

4

2010



Vedecký časopis pre potravinárstvo

číslo

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

ročník 4  
číslo 4  
november 2010

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

## Potravinárstvo

### Vedecký časopis pre potravinárstvo

**Šéfredaktor:**

Ing. Peter Zajác, PhD.  
SPU Nitra

**Zástupca šéf redaktora:**

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

**Redaktori:**

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

**Predseda redakčnej rady:**

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

**Redakčná rada:**

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

## Potravinárstvo

### Scientific Journal for Food Industry

**Editor:**

Peter Zajác  
SUA Nitra

**Deputy of Editor:**

Jozef Golian  
SUA Nitra

**Sub-Editor:**

Radoslav Židek,  
Jozef Čapla,  
Vladimír Vietoris  
SUA Nitra

**Chairman, Editorial Board:**

Jozef Golian,  
SUA Nitra

**Editorial Board:**

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

• **Potravinárstvo**® • **Ročník:** 4, č. 4/2010 • Vedecký časopis pre potravinárstvo • Scientific Journal for Food Industry • **Vydavateľ:** Ing. Peter Zajác, HACCP Consulting, Slivková 12, 951 01 Nitrianske Hrnčiarovce. Vydavateľ úzko spolupracuje s Katedrou hygieny a bezpečnosti potravín, FBP, SPU v Nitre • **Nakladateľ:** Združenie HACCP Consulting, Slivková 12, 951 01 Nitrianske Hrnčiarovce • **Periodicita:** vychádza 4x do roka • **Internetová stránka časopisu:** [www.potravinarstvo.com](http://www.potravinarstvo.com) • **Adresa redakcie:** Slivková 12, 951 01 Nitrianske Hrnčiarovce • **E-mail:** [info@potravinarstvo.com](mailto:info@potravinarstvo.com) • **Tel.:** +421908164361, +421904138562 • **Jazyková úprava:** Publikované články neprešli jazykovou úpravou • **Grafická úprava:** Flame-studio Nitra • **Tlač:** SPU Nitra • **Cena čísla:** nepredajné • **Distribuuje:** Združenie HACCP Consulting • **Náklad:** 150 ks • **Miesto vydania:** Nitra • **Právne informácie a autorské práva:** Za obsah jednotlivých článkov zodpovedajú autori. Za obsah inzerátov zodpovedajú inzerenti • Časopis je indexovaný v databázach: UIUC OAI registry, OAIster, AGRIS FAO, Google Scholar a CrossRef.

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



Katedra hygieny a bezpečnosti  
potravín



**INFLUENCE OF NATURAL ADDITIVES ON PROTEIN COMPLEX OF BREAD***Tatiana Bojňanská, Dana Urminská***ABSTRACT**

The study focuses on researching the influence of natural additives on certain technological characteristics of mixtures used for bread production, more particularly the influence of N substances in used raw material on selected qualitative parameters of bread. The blends for bread production to be analysed were prepared by mixing wheat flour with an addition of oat, buckwheat, lentil and chickpea wholegrain flour in different portions (10, 20, 30, 40 and 50 %). The experiment showed that the addition of natural additives worsened the protein complex of the blends used in bread production (worsening also qualitative parameters known as product volume). The loaves prepared with an addition of buckwheat, oat, lentil and chickpea were evaluated to be of a lesser quality from a technological viewpoint when compared with pure wheat loaves. The lower content of gluten forming proteins and the generally changed protein composition of blends due to additives caused a lower percentage of wet gluten content, its lower extensibility and swelling capacity. The sedimentation value (Zeleny index) decreased proportionally with the increase of addition until the level was unsatisfactory for raw material intended for bakery purposes. The N content in experimental loaves was higher than in the reference loaves and it increased according to the selected additive and its portion in the blend (more with the addition of lentil and chickpea, less in case of buckwheat and oat) which is considered as positive from a nutritional point of view. But from the technological point of view the additives did not show any positive influence and caused a lower loaf bread volume. The most significant decrease of the loaf bread volume was found with the addition of 50 % of buckwheat (- 45.6 %). Better results were obtained with a lower portion of the additive: loaf with an addition of 30 % of chickpea (volume decreased by 12.8 %) > loaf with an addition of 30 % of lentil (volume decreased by 8.7 %) > loaf with an addition of 10 % of oat (volume decreased by 14.3 %) > loaf with an addition of 10 % of buckwheat (volume decreased by 22.7 %). Such products can be considered as technologically good or at least satisfactory. To increase the volume of bread loaves, 3 % of vital wheat gluten was added to blends mixed with a portion of 30 % and 50 % of additives. The results were not adequate however. The only exception was buckwheat, where the loaf volume was satisfactory despite the addition of 30 %.

**Keywords:** bread, oat, buckwheat, lentil and chickpea addition, N content, loaf volume

**ÚVOD**

Kvalitu chleba a pečiva, predovšetkým jeho objem, ovplyvňuje vo veľmi významnej miere bielkovinový komplex surovín použitých na ich výrobu. Bielkoviny pšenice sú zložitá heterogénne látky, ktoré v súvislosti so svojím zložením majú rôzne vlastnosti a špecificky ovplyvňujú technológiu spracovania a kvalitu finálnych produktov. Pozostávajú z viacerých frakcií, resp. subfrakcií s charakteristickými vlastnosťami a aminokyselinovým zložením, a tým aj s rôznou terciálnou a kvartérnou štruktúrou. Zásobné bielkoviny tvorené frakciami gliadínov a glutenínov sú z nutričného hľadiska nepľnohodnotné, majú však významný vplyv na technologickú kvalitu pšenice (Baldshiev et al. 1997, Sapirstein and Fu, 1998, Hubík 2000, Bojňanská 2004, kolektív autorov 2006, Michalík et al. 2007).

Najdôležitejšou vlastnosťou pšeničných bielkovín je ich schopnosť tvoriť lepok, čo je trojrozmerný útvar, ktorého peptidické reťazce sú pospájané vodíkovými, disulfidickými a metylénovými mostíkmi. Z hľadiska koloidiky je hydrofilným gélom a má schopnosť napučiať vo vodnom prostredí a zväčšovať tak svoj objem. Je nesporné, že má kľúčovú úlohu pre kvalitu pečiva a jeho význam pre pekársku technológiu spočíva v tom, že pri vypracovaní cesta napomáha vytvárať z neho tenké blanky, ktoré zadržujú kvasný plyn, umožňujú nakysnutie cesta, jeho prepečenie a pórovitú štruktúru pekárskeho výrobku. Množstvo lepku vyjadreného ako „mokry lepok“ v % je odporúčaným ukazovateľom, ktorý je definovaný v legislatívne stanovených požiadavkách na potravinársku pšenicu a v závislosti od konkrétnej triedy

kvality sa má pohybovať v hodnotách nad 20 % (trieda kvality P pečivárenská), až nad 27 % (trieda kvality E elitná).

V ostatnom čase je prezentovaný značný záujem o výrobu potravín každodennej spotreby vrátane chleba a pečiva so zvýšenou nutričnou hodnotou, čo je možné dosiahnuť vhodnými prídavkami nepekárskych surovín, napríklad pohánky, ovsu, strukovín a ďalších maloobjemových plodín s významnou nutričnou hodnotou. Strukoviny majú množstvo nutričných výhod, predovšetkým vysoký obsah dusíkatých látok, z ktorých najväčší podiel tvoria bielkoviny. Najdôležitejšou bielkovinovou frakciou strukovín sú globulíny, ktoré môžu tvoriť 50 až 60 % z celkových bielkovín (Juliano 1999). Biologická hodnota bielkovín strukovín je daná ich aminokyselinovým zložením a je považovaná za pomerne vysokú (Khattoon a Prakash 2004). Boli zistené pozitívne vplyvy konzumácie strukovín pridaných do cereálnych potravín na zdravotný stav konzumentov (Yanez-Farias et al. 1999, Pittaway et al. 2007). Ďalšou zaujímavou surovinou, ktorú je možné využiť na výrobu chleba v zmesiach so pšeničnou múkou, je pohánka, ktorej je v ostatných rokoch venovaná pomerne značná pozornosť, predovšetkým v súvislosti so zaujímavým nutričným zložením, priaznivou skladbou bielkovín, minerálnych látok, vysokým obsahom vlákniny a významným obsahom flavonoidov (Francischi et al. 1994, Steadman et al. 2001, Stibilj et al. 2004). Ovos je z nutričného a dietetického hľadiska vysoko cenený ako bohatý zdroj vlákniny, predovšetkým  $\beta$ -D-glukánov, ktoré majú

vysokú imunoaktivitu, zlepšujú metabolické procesy a majú ďalšie vlastnosti ovplyvňujúce nutričnú aj senzoryckú hodnotu potravín (Capouchová et al. 2004).

Význam prídavku týchto látok z nutričného hľadiska je zrejmý (Bojňanská et al. 2009), väčším problémom sú nežiaduce zmeny technologickej kvality takýchto surovín, ktoré vedú k zhoršeniu výsledných parametrov kvality pekárskeho výrobku.

Cieľom príspevku je informovať o vplyve prírodných aditívnych látok na niektoré technologické vlastnosti zmesi používaných na výrobu chleba, resp. na vybrané kvalitatívne parametre chleba ovplyvňované predovšetkým dusíkatými látkami použitých surovín.

## MATERIÁL A METODIKA

Na Katedre skladovania a spracovania rastlinných produktov Fakulty biotechnológie a potravinárstva Slovenskej poľnohospodárskej univerzity v Nitre bol na prípravu pokusných chlebov ako prídavok použitý cícer (celozrnný jemný šrot), šošovica (celozrnný jemný šrot), pohánka (termicky lúpané krúpy upravené na jemný šrot) a nahý ovos (celozrnný jemný šrot) v množstve 10 %, 20 %, 30 %, 40 % a 50 % ku pšeničnej múke T 512, resp. T 650. Pokusné suroviny boli analyzované na množstvo N-látok (x 5,7, resp. x 6,25, Kjeldahl), množstvo mokrého lepku (G<sub>30</sub>), jeho vlastnosti (T<sub>30</sub>, Q<sub>30</sub>) a Zelenyho index (ICC štandardy). Pokusný chlieb bol pripravovaný zo zmesi: pšeničná múka + cícer, šošovica, pohánka, ovos v stanovených pomeroch, voda podľa väznosti múky, soľ, sacharóza a droždie. Cesto kyslo v kysiarni v stanovených teplotných podmienkach a následne boli upečené pokusné bochníky, ktoré boli objektívne a subjektívne hodnotené. Boli vybrané nasledovné objektívne ukazovatele technologickej kvality: objemu výrobku (cm<sup>3</sup>) a obsah dusíkatých látok (N x 5,7, Kjeldahl).

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

Podľa očakávaní bol najvyšší obsah N-látok zistený v strukovinách, takže tie môžeme zo zvolených surovín považovať za najlepší zdroj bielkovín (tabuľka 1). Bielkoviny strukovín sa vyznačujú zaujímavou aminokyselinovou skladbou, pričom významný je najmä vysoký obsah lyzínu (Vojtaššáková et al. 1999), ktorý je v stredoeurópskej strave tradične založenej na konzumácii výrobkov zo pšenice nedostatkovým. V strukovinách je relatívny nedostatok sírných aminokyselín, na druhej strane, ich dostatočnými množstvami sa vyznačujú práve cereálie. Znamená to, že strukoviny sú výborným doplnkom k cereálnej strave a naopak. Pokiaľ sú strukoviny v strave zmiešané s cereáliami, objavuje sa aj efekt komplementarity (Juliano 1999).

Tabuľka 1 Obsah N-látok vo vstupných surovinách použitých pri výrobe chleba, %

	Pšeničná múka	Pohánka	Cícer	Šošovica	Ovos
	T	T			
	512	650			
N x	12,2	12,5	14,3		
5,7					
N x			20,7	27,4	13,4
6,25					

N - množstvo dusíka stanoveného Kjeldahlou metódou, %

Lepešie aminokyselinové zloženie ako pšenica majú aj bielkoviny pohánky a ova, takže prídavok všetkých týchto surovín je možné považovať za nutričný prínos. Komponentná skladba bielkovinového komplexu pohánky je reprezentovaná vysokým podielom protoplazmatických bielkovín albumínov a globulínov s priaznivým aminokyselinovým zložením (sú bohaté na histidín, treonín, valín, fenylalanín, izoleucín, leucín, metionín) a minimálnym obsahom prolamínov, vďaka čomu nachádza pohánka uplatnenie aj v bezpečnej diete (Eggum et al. 1980, Francischi et al. 1994, Michalová 2001, Bonafaccia a Fabjan 2003, Hauptvogel et al. 2005, Guo a Yao 2006, Urmínská et al. 2009). Aj ovos je z nutričného a dietetického hľadiska vysoko cenený, jeho vysoká energetická a nutričná hodnota vyplýva z vysokého obsahu biologicky hodnotných bielkovín s významným zastúpením esenciálnych aminokyselín (metionín 2,5 %, valín 6,4 %, izoleucín 3,9 %, leucín 7,4 %, fenylalanín 5,3 % a tryptofán 1,7 %) (Asp et al. 1999), vysokého obsahu tuku, priaznivého zloženia sacharidov, vysokého obsahu rozpustnej vlákniny, vitamínov B, E a minerálnych látok (Bonafaccia a Fabjan 2003). Nevýhodou je citlivosť na poškodenie klíčku, po ktorom môže prísť k zažlknutiu a zhorknutiu.

