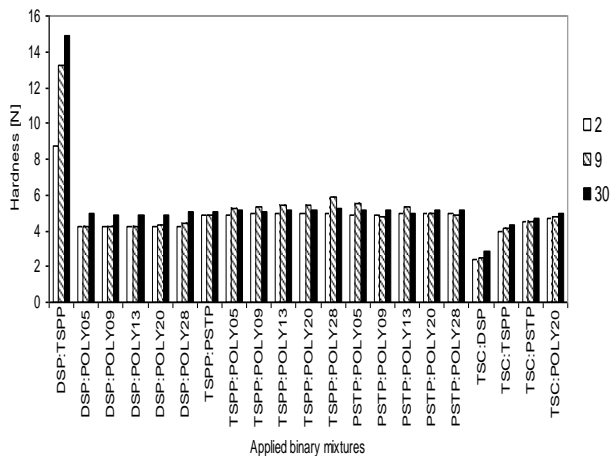


Figure 2 Influence of processed cheese hardness [N] on binary mixtures of citrate and phosphates with different chain length addition

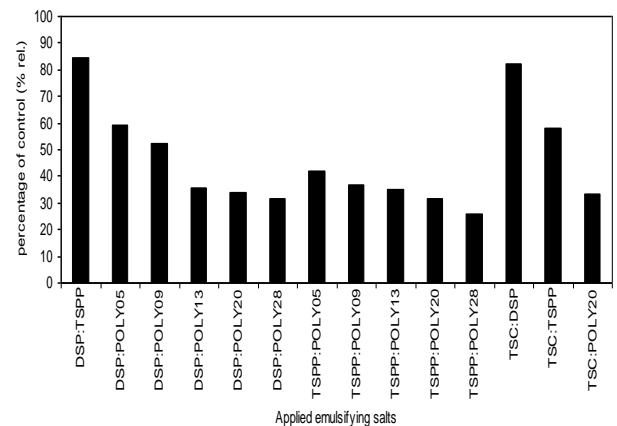


Figure 4 Influence of optical density (samples expressed with respect to optical density of the milk system without emulsifying salts addition) on binary mixtures of citrate and phosphates with different chain length addition

Hardness of processed cheese increases with increase in chain length of individual applied phosphates (Fig. 1). This phenomenon could be explain by larger ability of phosphates with longer chain length to ion exchanging, disperse caseins, stabilize water and fat in systems. The higher the presence of crosslinking in the matrix of the product, the harder processed cheese can be expected (Mizuno & Lucey, 2005; Shirashoji et al., 2010; Bayarri et al., 2012).

Low values of hardness in samples with trisodium citrate could be explained with their low affinity to calcium ions and low ability to protein hydratation. Low values in samples with trisodium citrate could be explained with their low affinity to calcium ions and low ability to protein hydratation. It is not capable to crosslink protein matrix and it could reduce hardness values of processed cheese (Mizuno & Lucey, 2005; 2007).

Hardness of samples with DSP and TSPP could be explained by a strong ability of the mixture of mono and diphosphate to enhance the formation of bridges between

diphosphate complexes with calcium ions and casein. Monophosphates are able to bind water there and therefore hardness of processed cheese increased (Mizuno & Lucey, 2007; Shirashoji et al., 2010; Kaliappan & Lucey, 2011; Buňka et al., 2012). Slight differences in hardness of binary mixtures including polyphosphates (in our case with chain length POLY05 and POLY09) could be explain mainly in their ability to give caseins multiple negative charges which probably leads to a lower intensity of hydrophobic interactions of the dispersed caseins and thus lower final matrix hardness (Shirashoji et al., 2010; Buňka et al., 2012; 2013).

After 30 storage days a little increase in hardness values was found. It could be caused by a hydrolysis of the emulsifying salts including more than two phosphorus atoms in a molecule, slight decrease of pH of the processed cheese, possible changes in the form of binding of the salts and thus a change in their dissociative characteristics and polymorphism of dairy fat and gradual change of its crystal forms (Carić & Kaláb, 1997;

Muslow et al., 2007; Shirashoji et al., 2010; Nagyová et al., 2012).

Intensity of casein dispersion is affected by the type of added emulsifying salts. Phosphates with longer chain length are capable of casein dispersion in larger intensity in comparison with phosphates with shorter chain length (Figure 3). This phenomenon is linked to idea that polyphosphates exchange more ions and therefore the intensity of milk optical intensity decrease. The hardness values are related to casein dispersion intensity. The more dispersed casein are, the more these proteins utilize their emulsifying and hydrating properties and stabilize oil and water present in the mixture. It leads to an increase in the intensity of interactions in the melt and crosslinking casein, resulting in processed cheese with higher hardness (Mizuno & Lucey, 2005; Shirashoji et al., 2010; Bayarii et al., 2012). Binary mixtures of emulsifying salts added in skim milk dispersion (Figure 4) had equal trend like individual emulsifying salts (decreasing values with increasing chain length). Citrate salts are comparable with monophosphates if individual or binary mixtures were applied.

CONCLUSION

The aim of this work was to describe hardness of model processed cheese spreads with individual and binary mixtures of trisodium citrate and disodium phosphate, tetrasodium diphosphate, pentasodium triphosphate and polyphosphates with different chain length ($n \approx 5, 9, 13, 20$ and 28) addition. The smallest values of processed cheese hardness were measured for trisodium citrate, followed by monophosphates and subsequently rose with increasing number of phosphorus atoms in phosphate chain. Majority of applied binary mixtures did not significantly influenced hardness of processed cheese spreads. A binary mixture (DSP:TSPP) was an exception.

Optical density of skim milk dispersion decreased with increase of phosphate chain length and the samples with trisodium citrate addition have higher values. The considerable trend was found if binary mixtures of emulsifying salts were applied.

REFERENCES

- Abdel-Hamid, L. B., El-Shabrawy, S. A., Awas, R. A. 2000. Chemical properties of processed ras cheese spreads as affected by emulsifying salt mixtures. *Journal of Food Processing and Preservation*, vol. 24, no. 3, p. 191-208. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1745-4549.2000.tb00413.x>
- Bayarii, S., Carconell, I., Costell, E. 2012. Viscoelasticity and texture of spreadable cheeses with different fat contents at refrigeration and room temperatures. *Journal of Dairy Science*, vol. 95, no. p. 6926-6936. <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2012-5711> PMID:22999281
- Brickley, C. A., Govindasamy-Lucey, S. 2008. Influence of emulsifying salts on the textural properties of nongat process cheese made from direct acid cheese bases. *Journal of Dairy Science*, vol. 91, no. p. 39-48. <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2007-0393> PMID:18096923
- Buňka, F., Doudová, L., Weiserová, E., Kuchař, D., Michálek, J., Slavíková, Š., Kráčmar, S. 2012. The effect of different ternary mixtures of sodium phosphates on hardness of processed cheese spreads. *International Journal of Food*

Science, vol. 47, no. 10, p. 2063-2071. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2621.2012.03070.x>

Buňka, F., Doudová, L., Weiserová, E., Kuchař, D., Ponížil, P., Začalová D., Nagyová G., Pachlová, V., Michálek J. 2013. The effect of ternary emulsifying salt composition and cheese maturity on the textural properties of processed cheese. *International Dairy Journal*, vol. 29, no. 1, p. 1-7. <http://dx.doi.org/10.1016/j.idairyj.2012.09.006>

Carić, M., Kaláb, M. 1997. *Processed cheese products*. Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology, Vol. 2, Major Cheese Groups, 2nd ed. P. F. Fox, ed., Chapman & Hall, London, p. 467-505. ISBN 0-412-535106.

Cunha, C. R., Viotto, W. H. 2010. Casein peptization, functional properties, and sensory acceptance of processed cheese spreads made with different emulsifying salts. *Journal of Dairy Science*, vol. 75, no. 1, p. C113-C120. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1750-3841.2009.01444.x> PMID:20492141

Dimitreli, G., Thomareis, A. S. 2008. Effect of chemical composition on the linear viscoelastic properties of spreadable-type processed cheese. *Journal of Food Engineering*, vol. 84, no. 3, p. 368-374. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2007.05.030>

El-Bakry, M., Duggan, E., O'Riordan, O'Sullivan, M. 2010. Effect of chelating salt type on casein hydration and fat emulsification during manufacture and post-manufacture functionality of imitation cheese. *Journal of Food Engineering*, vol. 102, no. 2, p. 145-153. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2010.08.012>

ČSN EN ISO 5534, 2005. *Sýry a tavené sýry – Stanovení obsahu celkové sušiny (Referenční metoda) [Cheese and processed cheese – Determination of total solid content (Reference method)]*. Český normalizační institut, Praha.

Kalliappan, S., Lucey, J. A. 2011. Influence of mixtures of calcium-chelating salts on the physicochemical properties of casein micelles. *Journal of Dairy Science*, vol. 94, no. 9, p. 4255-4263. <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2010-3343> PMID:21854899

Kapoor, R., L. E. Metzger, A. C. Biswan, Muthukummarappan, K. 2007. Effect of natural cheese characteristics on process cheese properties. *Journal of Dairy Science*, vol. 90, no. 4, p. 1625-1634. <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2006-746> PMID:17369202

Kawasaki, Y. 2008. Influence of „creaming“ on the properties of processed cheese and changes in the structure of casein during cheese making. *Milchwissenschaft*, vol. 63, no. 2, p. 149-152.

Lee, S. K., Anema, S., Klostermeyer, H. 2004. The influence of moisture content on the rheological properties of processed cheese spreads. *International Journal of Food Science and Technology*, vol. 39, no. 7, p. 763-771. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2621.2004.00842.x>

Lee, S. K., Klostermeyer, H. 2001. The effect of pH on the rheological properties of reduced-fat model processed cheese spreads. *LWT - Food Science and Technology*. 2001, vol. 34, no. 5, p. 288-292. <http://dx.doi.org/10.1006/fstl.2001.0761>

Lee, S. K., Huss, M., Klostermeyer, H. a Anema S. G. 2013. The effect of pre-denatured whey proteins on the textural and micro-structural properties of model processed cheese spreads. *International Dairy Journal*, vol. 32, no. 2, p. 79-88. <http://dx.doi.org/10.1016/j.idairyj.2013.04.006>

Lu, Y., Shirashoji, N., Lucey J. A. 2008. Effects of pH on the textural properties and meltability of pasteurized process cheese made with different types of emulsifying salts. *Journal of Food Science*, vol. 73, no. 8, p. E363-E369.

<http://dx.doi.org/10.1111/j.1750-3841.2008.00914.x> PMID: 19019107

Marchesseau, S., Gastaldi, E., Laguade, A., Cuq, J. L. 1997. Influence of pH on protein interactions and microstructure of process cheese. *Journal of Dairy Science*, vol. 80, no. 8, p. 1483-1489. [http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(97\)76076-4](http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(97)76076-4)

Mizuno, R., Lucey, J. A. 2005. Effects of emulsifying salts on the turbidity and calcium phosphate-protein interactions in casein micelles. *Journal of Dairy Science*, vol. 88, no. 9, 3070-3078. [http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(05\)72988-X](http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(05)72988-X)

Mizuno, R., Lucey J. A. 2007. Properties of milk protein gels formed by phosphates. *Journal of Dairy Science*, vol. 90, no. 10, p. 4524-4531. <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2007-0229> PMID:17881673

Mulsow, B. B., Jaros, D., Rohm, H. *Processed cheese and cheese analogues. 2007. Structure of Dairy Products*. Blackwell Publishing Ltd., p. 210-235. ISBN 9780470995921.

Nagyová, G., Buňka, F., Kuchař, D., Grüber T. 2012. The effect of chain length of phosphate on texture properties of processed cheese. *Mlékařské listy*, no. 133, p. IV-VI.

Sádlíková, I., Buňka, F., Budinský, F., Voldánová, B., Pavlínek, V., Hoza, I. 2010. The effect of selected phosphate emulsifying salts on viscoelastic properties of processed cheese. *LWT - Food Science and Technology*, vol. 43, no. 8, p. 1220-1225. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2010.04.012>

Shirashoji, N., Jaeggi, J. J., Lucey, J. A. 2010. Effect of sodium hexametaphosphate concentration and cooking time on the physicochemical properties of pasteurized process cheese. *Journal of Dairy Science*, vol. 93, no. 7, p. 2827-2837. <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2009-2960> PMID:20630199

Weiserová, E., Doudová, L., Galiová, L., Žák, L., Michálek, J., Janiš, R., Buňka, F. 2011. The effect of combinations of sodium phosphates in binary mixtures on selected texture parameters of processed cheese spreads. *International Dairy*

Journal, vol. 21, no. 12, p. 979-986. <http://dx.doi.org/10.1016/j.idairyj.2011.06.006>

Acknowledgments:

This study was supported by a project of the internal grant of Tomas Bata University in Zlín no. IGA/FT/2013/010 funded from resources for specific university research.

Contact address:

Gabriela Nagyová, Tomas Bata University in Zlín, Faculty of Technology, Department of Food Technology, Nám. T. G. Masaryka 5555, 767 01 Zlín, Czech Republic, E-mail: gabriela.nagy@post.cz.

František Buňka, Tomas Bata University in Zlín, Faculty of Technology, Department of Food Technology, Nám. T. G. Masaryka 5555, 767 01 Zlín, Czech Republic, E-mail: bunka@ft.utb.cz.

Richardos Nikolaos Salek, Tomas Bata University in Zlín, Faculty of Technology, Department of Food Technology, Nám. T. G. Masaryka 5555, 767 01 Zlín, Czech Republic, E-mail: rsalek@ft.utb.cz.

Michaela Černíková, Tomas Bata University in Zlín, Faculty of Technology, Department of Food Technology, Nám. T. G. Masaryka 5555, 767 01 Zlín, Czech Republic, E-mail: cernikova@ft.utb.cz.