Tabuľka 2 Lepok a jeho vlastnosti v použitých múkach

	G <sub>30</sub> , %	T <sub>30</sub> , cm	Q <sub>30</sub> , cm <sup>3</sup>	ZI, cm <sup>3</sup>
T 512	26,6	10,0	21,0	38,0
T 650	35,6	15,0	17,7	28,5

G<sub>30</sub> množstvo mokrého lepku vypratého po odležaní

T<sub>30</sub> ťažnosť lepku

Q<sub>30</sub> napúchavosť lepku

ZI sedimentačný test stanovený podľa Zelenyho

Zvyšovanie sa množstva bielkovín v zmesiach s prídavkom strukovín a ďalších surovín však nezvyšilo ich technologickú hodnotu, naopak, nutričná hodnota nie je v súlade s technologickou kvalitou a reálne množstvo lepkotvorných bielkovín sa znížilo, čo sa v konečnom dôsledku prejavilo znížením objemu pokusných bochníkov (tabuľka 5).

Z technologického hľadiska je dôležité množstvo lepku a jeho vlastnosti, ktoré mali v použitých pšeničných múkach veľmi dobré parametre vyhovujúce daným typom múk (tabuľka 2). Z fyzikálnych vlastností napučaného lepkového gélu je najdôležitejšia jeho schopnosť udržať si pevnú konzistenciu, slabý lepok totiž podlieha peptizácii, po čiastočnom napučaní sa rozplýva a nie je schopný trvalo udržať svoju štruktúru a prispievať tak k udržaniu oxidu uhličitého v striedke, t.j. k vytváraniu správnej pórovitosti striedky a optimálnemu tvaru finálneho výrobku (Muchová 2001).

Po prídavku cíceru (ktorý je prezentovaný ako príklad) sa v zmesiach význame znižovalo množstvo lepku, jeho ťažnosť, napúchavosť, aj hydratačná schopnosť bielkovín vyjadrená ako Zelenyho index (tabuľka 3), čo je možné považovať za nepriaznivý a neželaný jav. Pri prídavku cíceru v množstve 50 % sa lepok pri hodnotení jeho napúchavosti úplne rozplynul a nebolo možné ho stanoviť.



**Tabuľka 3 Lepok a jeho vlastnosti v zmesiach s prídavkom cíceru**

	G <sub>30</sub> , %	T <sub>30</sub> , cm	Q <sub>30</sub> , cm <sup>3</sup>	ZI, cm <sup>3</sup>
Kontrola	28,3	11,0	22,0	34,0
Cícer 10 %	26,0	10,0	21,0	29,0
Cícer 20 %	21,5	10,0	20,0	24,0
Cícer 30 %	13,5	9,0	20,0	21,0
Cícer 40 %	13,5	8,0	16,0	18,0
Cícer 50 %	10,1	6,0	-	11,0

G<sub>30</sub> množstvo mokrého lepku vypratého po odležaní  
 T<sub>30</sub> ťažnosť lepku  
 Q<sub>30</sub> napúčavosť lepku  
 ZI sedimentačný test stanovený podľa Zelenyho

Zistené výsledky predikujú zhoršujúcu sa technologickú akosť použitých zmesí spôsobenú zmenami frakčného zloženia bielkovín surovín, a to napriek tomu, že celkové množstvo N-látok v zmesiach sa zvyšovalo.

Pri hodnotení upечených pokusných bochníkov bol v nadväznosti na uvedené zistený v závislosti od použitých prídavkov vyšší percentuálny obsah N-látok ako v kontrolných pšeničných bochníkoch (tabuľka 4).

Najvyšší obsah bielkovín bol v bochníkoch s prídavkom šošovice a cíceru, v ktorých pri najvyššom podiele prídavku (50 %) vzrástol v porovnaní s kontrolou o 25 % (cícer), resp. až o 37,8 % (šošovica). Najnižší nárast bol

**Tabuľka 4 Obsah N-látok v % (x 5,7, resp. 6,25\*) v pokusných chleboch s prídavkom pohánky, cíceru, šošovice a ovsu**

	T 512	Pohánka	T 512	Cícer	T 512	Šošovica	T 512	Ovos
Kontrola	11,4	*14,5	12,6	*20,7	11,8	*27,5	12,9	*13,4
prídavok 10%	11,7		12,3		12,5		11,4	
prídavok 20%	12,0		13,0		13,1		11,2	
prídavok 30%	13,2		13,8		14,4		12,8	
prídavok 40%	13,4		14,7		15,5		13,1	
prídavok 50%	13,6		15,7		16,3		13,4	

zistený v bochníku s prídavkom ovsu (o 4 %), ale aj tu predpokladáme určité nutričné benefity spôsobené inou frakčnou skladbou a aminokyselinovým zložením ovsu (Eppendorfer 2006, Moudrý a Šterba 2006).

Množstvo N-látok, množstvo lepku a jeho vlastnosti sú považované za nepriame ukazovatele technologickej (pekárskej) kvality chlebopekárskych surovín. Nepriame ukazovatele stanovenia kvality nám do určitej miery napovedia aký finálny výrobok je možné z danej suroviny (zmesi) očakávať, skutočnú hodnotu však potvrdí až vlastné spracovanie suroviny – pekársky pokus, ktorý simuluje výrobné procesy v reálnych prevádzkach. Výsledky pokusného pečenia nie je možné kvantifikovať jednoducho a na jeho vyjadrenie je používaných viacero ukazovateľov s rozdielnou objektívnou mierou presnosti (Prugar et al. 2008). Všetky v príspevku prezentované pekárske pokusy boli realizované za rovnakých podmienok a z množstva výsledkov bol vybraný najvýznamnejší ukazovateľ pekárskej kvality – objem výrobku. Z tabuľky 5 jednoznačne vyplýva, že prídavok prírodných aditív

znižoval objem pokusných bochníkov, aj keď s rozdielnou mierou v závislosti od použitej suroviny. Z hľadiska objemu boli zistené najnižšie straty objemu pri najvyššom podiele prídavku pri ovse (- 27,6 %), pri cíceru (- 34,1 %) a pri šošovici (- 37,9 %). Prídavok pohánky spôsobil najvýznamnejšie zníženie objemu výrobku, až o 54,6 %.

**Tabuľka 5 Objem pokusných bochníkov, cm<sup>3</sup>**

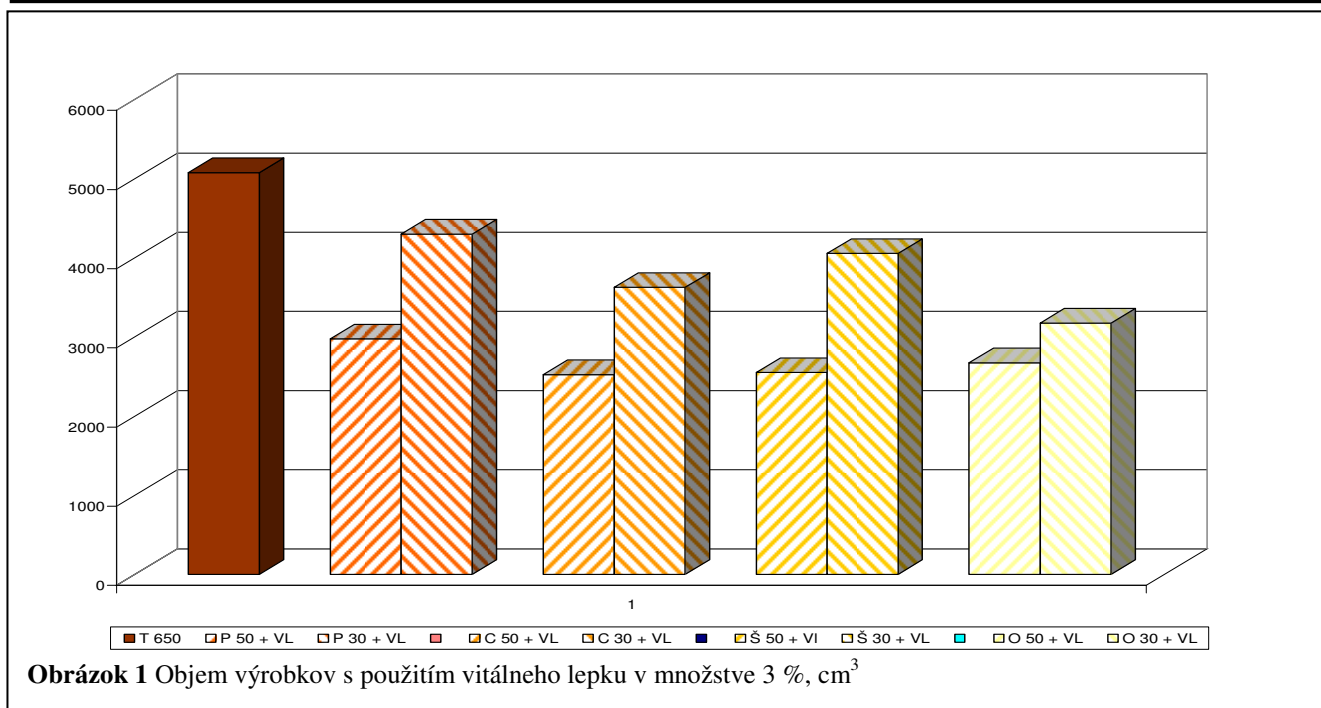
	Pohánka + T512	Cícer + T512	Šošovica+ T650	Ovos+ T650
Kontrola	970	820	1030	1050
prídavok 10 %	750	860	860	900
prídavok 20 %	580	810	940	740
prídavok 30 %	530	720	765	760
prídavok 40 %	480	680	630	780
prídavok 50 %	440	540	640	760

T512, T650 použité pšeničné múky

Oveľa lepšie výsledky boli zaznamenané, ak prídavky boli do výšky 20 %, resp. 30 %, kedy dokonca v prípade cíceru bolo zistené zvýšenie objemu v zmesi v porovnaní s kontrolou. Pokles objemu o 22,7 % pri výrobku s prídavkom pohánky 10 %, o 12,2 % s prídavkom cíceru

30 %, o 8,7 % s prídavkom šošovice 20 % a o 14,3 % s prídavkom ovsu 10 % nie je významný, a takéto výrobky je možné považovať za technologicky kvalitné, resp. aspoň uspokojivé.

S cieľom vylepšiť technologickú kvalitu pri zachovaní nutričných výhod zvolených nepekárskych surovín bol k zmesiam s ich prídavkom 30 % a 50 % prídávaný vitálny lepok v množstve 3 % (obrázok 1), prínos však nebol adekvátny, objem bochníkov sa významne nezvýšil a v porovnaní s kontrolou bol nedostatočný. Najhoršie parametre boli zistené pri bochníku s prídavkom ovsu, pri ktorom bolo zníženie objemu v porovnaní s kontrolou takmer 35 % a najlepšie s prídavkom pohánky a šošovice, pri ktorých bolo zníženie objemu v porovnaní s kontrolou 13,4 %, resp. 18,5 %. Prídavok vitálneho lepku nezabezpečil objem výrobkov na úrovni kontroly, v prípade pohánky však umožnil vyrobiť výrobok s jej podielom 30 % a zároveň vyhovujúcim objemom.



Obrázok 1 Objem výrobkov s použitím vitálneho lepku v množstve 3 %, cm<sup>3</sup>

## ZÁVER

Na základe zistení prezentovaných v príspevku je možné uviesť, že prídavok prírodných aditív, v tomto prípade nepekárskych surovín (pohánky, cícerca, šošovica a ovs), z technologického hľadiska zhoršil bielkovinový komplex zmesi použitých pri výrobe chleba, čím sa zhoršili aj kvalitatívne parametre vyjadrené ako objem získaného výrobku.

Obsah dusíkatých látok bol v nepekárskych surovinách vyšší ako v pšeničných múkach (pohánka 14,2 %, cícerca 20,7 %, šošovica 27,4 %, ovos 13,4 %), nižší obsah lepkotvorných bielkovín a v dôsledku prídavkov všeobecne zmenené bielkovinové zloženie zmesi sa však prejavili nižším percentuálnym podielom vypratého lepku, jeho nižšou ťažnosťou a napúčavosťou. Aj sedimentačná hodnota (Zeleného index) sa znižovala úmerne s výškou prídavku až na úroveň nevyhovujúcu pre suroviny určené na pekársku úpravu.

Obsah dusíkatých látok v pokusných bochníkoch bol vyšší ako v kontrolných a zvyšoval sa v závislosti od zvoleného prídavku a jeho podielu v zmesi (viac pri šošovici a cíceri, menej pri pohánke o ovse), čo je z nutričného hľadiska možné považovať za prínos. Z technologického hľadiska prídavky nepôsobili priaznivo, čo sa prejavilo znížením objemu chlebov, najvýznamnejšie pri prídavku vo výške 50 % pri pohánke (- 45,6 %). Lepšie výsledky boli zistené, ak bol zvolený nižší prídavok: bochník s prídavkom cícerca 30 % (zníženie objemu o 12,8 %) > bochník s prídavkom šošovice 20 % (zníženie objemu o 8,7 %) > bochník s prídavkom ovs 10 % (zníženie objemu o 14,3 %) > bochník s prídavkom pohánky 10 % (zníženie objemu o 22,7 %). Takéto výrobky je možné považovať za technologicky dobré, resp. aspoň uspokojivé.

K zmesiam s prídavkom vo výške 30 % a 50 % bol prídavaný vitálny lepok v množstve 3 %, prínos prejavujúci sa zväčšením objemu výrobkov však nebol adekvátny. Iba v prípade pohánky umožnil vyrobiť výrobok s jej podielom 30 % a zároveň vyhovujúcim objemom.

**Pod'akovanie:** Práca bola riešená vďaka podpore projektu VEGA 1/0282/10 *Využitie polysacharidov pri výrobe potravín s definovanými vlastnosťami.*

## LITERATÚRA

- ASP, N. G., MATTSSON, B., ÖNNING, G. 1999. Variation in dietary fibre,  $\beta$ -glucan, starch, protein, fat and hull content of oats grown in Sweden. In *Europe Journal Clinical Nutrition*, Vol. 46, 1999, p. 31-37.
- BALDSHIEV, D., BUTEBA, A., HANDRECK, B. 1997. Studies on the relationships between protein fractions and technological properties of wheat. In *Muhle and Mischfuttertechnik*, Vol. 134, 1997, No. 14, p. 433-436.
- BOJŇANSKÁ, T. 2004. Kvalita obilnín a strukovín ako surovín pre potravinárske spracovanie. Habilitačná práca. Nitra: SPU, 2004, 139 p.
- BOJŇANSKÁ, T., CHLEBO, P., GAŽAR, R., HORNA, A. 2009. Buckwheat enrichment bread production and its nutrition benefits. In *European Journal of Plant Science and Biotechnology*, Global Science Books, Vol. 3, Special Issue 1, 2009, ISSN 1752-3842, ISBN 978-4-903313-42-9, p. 49-55.
- BONAFACCIA, G., FABJAN, N. 2003. Nutritional comparison of tartary buckwheat with common buckwheat and minor cereals. In *Reports Biotechnological Faculty of the University of Ljubljana*. 2003, p. 349-355.
- CAPOUCHOVÁ, I., PETR, J., TLASKALOVÁ-HOGENOVÁ, H., MICHALÍK, I., FAMĚRA, O., URMINSKÁ, D., TUČKOVÁ, L., KNOBLOCHOVÁ, H., BOROVSÁ, D. 2004. Protein fractions of oats and possibilities of oat utilisation for patients with coeliac disease. In: *Czech Journal of Food Science*, Vol. 22, 2004, No. 4, p. 151-162.
- EGGUM, B. O., KREFT I., JAVORNIK, B. 1980. Chemical composition and protein quality of buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench). In *Plant Foods for Human Nutrition*, Vol. 30, 1980, No. 3-4, p. 175-179, ISSN 1573-9104
- EPENDORFER, W. H. 2006. Nutritive value of oat and rye grain protein as influenced by nitrogen and amino acid

- composition. In *Journal of the Science of Food and Agriculture*, Vol. 28, 2006, Issue 2, p.152-156.
- FRANCISCHI DE M. L. P., SALGADO, J. M., LETAO, R. F. 1994. Chemical, nutritional and technological characteristics of buckwheat and non-prolamine buckwheat flours in comparison of wheat flour. In *Plant Foods for Human Nutrition*, Vol. 46, 1994, No. 4, p. 323-329, ISSN 1573-9104
- GUO, X., YAO, H. 2006. Fractionation and characterization of tartary buckwheat flour proteins. In *Food Chemistry*, Vol. 98, 2006, p. 90-94.
- HAUPTVOGEL, P., ČIČOVÁ, I., MENDEL E. 2005. Obilniny a pseudoobilniny – nové zdroje pre výrobu funkčných potravín (funkčné múky). In *Kvalita, bezpečnosť a funkčnosť primárnych potravinových zdrojov*, Piešťany: VÚRV, 2005, p. 28-30, ISBN 80-88790-41-7
- HUBÍK, K. 2000. Využití SE-HPLC analýzy prolaminových zásobních bílkovin pro predikci technologické jakosti odrůd ozimé pšenice. In *Rostlinná výroba*, Vol. 46, 2000, No. 5, p. 213-217.
- JULIANO, B. O. 1999. Comparative nutritive value of various staple foods. In *Food Reviews International*, Vol. 15, 1999, No. 4, p. 399-434.
- KHATOON, N., PRAKASH, J. 2004. Nutritional quality of microwave-cooked and pressure-cooked legumes. In *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, Vol. 55, 2004, No. 6, p. 441-448.
- BOJŇANSKÁ, T., FIKSELOVÁ, M., FRANČÁKOVÁ, H., GÁLOVÁ, Z., KNOBLOCHOVÁ, H., LABUDA, R., MAREČEK, J., MICHALÍK, I., MUCHOVÁ, Z., SENDREJOVÁ, E., SZABOVÁ, E., TANČINOVÁ, D., TOMÁŠ, J., TÓTH, T., URMINSKÁ, D., VOLLMANNOVÁ, A. 2006. Výživná a technologická kvalita rastlinných produktov a ich potravinárske využitie. 1. vyd. Nitra : Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre, 2006, 198 p. ISBN 80-8069-780-9
- MICHALOVÁ, A. 2001. Minor cereals and pseudocereals in Europe. Maggioni L, Spellman O, compilers. Report of a Network Coordinating Group on Minor Crops. Ad hoc meeting, 7-8 July 2000, Radzikow, Poland. IPGRI, Rome, Italy.
- MICHALÍK, I., UŽÍK, M., URMINSKÁ, D., ŽOFAJOVÁ, A. 2007. Vplyv odrody a dusíkatej výživy na obsah a zloženie bielkovín zrna ovsa. In *Polnohospodárstvo*, Vol. 53, 2007, No. 4, p. 175-182. ISSN 0551-3677
- MOUDRÝ, J., ŠTERBA, Z. 2006. Kvalita potravinárskeho ovsa. In *Současné představy a požadavky na kvalitu rostlinných produktů: sborník referátů ze semináře Současné představy a požadavky na kvalitu rostlinných produktů České Budejovice, JU ČB*, 2006, p. 52-54, ISBN 80-7040-874-X
- MUCHOVÁ, Z. 2001. Faktory ovplyvňujúce technologickú kvalitu pšenice a jej potravinárske použitie. Nitra: SPU, 2001, 112 p., ISBN 80-7137-923-9
- PITTAWAY, J. K., AHUJA, K. D. K., ROBERTSON L. K., BALL, M. J. 2007. Effects of controlled diet supplemented with chickpeas on serum lipids, glucose tolerance, satiety and bowel function. In *Journal of the American College of Nutrition*, Vol. 26, 2007, Issue 4, p.334-340, 2007.
- PRUGAR, J. 2008. Kvalita rastlinných produktů na prahu 3.tisíciletí. Praha: VUPS, 2008, 327 p. ISBN 978-80-86576-28-2
- SAPIRSTEIN, H. D., FU, B. X. 1998. Intercultivar variation in the quantity of monomeric proteins, soluble and insoluble glutenin, and residue protein in wheat flour and relationships to breadmaking quality. In *Cereal Chemistry*, Vol. 75, 1998, No. 4, p. 500-507.
- URMINSKÁ, D., SOCHA, P., VOLLMANNOVÁ, A. 2009. ELISA and PAGE analysis of proteins determinans from cereal and pseudocereal grain causing human coeliac disease. In *FEBS Journal*. Oxford: Blackwell Publishing, 2009. Vol. 276, suppl. 1 (2009), p. 294. ISSN 1742-464X.
- VOJTAŠŠÁKOVÁ, A., KOVÁČIKOVÁ, E., SIMONOVÁ, E. 1999. *Obilniny a strukoviny. Potravinové tabuľky*, Bratislava: VUP, 1999, 268 p., ISBN 80-85330-62-8
- YANEZ-FARIAS, G. A., BERNAL-AGUILAR, V., RAMIREZ-RODRIGUEZ, L., BARRON-HOYOS, J. M. 1999. Fortification of some cereal foods with a chickpea protein concentrate. In *Food Science and Technology International*, Vol.5, 1999, Issue 1, p.89-93.

### Contact address:

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

doc. RNDr. Dana Urminská, CSc., Slovak University of Agriculture in Nitra, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Department of Biochemistry, Tr. A. Hlinku 2, 94976 Nitra, E-mail: Dana.Urminska@uniag.sk

## CEREALS AS BASIS OF PREVENTING NUTRITION AGAINST OBESITY

Lenka Duchoňová, Ernest Šturdík

### ABSTRACT

Still more alarming obesity studies show in fact that it is largely due to incorrect diet and lifestyle. For suitable alternative for prevention of this disease are now considered cereal foods, mainly based on increased fiber content. The importance of dietary fiber for human organism consists primarily in its protective function before civilization diseases. It has beneficial effects on digestive physiology and it is therefore an important factor in the prevention of obesity, but also other diseases. Fiber consumption in developed countries is low and it is below the lower limit of the recommended dose. Slovaks per day take only 10-12 g of fiber, which represents only 47% of the recommended dose. Recent large-scale epidemiological studies have shown that regular consumption of wholegrain cereals can reduce the risk of heart disease and certain cancers by 30 percent. One of the factors that increase the functionality of foods is the so-called indigestible resistant starch. For its the positive impact on the physiology of digestion is referred to as prebiotics new generation of dietary fiber. The increasing availability of tasty, whole grain products rich in fiber could be health benefits.

**Keywords:** cereal, fiber, obesity, nutrition, prevention, resistant starch

### ÚVOD

Správna výživa je základným predpokladom zdravého vývoja človeka a hlavnou podmienkou prevencie a liečby najvýznamnejších ochorení, ktoré postihujú veľké skupiny obyvateľstva. Na vzniku srdcovo-cievnych a nádorových ochorení sa výživa podieľa 20-60 percentami. Dnešné stravovanie možno charakterizovať ako nevyvážené, založené na pomerne obmedzenom výbere potravín s nízkou spotrebou rastlinných potravín (Elmadfa et al., 2005; Blackburn et al., 2010).

Pre prevažnú časť ľudstva našej Zeme sú obilniny najdôležitejšou a základnou potravinou, ktorá je v prirodzenom stave zdrojom sacharidov, ale dodáva nám aj vysokohodnotné bielkoviny, vitamíny, minerálne látky i dôležitú vlákninu (Žajová a Porubská, 1997). Obilniny výrazne ovplyvňujú výživovú bilanciu svetovej populácie a čo do objemu konzumu, majú medzi ostatnými poľnohospodárskymi produktmi výsadné postavenie (Dodok, 1998). Okrem ich nutričného významu sa stále viac u nich zdôrazňuje prospešnosť pre zdravie.

Celozrnné potraviny sú dôležitým zdrojom výživných a fytoprotektívnych látok, ktoré sú len slabo zastúpené v strave Európanov. Prínosom pre verejné zdravie by mohla byť zvyšujúca sa rozmanitosť, dostupnosť chutných celozrnných výrobkov a osвета medzi ľuďmi. Zvýšená konzumácia celozrnných potravín na báze obilnín a strukovín môže chrániť proti obezite, naopak zvýšený príjem stravy z rafinovaného obilia priamo prispieva k obezite (Koh-banerjee et al., 2003; Du et al., 2009). Je dokázané, že celozrnné potraviny a strukoviny môžu pomáhať redukovať hmotnosť alebo inak povedané značná strata hmotnosti je dosiahnuteľná schopnosťou regulovať výživu, a to tak aby bola bohatá na cereálie a strukoviny (Williams et al., 2008). Potravinová vláknina sa stala „populárnou“ na prelome 60-tych a 70-tych rokov, keď sa začal dávať do súvisu výskyt mnohých závažných ochorení s nedostatkom vlákniny v potrave. V mnohých krajinách národné stravovacie smernice odporúčajú konzumáciu potravín vyrobených z obilnín ako základ zdravej výživy a kladú dôraz na zvýšenie spotreby celozrnných potravín (Obr.1).

Výživové smernice v USA odporúčajú skonzumovať tri alebo viac celozrnných výrobkov denne. Hoci existujú



Obr.1 Potravinová pyramída zdravej výživy

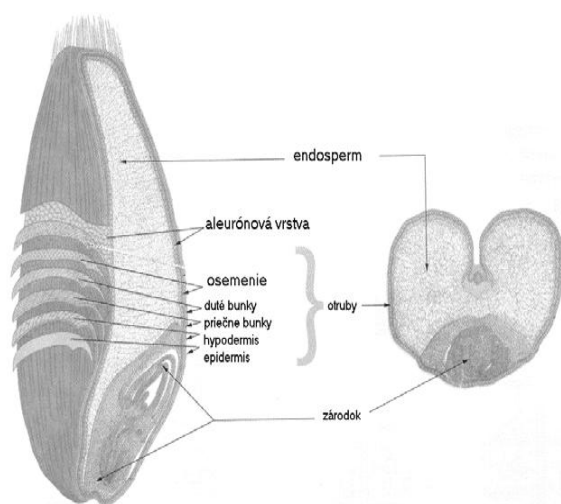
silné epidemiologické dôkazy, že konzumácia celozrnných potravín a strukovín má priaznivý vplyv na zníženie rizík mnohých chronických ochorení, predovšetkým kardiovaskulárnych a diabetu (Flight, 2006; Venn, 2004), mechanizmus pôsobenia nie je dostatočne vysvetlený. V prípade celozrnných potravín je nejasné do akej miery sú obsah vlákniny, glykemický index, zastúpenie živín alebo iných prvkov a ich vplyv na črevnú mikroflóru resp. iné parametre, hlavnými príčinami pozitívnych účinkov na zdravie (Williams et al., 2008).