Helena Bačová, Tomas Bata University in Zlín, Faculty of Technology, Department of Food Technology, Nám. T. G. Masaryka 5555, 767 01 Zlín, Czech Republic, E-mail: helena.bacova@seznam.cz

Stanislav Kráčmar, Tomas Bata University in Zlín, Faculty of Technology, Department of Food Analysis and Chemistry, Nám. T. G. Masaryka 5555, 767 01 Zlín, Czech Republic, E-mail: kracmar@ft.utb.cz

TEXTURAL PROPERTIES OF CHICKEN BREAST TREATED BY DIFFERENT MEANS

Jozef Čurlej, Eva Čurlejšová, Peter Zajác, Jozef Čapla

ABSTRACT

The aim of the study was to compare textural attributes of cooked chicken breast samples subjected to different storage or preparation conditions (raw meat after cooking, raw meat after freezing/subsequent thawing, after storage under modified – controlled conditions) using instrumental analysis. For this purpose, samples were subjected to texture testing by the use of Warner-Bratzler probe, to find changes in muscle hardness by determination of firmness and work of shear. As expected, various values of mentioned attributes were obtained for tested samples treated by three different ways. For statistical evaluation of the results, macro function of Exponent software and paired T test were used, statistically significant differences were taken at $p < 0.05$. In conclusion, different forces were needed for cutting of tested samples, subjected to selected storage conditions, prior to cooking.

Keywords: Chicken breast; texture; HDP/WBV set; firmness; work of shear

INTRODUCTION

Meat, in a broader sense, is constituted of the skeletal muscles together with fat and connective tissues, bones, cartilage, blood and lymph vessels and nerves, obtained during slaughtering of the stock and poultry. In the narrow sense, only muscles without bones, connective tissues, bigger fat layers and vessels are considered as meat (Kovacevic, 2001). Meat quality is defined by the combination of many factors; however, consumers attach a special importance to colour and texture. Inherent characteristics of animal, long and short-term environmental influences on animal and processing parameters that affect the carcass or meat directly are all factors that influence meat colour, texture and flavour (Lyon et al., 2004).

Human perception of meat palatability is derived from a complex interaction of sensory and physical processes during chewing (Jeremiah, 1982). Tenderness or texture is a major quality concern with boneless skinless broiler breast fillets (Sams, 1999). Tenderness has been described as the most important sensory characteristic of meat (Deatherage, 1963). Therefore, this attribute has drawn attention from researchers. Meat texture sensation is dictated by the presence of several factors including the amount of intramuscular fat, water holding capacity and actomyosin complex. However, it is the quality of collagen, which gives toughness to meat (Coró et al., 2003).

Fresh or cooked meat treatments to achieve sensory tenderness are constantly evaluated. For instance, freezing can damage meat definition resulting in textural deficiencies. Other factors such as cooking method, duration of cooking and meat choice extend the range of potential texture-affecting concerns. Because these

treatments usually directly affect the muscle fibres, tests that measure some aspects of fibre characteristics are central to research efforts to achieve simple, yet accurate, ways to evaluate the eating quality of meat. Texture is one of the most important attributes noted by consumers when assessing acceptability of cooked meat (URL 1, 2013).

Many methods exist for measuring tenderness of broiler breast meat. Instrumental analyses, descriptive sensory analysis, consumer sensory evaluations, or combinations of these tests have been utilized for assessing tenderness. Bourne (1982) reported that instrumental measurements are meaningless unless they correlate well with sensory analysis. Instrumental methods such as Warner-Bratzler Shear Blade and Texture Profile Analysis are commonly used within the poultry industry for evaluating tenderness in broiler breast meat (Sams et al., 1990). There are two factors or benefits to consider when investigating the possible use of a texture analyzer in food. The first benefit consideration is in reference to the manufacturing process itself, process adjustments can be made to control this variability. The second benefit often revolves around raw material supplies. The quality or characteristics of raw materials can often vary between batches or length of storage time. This can affect production and product characteristics (URL1, 2013). The benefits of making objective, accurate, and repeatable physical testing can shorten the product development cycle, improve product consistency, and minimize waste. Texture analysis is a key tool in this way (URL1, 2013). If the first assessment of meat texture characteristics by a consumer is to cut or bite through the fibres, a logical test approach would be to measure the force to cut or break the fibres to provide an indication of what the consumer might perceive. The biting action is used as a basis of many devices designed to

provide a measure that will closely relate to human assessment. The most common biting or shearing system for the assessment of meat and meat products is the Warner-Bratzler shear blade. This fixture is an empirical technique and remains as the main reference in parallel with sensory determinations for the assessment of raw or cooked meat. Standard Warner-Bratzler shear force involves measurement of raw or cooked meat tenderness using a Warner-Bratzler blade (Food online). Warner-Bratzler shear force measurements are the most popular indicator for meat texture (Culioli, 1995).

The objective of the present study was to investigate the influence of thermal processes on tenderness and losses of chicken breast meat. Freezing (24 h at -8 °C) and modified – controlled storage were used in the study of textural changes of cooked chicken breasts. For this purpose, texture profile analysis (TPA) of treated samples was performed to determine changes in muscle hardness. In order to achieve this purpose, a series of samples were selected, these cooked in an oven. The weight losses were considered cooking losses, while the variation of tenderness was analyzed by textural measurements.

MATERIAL AND METHODOLOGY

Instrumental equipment

- Conventional freezer: Indesit Prime (Indesit Company, Spain)
- Conventional oven: Mora ES 241 MW (Mora Moravia s.r.o., Czech Republic)
- Thermostatic chamber: Firlabo BVEHF (Fabilabo, France)
- Texture analyser TA XT2 plus (Stable Microsystems, United Kingdom) equipped with 5kg load cell

Set to texture measure: Warner-Bratzler blade (TA-42) of „European standard” (The blade is 1.2 mm thick with a rectangular hole 11 mm wide and at least 15 mm high. The hole has square smooth edges and the blade is pushed at 50-100 mm/min between side plates positioned to provide a minimum gap between blade and plates). Heavy-duty platform (Stable Micro Systems)

Samples

Commercial Chicken broiler breast were obtained from the slaughtery company immediately after the slaughtering and cutting. Chicken broiler breast was chilled directly in the company to 4 °C and transferred to the laboratory in the portable fridge. We have obtained eighteen chicken breast. The sample was represented with three chicken breast. Samples were analysed immediately or after the storage in defined conditions. Before analysing, samples were cooked.

A Chilled – fresh (4 °C) (analysed immediately after cooking)

B Chilled – fresh (4 °C) (analysed 24 hours after cooking, stored at 4 °C);

C Re-frozen at -18 °C (2 x 6 days);

D Frozen at -18 °C (6 days);

E Chilled – stored (2 days at 22 °C), (cold chain damage simulation);

F Chilled – stored (2 days at 12 °C) (cold chain damage simulation);

Sample preparation.

To measure changes on the muscle fibres in focus to products firmness, commercially supplied chicken breast muscle was subjected to texture analysis in raw stage, after frozen storage, after storage under modified - controlled conditions (48 h, 30 °C, and 60% relative humidity). Chicken breasts in frozen stage were completely thawed at 4 °C overnight. Prior testing, samples were oven-baked to an internal temperature of 74 °C in a conventional oven set at 177 °C for 20 min, and cooled to room temperature (22 °C) for 1 h in storage aluminium foil before measuring in all above mentioned cases of chicken breast samples. The differences in weight of the chicken breast before and after frozen storage, after storage in modified - controlled conditions or cooking were calculated as drip loss or cooking loss, respectively.

Warner-Bratzler shear force measurement

Shear force was measured using a TA.XT2 plus texture analyzer (Stable Micro Systems). The sample was cutted from cooked chicken breast meat and taken to avoid damage. Sample strips have been cutted with a 100 mm² (10 mm x 10 mm) crosssection with the fibre direction parallel to a long dimension of at least 30 mm. This weighed amount was enough to approximately fill the shear cell by 50% of its capacity. The sample was sheared at right angles to the fibre axis - across the muscle fibers with a standard knife blade (TA-42) (68 mm wide × 72 mm long × 3 mm thick), to a penetration depth of 20 mm. Three chicken breasts per treatment were sheared (3 x 15 sample strips per group). Three shear force values were recorded for each breast by the use of texture Exponent software 5,0,9,0 (Stable Micro Systems). The parameters measured from the force deformation curve were the peak force (the maximum recorded) and the total shear energy (the area under the force deformation curve from the beginning to the end of the test).

Test Set-Up

The empty shear plate was secured in the heavy-duty platform, which was loosely fixed onto the machine base. The blade was attached to the load cell carrier by means of the rapid locating adapter and lowered slowly into the shear plate and through the base slot. Platform was then manoeuvred until clearance was visible between the blade and slot to avoid frictional effects. The blade was then raised above the plate to allow for placement of the test sample. Before carrying out the test, the blade was calibrated to acknowledge the bottom of the plate as a zero position.

To optimise test settings the first tests were performed on the hardest samples (sample after storage under modified - controlled conditions) to anticipate the maximum testing range required and ensure the force capacity for all tested samples.

Data Analysis

Values of particular interest for sample analysis were automatically obtained by a MACRO (Exponent - Stable Micro Systems software). Results obtained from tested samples gave the total area - area under the curve (Work of Shear) and mean maximum force (Max. Shear Force)

values. For more statistical study, the results were tested by the use of paired t-test (Tanagra 1.4.43 software).

RESULTS AND DISCUSSION

Samples of chicken breast after six different storage conditions were subjected to texture analysis on the texture analyzer TA.XT2 Plus (Stable Microsystems). The measurements were performed on the samples after their heat treatment in an electric oven for until the sample has

reached the core at 75 °C. The texture analyzer continuously recorded the force, distance and time for the current material deformation pressure in the form of the deformation curve.

Statistical evaluation was performed by Exponent software (Stable microsystems) in focus to average values calculation and Tanagra software (paired T test) for significant differences identification between individual samples. Chilled chicken breasts - sample A were chosen

Table 1 Average values and standard deviations of tested samples

Sample	Average Shear strength (N)	Standard deviation (N)	Average Work of Shear (N.s ⁻¹)	Standard deviation (N)
A	10.941	±4.426	60.736	±17.910
B	13.518	±7.412	79.051	±36.301
C	13.728	±5.206	70.179	±23.566
D	11.532	±6.137	59.830	±25.186
E	11.818	±4.817	61.718	±17.666
F	17.191	±8.174	100.646	±37.459

* Considerations for the labeling of samples in tables and figures: **A** Chilled – fresh (4 °C) (analysed immediately after cooking); **B** Chilled – fresh (4 °C) (analysed 24 hours after cooking, stored at 4 °C); **C** Re-frozen at -18 °C (2 x 6 days); **D** Frozen at -18 °C (6 days); **E** Chilled – stored (2 days at 22 °C), (cold chain damage simulation); **F** Chilled – stored (2 days at 12 °C) (cold chain damage simulation);

Strange (N)

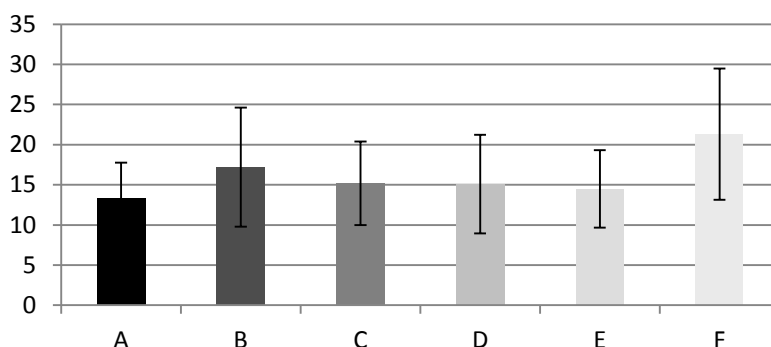


Figure 1 Identified values for strange (N) by individual samples

Work of Shear (N.s⁻¹)

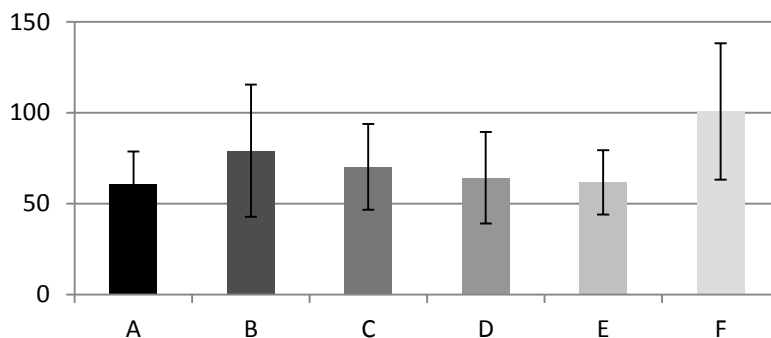


Figure 2 Identified values for work of shear (N.s⁻¹) by individual samples

as the standard, to that were compared all other samples after different storage conditions. Comparison was done in determining parameters, the total strength (N) and work of shear ($N \cdot s^{-1}$). The average values of the individual test samples are listed in Table 1 as well as plotted in Figure 1, and Figure 2.