### CEREÁLNE POTRAVINY A RIZIKÁ CHRONICKÝCH OCHORENÍ

Celozrnné potraviny sú bohatým zdrojom vlákniny, rezistentného škrobu, bielkovín, sacharidov, vitamínov, minerálov, fytoestrogénov, antioxidantov a iných dôležitých živín. Štruktúrne sú celé zrná (Obr.2) zložené z endospermu, klíčku (germ) a obalovej časti (bran). Hlavne obalová časť obsahuje dôležité antioxidanty, železo, zinok, meď, horčík, B vitamíny, vlákninu a ďalšie fytonutrienty. Zaberá približne 14% suchej hmotnosti zrna, endosperm asi 83% a klíčok 2,5% (Anderson et al., 2000).

Počas procesu mletia alebo rafinácie (frakcionácie) sú vonkajšia vrstva a klíčok (vnútorná vrstva) oddelené od

škrobového endospermu (stredná vrstva), čo vedie u



Obr.2 Morfológické zloženie celého zrna pšenice (Wrigley et al., 2004)

tradičnej múky k strate mnohých výživných látok a vlákniny (Slavin et al., 1997). Z tohto dôvodu sú rafinované zrná obilnín a pseudoobilnín výživovo horšie ako celé zrná, pretože obsahujú menšie množstvo vlákniny, vitamínov, minerálnych látok, fenolov, fytoestrogénov a nenasýtených mastných kyselín (Jacobs et al., 1998; Willett, 1998). Je preto potrebné posúdiť dôkazy o úlohe zŕn v oblasti prevencie, manažmentu nadváhy a obezity, s cieľom zabezpečiť zdravotné účinky, ktoré sú založené na dôkazoch a dostupných výskumoch (Williams et al., 2008).

K celozrnným potravinám, ktoré sú bežne konzumované v západných krajinách patrí tmavý chlieb, celozrnné cereálie konzumované na raňajky, pražená kukurica (popkorn), ovsené vločky a hnedá ryža (Liu et al., 1999). Avšak väčšina cereálnych potravín v USA je vysokorafinovaných (Slavin, 1994). Zatiaľ čo sa predpokladá, že celozrnné potraviny chránia proti obezite, epidemiologické údaje, ktoré priamo skúmajú príjem a efekty potravín celozrnného resp. rafinovaného typu vo vzťahu k obezite, sú veľmi zriedkavé.

Niekoľko epidemiologických štúdií definovalo celozrnné potraviny ako výrobky, ktoré obsahujú  $\geq 25\%$  celozrnného obsahu alebo otrúb (Liu et al., 2000; Mc Keown et al., 2002). Food and Drug Administration (FDA) v Spojených štátoch amerických vyžaduje, aby celozrnné potraviny obsahovali  $> 51\%$  celozrnného obsahu alebo otrúb za účelom získania zdraviu prospešných účinkov. Skutočnosť, že štruktúra zrna a glykemický index sú zriedkavo hodnotené v epidemiologických štúdiách, robí interpretáciu príslušných získaných poznatkov vo vedeckej literatúre neúplnou (Venn, 2004).

V epidemiologickej súvislosti aj strukoviny predstavujú potravinovú skupinu, ktorá bola relatívne nedostatočne preštudovaná. Vláknina obsiahnutá v strukovinách znižuje hodnoty cholesterolu v krvi. Strukoviny sú zdrojom desiatich najnedostatkovejších minerálnych prvkov (horčík, vápnik, železo, fosfor, zinok, meď, síra, jód, selén), avšak ich využitie nebýva dostatočné kvôli väzbe na kyselinu fytovú, šťaveľovú a iné. Z vitamínov sú obsiahnuté najmä vitamíny skupiny B a sója obsahuje aj vitamíny skupiny E. V strukovinách sa nachádzajú mnohé

látky chrániace človeka pred ochoreniami. Patria medzi ne napr. izoflavóny, ktoré bránia rastu nádorových buniek. Popri týchto priaznivo pôsobiacich látkach obsahujú strukoviny aj antinutričné a prírodné toxické látky. Najmä sójové bôby obsahujú lektíny, antivitamíny, kyselinu fytovú, nestráviteľné oligosacharidy, saponíny, rastlinné estrogény, puríny, inhibítory proteáz, alergény a iné. Väčšina týchto škodlivín sa však dá eliminovať technologickou, resp. tepelnou úpravou, niektorí autori dokonca uvádzajú aj pozitívne pôsobenie niektorých z týchto látok (napr. kyseliny fytovej, rastlinných estrogénov a pod.). Najviac ponúkanými produktmi zo strukovín sú sójové výrobky, najrozšírenejšími sú najmä textúrované potraviny zo sóje, nesprávne označované ako sójové mäso a sójové nápoje ako sójové mlieko. Tieto výrobky majú v porovnaní s klasickými veľa predností, napr. nižšia energetická hodnota, neprítomnosť tukov, cholesterolu. Súčasné dôkazy pre odporúčanie konzumácie strukovín k ich integrácii do zdravej výživy sa spájajú viac s obsahom ich živín (nízky obsah tuku, dobrý zdroj rozpustnej vlákniny a bielkovín), ako aj s prevenciou chronických ochorení. Ich nízke hodnoty glykemických indexov majú hlavný účinok v kontrole hmotnosti, i keď boli mnohé diskusie, že inhibítory alfa-amylázy v strukovinách môžu tiež zohrávať významnú úlohu (Duranti, 2006).

Glykemický index (GI) sa používa na určenie ako rýchle sa potraviny obsahujúce sacharidy absorbujú a strávia v organizme. Závisí od podielu sacharidov v danej potravine a od ich zložitosti (čím jednoduchší je sacharid, tým vyšší je glykemický index). Meria sa v stupnici 0-100, pričom najvyššiu hodnotu (100) má samotná glukóza. Pomaly trávené sacharidy majú nízky glykemický index, preto sa považujú za "plniace", kým sacharidy trávené rýchle majú vysoký glykemický index a považujú sa za menej zdraviu prospešné (Flint et al., 2004).

Walker (1947), Burkitt (1952), Cleave (1956) a Trowell (1972) boli priekopníci koncepcie, že vysokorafinované potraviny prispievajú k západným chorobám, vrátane koronárnych tepnových ochorení (CHD). Celozrnné potraviny sa spájajú so zníženým rizikom niekoľkých chronických ochorení vrátane CHD (Rimm et al. 1996; Liu et al., 1999; Jensen et al., 2004), diabetes (Salmeron et al., 1997; Franz et al., 2002; Murtaugh et al., 2003) a niektorých druhov rakoviny (Adlercreutz, 1990; Slavin et al., 2000). Výskumníci zistili, že strava bohatá na celozrnné jedlá znižuje LDL cholesterol, triglyceridy, krvný tlak a zvyšuje HDL cholesterol (Anderson, 2003). Zložky niektorých celých zŕn vrátane rozpustnej vlákniny, betaglukánov, alfatokotrienolu a pomeru arginín-lyzín zohrávajú dôležitú úlohu v znižovaní hladiny krvného cholesterolu. Ďalšie bioaktívne zložky cereálií majú dôležitú funkciu pri zrážaní krvi a inzulínovej senzitivite (Liese et al., 2003). Celozrnné potraviny majú nízku hodnotu glykemického indexu vzhľadom na ich obsah škrobu, veľkosť častíc, obsah prečistenia a vysoký obsah vlákniny (Liu et al., 2000). V kontraste s rafinovanými produktmi, celozrnné potraviny sú vstrebávané a trávené pomalšie, čo má za následok menšiu glukózovú odpoveď a potrebu inzulínu (Slavin, 1994).

Avšak skutočná sila celozrnných obilnín spočíva v ich potenciálnych ochranných účinkoch proti koronárnej chorobe srdca a určitým onkologickým ochoreniam. V



populačnej štúdií vykonanej na 34 000 ženách vo veku 55-69 rokov v Lowe bolo zistené, že respondentky, ktoré uviedli, že denne konzumujú aspoň jeden celozrnný pokrm, mali oveľa nižšie riziko úmrtia na koronárnu chorobu srdca, ako tie, ktoré nejedli takmer žiadne celozrnné potraviny. Ďalšie údaje ukazujú, že ženy, ktoré konzumovali celozrnné jedlo v priemere viac ako 2,7-krát denne, mali o 30 % nižšie riziko koronárnej choroby srdca ako tie, ktoré ho konzumovali iba 0,13-krát denne. Navyše pravidelná konzumácia celozrnných potravín pravdepodobne znižuje riziko mozgovej mŕtvice a cukrovky 2. typu.

Ochranné účinky celozrnných potravín sa vzťahujú aj na onkologické ochorenia, špeciálne na rakovinu hrubého čreva. Celozrnné potraviny sú bohatým zdrojom fermentovateľných sacharidov, ktoré sa črevnou mikroflórou premieňajú na nižšie mastné kyseliny. Tieto kyseliny sú schopné znížiť aktivitu určitých faktorov spôsobujúcich onkologické ochorenia. Celozrnná vláknina tiež zväčšuje objem stolice a viaže karcinogény, ktoré sa môžu z čriev urýchlene odstrániť predtým, ako začnú spôsobovať problémy.

### VLÁKNINOVÁ ZLOŽKA CELOZRNNÝCH POTRAVÍN

Vláknina je skupina zložitých látok, ktoré môžu byť v zásade rozdelené na rozpustné a nerozpustné typy. Rozpustnosť vlákniny závisí na tom, do akej miery sa táto rozpúšťa vo vode alebo vytvára gél. Dobrým zdrojom rozpustnej vlákniny je ovos, jačmeň, ovocie, zelenina a strukoviny. Bohatým zdrojom nerozpustnej vlákniny je celozrnný chlieb, cereálne raňajky a pod. V roku 1998 komisia American Association of Cereal Chemists (AACC), po rozsiahlej odbornej diskusii navrhla a schválila novú definíciu vlákniny zahrňujúcu i jej priaznivé účinky: „Vlákninu potravy tvoria jedlé časti rastlín alebo analogické sacharidy, ktoré sú odolné voči tráveniu a absorpcii v ľudskom tenkom čreve a sú úplne alebo čiastočne fermentované v hrubom čreve. Počas fermentácie vznikajú rôzne produkty, hlavne mastné kyseliny s krátkym reťazcom a plyny. Práve kombinácia účinkov fermentačného procesu a vzniknutých vedľajších produktov priaznivo ovplyvňuje zdravie. Stupeň degradácie jednotlivých zložiek tvoriacich vlákninu sa mení podľa druhu prítomných polysacharidov ako je zrejme z Tab. 1.

Tab.1 Stupeň odbúrania potravinovej vlákniny v hrubom čreve ľudí (FAO/WHO, 1997)

Potravinová vláknina	Stupeň odbúrania v %
Celulóza	20 - 80
Hemicelulózy	60 - 90
Pektíny	100
Guarová guma	100
Pšeničné otruby	50
Rezistentný škrob	50
Inulín, oligosacharidy	100, ak nie sú v nadbytku

Vláknina obsahuje neškrobové polysacharidy (celulózu, hemicelulózu, rastlinné gumy, pektíny), oligosacharidy (inulín), lignín a ďalšie rastlinné zložky (vosky). Zahŕňa aj jeden druh nestráviteľného škrobu, ktorý je označovaný ako rezistentný (nachádza sa v celozrnných múkach, šrotoch, v niektorých raňajkových cereáliách a v strukovinách). Rezistentný škrob (RS) je jednou z novšie objavených substancií, ktoré zvyšujú funkčnosť potravín. Pojem *rezistentný škrob* zaviedli **Englyst et al. (1992)**, ktorí ho definujú ako škrob a jeho degradačné produkty, ktoré zdravý človek nie je schopný absorbovať v tenkom čreve. Nestrávené prechádzajú do hrubého čreva, kde podliehajú fermentácii črevnou mikroflórou, pričom vznikajú nasýtené monokarboxylové kyseliny s krátkym reťazcom – butyrát, propionát a acetát. Práve tieto kyseliny sú zodpovedné za zdraviu prospešné účinky. Existujú štyri typy rezistentného škrobu:

- **RS<sub>1</sub>** je fyzicky nedostupný pre degradáciu amylolytickými enzýmami tráviaceho traktu (napr. nahrubo pomleté semená)
- **RS<sub>2</sub>** má primárnu štruktúru a konformáciu, ktoré spôsobujú jeho prirodzenú odolnosť voči degradácii (surový zemiak alebo odrody plodín s vysokým obsahom amylozy).
- **RS<sub>3</sub>** vzniká pri bežnej úprave potravín varením, pečením alebo mrazením.
- **RS<sub>4</sub>** je chemicky modifikovaný škrob (priechnymi väzbami alebo esterifikáciou).