Sample A (Table 1) has the lowest average value for the strength (10.941 N), on the other hand the highest average strength value has the sample F (17.191 N). In terms of the mean value for the work of shear, the lowest value was found in the sample D ($59.830 N \cdot s^{-1}$) and the highest for a sample F ($100.646 N \cdot s^{-1}$). The storage of already cooked chicken breast for 24 hours – sample B was leading to an increase of the shear work about $19.221 N \cdot s^{-1}$ versus the samples D. The measured value for sample B was $79.051 N \cdot s^{-1}$. Repeated freezing of poultry meat causes increasing the force required to cut through a sample of defined dimensions, probably due to decrease in the water content of the sample influenced by damage of the muscle cell by ice crystals. The difference in mean value of shear strength between the sample A and sample C was 2.787 N and in mean value focused to work of shear was $9.443 N \cdot s^{-1}$. Storage under unfavorable conditions affects the quality of chicken breast. The difference in the average value for shear strength between the samples A and the sample F, was found as 6.25 N and in mean value for work of shear it was $39.91 N \cdot s^{-1}$ (Table 1). The storage of samples under higher temperatures causes the acceleration of chemical, microbiological and enzymatic changes what results in the changes of muscle fibres textural properties.

From the output of the statistical software program Tanagra was identified significant difference ($p < 0.001$) between the sample A and the sample F for shear strength textural parameter (Table 2). Therefore, we can state that storage at $12\text{ }^{\circ}\text{C}$ two days significantly affecting the strength of chicken breast. Another significant difference ($p < 0.05$) for strength was found between the sample A and the sample B. In the case of work in shear (Table 3), we have identified a significant difference ($p < 0.001$) between the samples A and the sample F. Another significant difference ($p < 0.05$) was identified between the sample A and the sample B.

Textural analysis is mainly used for food businesses to assess products in terms of their balance. The food texture can be measured during/after their manufacture, or after a period of storage of the product. Therefore the evaluation of textural properties brings a fundamental process of evaluation the quality of food products. Yoon (2002) in his study focused to the structural and microstructural properties of frozen chicken breast indicates that the method of storage has a significant influence on the final evaluation of the structural properties of the meat. Similarly, Březina (2003) argue that lowering the temperature slows the progress of chemical, microbiological and enzymatic changes that have a significant role in the final evaluation of textural properties of the meat. He recommends the storage conditions for fresh meat at temperatures below $5\text{ }^{\circ}\text{C}$, where the temperature should not fall below $-1\text{ }^{\circ}\text{C}$. According to our results evaluated by statistical software, similar findings have been recorded. The obtained results confirm the assumption, that the cooling and freezing reduces the

strength and work of shear during cutting the samples of chicken breast. Improper storage at elevated temperature than recommended leads to denaturation of myofibrillar proteins, what causes hardening of the meat (Palka a Daun, 1999). Similar findings were recorded in the present study.

CONCLUSION

Instrumental analyses of texture properties have become a useful tool in determination of input product quality. Similar studies may point to textural changes of meat of various origins, according to term and method of product storage. Processors and customers in practice may apply recommended storage time or method with minimal negative effect to textural properties in compare to raw product parameters.

We have found, that the average shear strength and average work of shear of the middle area of deboned broiler breast meat fillets are depending on the storage conditions prior the cooking.

The lowest average shear strength 10.941 N was determined in chilled – fresh chicken breast. The highest average shear strength 17.191 N was determined in chicken breast stored at $12\text{ }^{\circ}\text{C}$ two days.

The lowest average work of shear $60.736 N \cdot s^{-1}$ was determined in chilled – fresh chicken breast. The highest average work of shear $100.646 N \cdot s^{-1}$ was determined in chicken breast stored at $12\text{ }^{\circ}\text{C}$ two days.

COMPLIANCE WITH ETHICS REQUIREMENTS

This article does not contain any studies with human or animal subjects.

REFERENCES

- Bourne, M. C. 1982. *Food texture and viscosity: Concept and measurement*. 2nd Ed. San Diego, USA: Academic Press, 427 p. ISBN 0-12-119062-5.
- Březina, P., Komar, A., Hrabě, J. 2001. *Technologie, zbožiznalství a hygiena potravin II. část-Technologie, zbožiznalství a hygiena potravin živočišného původu*. VYŠKOV, CZECH REPUBLIC : VVŠVP, 181 p. ISBN 80-7231-079-8.
- Coró, F. A. G., Youssef, E. Y., Shimokomaki, M. 2003. Age related changes in poultry breast meat collagen pyridinoline and texture. *J. Food Biochem.*, vol. 26, no. 6, p. 533-541. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1745-4514.2002.tb00771.x>
- Culioli, J. 1995. Meat tenderness: mechanical assessment. In Ouali, A., DeMeyer, D. I., Smulders, F. J. M. (Eds), *Expression of tissue proteinases and regulation of protein degradation as related to meat quality*. Utrecht, The Netherland : ECCEAMST, p. 239-266. Available online at: <http://www.ars.usda.gov/SP2UserFiles/Place/54380530/1995000395.pdf>
- Deathage, F. E. 1963. The effects of water and inorganic salts on tenderness. *Proceedings Meat Tenderness Symposium*. Camden NJ: Campbell Soup Co., p. 45-68.
- Jeremiah, L. E. 1982. A review of factors influencing consumption, selection and acceptability of meat purchases. *International Journal of Consumer Studies*, vol. 6, no. 2, p. 137-154. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1470-6431.1982.tb00593.x>

Kovacevic, D. 2001. *Kemija i tehnologija mesa i ribe*. OSIJEK, CROATIA: PTF (Prehrambeno tehnološki fakultet). p. 296.

Lyon, B. G., Smith, D. P., Lyon, C. E., Savage, E. M. 2004. Effects of diet and feed withdrawal on the sensory descriptive and instrumental profiles of broiler breast. *Poultry Sci.*, vol. 83, no. 2, p. 275-281. [PMid:14979580](#)

Palka, K., Daun, H. 1999. Changes in texture, cooking losses, and myofibrillar structure of bovine M. Semitendinosus during heating. *Meat Science*. vol. 51, no. 3, p. 237-243. [http://dx.doi.org/10.1016/S0309-1740\(98\)00119-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0309-1740(98)00119-3)

Sams, A. R. 1999. Problems and solutions in deboning poultry meat. *Poultry Meat Science, Poultry Science Symposium Series Volume Twenty-five*, Wallingford, UK: CABI Publishing, p. 347-357. ISBN 0-85199-237-4

Sams, A. R., Janky, D. M., Woodward, S. A. 1990. Comparison of two shearing methods for objective tenderness evaluation and two sampling times for physical-characteristic analysis of early-harvested broiler breast meat. *Poultry Sciences*. vol. 69, no. 2, p. 348-353. <http://dx.doi.org/10.3382/ps.0690348>

URL 1 Stablemicrosystems, 2013. About texture analysis. Meat Testing. Available online at: <http://www.stablemicrosystems.com/frameset.htm?http://textureanalyser.co.uk/updates/tee32.htm>

Yoon, K. S. 2002. Texture and microstructure properties of frozen chicken breasts pretreated with salt and phosphate

solutions. *Poultry Science*, vol. 81, no. 12, p. 1910-1915. [PMid:12512586](#)

Acknowledgments:

This work was supported by the VEGA grants from the Ministry of Education Science, Research and Sport of the Slovak Republic, grants No. 1/1074/ 11.

Contact address:

Jozef Čurlej, Slovak University of Agriculture in Nitra, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Department of Food Hygiene and Safety, Tr. A. Hlinku 2, 949 01 Nitra, Slovakia, E-mail: jozef.curlej@uniag.sk

Eva Čurlejová, Department of Traumatology, University Hospital Olomouc, I. P. Pavlova 6, 779 00 Olomouc, Czech Republic, E-mail: curlejova@yahoo.com

Peter Zajác, Slovak University of Agriculture in Nitra, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Department of Food Hygiene and Safety, Tr. A. Hlinku 2, 949 01 Nitra, Slovakia, E-mail: zajac@potravinarstvo.com

Jozef Čapla, Slovak University of Agriculture in Nitra, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Department of Food Hygiene and Safety, Tr. A. Hlinku 2, 949 01 Nitra, Slovakia, E-mail: capla@potravinarstvo.com

POSITION OF FOLIC ACID IN FORTIFICATION OF NUTRITION IN NEONATAL PERIOD

Tatiana Žikavská, Ingrid Brucknerová

ABSTRACT

Folic acid is an essential vitamin which has been known in recent 50 years. It plays an important role in period of neurogenesis. The substitution of folic acid is one of the important parts in the complex treatment of anaemia in premature newborns. It is also a component of artificial milk formulae or breast milk following mother's intake. Fortification of foods with folic acid for population in the world is still discussed. To determine optimal dose of folic acid in premature newborns is difficult. Daily recommended doses of folic acid in infants under the six months were identified. The needs of folic acid in newborns vary. It depends upon the gestational age, body reserves at birth or maternal status of folates during gravidity. On the other hand there is a risk of accumulation of unmetabolised folic acid in circulation of newborns after mandatory folic acid fortification in some countries, which were reported in some studies. The safe upper limits of folic acid intake in premature newborns are not known.

In this review article authors inform about the clear positive effect of folic acid in prenatal and neonatal period, but excessive doses of folic acid could present risk of accumulation and possible adverse effects. To follow up these notions further studies are required.

Keywords: newborn; folic acid; fortification; milk fortifier

INTRODUCTION

Folic acid is an essential vitamin which has been known in recent 50 years. It is synthetic form of folates which are substantial parts of many biochemical processes in the human body (Jackson, 2006). In the period of rapid growth of organism or in cell growth, body's demands for folate increase. Fortification of foods with folic acid for population in the world is still discussed. Its impact in neonatal period varies even in premature newborns. Substitution of folic acid is one of the important parts in the comprehensive treatment of anaemia in premature newborns (Hoffbrand and Weir, 2001). It is also a component of artificial milk formulae or breast milk following mother's intake. To determine optimal doses for each age group is difficult. Other influence should also be considered. On the other hand excessive intake of folic acid is not a concern as folate is water-soluble and easily excreted by kidneys when in excess but on the other side growing organism of preterm newborn and disruption of metabolic balance could be potential risks for optimal development (Hybenova, 2012).

In the beginning of 20th century, the link between folic acid deficiency and anaemia was assumed. Among the first who explored these findings was the English Lucy Wills in 1931. She left for India and investigated macrocytic anaemia in pregnancy, prevalent in female textile workers. Wills and Evans reported cases of patients with tropical megaloblastic anaemia who were treated with crude liver extract (Hoffbrand and Weir, 2001). The name of folic

acid comes from the Latin word folium because it was isolated from spinach leaves in 1941. Folic acid is a synthetic form of folate used in nutritional supplements or food fortification. Folate exists as many structural forms, natural occurring and synthetic, which are known as vitamin B₉. The active form is used at the cellular level for DNA synthesis and the regulation of homocysteine among other functions (Schiff, 2011).

Rich sources of folate are liver, yeast extracts and green leafy vegetables such as spinach, kale, beans, cabbage and broccoli and also pork, poultry, shellfish and liver (Jackson, 2006). In some countries as United States the folic acid intake can come from multiple sources including supplements enriched cereal grain products or other types of fortified food (Crider et al., 2011).

Folates are an integral part of important biochemical processes in the human body. Folate-mediated one-carbon metabolism is essential for metabolic processes in organism. The most important functions are nucleotide biosynthesis, methionine biosynthesis, and cellular methylation reactions (Beaudin and Stover, 2007). In organism folates can be absorbed as one-carbon forms of tetrahydrofolate or polyglutamyl tetrahydrofolate. Folate polyglutamates are broken down in the gut by folate conjugase in the mucosal brush borders to the monoglutamate forms. In this process is reduced the bio-availability of natural folates (Jackson, 2006). The monoglutamates are subsequently absorbed and converted to 5-methyltetrahydrofolate. Synthetic folic acid is not conjugated and is therefore more bio-available. Before it

can become active, folic acid has to be reduced in cells to dihydro forms and tetrahydro forms, which are chemically unstable. The reduction is catalysed by dihydrofolate reductase and tetrahydrofolate is then converted to 5-methyltetrahydrofolate, the form found in the circulation. These reduced and polyglutamylated forms are essential for the DNA (deoxyribonucleic acid) biosynthesis. Also vitamin B₁₂ is required in as co-factor in the methylation cycle. The methylation cycle and DNA cycle regenerate tetrahydrofolate (Gregory, 1997). For healthy embryonic growth the optimal folate status in cells is needed to secure optimal DNA methylation status. It is also known that the aging process by itself is accompanied by alterations in DNA methylation. Age and reduced folate intake can alter folate metabolism (Kim et al., 2009).

Also some polymorphism in gene for metabolism of folate can interact on RBC folate. Interaction between the DHFR polymorphism and folic acid intake was also seen with respect to RBC folate. It suggests a functional DHFR polymorphism, because it limits assimilation of folic acid into cellular folate stores at high and low folic acid intakes (Kalmbach et al., 2008). Some single-nucleotide polymorphism in MTHFR genes are considered to be risk factors for NTD (Evinova et al., 2012). The genetic polymorphisms of the MTHFR can be also associated with some neuropsychiatric disorders, such as major depressive disorders (Capra et al., 2013).

Folates and vitamin B₁₂ play an important role in methylation cycle. In the liver it is performed via recycling homocysteine (Pristoupilova et al., 1999).

DISCUSSION

The benefits of intake of folic acid in periconceptional period were reported. The folic acid supplementation in periconceptional period decreases the recurrent risk of neural tube defects significantly by 85-100 % (Gross and Collins, 2007). Daily dose of 400 µg of folic acid during pregnancy is recommended for reduction of neural tube defects and oro-facial clefts (Canfield et al., 2005; Wilcox et al., 2007; Johnston, 2009). Due to several studies in the prevention of NTD the periconceptual use of folic acid (0,4 mg) per day was recommended by World Health Organisation.

Bánhidý et al. (2011) reported the reduction of structural birth defects in offsprings of pregnant women with diabetes mellitus type 1 after folic acid supplementation. They described it in specific congenital anomalies such as renal dysgenesis, obstructive anomalies of urinary tract, cardiovascular anomalies and caudal dysplasia sequence. Relevant decrease in incidence of neural tube defect by more than 49 % in northern Jordan after folic acid fortification of flour was reported by Amarin and Obeidat (2010).