Mechanizmus benefičného účinku RS na zdravie človeka (najmä na fyziológiu trávenia a kardiovaskulárne choroby) bol objasnený na základe mnohých klinických štúdií aj pokusov in vitro a in vivo na zvieracích modeloch alebo tkanivových kultúrach (**Jenkins et al., 1999 a 2000; Björck et al., 2000**). Rezistentný škrob sa kvôli jeho priaznivým účinkom na fyziológiu trávenia zaraďuje ako prebiotikum medzi novú generáciu diétnej vlákniny (**Anison et al., 1994; Baghurst et al., 1996**).

Pektíny, rastlinné slizy a gumy sa takmer úplne odbúravajú, kým celulóza len čiastočne.

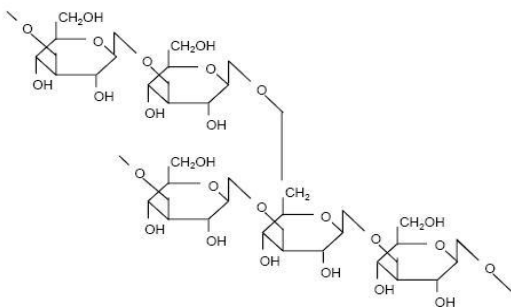
Vláknina (jej nerozpustné aj rozpustné typy, v závislosti od zrna) sa dlho považovala za hlavnú zdraviuprospešnú zložku celozrnných výrobkov. V súčasnosti stúpa množstvo dôkazov o zdravotnom prínose ďalších zložiek obsiahnutých v zrne. Ide o vitamín E, vitamíny skupiny B, viacero minerálnych látok ako je železo, horčík, zinok, selén a niektoré ďalšie ochranné fytochemikálie. Bohaté množstvo nutričov a zdraviuprospešných látok pôsobí synergicky a má pravdepodobne väčší prínos pre zdravie, ako by sa dalo dosiahnuť sčítaním individuálnych účinkov jednotlivých zložiek.

Vláknina môže regulovať telesnú hmotnosť vďaka svojim nasledovným účinkom:

- upravuje motilitu čriev,
- pôsobí proti obezite,
- navodzuje rovnováhu mikrobiálnej flóry,
- znižuje hladinu cholesterolu v krvi
- reguluje zažívanie,
- urýchľuje prechod trávenej potravy,

Významnou zložkou potravinovej vlákniny sú  $\beta$ -D-glukány. Ide o lineárne, vo vode čiastočne rozpustné polysacharidy. Tvoria ich glukózové jednotky (**Johansson et al., 2004**) pospájané beta-(1→3) a beta-(1→4) glykozidovými väzbami (**Beer et al., 1995; Rimsten et**

al., 2003). V obilninách predstavujú  $\beta$ -D-glukány hlavnú zložku bunkovej steny (Virkki et al., 2005). Spomedzi všetkých obilných zŕn, jačmeň a ovos obsahujú najvyššie množstvá  $\beta$ -glukánov, ktoré tvoria 3-11 % (jačmeň) a 3-7 % (ovos) sušiny.  $\beta$ -glukány sú obvyčajne koncentrované vo vnútorných aleurónových bunkových stenách a subaleurónových bunkových stenách endospermu jačmeňa, ovsá a pšenice. (Trogh et al., 2004; Demirbas, 2005; Virkki et al., 2005). Základná chemická štruktúra  $\beta$ -D-glukánov je na Obr.3.



Obr.3 Molekulárny vzorec  $\beta$ -D-glukánov

$\beta$ -D-glukány majú široké pole pôsobnosti v ľudskom i živočíšnom organizme. Predovšetkým sú veľmi účinnými aktivátormi imunitných procesov (Yun et al., 2003). Okrem toho sa zistilo, že obilninové  $\beta$ -D-glukány pomáhajú redukovat' hladiny celkového a LDL cholesterolu v krvi (Davidson et al., 1991; Kerckhoffs et al., 2003), čím znižujú riziko vzniku srdcovo-cievnych chorôb (Keogh et al., 2003). Fyzikálne a fyziologické vlastnosti cereálnych  $\beta$ -D-glukánov sú nutrične a komerčne významné (Mällki et al., 2001). Stúpajúci záujem o cereálne  $\beta$ -D-glukány v priebehu posledných dvoch desaťročí je spôsobený ich prijatím ako funkčných, bioaktívnych zložiek (Cui et al., 2000).

Cereálne  $\beta$ -D-glukány sa používajú na vývoj nízkokalorických jedál ale majú tiež vplyv na sensorickú kvalitu nápojov (Lyly et al., 2003). Je jasné, že poznatky o  $\beta$ -D-glukánoch v cereálnych zrnách môžu byť užitočné pre konzumentov, čo je dobrá príležitosť pre vedcov a šľachtiteľov vyvíjať nové kultivary obohatené o  $\beta$ -D-glukány.

### FYZIOLOGICKÉ ÚČINKY VLÁKNINY

Význam potravinovej vlákniny pre ľudský organizmus spočíva predovšetkým v jej ochranej funkcii pred civilizačnými chorobami. Podľa literárnych údajov je konzumácia vlákniny vo vyspelých krajinách nízka, pohybuje sa pod dolnou hranicou doporučenej dávky. Optimálny denný príjem vlákniny by sa mal u dospelého človeka pohybovať v rozmedzí 20 až 35 g (Marlet et al., 2002). Muži vo veku do 50 rokov by mali prijímať 38 g, dospelé ženy 25 g vlákniny (Slavin, 2003). Podľa odporúčaní lekárov by sa mal príjem vlákniny zvýšiť najmä konzumáciou strukovín, ovocia, zeleniny, obilnín a celozrnných výrobkov, ďalej orechov, semien a pod. Na Slovensku pretrvávajú nízka spotreba ovocia, zeleniny a strukovín, ako aj celozrnných pekárskeých výrobkov (v porovnaní s odporúčanými dávkami potravín – ODP), čo má za následok nízky príjem potravinovej vlákniny. Zníženie spotreby obilnín môže byť zapríčinené väčšou

spotrebou polotovarov. Zvýšila sa spotreba orechov, poklesla však spotreba maku, ktorý je zároveň dobrým zdrojom vápnika (Kováčiková et al., 2007).

Prídavok vlákniny do potravinových výrobkov má veľký význam, najmä z hľadiska zníženia ich energetickej hodnoty (Stauffer, 2001).

Mnohé štúdie potvrdili priaznivý vplyv vlákniny na zdravie človeka, najmä na fyziológiu trávenia. Okrem priaznivého preventívneho čreva a konečníka, chronický zápal hrubého čreva, ochorenia žľáz, má vláknina veľký význam v prevencii vzniku tzv. civilizačných chorôb (Champ et al., 2003).

Vláknina, najmä nerozpustná, bráni vzniku zápchy, pretože zväčšuje objem stolice a skracuje prechod potravy tráviacim systémom. Tieto účinky sa zvyšujú, ak sa zároveň s príjmom vlákniny zvyšuje aj príjem vody (Marlet et al., 2002).

Mastné kyseliny, ktoré vznikajú fermentáciou vlákniny v hrubom čreve, predstavujú významný zdroj energie pre bunky hrubého čreva a môžu zároveň inhibovať rast rakovinových buniek čriev. Úpravou funkcie čriev znižuje vláknina i nebezpečenstvo vzniku niektorých zdravotných ťažkostí, napr. hemoroidov (Swinburn et al., 2004; Slavin, 2005).

Rozpustná vláknina môže spomaľovať trávenie a absorpciu sacharidov, a tak znižovať vzostup hladiny glukózy v krvi po požití potravy bohatej na sacharidy. Osoby postihnuté cukrovkou tak môžu lepšie ovplyvňovať svoju hladinu glukózy v krvi (Champ et al., 2003). Výsledky epidemiologických štúdií poukázali aj na význam vlákniny pri prevencii srdcovocievnych ochorení, pretože priaznivo ovplyvňuje profil krvných lipidov. Túto skutočnosť potvrdili klinické skúšky. Viskózna vláknina (pektín), alebo ovsené či ryžové otruby, znižujú hladinu celkového sérového cholesterolu i lipoproteínu s nízkou hustotou (LDL) v krvi. Vplyv potravinovej vlákniny na hladinu cholesterolu v krvi sa naďalej intenzívne študuje. Výsledky doterajších štúdií potvrdili priaznivý vplyv niektorých látok potravinovej vlákniny na hladinu cholesterolu, ale nepreukázali výrazný vplyv. Ide najmä o pektín (ovocie a zelenina), vlákninu strukovín a ovsených produktov. Aj naďalej pokračujú výskumné práce, ktoré majú overiť, či strava s vysokým podielom zmesi rôznych druhov vlákniny má ochranný vplyv proti srdcovocievny ochoreniam (Vries, 2003; Djousse et al., 2007).

Nedostatok vlákniny prispieva k rozvoju mnohých chorôb vrátane dvanástnikových vredov, žľazových kameňov, cukrovky, artritídy, rakoviny hrubého čreva a hromadenia nadbytočných tukových zásob v organizme. Dôležité je, že cereálne produkty poskytujú 20-50% vlákniny v rozpustnej alebo viskóznej forme (Chen et al., 1986). Vláknina môže tiež ovplyvniť črevnú sekréciu hormónov vrátane cholecystokinínu, ktorý môže pôsobiť ako faktor presýtenosti alebo môže zmeniť glukózovú homeostázu.

### FERMENTOVANÉ CEREÁLIE

Cereálne zrná predstavujú významný zdroj dietetických živín (bielkovín, sacharidov, vitamínov, minerálnych látok a vlákniny) pre ľudí na celom svete. Nutričná kvalita cereálií a sensorické vlastnosti ich produktov sú niekedy horšie alebo zlé v porovnaní s mliekom a mliečnymi výrobkami. Dôvodom je nižší obsah bielkovín, nedostatok niektorých esenciálnych aminokyselín (lyzín), nízka

dosupnosť škrobu, prítomnosť tanínov, polyfenolov, kyseliny fytovej (Chavan et al., 1989; Blandino et al., 2003). Preto boli použité mnohé metódy s cieľom zlepšenia nutričnej kvality cereálií. Medzi ne patrí zlepšenie v oblasti aminokyselinového zloženia doplnením o proteínovo bohaté zdroje. Okrem toho bolo uvedených do praxe aj niekoľko výrobných technológií na prípravu cereálnych potravín, ktoré zahŕňajú varenie, klíčenie, mletie a kvasenie (fermentáciu), s cieľom zlepšiť nutričné vlastnosti cereálií. Z nich pravdepodobne najstaršia a najlepšia je fermentácia, proces závislý na biologickej aktivite mikroorganizmov za vzniku mnohých metabolitov, ktoré potláčajú rast a zvyšok nežiaducej mikroflóry v potravinách (Mattila-Sandholm, 1998; Ross et al., 2002).

Fermentácia je vhodná stratégia na znižovanie bakteriálnej infekcie potravinových matric i jedál. Táto metóda by mohla pomôcť znížiť prevalenciu hnačkových ochorení (Mensah, 1990). Je to lacná a najekonomickejšia technika výroby a uchovávaní jedál (Egounlety, 2002). Fermentované potraviny a nápoje sú definované ako tie produkty, ktoré sú výsledkom účinku mikroorganizmov alebo enzýmov prispievajúcich k žiaducej príčine biochemických a mikrobiologických zmien (Blandino et al., 2003).

Všeobecne možno povedať, že fermentáciou cereálií dochádza k zníženiu hladiny nízkomolekulových sacharidov aj niektorých nestráviteľných oligo- a polysacharidov. Kvasenie ďalej zabezpečuje optimálne pH pre enzymatickú degradáciu kyseliny fytovej, ktorá sa vyskytuje v cereáliách vo forme komplexov s polyvalentnými kationmi, ako sú železo, zinok, vápnik, horčík. Redukcia kyseliny fytovej môže zvýšiť množstvo rozpustného železa, zinku a vápnika (Chavan et al., 1989; Nout et al., 1997; Blandino et al., 2003).

Fermentácia vedie k zlepšeniu trvanlivosti, textúry, chuti a arómy výsledného produktu. Počas fermentácie cereálií sa tvorí niekoľko prechavých a iných zlúčenín (kyselina maslová, kyselina jantárová, kyselina mravčia, kyselina mliečna, kyselina pyrohroznová, etanol, acetaldehyd, propiónaldehyd, acetón), ktoré prispievajú k žiadanej zmene chuti vo výrobku (Chavan et al., 1989).