In South Africa through the program of folic acid fortification of staple foods was for the first time observed in African population a benefit in prevention of neural tube defects. It was significant decline of neural tube defects by 30.5 % and spina bifida by 41.6 % compared to 10.9 % for anencephaly (Sayed et al., 2008). Distribution of neural tube defects shows considerable geographical and ethnic variation (Gupta and Gupta, 2004). Some limiting factors are seasonal and geographic differences, but also

cultural and ethnical variabilities (Zhu and Ling, 2008; Hoyo et al., 2011). Hoyo et al. (2011) assumed that Caucasian race and ethnicity, advanced maternal age and higher education represent greater wherewithal to supplemental folic acid access.

The specific group includes newborns and mostly very low birth weight newborns. Supplementation depends upon the gestational age, which is related to the placental transfer. Body reserves at birth, vitamin content of breast milk with maternal status interact with total amounts of folate in newborn's blood (Jain, 1994). The influence of breastfeeding on folate and cobalamine status was reported. Folate was positively correlated with duration of exclusive breastfeeding. On the other side low cobalamin status is a characteristic finding in breastfed children (Hay et al., 2012). Beneficial effect of supplementation with folate throughout lactation were documented on folate-supplemented women had lower total homocysteine and higher folate levels (Ramlau-Hansen et al., 2006).

In some developing countries folic acid and iron supplementation of pregnant woman could be beneficial to prevent children's malnutrition. Early childhood stunting predicts poor human capital including decreased offspring birth weight and shorter adult height (Sachdev, 2012). The prenatal supplementation with folic acid decrease risk of low birth weight in newborns (Takimoto et al., 2011; Peña-Rosas et al., 2012). In some countries young woman with low socioeconomic status has limited accesses to prenatal care and adequate nutrition during pregnancy. Maternal and newborn health status could be improved by reinforcing the use of folate-enriched diet (Couto et al., 2007).

The requirement of periconceptual supplementation with folate was documented repeatedly. Risk factors associated with birth defects of central nervous system include deficiency of folate supplementation, cigarette smoking and exposure to x-rays (Raza et al., 2012). In some countries maternal micronutrient supplementation does not have impact on early neonatal morbidity (Christian et al., 2008). On the other side pertinent ongoing intervention as delaying early child birth, adequate antenatal care and maternal iron-folate supplementation are beneficial but have sub-optimal coverage (Sachdev, 2012). Also the folate supplementation during pregnancy can lead to preventing allergic diseases in childhood. To follow up these notions further studies are required (Peroni et al., 2012). Intake of folic acid supplementation around the time of conception can protect against neurodevelopmental disorders as autism spectrum disorders. The use of prenatal folic acid supplements was associated with a lower risk of autistic disorder in Norwegian mother (Surén et al., 2013). The supplementation of folic acid as a part of comprehensive treatment with erythropoietin, intravenous iron and vitamin B₁₂ reduce the need for transfusion in extremely low birth weight newborns (Haiden et al., 2006; Eghbalian a Monsef, 2005).

In last ten years folic acid is conjugated with specific anticancer drugs, which are used for treatment of ovarian, breast and lung cancer (Pribylova et al., 2010).

The needs of folic acid in newborns vary. Current recommendations of folic acid intake after birth are different compared with older. Rapid growth of organism

or cell growth, body's demands for folate are increasing after birth. It is influenced by several factors on the mother's side, as well as on the newborn's side or other associated complications. Daily recommended doses for infants under six months are 60 µg of folic acid in Slovak Republic (Kajaba et al., 1997). Also other researchers reported the lower reference nutrient intake for children under the first year of life with 60 µg of folic acid (Gregory, 1997).

Food fortification is a massive exercise and requires multidisciplinary co-operation and on the other side many obstacles as financial barriers and centrally processed food cannot adopt to this approach (Gupta and Gupta, 2004). The mandatory folic acid fortification of food (flour, cereals) was initiated in some countries of the world for example USA, Canada and Chile (Crider et al., 2011).

Folic acid fortification in some countries of the world refers to the risk of accumulation of unmetabolised folic acid in serum. In one week-long study of folate-replete adults consuming folic acid-fortified bread, the dose at which unmetabolised folic acid appeared in the blood lay between 200-400 µg daily (Sweeney et al., 2007). The lower limits of detection offered by the electrochemical detection allow the analysis of folate form distribution in small specimens as human red blood cells and lymphocytes. Measurement in biological samples is provided by means of fully automated combination of affinity chromatography and HPLC with electronical detection (Bagley and Selhub, 2000). Currently the microbiological assays based on growth of microorganisms are used rarely. Highly effective liquid chromatography showed better sensitivity and was suitable for determination of folate in food samples (Strandler, 2012).

Obligation to monitor unmetabolised amounts of folic acid in national programmes of fortification is required. A specific group are newborns who intake folates in perinatal period and after birth in breast milk, milk formulae or human milk fortifiers subsequently. Sweeney et al. reported cases of seven newborns with high level of unmetabolised folic acid in serum. In that time fortification was not mandatory in Ireland and also none of the mothers took folic acid supplementation (Sweeney, 2005). In preterm newborns the positive effect of human milk fortification was significantly confirmed. It improves the growth of preterm very low birth weight babies and predominantly of small for gestation babies (Mukhopadhyay et al., 2007). On the other side potential risks of necrotizing enterocolitis in association have been reported. Some authors reported after addition of human milk fortifiers a significant increase in osmolality of breast milk (Agarwal et al., 2004). Preterm formula milks and breast milk fortifiers provide sufficient folic acid to prevent folate deficiency in preterm infants. The supplementation may also benefit in preterm newborns to reduce the risk of brain injury as a result of decreased plasma homocysteine concentration (Jyothi et al., 2007). High intakes of folic acid have also been associated with theoretical risks of adverse effects. It could delay the diagnosis of vitamin B₁₂ deficiency in treating the anaemia at high doses of folic acid and lead to irreversible neurological damage if treatment with vitamin B₁₂ is not

provided. The safe upper limit for the intake of folate is considered to be 1 mg for adults (Smith et al., 2008). The potential of folic acid is to mask pernicious anaemia and possibly accelerate the growth of existing cancer after mandatory fortification (Sweeney, 2009). The safe upper limits in newborns are not known.

CONCLUSION

Folates participate in multiple different biochemical pathways and their metabolism intersects on an important step in one-carbon metabolism. Folate is required in period of neurogenesis in brain and spinal cord. Folate deficiency may cause disruption of myelination and inflammatory processes. Folic acid seems to be protective against development of other disease such as atherosclerosis and vascular disease. Fortification with folic acid appears to be beneficial but after mandatory fortification the low levels of circulatory unmetabolised folic acid have been reported. On the other side it could be potentially hazardous and depends on the type of food, time interval and amounts of folic acid and individuality of organism in neonatal age. Unmetabolised folic acid in circulation of newborns could have potentially adverse effects. Toxicity of folic acid is not a concern as folate is water-soluble and easily excreted by kidneys when in excess but on the other side growing organism of preterm newborn and disruption of metabolic balance could be potential risks. More studies are necessary to ascertain this issue.

REFERENCES

- Agarwal, R., Singal, A., Aggarwal, R., Deorari, A. K., Paul, V. K. 2004. Effect of fortification with human milk fortifier (HMF) and other fortifying agents on the osmolality of preterm breast milk. *Indian Pediatrics*, vol. 41, p. 63-67. [PMid:14767087](#)
- Amarin, Z. O., Obeidat, A. Z. 2010. Effect of folic acid fortification on the incidence of neural tube defects. *Paediatric and perinatal epidemiology*, vol. 24, no. 4, p. 349-351. [PMid:20618724](#)
- Bagley, P. J., Selhub, J. 2000. Analysis of folate form distribution by affinity followed by reversed-phase chromatography with electrochemical detection. *Clinical Chemistry*, vol. 46, p. 404-411. [PMid:10702529](#)
- Bánhidý, F., Dakhaloui, A., Puhó, E. H., Czeizel, A. A. E. 2011. Is there a reduction of congenital abnormalities in the offspring of diabetic pregnant women after folic acid supplementation? Population-based case-control study. *Congenital Anomalies*, vol. 51, p. 80-86. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1741-4520.2010.00302.x> [PMid:21039913](#)
- Beaudin, A. E., Stover, P. J. 2007. Folate-mediated one-carbon metabolism and neural tube defects: Balancing genome synthesis and gene expression. *Birth Defects Research (Part C)*, vol. 81, no. 3, p. 183-203. <http://dx.doi.org/10.1002/bdrc.20100> [PMid:17963270](#)
- Black, M. M. 2008. Effects of vitamin B₁₂ and folate deficiency on brain development in children. *Food Nutrition Bulletin*, vol. 29(2Suppl), p. 126-131. [PMid:18709887](#)
- Canfield, M. A., Collins, J. S., Botto, L. D., Williams, L. J., Mai, C. T., Kirby, R. S., Pearson, K., Devine, O., Mulinare, J. 2005. Changes in the birth prevalence of selected birth defects after grain fortification with folic acid in the United States: Findings from a multi-state population-based study. *Birth Defects Research Part A: Clinical and Molecular Teratology*,

vol. 73, no. 10, p. 679-689.

<http://dx.doi.org/10.1002/bdra.20210> PMID:16240378

Capra, L., Tezza, G., Mazzei, F., Boner, A. L. 2013. The origins of health and disease: the influence of maternal diseases and lifestyle during gestation. *Ital. J. Pediatr.*, vol. 39, p. 1-7. PMID:23343462

Couto, F. D., Moreira, L. M., dos Santos, D. B., Reis, M. G., Gonçalves, M. S. 2007. Folate, vitamin B12 and total homocysteine levels in neonates from Brazil. *European Journal of Clinical Nutrition*, vol. 61, no. 3, p. 382-386. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.ejcn.1602528> PMID:16988650

Crider, K. S., Bailey, L. B., Berry, R. J. 2011. Folic acid food fortification - its history, effect, concerns, and future directions. *Nutrients*, no. 3, p. 370-384. <http://dx.doi.org/10.3390/2Fnu3030370> PMID:3257747

Christian, P., Darmstadt, G. L., Wu, L., Khatri, S. K., Leclercq, S. C., Katz, J., West, K. P. jr., Adhikari, R. K. 2008. The effect of maternal micronutrient supplementation on early neonatal morbidity in rural Nepal: a randomised, controlled, community trial. *Arch Dis Child*, vol. 93, p. 660-664. PMID:18644934

Eghbalian, F., Monsef, A. 2005. Early treatment of anemia of prematurity with recombinant human erythropoietin. *MJIRC*, vol. 8, no. 1, p. 80-83.

Evinova, A., Babusikova, E., Straka, S., Ondrejka, I., Lehotsky, J. 2012. Analysis of genetic polymorphisms of brain-derived neurotrophic factor and methylenetetrahydrofolate reductase in depressed patients in a Slovak (Caucasian) population. *Gen Physiol Biophys*, vol. 31, no. 4, p. 415-422. <http://dx.doi.org/10.4149/gpb.2012.049> PMID:23255668

Gregory, J. F. 1997. Bioavailability of folate. *European Journal of Clinical Nutrition*, vol. 51 (Suppl. 1), p. 554-559. PMID:9023482

Gross, S. D., Collins, J. S. 2007. Folic acid supplementation and neural tube defect recurrence prevention. *Birth Defects Research (Part A)*, vol. 79, p. 737-742. PMID:17990333

Gupta, H., Gupta, P. 2004. Neural tube defects and folic acid. *Indian Pediatrics*, vol. 41, p. 577-586. PMID:15235163

Haiden, N., Schwidnt, J., Cardona, F., Berger, A., Klebermass, K., Wald, M., Kohlhauser-Vollmuth, C., Jilma, B., Pollak, A. 2006. Effects of a combined therapy of erythropoietin iron, folate, and vitamin B12 on the transfusion requirements of extremely low birth weight infants. *Pediatrics*, vol. 118, no. 5, p. 2004-2013.

Hay, G., Johnston, C., Whitelaw, A., Trygg, K., Refsum, H. 2008. Folate and cobalamin status in relation to breastfeeding and weaning in healthy infants. *American Journal of Clinical Nutrition*, no. 88, vol. 1, p. 105-114. PMID:18614730

Hoffbrand, A. V., Weir, D. G. 2001. Historical review. The history of folic acid. *British Journal of Haematology*, vol. 113, p. 579-589. PMID:11380441

Hoyo, C. et al. 2011. Folic acid supplementation before and during pregnancy in the Newborn Epigenetics Study (NEST). *BMC Public Health*, vol. 11, p. 46. PMID:21255390

Hybenova, E. 2012. Methodology for determining pterylmonoglutamate in various food matrices. *Ministry of Agriculture and Rural Development 2012*.

Jackson, A. et al. 2006. *Folate and disease prevention*. London, United Kingdom, The Stationery Office. 222 p. ISBN 978 0 11 243111 4. Available online at: http://www.sacn.gov.uk/pdfs/foilate_and_disease_prevention_report.pdf

Jain, B. K. 1994. Vitamin requirements of very low birth weight infants: a review. *Indian J Matern Child Health*, vol. 5, p. 46-49. PMID:12318806

Johnston, R. B. 2009. Folic acid: preventive nutrition for preconception, the fetus, and the newborn. *NeoReviews*, vol. 10, no. 1, p. e10-e19. <http://dx.doi.org/10.1542/neo.10-1-e10>

Joythi, S., Misra, I., Morris, G., Benton, A., Griffin, D., Allen, S. 2007. Red cell folate and plasma homocysteine in preterm infants. *Neonatology*, vol. 92, p. 264-268. <http://dx.doi.org/10.1159/000103745> PMID:17556845

Kajaba, I., Šimončič, R., Ginter, E., Ondrejka, J., Trusková, I., Kaláč, J., Bzdúch, V. 1997. Recommended nutritional doses for population of Slovak republic - valid from 1997. Available online at: <http://www.jedalne.sk/sk/public/tabulka1.pdf>

Kalmbach, R. D., Choumenkovitch, S. F., Troen, A. P., Jacques, P. F., D'Agostino, R., Selhub, J. 2008. A 19-base pair deletion polymorphism in dihydrofolate reductase is associated with increased unmetabolized folic acid in plasma and decreased red blood cell folate. *J Nutr*, vol. 138, no. 12, p. 2323-2327. <http://dx.doi.org/10.3945/jn.108.096404> , PMID:19022952

Kim, K. C., Friso, S., Choi, S. W. 2009. DNA methylation, an epigenetic mechanism connecting folate to healthy embryonic development and aging. *J. Nutr. Biochem.*, vol. 20, no. 12, p. 917-926. PMID:19733471

Mukhopadhyay, K., Narang, A., Mahajan, R. 2007. Effect of human fortification in appropriate for gestation and small for gestation preterm babies: a randomized controlled trial. *Indian Pediatrics*, vol. 44, p. 286-290. PMID:17468524

Peña-Rosas, J. P., De-Regil, L. M., Dowswell, T., Viteri, F. E. 2012. Daily oral iron supplementation during pregnancy. In *Cochrane Database of Systematic Reviews*, Issue 12. Art. No.:CD00473 6.

Peroni, D. G., Bonomo, B., Casarotto, S., Boner, L., Piacentini, G. L. 2012. How changes in nutrition have influenced the development of allergic diseases in childhood. *Italian Journal of Pediatrics*, vol. 38, p. 22. PMID:22651129

Pribylova, M., Dvorakova, M., Vanek, T. 2010. Paclitaxel derivatives for targeted delivery to cancer cells. *Chemické Listy*, vol. 104, p. 1023-1028.

Pristoupilova, K., Pristoupil, T. I., Heyrovsky, M. 1999. Homocysteine - a Molecule Attracting Increasing Attention. *Chemické Listy*, vol. 93, p. 365-374.

Ramlau-Hansen, C. H., Møller, U. K., Henriksen, T. B., Nexø, E., Møller, J. 2006. Folate and vitamin B12 in relation to lactation: a 9-month postpartum follow-up study. *European Journal of Clinical Nutrition*, vol. 60, p. 120-128.

Raza, M. Z., Sheikh, A., Ahmed, S. S., Ali, S., Anagyi, S. M. A. 2012. Risk factors associated with birth defects at a tertiary care center in Pakistan. *Italian Journal of Pediatrics*, vol. 38, p. 68. PMID:23217204

Sachdev, H. P. S. 2012. Overcoming challenges to accelerating linear growth in Indian children. *Indian Pediatr*, vol. 49, p. 271-275. PMID:22565072

Sayed, A. R., Bourne, D., Pattinson, R., Nixon, J., Henderson, B. 2008. Decline in the prevalence of neural tube defects following folic acid fortification and its cost-benefit in South Africa. *Birth Defects Research (Part A)*, vol. 82, p. 211-216. PMID:18338391

Schiff, M. 2011. Isolated remethylation disorders: do our treatments benefit patients? *Journal of inherited metabolic disease*, vol. 34, p. 137-145. PMID:20490923

Smith, A. D., Young-In, K., Refsum, H. 2008. Is folic acid good for everyone? *American Journal of Clinical Nutrition*, vol. 87, p. 517-533. [PMid:18326588](#)

Strandler, H. S. 2012. Determination of folate for food composition data. Development and improvement of analytical methods. *Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala*.

Surén, P., Roth, Ch., Bresnahan, M., Haugen, M., Hornig, M., Hirtz, D., Lie, K. K., Lipkin, W. I., Magnus, P., Reichborn-Kjennerud, T., Schjølberg, S., Smith, G. S., Øyen, A., Susser, E., Stoltenberg, C. 2013. Association between maternal use of folic acid supplements and risk of autism spectrum disorders in children. *JAMA*, vol. 309, no. 6, p. 570-577.

Sweeney, M. R., McPartlin, J., Scott, J. 2007. Folic acid fortification and public health: Report on threshold doses above which unmetabolised folic acid appear in serum. *BMC Public Health*, vol. 7, p. 41. [PMid:17378936](#)

Sweeney, M. R., McPartlin, J., Weir, D. G., Daly, S., Pentieva, K., Daly, L., Scott, J. M. 2005. Evidence of unmetabolized folic acid in cord blood of newborn and serum of 4-day-old infants. *British Journal of Nutrition*, vol. 94, p. 727-730. [http://dx.doi.org/10.1079/BJN20051572](#)

[PMid:16277775](#)

Sweeney, M. R., Staines, A., Daly, L., Traynor, A., Daly, S., Bailey, S. W., Alverson, P. B., Ayling, J., Scott, J. M. 2009. Persistent circulating unmetabolised folic acid in a setting of liberal voluntary folic acid fortification. Implications for further mandatory fortification? *BMC Public Health*, vol. 9, no. 295, p. 1-7. [http://dx.doi.org/10.1186/1471-2458-9-295](#) [PMid:19689788](#)

Takimoto, H., Hayashi, F., Kusama, K., Kato, N., Yoshiike, N., Toba, M., Ishibashi, T., Miyasaka, N., Kubota, T. 2011. Elevated maternal serum folate in the third trimester and reduced fetal growth: a longitudinal study. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, vol. 57, p. 130-137. [http://dx.doi.org/10.3177/jnsv.57.130](#) [PMid:21697631](#)

Wilcox, A. J., Lie, R. T., Solvoll, K., Taylor, J., McConnaughey, D. R., Abyholm, F., Vindenes, H., Vollset, S. E., Drevon, C. A. 2007. Folic acid supplements and risk of facial clefts: national population based case-control study. *BMJ*, vol. 334, p. 464-467. [http://dx.doi.org/10.1136/bmj.39079.618287.0B](#) [PMid:17259187](#)

Zeisel, S. H. 2009. Importance of methyl donors during reproduction. *The American journal of clinical nutrition*, vol. 89, p. 673-677. [PMid:19116320](#)

Zhu, L., Ling, H. 2008. National Neural Tube Defects Prevention Program in China. *Food and Nutrition Bulletin*, vol. 29, p. 196-204. [PMid:18709893](#)

Contact address:

Tatiana Zikavska, M. D., 1st Department of Paediatrics, Faculty of Medicine, Comenius University in Bratislava, Limbova 1, 833 40 Bratislava, Slovakia, E-mail: zikavska@gmail.com.

Ingrid Brucknerova Assoc Prof, M. D., PhD., 1st Department of Paediatrics, Faculty of Medicine, Comenius University in Bratislava, Limbova 1, 833 40 Bratislava, Slovakia, E-mail: osmium@centrum.sk.



RELATIONSHIP BETWEEN MASTITIS CAUSATIVE PATHOGENS AND SOMATIC CELL COUNTS IN MILK OF DAIRY COWS

Sharaf Eldeen Idriss, Vladimír Tančín, Vladimír Foltys, Katarína Kirchnerová, Dana Tančinová, Martina Vršková

ABSTRACT

Milk somatic cell count is a key component of national and international regulation for milk quality and an indicator of udder health and of the prevalence of clinical and subclinical mastitis in dairy herds. The objective of this study was to evaluate the presence of mastitis pathogens in milk samples differed by somatic cell count (SCC) in microbiologically positive samples. Also frequency of distribution of samples differed by SCC were studied in non infected samples as well. The milk samples were collected from individual quarters from the dairy farms located in Nitra region with problematic udder health of herd for SCC and bacteriological analysis. Totally, 390 milk samples were examined, and 288 (73.85%) positive milk samples were detected. Four SCC groups of samples (<100 , $<100 < \text{SCC} < 200$, $<200 < \text{SCC} < 400$ and $>400 \times 10^3/\text{ml}$) were used to identify presence of microorganisms in positive samples. The most frequently isolated pathogens in samples with high SCC $>400 \times 10^3/\text{ml}$ according to year were Coagulase-negative Staphylococci (29.11 %) in 2012, followed by *Staphylococcus aureus* (28.0%) in 2010, yeasts (24.05%) in 2012, *Escherichia coli* (22.78%) in 2012, *Bacillus sp.* (20%) in 2010 and *Pseudomonas aeruginosa* (11.88%) in 2011. Coagulase-negative Staphylococci (66.67%) were the predominantly identified in the samples with low SCC $<100 \times 10^3$ cells/ml, followed by *Bacillus spp* (50%), *Enterococcus spp.* (33.33%) and *Staphylococcus aureus* (16.67%) and *E. coli* (16.67%). The results of this study indicated that the SCC of individual milk samples corresponded with the health status of the udder of dairy cows represented by presence of mastitis microorganisms in milk. However, the contamination of milk samples could be also connected with low SCC. On the other side the samples with high SCC were found out without presence of microorganism. The further study is needed to identify the reason of high SCC in milk from negative samples.

Keywords: bovine mastitis; microorganism; somatic cell count, milk

INTRODUCTION

Milk somatic cell count is a key component of national and international regulation for milk quality and an indicator of udder health and of the prevalence of clinical and subclinical mastitis in dairy herds (Sundekilde et al., 2012). The trade with milk and milk product could be thus possible influenced by milk quality related to consumer demands (Kubicová and Dobák, 2012).

The majority of mastitis cases are caused by only a few common bacterial pathogens namely, *Staph.* spp., *Strep.* spp., Coliforms and *Actinomyces pyogenes* (Sharma, 2010). While in a report by Kumar et al., (2009) *Strep. dysgalactiae* was major (50.00 %) organism isolated from the cases of subclinical mastitis in cows followed by *Staph. aureus* and others. Most of the intramammary infections (IMIs) arise during the process of milking or within 2 hours after it, i.e. to the time when the teat canal is fully closed. Microbial contamination of milk before and after preparation of the udder for milking was described by Tančín et al., (2006).

SCC represent the number of cells in milk (representing mainly blood white cells during an immune response of mammary tissue) (Sarikaya et al., 2006) and indicate

intramammary infection (IMI) when elevated (Reksen et al., 2008). However, SCC can be affected by several factors such as stage of lactation, age, stress of the animals, time and frequency of milking, management, seasons, and mainly IMIs (Schwarz et al., 2010; Tančín, 2013). SCC is used as a diagnostic tool to monitor subclinical mastitis in dairy herd's worldwide (Schukken et al., 2003). SCC could be also important for comparison of different milking systems (Mikulová, 2011).

The normal composition of milk somatic cells varies with the type of secretion or lactation cycle. Normally, in milk from a healthy mammary gland, the SCC is below 100×10^3 cells/ml, or even lowers (Leitner et al., 2003). The high SCC is mostly related to the presence of microorganism in the udder but also the type of microbes could affect the SCC in milk (Ariznabarreta et al., 2002). On the other side in some cases the high SCC was detected in milk samples without presence of microorganisms (McDougall et al., 2001). Therefore, mastitis should be detected in a reliable and timely fashion based on SCC values or bacteriological culture; otherwise subclinical mastitis could develop into a clinical disease (Hallén Sandgren et al., 2008).

Generally, the increase of somatic cells may lead to the greater risk of raw cow's milk contaminated by pathogens and antibiotic residues. Furthermore, high somatic cells count raises the suspicion that the raw food is produced under poorer standards of hygiene and from unhealthy cows (Zajác et al., 2007, 2012).

The frequency of distribution of pathogens in positive milk samples we have recently published in work of Idriss et al. (2013) without evaluation of possible relationship to SCC. The aim of this study was to evaluate the prevalence of mastitis pathogens in milk samples in dependence of SCC. Also frequency of distribution of samples differed by somatic cells were studied in non infected samples as well.

MATERIAL AND METHODOLOGY

The study was conducted during the period from 2010 - 2012 in a surroundings Nitra region in Slovakia, which is located about 100 kms east from Bratislava. A total of 390 milk samples were collected from quarters of dairy cows at different dairy farms, and somatic cell count and pathogenic bacteria were examined. The samples were collected from farms with high bulk tank SCC and consequently from cows with possible problems with udder health (Idriss et al., 2013).

Somatic cell count analysis

Somatic cell counts were performed within 24 h of collection using a Fossomatic 90 instrument (Foss Electric, Hillerod, Denmark) after heat treatment at 40 C for 15 min.

Categories of somatic cell count (SCC)

SCC is considered as health indicator. Healthy and recovered cows were assumed to have SCC $<200 \times 10^3$ cells/ml, and cows with IMIs were assumed to have SCC $>400 \times 10^3$ cells/ml. Therefore, SCC were categorized as low when the uncorrected SCC measured was $<200 \times 10^3$ cells/ml, and high when the uncorrected SCC was $>400 \times 10^3$ cells/ml. An intermediate category was defined for SCC 200- 400 $\times 10^3$ cells/ml. The frequency of milk samples distribution in above mentioned sorting criteria was calculated. Also the frequency of distribution of samples in above mentioned three SCC groups were evaluated in non-infected samples.

On the base of above SCC four groups of microbiologically positive samples only (<100 , $<100 < SCC < 200$, $<200 < SCC < 400$ and $>400 \times 10^3$ /ml) were created to identify effect of microorganisms.