Bežné baktérie, ktoré sa používajú na fermentáciu sú rody *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Micrococcus*, *Bacillus*. Kvasinky rodu *Saccharomyces* spôsobujú alkoholové kvasenie. Huby rodov *Paecilomyces*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Penicillium* a *Trichothecium* sú najčastejšie nachádzané v niektorých kvasených potravinárskych produktoch (Steinkraus, 1998). Typ mikrobiálnej flóry vyvinutý v každej fermentovanej potravine závisí od vodnej aktivity, pH, soli, koncentrácie, teploty a zloženia potravinovej matrice. Mnohé z fermentovaných produktov, ktoré sú bežné v západnom i východnom svete, sú závislé na baktériách produkujúcich kyselinu mliečnu (LAB), ktoré sprostredkovávajú kvasenie (Conway, 1996). Tradične fermentované potraviny pripravené z najbežnejších druhov obilnín (napr. ryža, pšenica, kukurica a cirok), sú veľmi dobre známe v mnohých častiach sveta (Campbell-Platt, 1994). Niektoré sú zužitkované ako farbivá, koreniny, nápoje, ľahké mäsité jedlá, pričom mnohé z nich sa používajú ako hlavné jedlá pri diéte (Blandino et al., 2003).

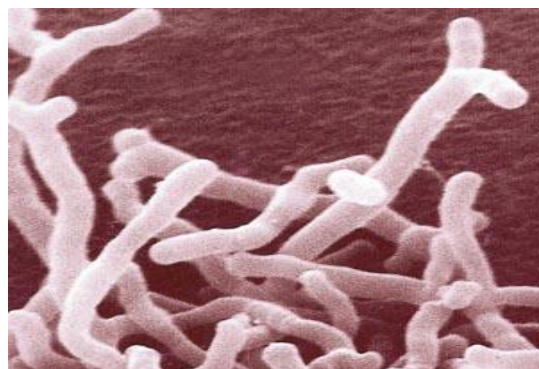
Fermentácia cereálií kyselinou mliečnou je dlhodobo zavedená metóda a používa sa v Ázii a Afrike na produkciu potravín v rôznych formách ako sú nápoje a kaše. Kyselina mliečna prispieva k bezpečnosti, nutričnej hodnote, trvanlivosti a prijateľnosti širokého spektra cereálnych produktov (Oyewole, 1997). Baktérie typické produkciou kyseliny mliečnej majú niekoľko priaznivých fyziologických účinkov ako sú antimikrobiálna aktivita, zvyšovanie imunity, prevencia rakoviny a znižovanie hladiny cholesterolu (Kaur, 2002). *Lactobacillus sp.* hrá dôležitú úlohu vo väčšine fermentovaných cereálií.

## CEREÁLNE PROBIOTICKÉ POTRAVINY

Pojem probiotický sa vzťahuje na výrobok obsahujúci mono alebo zmiešané kultúry živých mikroorganizmov, ktoré po požití zlepšia zdravotný stav, a / alebo pozitívne ovplyvnia organizmus zmenou jeho mikrobiálnej rovnováhy (Salovaara, 2000). Väčšina probiotických kmeňov je izolovaná z ľudského čreva a patrí do skupiny mliečnych baktérií, z ktorých rôzne druhy rodu *Lactobacillus* a *Bifidobacterium* sú najdôležitejšie (Obr.4, 5).



Obr.4 *Lactobacillus casei*



Obr. 5 *Bifidobacterium species*

Existujú cereálnofermentované potraviny, ktoré sú považované za probiotické výrobky (Wood, 1997). Napríklad Yosa je potravina vyrobená z pudingu pripraveného z ovsených otrúb, ich varením vo vode a kvasením s mliečnymi baktériami a bifidobaktériami. Po kvasení je dochutená sacharózou alebo fruktózou a ovocným džemom (Salminen et al., 1998; Blandino et al., 2003). Konzumuje sa vo Fínsku a ostatných škandinávskych krajinách. Má textúru a chuť podobnú jogurtu, ale nie je vyrobená len z mlieka alebo iných produktov živočíšneho pôvodu (Toufeili et al., 1997). Má

nízky obsah tuku, neobsahuje laktózu, ale je bohatá na  $\beta$ -glukány, ktoré sú vhodné pre vegetariánov. Yosa je zdravá, pretože obsahuje ovsennú vlákninu a probiotické baktérie, ktoré môžu udržiavať a zlepšovať prostredie črevnej mikrobióty spotrebiteľa (Toufeili et al., 1997; Blandino et al., 2003). Ovsenná vláknina je tiež dobrým zdrojom  $\beta$ -glukánov, ktoré znižujú hladinu cholesterolu v krvi spotrebiteľov, čo zase môže znížiť riziko ochorenia srdca. Napriek konvenčným potravinám a nápojom z veľkej časti vyrobených z obilnín v krajinách západného sveta (chlieb, pečivo, cestoviny a pivo), existuje široká škála ďalších produktov po celom svete, ktoré ešte nezískali takú pozornosť, ktorú si zaslúžia. Tieto sú často fermentované a majú lepšie nutričné vlastnosti v porovnaní s použitým surovým cereálnym materiálom. Flóra zodpovedná za fermentáciu je v mnohých prípadoch autochtónna a zahŕňa kmene mliečnych baktérií, kvasinky a plesne. Fermentačné postupy zabezpečené probiotickými kultúrami vedú k vývoju nových potravín so zlepšeným zdravotným účinkom, čo je trend, ktorý bude pokračovať i v budúcnosti (Blandino et al., 2003).

### STRATÉGIA KONZUMÁCIE CEREÁLNYCH POTRAVÍN V PREVENCIÍ OBEZITY

Zvýšenie konzumácie cereálnych potravín by mohla byť stratégia, ktorej cieľom je znížiť príjem tukov a zvýšiť spotrebu nestráviteľných sacharidov, čoho výsledkom je strava s nižšou energetickou hustotou. Stratégia, ktorej cieľom je zvýšiť konzumáciu cereálií vedúcu k zníženiu obezity, je účinná iba ak je sprevádzaná výživovým vzdelávacím programom. Potreba vzdelávania musí byť kombinovaná s inými stratégiami určenými na liečbu obezity (Rosado et al., 2008). Súčasná štúdia ukázali, že zvýšenie konzumácie cereálií u detí bolo účinné (znižovala sa telesná hmotnosť a telesný tuk) len v prípade, keď bol zahrnutý do tejto liečby výživový a zdravotný program. Jedna alebo dve porcie cereálií denne zahrnuté v strave bez výživového programu nespôsobili žiadne významné zmeny v telesnej hmotnosti ani v znížení telesného tuku v porovnaní s kontrolnou skupinou. Kirk et al. (2000) zistili významné zníženie hmotnosti o 2 kg u 29 dospelých, keď nahradili 1 jedlo za jednu porciu cereálií každý deň počas 4 týždňov. Rodearmel et al. (2006) skúmali zvýšenie konzumácie cereálií (2 dávky/deň v 13-týždňovej štúdii) v prevencii obezity a zistili významné rozdiely v telesnom tuku a v BMI medzi exponovanými a kontrolnými skupinami detí.

Tieto štúdie sa zhodujú s ostatnými vo fakte, že zvýšenie konzumácie cereálnych potravín ako zdroja sacharidov je účinná stratégia k chudnutiu u obéznych detí, ale Rosado et al. (2008) naznačujú, že iba v prípade, keď sa podávanie cereálií kombinuje spolu s edukačným výživovým programom.

Príjem cereálnych potravín spolu s výživovým programom potvrdil výrazné straty telesnej hmotnosti, zníženie telesného tuku a triglyceridov v plazme a zvýšenie hustoty lipoproteínov (Rosado et al., 2008). Význam výučbových programov v liečbe obezity je známy niekoľko rokov, ale len nedávno bolo navrhnuté, že vzdelávanie vo výžive by malo byť súčasťou akejkoľvek úspešnej stratégie, ktorej cieľom je znížiť obezitu u detí (Epstein et al., 2001; Kain et al., 2004; Deckelbaum et al., 2001), dospievajúcich (Dietz et al., 2001; Stettler,

2002) a dospelých (Crawford et al., 2004; Mc Crory et al., 2004). Výživový program sa tak ukázal byť efektívny v zlepšení výživového stavu jednotlivca u rôznych skupín, ktorých ohrozuje obezita.

### SPRÁVNA VOĽBA CEREÁLNYCH POTRAVÍN

Chutnosť, prínos pre zdravie, dostupnosť a cena sú typické kritériá, ktorými sa riadia európski konzumenti pri výbere potravín. Produkty na báze obilnín zohrávajú aj dôležitú kultúrnu úlohu v rôznych častiach Európy. Hoci chutnosť a prospešnosť zdraviu sa často považovali za protiklady, dnes si už konzumenti môžu vybrať z veľkého množstva chutných a zároveň zdravých výrobkov. Vláknina zvyšuje objem prijímanej potravy bez zvyšovania energetickej hodnoty, čo môže priaznivo ovplyvňovať pocit nasýtenia a pomáhať pri znižovaní telesnej hmotnosti. Na získanie všetkých uvedených výhod je potrebné striediť zdroje vlákniny v potrave. Strava využívajúca ovocie, zeleninu, strukoviny a celozrnné obilniny obsahuje nielen dostatok vlákniny, ale i mnoho ďalších živín a zložiek nevyhnutných na zabezpečenie dobrého zdravotného stavu (Lupton et al., 2003). Cereálne výrobky sa radia medzi potraviny s vysokým stupňom inovácie, omnoho vyšším než v ktoromkoľvek inom potravinárskom odvetví. Vývoj nových výrobkov reflektuje požiadavky spotrebiteľov, ale v súčasnej dobe predovšetkým názory výživárov, lekárov a snaží sa tak prispievať k riešeniu zdravotných problémov populácie. Na druhej strane sa ale zvyšuje záujem o výrobky „luxusné“, energeticky bohaté (napr. rôzne dezerty a torty s vysokým obsahom tuku i cukru), bio či organické výrobky. Medzi týmito trendami sa v súčasnej dobe presadzuje predovšetkým výroba širokého sortimentu celozrnných potravín a hotových múčnych zmesí a premixov. Celozrnným výrobkom sa konečne dostáva zaslúženého uznania. Príkladom bola spolupráca európskych vedcov na novom projekte HEALTHGRAIN, financovanom Európskou komisiou v rámci Šiesteho rámcového programu. Cieľom tohto projektu bolo zlepšiť a posilniť nutričnú hodnotu a zdravotný prínos cereálií a zvýšiť použitie celých zŕn v moderných potravinách. Projekt HEALTHGRAIN sa začal v roku 2005. Zaoberal sa požiadavkami konzumentov, senzorkou kvalitou bioaktívnych cereálnych potravín a vyvíjal nové technológie, ktoré umožnia produkciu potravín s obsahom zdravie podporujúcich prvkov ako je vláknina, oligosacharidy a fytochemikálie - fytoestrogény (lignany), polyfenoly a antioxidanty.

Úlohou projektu bolo poukázať aj na pozitívny vplyv týchto zložiek na zdravie, špeciálne na hladinu krvného cukru a inzulínový metabolizmus. Rozbehnutý bol tiež komplexný program zameraný na komunikáciu o zdravotnom prínose celých zŕn medzi európskym potravinárskym priemyslom a odborníkmi v zdravotníctve. Vedci budú podporovať šírenie informácií o zdravotných účinkoch hlavne v UK, Švédsku a USA, kde je dôležité, aby ľudia vedeli o význame celozrnných produktov pri prevencii srdcových ochorení a niektorých druhov rakoviny.

Fyziologický efekt celých zŕn a ich úloha v zlepšovaní zdravia sú vysvetlené stále len čiastočne. Štúdie v Európe za posledných desať rokov pomôžu identifikovať dôležité

procesy a biologické mechanizmy prebiehajúce v pozadí sledovaných zdravotných prínosov (Venn et al., 2004).

## ZÁVER

Zvýšená konzumácia cereálií a strukovín môže byť ukazovateľom zdravého životného štýlu a prevencie pred obezitou. Zámerom tohto článku bolo zosumarizovať poznatky o cereálnych potravinách vo vzťahu k prevencii obezity. Vlákna sa dlho považuje za hlavnú zdraviu prospešnú zložku celozrnných výrobkov.

V súčasnosti stúpa množstvo dôkazov o zdravotnom prínose ďalších zložiek v zrne. Celozrnná výživa je spojená s klesaním BMI (body mass index), znižovaním obvodu pásu a rizikom nadváhy. Celozrnné potraviny a strukoviny pomáhajú redukovať hmotnosť. Výskumné programy, ktoré by priamo skúmali vzťah príjmu obilnín k obezite, sú pomerne zriedkavé. (Friedrich, 2006).

Vedomosti o vzťahu medzi obilninami a obezitou sú stále nekompletné a na nedávnom Whole Grain and Health summite v Minnesote sa odporúčalo, že je potrebný ďalší výskum orientovaný na:

- (1) súvislosť medzi celozrnnými potravinami a zdravotnou starostlivosťou,
- (2) vývoj inovatívnych výrobkov,
- (3) efektívna komunikácia so zákazníkmi o celozrnných potravinách.

## Pod'akovanie

Touto cestou ďakujeme agentúram VEGA, číslo: 1/0845/08, GAAV, číslo: 4/0013/07 a APVV- 0310-06 za financovanie našich projektov.

## LITERATÚRA

ADLERCREUTZ, H. 1990. Western diet and western diseases; some hormonal and biochemical mechanisms and associations. In *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*, vol. 201, 1990, p. 3–23.

ANDERSON, J. W., HANNA, T. J., PENG, X., KRYSICIO, R. J. 2000. Whole grain foods and heart disease risk. In *Journal of the American College of Nutrition*, vol. 19, 2000, p. 291–299.