Milk sample collection and laboratory analysis

Milk samples were collected from quarters immediately before a.m. milking as recommended by Riekerink et al. (2007). After a quarter had been cleaned up by removing any possible dirt and washed with tap water, the teat end was dried and swabbed with cotton soaked in 70% ethylalcohol. Approximately 100 ml of milk was then collected aseptically into sterile bottles, after discarding the first 3 milking streams. Milk samples from each quarter were transported to the Animal Production Research Center Laboratory in an ice cooled box at 4 C and analysed immediately (max. 4 h after collection) either for identification of the clinical mastitis pathogen or to

determine somatic cell count (SCC). The milk samples were investigated for pathogenic mastitis accredited to a valid procedure of IDF (IDF, 1981).

Statistical evaluation of data was done by Excel program to calculate frequency of distribution.

RESULTS

Distributions of somatic cell count (SCC)

The frequency of distributions of SCC in whole milk samples of dairy cow's was described in Table 1. Most milk samples were incorporated in group SCC $>400 \times 10^3$ /ml. During the individual years the distribution was: the least in 2010 with 67.06%, followed by 2011 with 68.56% and a high frequency in 2012 with 70.27%. A low frequencies of samples in SCC group 200- 400 $\times 10^3$ /ml were 12.94% and 11.86% in 2010 and 2011 respectively. While, in 2012 the frequency of SCC increased linearly from 12.61% (SCC $<200 \times 10^3$ /ml to 70.27% (SCC $>400 \times 10^3$ /ml).

Table 2 shows the frequency of distributions of SCC in microbiologically positive milk samples of dairy cows. The most samples were found out in a group of high SCC $>400 \times 10^3$ /ml with 79.86%, followed by the SCC from 200-400 $\times 10^3$ /ml with 9.03%, SCC from 100-200 $\times 10^3$ /ml with 7.29% and the least samples in SCC $<100 \times 10^3$ /ml with 3.82%. The obtained results showed that the year 2010 was the worst, with 81.97% of samples with SCC $>400 \times 10^3$ /ml, and the best year were 2011 with 77.69% of samples. The lower percentage of SCC in 2011 - 2012 with SCC $<100 \times 10^3$ /ml and from 100- 200 $\times 10^3$ /ml were 4.62 and 11.54% and 3.09 and 4.12 respectively. In 2010 the frequency of SCC increased linearly from 3.28% (SCC $<100 \times 10^3$ /ml) to 81.97% (SCC $>400 \times 10^3$ /ml).

Distributions of bacteriological results

The results of distributions of mastitis pathogens and SCC groups in milk dairy cows showed that the type of micro-organisms could affect the SCC in milk. The high frequency of mastitis pathogenic in high SCC $>400 \times 10^3$ /ml group of samples depending on the year were Coagulase Negative Staphylococci (CNS), *Staph. aureus*, yeasts, *E. Coli*, *Bacillus sp.* and *Pseudomonas aeruginosa*. CNS also was the most frequently isolated pathogens in a group of samples with low SCC $<100 \times 10^3$ cells/ml, followed by *Bacillus spp.*, *Enterococcus spp.* and *Staph. aureus* and *E. coli*. (Table 3).

E. coli and *Corynebacterium pyogenes* were the most frequency isolated pathogenic with 50.0% for each one with low SCC from 100-200 $\times 10^3$ /ml, followed by CNS (42.86%), other pathogenic (28.57%) and *S. chromogenes* (23.81%). CNS (66.67%) was the predominantly identified in the samples with SCC $<100 \times 10^3$ cells/ml, followed by *Bacillus spp.* (50.0%), *Enterococcus spp.* (33.33%) and *S. aureus* and *E. coli* were (16.67%) for each one.

Table 4 shows the frequency distributions of microbiologically negative milk samples of dairy cows. There is no mastitis pathogens detected in 102 milk samples (microbiologically negative milk samples), and 92.29% of total negative samples incorporated into the groups of SCC $<200 \times 10^3$ cells/ml and f 200 - 400 $\times 10^3$ cells/ml. Only 6.73% of samples were incorporated within the group of SCC $>400 \times 10^3$ cells/ml. In the group

Table 1 Frequency distributions of SCC in quarter milk samples of dairy cows

year	Number of samples (N)	Frequency of distribution (SCC in 10 ³ cell/ml) in % from quarters		
	N	<200	200-400	>400
2010	85	20	12.94	67.06
2011	194	19.59	11.86	68.56
2012	111	12.61	17.12	70.27
Total	390	17.69	13.59	68.72

(SCC) - Somatic cell count, (%) - the percentage of SCC in milk sample

Table 2 Frequency distributions of microbiologically positive quarter milk samples of dairy cows in relation to SCC

year	Number of samples (N)	Frequency of distribution (SCC in 10 ³ cell/ml) in %			
	N	<100	100-200	200-400	>400
2010	61	3.28	3.28	11.48	81.97
2011	130	4.62	11.54	6.15	77.69
2012	97	3.09	4.12	11.34	81.44
Total	288	3.82	7.29	9.03	79.86

(SCC) - Somatic cell count, (%) - the percentage of SCC in milk sample

>400×10³/ml rose SCC linearly according to year from 4.17% (2010) to 12.5% (2012).

DISCUSSION

Most milk samples in studied years were found out in a group of high SCC >400×10³/ml (around 70%). These results could be explained by taking samples from problematic farms and cows and also correspond to the findings in the same samples where we demonstrated high percentage of infected samples by microorganisms (Idriss et al., 2013). In another study in milk with geometric mean composite SCC >50 000 cells/ml, nearly 65% samples had at least one culture-positive quarter (Piepers et al., 2007).

In our study, when only infected samples were evaluated the percentage of samples with high SCC (>400×10³/ml) was around 80%, which support last mentioned authors. It could be highly expected result because microorganism's presence stimulates the immunity of udder by release of somatic cells from blood into the milk (Leitner et al., 2003; Schwarz et al., 2011). On the other side, we could demonstrate in samples with low SCC (<200×10³ cells/ml) the presence of microorganisms in positive samples. It is difficult to conclude that whether the pathogens isolated from quarter foremilk samples with low SCC originated from contamination or whether they caused an IMI as pointed out by Schwarz et al., (2010).

In our findings, the environmental microorganisms were the most frequent found out in samples with low SCC, though in 2011 only, there were two samples infected by *S. aureus* in SCC groups below 200×10³ cells/ml. This finding is difficult to explain because *S. aureus* and *St. agalactiae* (contagious bacteria) are associated with high SCC in milk of ewes (Ariznabarreta et al., 2002). SCC around 400×10³ cells/ml was mainly related to the presence of minor pathogens (coagulase-negative staphylococci, *Corynebacterium bovis*, enterococci, and *Bacillus* spp.) (Riekerink et al., 2007).

Low and high SCC in milk infected by CNS could be related to sensitivity to novobiocin as the possible criterion associated with staphylococci pathogenicity (Ariznabarreta et al., 2002). Isolates of novobiocin-resistant CNS, micrococci, and *Corynebacteria* were associated to low values of log SCC (4.85 to 5.20). In contrast, infection by novobiocin-sensitive CNS, streptococci, and enterococci organisms was related to a sharp inflammatory response with high SCC (Ariznabarreta et al., 2002). However, the prevalence of mastitis pathogens in the SCC range from 1,000 to ≤100,000 cells/ml was 8.5% (5.51% minor pathogens, 2.01% major pathogens, and 0.98% other pathogens) (Schwarz et al., 2010). CNS is currently the most isolated pathogens from milk samples and usually related with high SCC (Piepers et al., 2007).

Table 3 Frequency distributions of mastitis pathogens in relation to SCC in milk of dairy cows from microbiologically positive quarters

Frequency	2010					2011					2012					
	<100	100-200	200-400	>400	<100	100-200	200-400	>400	<100	100-200	200-400	>400	<100	100-200	200-400	>400
<i>Staphylococcus aureus</i>				28.00	16.67	4.76		18.81								2.53
<i>Strep. agalactiae</i>				2.00				4.95								
<i>Strep. uberis</i>			22.22	6.00				4.95						9.09		5.06
<i>Escherichia Coli</i>		50.00		4.00	16.67	19.05		10.89		25.00			28.57	27.27		22.78
<i>Enterococcus spp.</i>					16.67	4.76		3.96		12.00			33.33			7.59
<i>Bacillus spp.</i>	50.00			20.00	16.67			4.95						9.09		6.33
<i>C. pyogenes</i>		50.00	11.11	6.00		19.05				12.00						
CNS	50.00		44.44	12.00	33.33	14.29		22.77		50.00			66.67	42.86		29.11
<i>Pseud. aeruginosa</i>								11.88								
<i>S. epidermidis</i>				8.00				5.94						18.18		2.53
<i>S. chromogenes</i>				8.00		23.81		3.96								
Yeasts				2.00				1.98								24.05
Others				4.00		14.29		4.95		28.57						
Number of samples	2	2	9	50	6	21	8	101	3	7	11	7	7	11	11	79

CNS - Coagulase Negative Staphylococci; *C. pyogenes* - *Corynebacterium pyogenes*; *S.* - *Staphylococcus*; SCC - Somatic cell count; others - (different types of bacteria and mold).

Table 4 Frequency distributions of microbiologically negative milk samples of dairy cows in relation to SCC

year	Number of samples	Frequency of distribution (SCC in 10 ³ cell/ml) in %		
		<200	200-400	>400
2010	24	58.33	37.5	4.17
2011	62	31.96	48.44	6.25
2012	16	56.25	31.25	12.50
Total	102	49.02	43.27	6.73

(SCC) - Somatic cell count, (%) - the percentage of SCC in milk sample

In a study conducted by **Gonzalez-Rodriguez et al., (1995)**, they found that CNS were the most frequently isolated bacterial group, and gave lower SCC values compared with *Coagulase-positive staphylococci* and streptococci. Those results are comparable to our findings.

Bradley (2002) reported that *E. coli* was the most common cause of clinical mastitis in well-managed dairy herds with low milk SCC in the U. K. which was not found out by **Schwarz et al., (2010)**. Our results showed also occasionally occurrence of *E. coli* in low SCC group.

Low SCC in microbiologically positive milk samples could be related with possible effect of selection for improved mastitis resistance. Selection for lower 2 lactation average somatic cell count is expected to decrease the incidence of pathogen-specific mastitis, especially for *S. uberis*, *S. dysgalactiae*, and CNS and, to a lesser extent, for *S. aureus* and *E. coli* (**Sorensen et al., 2009**).

Mastitis due to fungi and yeast are uncommon or rare. We could demonstrate also low occurrence of yeast in milk samples except in year 2012. Additionally, their presence was connected with high SCC. The comparable result was found by **De Casia dos Santos and Marin (2005)** 25.4% samples with high SCC.

As we could expect in a group of microorganisms free samples (microbiologically negative milk samples, Table 4) there were low percentage of samples with high SCC. However, the percentage of samples in intermediate group was relatively high when health of udder is taking into account. Threshold of 200×10³ cells/ml has been recommended to differentiate between infected and uninfected quarters or cows (**Schukken et al., 2003**). In bacteriologically negative milk samples the SCC was low (**Laevens et al., 1997**). **McDougall et al., (2001)** stated that the high SCC value in the absence of bacterial growth on blood agar may be due to microorganism, such as *Mycoplasma*, or due non-bacterial causes, including physiological factors. We also assume that high SCC in milk samples free of microorganisms could be explained by possible consumption or killing the microorganism by white cells.

CONCLUSION

The results of this study indicated that the SCC of individual milk samples corresponded with the health status of the udder of dairy cows represented by presence of mastitis microorganisms in milk. However, the contamination of milk samples by microorganisms could

be also connected with low SCC. On the other side the samples with high SCC were found out without presence of microorganism. The further study is needed to identify the reason of high SCC in milk from negative samples.

REFERENCES

- Ariznabarreta, A., Gonzal, C., San Primitivo, O. F. 2002. Microbiological quality and somatic cell count of ewe milk with special reference to staphylococci, *Journal of Dairy Science*, vol. 85, no. 6, p. 1370-1375. [http://dx.doi.org/2010.3168/jds.S0022-0302\(02\)74203-3](http://dx.doi.org/2010.3168/jds.S0022-0302(02)74203-3)
- Bradley, A. J. 2002. Bovine mastitis: An evolving disease. *Veterinary Journal*, vol. 164, no. 2, p. 116-128. <http://dx.doi.org/10.1053/tvjl.2002.0724> PMID:12359466
- De Casia Dos Santos, R., Marin, J. M. 2005. Isolation of *Candida* spp. from mastitic bovine milk in Brazil. *Mycopathologia*, vol. 159, no. 2, p. 251-253. <http://dx.doi.org/2010.1007/s11046-004-2229-2> PMID:15770451
- Gonzalez-Rodriguez, M. C., Gonzalo, C., San Primitivo, F., Carmenes, P., Rodriguez, M. C. G. 1995. Relations between somatic cell count and intramammary infection of the half udder in dairy ewes. *Journal of Dairy Science*, vol. 78, no. 2, p. 2753-2759. [http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(95\)76906-5](http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(95)76906-5)
- Hallén Sandgren, C., Persson Waller, K., Emanuelson, U. 2008. Therapeutic effects of systemic or intramammary antimicrobial treatment of bovine subclinical mastitis during lactation, *Veterinary Journal*, vol. 175, no. 1, p. 108-117. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tvjl.2006.12.005> PMID:17320434
- Idriss, Sh., Foltys, V., Tančin, V., Kirchnerová, K., Zaujec, K. 2013. Mastitis pathogens in milk of dairy cows in Slovakia, *Slovak Journal of Animal Science*, in press.
- International Dairy Federation 1981. Laboratory Methods for use in mastitis Work. Document No 132, *IDF Brussels*, p. 27.
- Kubicová, E., Dobák, D. 2012. The development and the level of milk consumption and milk product in Slovak Republic and modeling of food demand of selected groups of households : SPU Nitra, 88 p.
- Kumar, M., Goel, P., Sharma, A., Kumar, A. 2009. Prevalence of sub clinical mastitis in cows at a Goshala. Proceedings of Compendium of 27th ISVM International Summit and Convention at Chennai, Tamilnadu, India, p. 4-7.
- Laevens, H., Deluyker, H., Schukken, Y. H., De Meulemeester, L., Vandermeersch, R., De Muelenaere, E., De Kruif, A. 1997. Influence of parity and stage of lactation on somatic cell count in bacteriologically negative dairy cows. *Journal of Dairy Science*, vol. 80, no. 12, p. 3219-3226. [http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(97\)76295-7](http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(97)76295-7)

- Leitner, G., Eligulashvily, R., Krifucks, O., Perl, S., Saran, A. 2003. Immune cell differentiation in mammary gland tissues and milk of cows chronically infected with *Staphylococcus aureus*. *Journal of Veterinary Medicine*, vol. 50, no. 1, p. 45-52. [PMid:12710501](#)
- Mikulová, M. 2011. Content of free fatty acids, lipolytic bacteria and somatic cells in relation to milking technology. *Journal of Agrobiology*, vol. 28, no. 1, p. 49-54. Retrieved from the web: http://www.zf.jcu.cz/copy_of_dokumenty/dokumenty-journal-of-agrobiology/2011-number-1/Mikulova_imprim_web.pdf
- McDougall, S., Murdough, P., Pankey, W., Delaney, C., Barlow, J., Scruton, D. 2001. Relationship among somatic cell count, California mastitis test, impedance and bacteriological status of milk in goats and sheep in early lactation. *Small Ruminant Research*, vol. 40, no. 3, p. 245-254. [http://dx.doi.org/10.1016/S0921-4488\(01\)00185-7](#)
- Piepers, S., Meulemeester, L. De., De Kruijff, A., Opsomer, G., Barkema, H. W., De Vliegher, S. 2007. Prevalence and distribution of mastitis pathogens in subclinically infected dairy cows in Flanders, Belgium. *Journal of Dairy Research*, vol. 74, no. 4, p. 478-483. [http://dx.doi.org/10.1017/S00022029907002841](#) [PMid:17931457](#)
- Reksen, O., Sølverød, L., Østeras, O. 2008. Relationships between milk culture results and composite milk somatic cell counts in Norwegian Dairy Cattle. *Journal of Dairy Science*, vol. 91, no. 8, p. 3102-3113 [http://dx.doi.org/2010.3168/jds.2008-1006](#) [PMid:18650286](#)
- Olde Riekerink, R. G., Barkema, H. W., Veenstra, W., Berg, F. E., Stryhn, H., Zadoks, R. N. 2007. Somatic cell count during and between milkings. *Journal Dairy Science*, vol. 90, no. 8, p. 3733-3741. [http://dx.doi.org/10.3168/jds.2007-0001](#) [PMid:17638984](#)
- Sarikaya, H., Schlaberger, G., Meyer, H. H. D., Bruckmaier, R. M. 2006. Leukocyte populations and mRNA expression of inflammatory factors in quarter milk fractions at different somatic cell score levels in dairy cows. *Journal Dairy Science*, vol. 89, p. 2479-2486. [http://dx.doi.org/2010.3168/jds.S0022-0302\(06\)72322-0](#)
- Schukken, Y. H., Wilson, D. J., Welcome, F., Garrison-Tikofsky, L., Gonzalez, R. N. 2003. Monitoring udder health and milk quality using somatic cell counts. *Veterinary Research*, vol. 34, no. 5, p. 579-596. [http://dx.doi.org/10.1051/vetres:2003028](#) [PMid:14556696](#)
- Schwarz, D., Diesterbeck, U. S., Failing, K., König, S., Brügemann, K., Zschöck, M., Wolter, W., Czerny, C. P. 2010. Somatic cell counts and bacteriological status in quarter foremilk samples of cows in Hesse, Germany. *Journal of Dairy Science*, vol. 93, no. 12, p. 5716-5728. [http://dx.doi.org/10.3168/jds.2010-3223](#) [PMid: 21094743](#)
- Schwarz, D., Diesterbeck, U. S., König, S., Brügemann, K., Schlez, K., Zschöck, M., Wolter, W., Czerny, C. P. 2011. Flow cytometric differential cell counts in milk for the evaluation of inflammatory reactions in clinically healthy and subclinically infected bovine mammary glands. *Journal of Dairy Science*, vol. 94, no. 10, p. 5033-5044. [http://dx.doi.org/10.3168/jds.2011-4348](#) [PMid:21943754](#)
- Sharma, D. K., Jallewar, P. K., Sharma, K. K. 2010. Antibigram of bacteria isolated from bovine subclinical mastitis. *Indian Veterinary Journal*, vol. 87, p. 407-407.
- Sorensen, L. P., Mark, T., Madsen, P., Lund, M. S. 2009. Genetic correlations between pathogen-specific mastitis and somatic cell count in Danish Holsteins. *Journal of Dairy Science*, vol. 92, no. 7, p. 3457-3471. [http://dx.doi.org/10.3168/jds.2008-1870](#) [PMid:19528624](#)
- Sundekilde, U. K., Poulsen, N. A., Larsen, L. B., Bertram, H. C. 2012. Nuclear magnetic resonance metabonomics reveals strong association between milk metabolites and somatic cell count in bovine milk. *Journal of Dairy Science*, vol. 96, no. 1, p. 290-299. [http://dx.doi.org/10.3168/jds.2012-5819](#) [PMid:23182357](#)
- Tančin, V. 2013. Somatic cell counts in milk of dairy cows under practical conditions. *Slovak Journal of Animal Science*, vol. 46, p. 31-34 Retrieved from the web: http://www.cvzv.sk/slju/13_1/Tancin.pdf
- Tančin, V., Kirchnerová, K., Foltys, V., Mačuhova, L., Tančinová, D. 2006. Microbial contamination and somatic cell count of bovine milk striped and after udder preparation for milking. *Slovak Journal of Animal Science*, vol. 39, p. 214-217. Retrieved from the web: http://www.cvzv.sk/slju/06_4/Tancin.pdf
- Zajác, P., Golian, J., Nováková, R. 2007. The effect of high somatic cells count on raw cow's milk safety. *Potravinarstvo*, vol. 1, no. 1, p. 10-15. Retrieved from the web: http://www.potravinarstvo.com/dokumenty/potravinarstvo_no_1_2007.pdf
- Zajác, P., Tomáška, M., Murárová, A., Čapla, J., Čurlej, J. 2012. Quality and safety of raw cow's milk in Slovakia in 2011. *Potravinarstvo*, vol. 6., no. 2, p. 64-73. [http://dx.doi.org/10.5219/189](#)

Acknowledgments:

Part of this study was funded by the Operational Programme for Research and Development project "MLIEKO No. 26220220098" of the European Regional Development Fund.

Contact address:

Sharaf Eldeen Idriss, Slovak University of Agriculture in Nitra, Faculty of Biotechnology and Food Science, Department of Evaluation and Processing of Animal Product, A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovak Republic, E-mail: sharafdm@yahoo.com

Vladimír Tančin, Animal Production Research Centre Nitra, Hlohovecká 2, 951 41 Lužianky, Slovak Republic, E-mail: tancin@cvzv.sk, Slovak University of Agriculture in Nitra, Faculty of Agrobiolgy and Food Resources, Department of Veterinary Sciences, A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovak Republic, E-mail: vladimir.tancin@uniag.sk

Vladimír Foltys, Animal Production Research Centre Nitra, Hlohovecká 2, 951 41 Lužianky, Slovak Republic, E-mail: foltys@cvzv.sk

Katarína Kirchnerová, Animal Production Research Centre Nitra, Hlohovecká 2, 951 41 Lužianky, Slovak Republic, E-mail: kirchnerova@cvzv.sk

Dana Tančinová, Slovak University of Agriculture in Nitra, Faculty of Biotechnology and Food Science, Department of Microbiology, A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovak Republic, E-mail: dana.tancinova@uniag.sk

Martina Vrškova, Animal Production Research Centre Nitra, Hlohovecká 2, 951 41 Lužianky, Slovak Republic, E-mail: vrskova@cvzv.sk

Table of Contents

CHANGES OF PLASMA LIPIDS IN RELATION TO THE REGULAR CONSUMPTION OF BILBERRIES (*VACCINIUM MYRTILLUS* L.)

Marta Habánová, Miroslav Habán, Peter Chlebo, Marianna Schwarzová

Potravinarstvo, vol. 7, no. 1, 2013, p. 1-6, [\[abstract\]](#) doi:10.5219/233 [\[fulltext\]](#)

PREPARATION AND CHARACTERISTICS OF BETA-GLUCAN CONCENTRATE FROM BREWER'S YEAST AS THE ADDITIVE SUBSTANCE IN FOODS

Mária Kováčová, Ladislav Dodok, Livia Žofajová, Ľubomír Mikuš

Potravinarstvo, vol. 7, no. 1, 2013, p. 7-11, [\[abstract\]](#) doi:10.5219/258 [\[fulltext\]](#)

PERCEPTION OF BASIC TASTES AND THRESHOLD SENSITIVITY DURING TESTING OF SELECTED JUDGES

Petra Barborová, Jana Jančovičová, Peter Zajác, Jozef Čapla, Vladimír Vietoris

Potravinarstvo, vol. 7, no. 1, 2013, p. 12-17, [\[abstract\]](#) doi:10.5219/259 [\[fulltext\]](#)

ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF OREGANO AND SAGE PLANT EXTRACTS AGAINST DECARBOXYLASE-POSITIVE ENTEROCOCCI ISOLATED FROM RABBIT MEAT

Renata Szabóová, Andrea Lauková, Ľubica Chrástíková

Potravinarstvo, vol. 7, no. 1, 2013, p. 18-21, [\[abstract\]](#) doi:10.5219/239 [\[fulltext\]](#)

SUITABILITY OF CEREAL PORRIDGES AS SUBSTRATE FOR PROBIOTIC STRAIN *LACTOBACILLUS RHAMNOSUS* GG

Monika Kocková, Ľubomír Valík

Potravinarstvo, vol. 7, no. 1, 2013, p. 22-27, [\[abstract\]](#) doi:10.5219/242 [\[fulltext\]](#)

IMPORTANCE OF PREBIOTIC AND PROBIOTIC: THE ROLE OF GALACTOOLIGOSACHARIDES AS PREBIOTIC ADDITIVES: A REVIEW

Monika Vidová, Helena Hronská, Silvia Tokošová, Michal Rosenberg

Potravinarstvo, vol. 7, no. 1, 2013, p. 28-35, [\[abstract\]](#) doi:10.5219/251 [\[fulltext\]](#)

MORPHOLOGICAL, BIOCHEMICAL AND SENSORY CHARACTERISTICS OF BLACK MULBERRY FRUITS (*MORUS NIGRA* L.)

Ján Brindza, Lucia Kucelová, Andrej Sinica, Beáta Stehlíková, Marcela Čuláková

Potravinarstvo, vol. 7, no. 1, 2013, p. 36-44, [\[abstract\]](#) doi:10.5219/234 [\[fulltext\]](#)

MICROWAVE MILK PASTEURIZATION WITHOUT FOOD SAFETY RISK

Péter Korzenszky, Péter Sembery, Gábor Géczy

Potravinarstvo, vol. 7, no. 1, 2013, p. 45-48, [\[abstract\]](#) doi:10.5219/260 [\[fulltext\]](#)

MEASUREMENT OF THE RESIDUAL GASES O₂ AND CO₂ IN MEAT PRODUCTS PACKED IN MODIFIED ATMOSPHERE

Jozef Čapla, Peter Zajác, Jozef Čurlej, Ľubomír Lopašovský, Vladimír Vietoris

Potravinarstvo, vol. 7, no. 1, 2013, p. 49-52, [\[abstract\]](#) doi:10.5219/261 [\[fulltext\]](#)

HOP PELLETS AS AN INTERESTING SOURCE OF ANTIOXIDANT ACTIVE COMPOUNDS

Andrea Holubková, Silvia Mošovská, Barbora Baloghová, Ernest Šturdík

Potravinarstvo, vol. 7, no. 1, 2013, p. 53-57, [\[abstract\]](#) doi:10.5219/270 [\[fulltext\]](#)

**EXPOSURE AND RISK ASSESSMENT OF STAPHYLOCOCCUS AUREUS IN FOOD CHAIN
IN SLOVAKIA**

Lubomír Valík, Alžbeta Medved'ová

Potravinarstvo, vol. 7, no. 1, 2013, p. 58-62, [\[abstract\]](#) doi:10.5219/263 [\[fulltext\]](#)

MODELING OF BACILLUS CEREUS DISTRIBUTION IN PASTEURIZED MILK AT THE TIME OF CONSUMPTION

Pavel Ačaj, Lubomír Valík, Denisa Liptáková, Jana Minarovičová

Potravinarstvo, vol. 7, no. 1, 2013, p. 63-66, [\[abstract\]](#) doi:10.5219/264 [\[fulltext\]](#)

COMPARISON OF TEXTURAL ATTRIBUTES OF SELECTED MEAT SAUSAGES USING INSTRUMENTAL ANALYSIS

Jozef Čurlej, Peter Zajác, Jozef Čapla, Vladimír Vietoris, Lubomír Lopašovský

Potravinarstvo, vol. 7, no. 1, 2013, p. 67-70, [\[abstract\]](#) doi:10.5219/273 [\[fulltext\]](#)

**CONTRIBUTION OF TEMPORAL DOMINANCE OF SENSATIONS METHOD TO THE SENSORY DESCRIPTION OF
TASTE PROPERTIES OF COMMERCIAL GREEN TEA BRANDS**

Trembecká, Tomáš Fekete, Zuzana Beňová, Noémi Dubová

Potravinarstvo, vol. 7, no. 1, 2013, p. 71-75, [\[abstract\]](#) doi:10.5219/274 [\[fulltext\]](#)