ANDERSON J. W. 2003. Whole grains protect against atherosclerotic cardiovascular disease. In *Proceedings of the Nutrition Society*, vol. 62, 2003, s. 135–142.

ANNISON, G., TOPPING, D. L. 1994. Nutritional role of resistant starch: chemical structure vs physiological function. In *Annual Review of Nutrition*, vol. 14, 1994, p. 297–320.

BAGHURST, P. A., BAGHURST, K. I., RECORD, S. J. 1996. Dietary fibre, non-starch polysaccharides and resistant starch. In *Food Australia*, vol. 48, 1996, p. 3–35.

BEER, M. U., ARRIGONI, E., AMADO, R. 1995. Effects of oat gum on blood cholesterol levels in healthy young men. In *European Journal of Clinical Nutrition*, vol. 49, 1995, p. 517–522.

BJORCK, I., LILJEBERG, H., ÖSTMAN, E. 2000. Low glycaemic index food. In *British Journal of Nutrition*, vol. 83, 2000, p. 149–155.

BLACKBURN, G. L., WOLLNER, S., HEYMSFIELD, S. B. 2010. Lifestyle interventions for the treatment of class III

obesity: a primary target for nutrition medicine in the obesity epidemic. In *American Journal of Clinical Nutrition*, vol. 91, 2010, p. 289–292.

BLANDINO, A., AL-ASEERI, M. E., PANDIELLA, S. S., CANTERO, D., WEBB, C. 2003. Cereal-based fermented foods and beverages. In *Food Research International*, vol. 36, 2003, p. 527–543.

BURKITT, D. P. 1952. Acute abdomens. British and Bagand compared. In *East African Medical Journal*, vol. 19, 1952, p. 189–192.

CAMPBELL-PLATT, G. 1994. Fermented foods: a world perspective. In *Food Research International*, vol. 27, 1994, p. 253.

CLEAVE, T. L. 1956. The neglect of the natural principles in current medical practice. In *Journal of the Royal Naval Medical Service*, vol. 42, 1956, p. 55–60.

CONWAY, P. L. 1996. Selection criteria for probiotics microorganisms. In *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, vol. 5, 1996, p. 10–14.

CRAWFORD P. B., GOSLINER, W., ANDERSON, C., STRODE, P., BECERRA-JONES, Y., SAMUEL, S., CARROLL, A. M., RITCHIE, L. D. 2004. Counseling latina mothers of preschool children about weight issues: Suggestions for a new framework. In *Journal of American Diet Association*, vol. 104, 2004, p. 387–94.

CUI, W., WOOD, P. J. 2000. Relationship between structural features, molecular weight and rheological properties of cereal  $\beta$ -D-glucan. In: Nishinari, K. (Ed.): *Hydrocolloids - Part 1*, Elsevier, Amsterdam, 2000, p. 159–168.

CHAMP, M., LANGKILDE, A. M., BROUNS, F., KETLITZ, B., COLLET, Y. I. B. 2003. Advances in dietary fibre characterisation. 1. Definition of dietary fibre, physiological relevance, health benefits and analytical aspects. In *Nutrition Research Reviews*, vol. 16, 2003, p. 71–80.

CHAVAN, J. K., KADAM, S. S. 1989. Critical reviews in food science and nutrition. In *Food Science*, vol. 28, 1989, p. 348–400.

DAVIDSON, M. H., DUGAN, L. D., BURNS, J. H., BOVA, J., STORY, K., DRENNAN, K. B. 1991. The hypocholesterolemic effects of beta-glucan in oatmeal and oat bran. In *Journal of American Medicinal Association*, vol. 265, 1991, p. 1833–1839.

DECKELBAUM, R. J., WILLIAMS, C. L. 2001. Childhood obesity: The health issue. In *Obesity Research*, vol. 9, 2001, p. 239–243.

DEMIRBAS, A. 2005. Beta-glucan and mineral nutrient contents of cereals grown in Turkey. In *Food Chemistry*, vol. 90, 2005, p. 273.

DIETZ, W. H., GORTMAKER, S. L. 2001. Preventing obesity in children and adolescents. In *Annual Review of Public Health*, vol. 22, 2001, p. 337–53.

DJOUSSE, L., GAZIANO, J. M. 2007. Breakfast cereals and risk of heart failure in the physicians' health study I. In *Archives of Internal Medicine*, vol. 167, 2007, p. 2080–2085.

DODOK, L. 1998. Obilniny- zdroj základných živín v ľudskej výžive. In *Výživa a Zdravie*, č. 4, 1998, s. 5–6.

DU, H., VAN DER A. D. L., BOSHIJZEN, H. C., FOROUCHI, N. G.; WAREHAM, N.; HALKJAER, J.; TJONNELAND, A.; OVERVAD, K.; JAKOBSEN, M. U.; BOEING, H.; BUIJSSE, B.; MASALA, G.; PALLI, D.; SORENSEN, T.; SARIS, W. H.; FESKENS, E. J. M. 2009. Dietary fiber and subsequent changes in body weight and waist



- circumference in European men and women. In *American Journal of Clinical Nutrition*, vol. 91, 2009, p. 329-336.
- DURANTI, M. 2006. Grain legume proteins and nutraceutical properties. In *Fytoterapia*, vol. 72, 2006, p. 67-82.
- EGOUNLETY, M. 2002. Production of legume-fortified weaning foods. In *Food Research International*, vol. 35, 2002, p. 233-237.
- ELMADFA, I., FREISLING, H. 2005. Fat intake, diet variety and health promotion. Diet diversification and health promotion. In *Forum of Nutrition*, vol. 57, 2005, p. 1-10.
- ENGLYST, H. N., KINGMAN, J. H., CUMMINGS, J. H. 1992. Classification and measurement of nutritionally important starch fraction. In *European Journal of Clinical Nutrition*, vol. 46, 1992, p. 33-50.
- EPSTEIN, L. H., ROEMMICH, J. N., RAYNOR, H. A. 2001. Behavioral therapy in the treatment of pediatric obesity. In *Pediatric Clinic of North America*, vol. 48, 2001, p. 981-93.
- FAO/WHO. 1997. Carbohydrates in human nutrition. Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation Rome, 1997, p. 140.
- FLIGHT, I., CLIFTON, P. 2006. Cereal grains and legumes in the prevention of coronary heart disease and stroke: a review of the literature. In *European Journal of Clinical Nutrition*, vol. 60, 2006, p. 1145-1159.
- FLINT, A., MOLLER, B. K. 2004. The use of glycaemic index tables to predict glycaemic index of composite breakfast meals. In *British Journal of Nutrition*, vol. 91, 2004, p. 979-89.
- FRANZ, M. J., BANTLE, J. P., BEEBE, C. A., BRUNZELL, J. D., COULSTON, A. M., HENRY, R. R. 2002. Evidence-Based Nutrition Principles and Recommendations for the Treatment and Prevention of Diabetes and Related Complications. In *Diabetes Care*, vol. 25, 2002, p. 148-198.
- FRIEDRICH M. 2006. Better strategies sought against obesity. In *The Journal of the American Medical Association*, vol. 296, 2006, p. 1577-1579.
- JACOBS, D. R., MEYER, K. A., KUSHI, L. H., FOLSOM, A. R. 1998. Wholegrain intake may reduce the risk of ischemic heart disease death in postmenopausal women: the Iowa Women's Health Study. In *American Journal of Clinical Nutrition*, vol. 68, 1998, p. 248-257.
- JENKINS, D. J., AXELSEN, M., KENDALL, C. W. C., AUGUSTIN, L. S. A., VUKSAN, V., SMITH, U. 2000. Dietary fibre, lente carbohydrate and insuline-resistant disease. In *British Journal of Nutrition*, vol. 83, 2000, p. 157-163.
- JENKINS, D. J., VUKSAN, V., RAO, A.V., VIDGEN, E., KENDALL, C. W., TARIG, N., WURSCHE, P., KOELLREUTTER, B., SHIWNARAIN, N., JEFFCOAT, R. 1999. Colonic bacterial activity and serum lipid risk factors for cardiovascular diseases. In *Metabolism*, vol. 48, 1999, p. 264-268.
- JENSEN, M. K., KOH-BANARJEE, P., HU, F. B., FRANZ, M. J., SAMPSON, L., GRONBAEK, M., RIMM, E. B. 2004. Intake of whole grains, bran, and germ risk of coronary heart disease among men. In *American Journal of Clinical Nutrition*, vol. 80, 2004, p. 1492-9.
- JOHANSSON, L., TUOMAINEN, P., YLINEN, M., EKHOLM, P., VIRKKI, L. 2004. Structural analysis of water-soluble and -insoluble beta-glucans of whole-grain oats and barley. In *Carbohydrate Polymers*, vol. 58, 2004, p. 267-274.
- KAIN, J., UAUY, R., VIO, F., CERDA, R., LEYTON, B. 2004. School-based obesity prevention in Chilean primary school children: Methodology and evaluation of a controlled study. In *International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders*, vol. 28, 2004, p. 483-93.
- KAUR, I. P., CHOPRA, K., SAINI, A. 2002. Probiotics: potential pharmaceutical applications. *European Journal of Pharmaceutical Science*, vol. 15, 2002, p. 1-9.
- KEOGH, G. F., GARTH, J. S., MULVEY, T. B., MCARDLE, B. H., COLES, G. D., MONRO, J. A., POPPITT, S. D. 2003. Randomized controlled crossover study of the effect of a highly  $\beta$ -glucan-enriched barley on cardiovascular disease risk factors in mildly hypercholesterolemic men. In *American Journal of Clinical Nutrition*, vol. 78, 2003, p. 711-713.
- KERCKHOFFS, D. A. J. M., HORNSTRA, G., MENSINK, R. P. 2003. Cholesterol-lowering effect of  $\beta$ -glucan from oat bran in mildly hypercholesterolemic subjects may decrease when  $\beta$ -glucan is incorporated into bread and cookies. In *American Journal of Clinical Nutrition*, vol. 78, 2003, p. 221-227.
- KIRK, T., CROMBIE, N., CURSITER, M. 2000. Promotion of dietary carbohydrate as an approach to weight maintenance after initial weight loss: A pilot study. In *Journal of Human Nutrition and Dietetics*, vol. 13, 2000, p. 277-285.
- KOH-BANERJEE, P., RIMM, E. 2003. Whole grain consumption and weight gain: a review of the epidemiological evidence, possible mechanisms and opportunities for further research. In *Proceedings of the Nutrition Society*, vol. 62, 2003, p. 25-29.
- KOH-BANERJEE, P., FRANZ, M., SAMPSON, L. 2004. Changes in whole-grain, bran, and cereal fiber consumption in relation to 8-y weight gain among men. In *American Journal of Clinical Nutrition*, vol. 80, 2004, p. 1237-1245.
- KOVÁČIKOVÁ, E., VOJTAŠŠÁKOVÁ, A., MOSNÁČKOVÁ, J., PASTOROVÁ, J., HOLČIKOVÁ, K., SIMONOVÁ, E., KOŠICKÁ, M. 2007. Vlákna v potravinách. Výskumný ústav potravinársky, Bratislava, 2007.
- LIESE, A. D., ROACH, A. K., SPARKS, K. C., MARQUART, L., D'AGOSTINO, R. B., MAYER-DAVIS, E. J. 2003. Whole-grain intake and insulin sensitivity: the Insulin Resistance Atherosclerosis Study. In *American Journal of Clinical Nutrition*, vol. 78, 2003, p. 965-71.
- LIU, S., STAMPFER, M., HU, F. B., GIOVANNUCCI, E., RIMM, E., MANSON, J., HENNEKENS, C. WILLETT, W. 1999. Whole-grain consumption and risk of coronary heart disease: results from the Nurses' Health Study. In *American Journal of Clinical Nutrition*, vol. 70, 1999, p. 412-419.
- LIU, S., MANSON, J., STAMPFER, M. 2000. A prospective study of whole-grain intake and risk of type 2 diabetes mellitus in US women. In *American Journal of Public Health*, vol. 90, 2000, p. 1409-1415.
- LUPTON, J. R., TURNER, H. D. 2003. Dietary Fibre and Coronary Disease: Does the evidence support an association? In *Current Atherosclerosis Reports*, vol. 5, 2003, p. 500-595.
- LYLY, M., SALMENKALLIO-MARTTILA, M., SUORTTI, T., AUTIO, K., POUTANEN, K., LAHTENMAKI, L. 2003. Influence of oat  $\beta$ -D-glucan preparations on the perception of mouthfeel and rheological properties in beverage prototypes. In *Cereal Chemistry*, vol. 80, 2003, p. 536-541.
- MATTILA-SANDHOLM, T. 1998. VTT on lactic acid bacteria. VTT Symposium, VTT Information Service, Finland, vol. 156, 1998, p. 1-10.