AETHEROLEUM AND FAT OXIDATION OF CHICKEN MEAT

Jana Tkáčová, Mária Angelovičová

Potravinarstvo, vol. 7, no. 1, 2013, p. 76-79, [\[abstract\]](#) doi:10.5219/267 [\[fulltext\]](#)

**THE EFFECT OF THE PROBIOTICS BACILLUS SUBTILIS (PB6) ON THE SELECTED INDICATORS OF THE TABLE
EGGS QUALITY, FAT AND CHOLESTEROL**

Mária Angelovičová, Ebrahim Alfaig, Martin Král, Jana Tkáčová

Potravinarstvo, vol. 7, no. 1, 2013, p. 80-84, [\[abstract\]](#) doi:10.5219/271 [\[fulltext\]](#)

SAFETY AND FORTIFICATION WITH FOLIC ACID IN NEONATAL PERIOD

Tatiana Žikavská, Ingrid Brucknerová

Potravinarstvo, vol. 7, no. 1, 2013, p. 85-88, [\[abstract\]](#) doi:10.5219/269 [\[fulltext\]](#)

ANTIOXIDANT AND ANTIPROTEINASE EFFECTS OF BUCKWHEAT HULL EXTRACTS

Martina Danihelová, Ernest Šturdík

Potravinarstvo, vol. 7, no. 1, 2013, p. 89-94, [\[abstract\]](#) doi:10.5219/272 [\[fulltext\]](#)

CELIAC DISEASE AND GLUTEN-FREE DIET

Eva Hybenová, Júlia Štofirová, Anna Mikulajová

Potravinarstvo, vol. 7, no. 1, 2013, p. 95-100, [\[abstract\]](#) doi:10.5219/276 [\[fulltext\]](#)

**OILSEED RAPE AS FEEDSTOCK FOR BIODIESEL PRODUCTION IN RELATION TO THE ENVIRONMENT AND HUMAN
HEALTH**

Michal Angelovič, Zdenko Tkáč, Marek Angelovič

Potravinarstvo, vol. 7, no. 1, 2013, p. 101-106, [\[abstract\]](#) doi:10.5219/278 [\[fulltext\]](#)

SENSORY EVALUATION FOR BROILER MEAT AFTER ADDITION SLOVAK BEE POLLEN IN THEIR FEED MIXTURE

Ibrahim Omer Elamin Elimam, Peter Haščík, Jozef Garlík, Marek Bobko

Potravinarstvo, vol. 7, no. 1, 2013, p. 107-110, [\[abstract\]](#) doi:10.5219/280 [\[fulltext\]](#)

THE EFFECT OF IODINE IN PRODUCTION OF BROILER CHICKENS AND SELECTED QUALITY INDICATORS OF BREAST MUSCLES

Mária Angelovičová, Marieta Semivanová

Potravinarstvo, vol. 7, no. 1, 2013, p. 111-119, [\[abstract\]](#) doi:10.5219/297 [\[fulltext\]](#)

APPLYING THE PRINCIPLES OF WELFARE AND QUALITY OF PRODUCTION IN THE ORGANIC FARM OF THE LAYING HENS

Mária Angelovičová, Martin Mellen, Jana Zdechovanová

Potravinarstvo, vol. 7, no. 1, 2013, p. 120-129, [\[abstract\]](#) doi:10.5219/298 [\[fulltext\]](#)

EVALUATION OF ANTHOCYANIN CHANGES IN BLUEBERRIES AND IN BLUEBERRY JAM AFTER THE PROCESSING AND STORAGE

Andrea Mendelová, Ľubomír Mendel, Martina Fikselová, Peter Czako

Potravinarstvo, vol. 7, no. 1, 2013, p. 130-135, [\[abstract\]](#) doi:10.5219/293 [\[fulltext\]](#)

CONTENT OF AMINO ACIDS AND MINERALS IN SELECTED SORTS OF LEGUMES

Petra Vojtíšková, Pavel Švec, Stanislav Kráčmar

Potravinarstvo, vol. 7, no. 1, 2013, p. 136-140, [\[abstract\]](#) doi:10.5219/299 [\[fulltext\]](#)

EFFET OF DRYING TEMPERATURE ON LYCOPENE CONTENT OF PROCESSED TOMATOES

Andrea Mendelová, Ľubomír Mendel, Martina Fikselová, Peter Czako

Potravinarstvo, vol. 7, no. 1, 2013, p. 141-145, [\[abstract\]](#) doi:10.5219/300 [\[fulltext\]](#)

QUALITY AND AVAILABILITY OF ORGANIC FOODS BY SLOVAK CONSUMERS

Dagmar Kozelová, Vladimír Vietoris, Martina Fikselová

Potravinarstvo, vol. 7, no. 1, 2013, p. 146-150, [\[abstract\]](#) doi:10.5219/306 [\[fulltext\]](#)

STUDY OF ANTIOXIDANT ACTIVITY OF NATURAL FOOD SUPPLEMENTS

Tetyana Lozova

Potravinarstvo, vol. 7, no. 1, 2013, p. 151-155, [\[abstract\]](#) doi:10.5219/307 [\[fulltext\]](#)

TEXTURAL PROPERTIES OF SELECTED SLOVAK COW AND SHEEP PRODUCTS MEASURED BY TEXTUROMETER

Mária Angelovičová, Mária Angelovičová, ml.

Potravinarstvo, vol. 7, no. 1, 2013, p. 156-163, [\[abstract\]](#) doi:10.5219/308 [\[fulltext\]](#)

THE CHANGES OF THE POLYPHENOL CONTENT AND ANTIOXIDANT ACTIVITY IN POTATO TUBERS (SOLANUM TUBEROSUM L.) DUE TO NITROGEN FERTILIZATION

Janette Musilová, Jaromír Lachman, Judita Bystrická, Zuzana Poláková, Peter Kováčik, Diana Hrabovská

Potravinarstvo, vol. 7, no. 1, 2013, p. 164-170, [\[abstract\]](#) doi:10.5219/305 [\[fulltext\]](#)

EVALUATION OF DIET QUALITY INDICATORS IN ADULTS

Katarína Fatrcová-Šramková

Potravinarstvo, vol. 7, no. 1, 2013, p. 171-180, [\[abstract\]](#) doi:10.5219/302 [\[fulltext\]](#)

OCCURENCE OF ANTIBIOTIC RESISTANT ENTEROCOCCI ON SKIN OF TEATS AND TEAT CUPS OF MILKING MACHINE

Anna Krebs Artimová, Viera Ducková, Miroslav Kročko

Potravinarstvo, vol. 7, no. 1, 2013, p. 181-185, [\[abstract\]](#) doi:10.5219/310 [\[fulltext\]](#)

COMPARISON OF THE SENSITIVITY OF DETERMINING SOYEABEAN ALLERGENS BY ELISA METHOD AND SYBR GREEN I

Jozef Golian, Ľubomir Belej, Radoslav Židek, Jozef Trandžík, Jozef Čapla, Peter Zajác

Potravinarstvo, vol. 7, no. 1, 2013, p. 186-190, [\[abstract\]](#) doi:10.5219/311 [\[fulltext\]](#)

THE EFFECT OF INDIVIDUAL PHOSPHATE EMULSIFYING SALTS AND THEIR SELECTED BINARY MIXTURES ON HARDNESS OF PROCESSED CHEESE SPREADS

František Buňka, Gabriela Nagyová, Richados Nikolaos Salek, Michaela Černíková, Helena Bacova, Stanislav Kráčmar

Potravinarstvo, vol. 7, no. 1, 2013, p. 191-196, [\[abstract\]](#) doi:10.5219/312 [\[fulltext\]](#)

TEXTURAL PROPERTIES OF CHICKEN BREAST TREATED BY DIFFERENT MEANS

Jozef Čurlej, Eva Čurlejová, Peter Zajác, Jozef Čapla

Potravinarstvo, vol. 7, no. 1, 2013, p. 197-201, [\[abstract\]](#) doi:10.5219/313 [\[fulltext\]](#)

POSITION OF FOLIC ACID IN FORTIFICATION OF NUTRITION IN NEONATAL PERIOD

Tatiana Žikavská, Ingrid Brucknerová

Potravinarstvo, vol. 7, no. 1, 2013, p. 202-206, [\[abstract\]](#) doi:10.5219/303 [\[fulltext\]](#)

RELATIONSHIP BETWEEN MASTITIS CAUSATIVE PATHOGENS AND SOMATIC CELL COUNTS IN MILK OF DAIRY COWS

Sharaf Eldeen Idriss, Vladimír Tančín, Vladimír Foltys, Katarína Kirchnerová, Dana Tančinová, Martina Vršková

Potravinarstvo, vol. 7, no. 1, 2013, p. 207-212, [\[abstract\]](#) doi:10.5219/304 [\[fulltext\]](#)



**KATEDRA HYGIENY
A BEZPEČNOSTI POTRAVÍN**

**Predmety zabezpečované katedrou na bakalárskom a inžinierskom
stupni štúdia**

Predmet	Gestor	Vyučujúci
Hygiena potravín*	prof. Ing. Jozef Golian, Dr.	prof. Ing. Jozef Golian, Dr. Ing. Lucia Zeleňáková, PhD. Ing. Simona Kunová, PhD. Ing. Ondrej Revák
Legislatíva a kontrola potravín*	prof. Ing. Jozef Golian, Dr.	prof. Ing. Jozef Golian, Dr. Ing. Jozef Čapla, PhD. Ing. Pavol Bajzík
Bezpečnosť potravín*	prof. Ing. Jozef Golian, Dr.	prof. Ing. Jozef Golian, Dr. MVDr. Ľubomír Lopašovský, PhD.
Hygiena výživy a stravovania	Ing. Lucia Zeleňáková, PhD.	Ing. Lucia Zeleňáková, PhD. Ing. Ľubomír Belej Ing. Jana Tkáčová
Ochorenia z potravín*	Ing. Lucia Zeleňáková, PhD.	Ing. Lucia Zeleňáková, PhD. Ing. Jana Tkáčová
Sanitácia v potravinárstve*	Ing. Simona Kunová, PhD.	Ing. Simona Kunová, PhD. Ing. Pavol Bajzík
Falšovanie a autentifikácia potravín	Ing. Alica Bobková, PhD.	Ing. Martina Fikselová, PhD. Ing. Alica Bobková, PhD.
Všeobecná hygiena potravín	MVDr. Ľubomír Lopašovský, PhD.	MVDr. Ľubomír Lopašovský Ing. Ľubica Mrázová
Ochrana zvierat a produkcia potravín*	prof. Ing. Mária Angelovičová, CSc.	prof. Ing. Mária Angelovičová, CSc. Ing. Martin Kliment
Správna hygienická prax v potravinárstve*	Ing. Jozef Čapla, PhD.	Ing. Jozef Čapla, PhD.
Hygiena distribúcie a predaja potravín	Ing. Peter Zajác, PhD.	Ing. Peter Zajác, PhD. Ing. Ľubomír Belej
Verejné zdravie a produkcia potravín	Ing. Alica Bobková, PhD.	Ing. Alica Bobková, PhD.
Epidemiológia a alergie z potravín	MVDr. Ľubomír Lopašovský, PhD.	MVDr. Ľubomír Lopašovský, PhD. Ing. Martina Fikselová, PhD.
Riziká pri produkcii potravín*	prof. Ing. Mária Angelovičová, CSc.	prof. Ing. Mária Angelovičová, CSc.
Hodnotenie rizík	prof. Ing. Mária Angelovičová, CSc.	prof. Ing. Mária Angelovičová, CSc. Ing. Simona Kunová, PhD.
Akreditácia a certifikácia v potravinárstve	Ing. Peter Zajác, PhD.	Ing. Peter Zajác, PhD.
Zdravotná bezpečnosť potravín	Ing. Martina Fikselová, PhD.	Ing. Martina Fikselová, PhD.
Imunoanalýzy v biológii a potravinárstve*	Ing. Radoslav Židek, PhD	Ing. Radoslav Židek, PhD. Ing. Lenka Maršáľková
Seminár k praxi	Ing. Dagmar Kozelová, PhD	Ing. Dagmar Kozelová, PhD.
Teória metodológia záverečnej práce	prof. Ing. Jozef Golian, Dr.	prof. Ing. Jozef Golian, Dr. Ing. Dagmar Kozelová, PhD.
Informačné zdroje v biológii a potravinárstve	Ing. Jozef Čurlej, PhD.	Ing. Jozef Čurlej, PhD.

* Predmety označené hviezdíčkou sa vyučujú aj v anglickom jazyku.

H A C C P

C O N S U L T I N G

PODPORUJEME VEDU A VÝSKUM

www.haccp.sk

FAKULTA BIOTECHNOLÓGIE A POTRAVINÁRSTVA
SLOVENSKEJ POĽNOHOSPODÁRSKEJ UNIVERZITY V NITRE
KATEDRA HYGIENY A BEZPEČNOSTI POTRAVÍN



**KATEDRA HYGIENY
A BEZPEČNOSTI POTRAVÍN**

IX. VEDECKÁ KONFERENCIA S MEDZINÁRODNOU ÚČASŤOU

**BEZPEČNOSŤ A KONTROLA
POTRAVÍN**

28. – 29. marca 2012
Nitra, Slovenská republika



Školenia pre potravinárske firmy

Školenia sú akreditované Ministerstvom školstva SR

- **Školenie:** Zásady Správnej výrobnjej praxe a systému HACCP. Osobná hygiena a prevádzková hygiena.
- **Školenie:** Systém manažérstva bezpečnosti potravín podľa STN EN ISO 22000:2005
- **Individuálny prístup, školenie priamo u Vás, modelové situácie**

**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