- MÄLKKI, Y., VIRTANEN, E. 2001. Gastrointestinal effects of oat bran and oat gum - a review. In *Lebensmittel- Wissenschaft und Technologie*, vol. 34, 2001, p. 337-347.
- MARLET, J. A., MCBURNEY, M. I., SLAVIN, J. L. 2002. Position of the american dietetic association: Health implications of dietary fibre. In *Journal of the American Dietetic Association*, vol. 102, 2002, p. 993-996.
- MENSAH, P. P. A., TOMKINS, A. M., DRASAR, B. S., HARISSON, T.J. 1990. Fermentation of cereals for reduction of bacterial contamination of weaning food in Ghana. In *Lancet*, vol. 336, 1990, p. 140-143.
- MCKEOWN, N. M., MEIGS, J., LIU, S. 2002. Whole-grain intake is favorably associated with metabolic risk factors for type 2 diabetes and cardiovascular disease in the Framingham Offspring Study. In *American Journal of Clinical Nutrition*, vol. 76, 2002, p. 390-398.
- MCCRORY, M. A., SUEN, V. M. M., ROBERTS, S. B. 2002. Biobehavioral influences on energy intake and adult weight gain. In *Journal of Nutrition*, vol. 132, 2002, p. 3830-3834.
- MURTAUGH, M. A., JACOBS, D. R. J., JACOB, B., STEFFEN, L. M., MARQUART, L. 2003. Epidemiological support for the protection of whole grains against diabetes. In *Proceedings of the Nutrition Society*, vol. 62, 2003, p. 143-149.
- NOUT, M. J. R., MOTARJEMI, Y. 1997. Assessment of fermentation as a household technology for improving food safety: a joint FAO/WHO workshop. In *Food Control*, vol. 8, 1997, p. 221-226.
- OYEWOLE, O. B. 1997. Lactic fermented foods in Africa and their benefits. In *Food Control*, vol. 8, 1997, p. 289-297.
- RIMM, E. B., ASCHERIO, A., GIOVANNUCCI, E., SPIEGELMAN, D., STAMPFER, M., WILLETT, W. 1996. Vegetable, fruit and cereal fiber intake and risk of coronary heart disease risk among men. In *Journal of the American Medical Association*, vol. 275, 1996, p. 447-451.
- RIMSTEN, L., STENBERG, T., ANDERSSON, R., ANDERSSON, A., ÅMAN, P. 2003. Determination of beta-glucan molecular weight using SEC with calcofluor detection in cereal extracts. In *Cereal Chemistry*, vol. 80, 2003, p. 485-490.
- RODEARMEL, S. J., WYATT, H. T., BARRY, M. J., DONG, F., PAN, D., ISRAEL, R. G., CHO, S. S., MCBURNEY, M. I., HILL, J. O. 2006. A family-based approach to preventing excessive weight gain. In *Obesity*, vol. 14, 2006, p. 1392-1401.
- ROSADO, J. L., ARELLANO, M. D. R., MONTEMAYOR, K., GARCIA, O. P., CAAMANO, M. D. C. 2008. An increase of cereal intake as an approach to weight reduction in children is effective only when accompanied by nutrition education: a randomized controlled trial. In *Nutrition Journal*, vol. 7, 2008, p. 28-32.
- ROSS, R. P., MORGAN, S., HILL, C. 2002. Preservation and fermentation: past, present and future. In *International Journal of Food Microbiology*, vol. 79, 2002, p. 3-16.
- SALMERON, J., ASCHERIO, A., RIMM, E., COLDITZ, G., SPIEGELMAN, D., JENKINS, D., STAMPFER, M., WING, A., WILLETT, W. 1997. Dietary fiber, glycemic load, and risk of NIDDM in men. In *Diabetes Care*, vol. 20, 1997, p. 545-550.
- SALMERON, J., MANSON, J. E., STAMPFER, M. J., COLDITZ, G. A., WING, A. L., WILLETT, W. C. 1997. Dietary fiber, glycemic load, and risk of non-insulin dependent diabetes mellitus among women. In *Journal of the American Medical Association*, vol. 277, 1997, p. 472-477.
- SALMINEN, S., VON WRIGHT, A. 1998. Safety of probiotic bacteria: Current perspectives. In: T. Mattila-Sandholm, T. Kauppila: Functional food research in Europe, Haikko, Finland, 1998, p. 105-106.
- SALOVAARA, H. 2000. The time of cereal based functional food is here: introducing yosa, a vellie. In G., Skrede, E.M., Magnus: The Nordic cereal industry towards year, Haugesund, Norway, 2000, p. 195-202.
- SLAVIN, J. 1994. Whole grains and health: separating the wheat from the chaff. In *Nutrition Today*, vol. 29, 1994, p. 6-10.
- SLAVIN, J., JACOBS, D., MARQUART, L. 1997. Whole-grain consumption and chronic disease: protective mechanisms. In *Nutrition in Cancer*, vol. 27, 1997, p. 14-21.
- SLAVIN, J., MARQUART, L., JACOBS, D. 2000. Consumption of whole-grain foods and decreased risk of cancer: proposed mechanisms. In *Cereal Foods World*, vol. 45, 2000, p. 54-8.
- SLAVIN, J. 2003. Impact of the proposed definition of dietary fibres on nutrient databases. In *Journal of Food Composition Analyses*, vol. 16, 2003, p. 287-290.
- SLAVIN J. 2005. Dietary fiber and body weight. In *Nutrition*, vol. 21, 2005, p. 411-418.
- STAUFER, C. E. 2001. Functional additives for bakery foods. In: Gómez, C., Navarro, A., Manzanares, P., et al. Physical and structural properties of barley (1→3),(1→4)-β-glucan. Part I. Determination of molecular weight and macromolecular radius by light scattering. In *Carbohydrate Polymers*, vol. 32, 1997, p. 7-12.
- STEINKRAUS, K. H. 1998. Bio-enrichment: production of vitamins in fermented foods. In Wood J. B. Microbiology of fermented foods, Blackie Academic and Professional, London, 1998, p. 603-619.
- STETTLER, N. 2002. Environmental factors in the etiology of obesity in adolescents. In *Ethnic Diseases*, vol. 12, 2002, p. 41-5.
- SWINBURN B, CATERSON I, SEIDEL J., JAMES, W. P. T. 2004. Diet, nutrition and the prevention of excess weight gain and obesity. In *Public Health Nutrition*, vol. 71, 2004, p. 123-146.
- TOUFEILI, I., OLABI, A., SHADAREVIAN, S., ABI ANTOUN, M., ZURAYK, R., BAALBAKI, I. 1997. Relationships of selected wheat parameters to bulgur-making quality. In *Journal of Food Quality*, vol. 20, 1997, p. 211-224.
- TROGH, I., COURTIN, C. M., ANDERSSON, A. A. M., ÅMAN, P., SORENSEN, J. F., DELCOUR, J. A. 2004. The combined use of hull-less barley flour and xylanase as a strategy for wheat/hull-less barley flour breads with increased arabinoxylan and (1→3, 1→4)-beta-D-glucan levels. In *Journal of Cereal Science*, vol. 40, 2004, p. 257.
- TROWELL, H. 1972. Ischemic heart disease and dietary fiber. In *American Journal of Clinical Nutrition*, vol. 25, 1972, p. 926-932.
- VENN, B., MANN, J. 2004. Cereal grains, legumes and diabetes. In *European Journal of Clinical Nutrition*, vol. 58, 2004, p. 1443-1461.
- VIRKKI, L., JOHANSSON, L., YLINEN, M. 2005. Structural characterization of water-insoluble nonstarchy polysaccharides of oats and barley. In *Carbohydrate Polymers*, vol. 59, 2005, p. 357-366.
- VRIES, J. 2003. On defining dietary fibre. In *Proceedings of the Nutrition Society*, vol. 62, 2003, p. 37-43.

WALKER, A. R. P. 1947. The effects of recent changes of food habits and bowel motility. In *South African Medical Journal*, vol. 21, 1947, p. 590–592.

WILLIAMS, P. G., GRAFENAUER, S. J., O'SHEA J. E. 2008. Cereal grains, legumes and weight management: a comprehensive review of the scientific evidence. In Faculty of Health and Behavioural Sciences-Papers. University of Wollongong, 2008.

WILLETT, W. C. 1998. The dietary pyramid: does the foundation need repair?. In *American Journal of Clinical Nutrition*, vol. 68, 1998, p. 218–219.

WOOD, P. J. 1997. Functional foods for health: opportunities for novel cereal processes and products. In *Cereals*, vol. 8, 1997, p. 233–238.

WRIGLEY, C., CORKE, H., WALKER, CH. E. 2004. Oats. In *Encyclopedia of Grain Science*, Oxford: Academic Press, vol. 2, 2004, p. 365–374.

ŽAJOVÁ, A., PORUBSKÁ, M. 1997. Obilniny vo výžive zdravých i chorých ľudí. In: *Obilniny Zborník VÚRV*, Piešťany, 1997, s. 400.

YUN, CH. H., ESTRADA, A. 2003. Beta-glucan, extracted from oat, enhances disease resistance against bacterial and parasitic infections. In *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, vol. 35, 2003, p. 67–75.

### **Kontaktná adresa:**

Mgr. Lenka Duchoňová, Institute of Biochemistry, Nutrition and Health Protection, Faculty of Chemical and Food Technology Slovak University of Technology in Bratislava, Radlinského 9, 812 37 Bratislava, 02/59325400, lenka.duchonova@stuba.sk

doc. Ing. Ernest Šturdík, CSc., Institute of Biochemistry, Nutrition and Health Protection, Faculty of Chemical and Food Technology Slovak University of Technology in Bratislava, Radlinského 9, 812 37 Bratislava, 02/52731595, ernest.sturdik@stuba.sk

**GENETIC MARKERS AS ONE OF TOOLS FOR PRODUCTION OF TENDERNESS MEAT IN CATTLE***Michal Gábor, Anna Trakovická, Martina Miluchová, Nina Moravčíková***ABSTRACT**

Meat tenderness is one of the major characteristic quality of beef not only for consumers but for breeders of beef cattle too. Selection of cattle focussed on an increment of meat tenderness is complicated because this trait has large variability not only between different breeds but between individuals of equal breed too. Similarly a measurement of meat tenderness is expensive because it make after slaughter of animal and ageing of meat post mortem. Therefore it was developed a several methods, by the help of which is possible increase tenderness of meat. However still exist variance in values of meat tenderness which are caused by distinctness genetic base of animal. By using molecular genetic methods was described the most significant candidate genes (CAPN1, CAST) coding formation of the calpains-calpastatin proteolytic system, which exercise an influence on tenderness. The single nucleotide polymorphisms (SNPs) in these genes were using to design commercially genetic marker panels GeneSTAR Tenderness and Igenity Tender-GENE. By help this commercially test is possible to make genotyping and selection of animals for production of tenderness beef meat in meat industry.

**Keywords:** cattle, meat, tenderness, SNPs, CAPN1, CAST

**ÚVOD**

Cieleným šľachtením hovädzieho dobytku sa dosiahol výrazný nárast v produkcii mlieka pri mliečnych plemenách alebo sa výrazne zvýšila intenzita rastu mäsových plemien, to znamená, že pri selekcii sa doteraz uprednostňoval zámer šľachtenia na kvantitu živočíšnych produktov (mlieko, mäso). Selektívny zámer na zvýšenie kvality jednotlivých produktov hovädzieho dobytku, predovšetkým kvality mäsa, bol podstatne slabší. V poslednej dobe sa však ciele selekcie pri mäsových plemenách hovädzieho dobytku čoraz výraznejšie zameriavajú v prospech zvýšenia kvalitatívnych znakov, ktoré výrazne posilňujú záujem konzumentov o kúpu hovädzieho mäsa.

Pri hodnotení kvality mäsa rozoznávame dva dôležité faktory, ktoré výrazne ovplyvňujú kvalitu mäsa. Prvým faktorom je vplyv prostredia zahrňujúci rôzne systémy chovu, vek pri zabití, zaobchádzanie so zvieratami pred zabitím (eliminácia stresových faktorov) ako aj podmienky pri zretí mäsa v *post mortem*.

Druhým dôležitým faktorom je vplyv genetického založenia jednotlivých mäsových plemien. Dôležitosť genetických faktorov môže byť demonštrovaná porovnávaním rôznych plemien a rozličných genotypov v rámci rovnakých plemien, či preskúmaním major génov alebo štúdiom polygenetickej dedičnosti pri mäsových plemenách. Rozdielne plemená alebo rozdielne genotypy v jednej populácii plemena sú príčinou odlišne fyziológie vo svaloch. V dôsledku toho môže byť teda rozdielna kvalita mäsa závislá od genotypu zvierat'a.

**Jemnosť hovädzieho mäsa „tenderness“**

Na základe rozsiahleho výskumu spotrebiteľov sa zistilo, že väčšina z nich pri zmyslovom posudzovaní hovädzieho mäsa prikladá väčšiu pozornosť práve jemnosti mäsa (Miller et al., 1995). Je dokázané, že konzumenti môžu cítiť rozdiely medzi tuhým a jemným mäsom klasifikovaným podľa Warner-Bratzlerového testu strižnej sily (Hauffman et al., 1996) a sú ochotní zaplatiť viac za jemnejšie mäso (Boleman et al., 1997). Odlišnosť

v jemnosti mäsa vnímaný konzumentmi závisí hlavne od procesu uskutočneného počas fázy krehnutia (Veiseth a Koohmaraie, 2005).

Samotný proces zrenia mäsa *post mortem* môžeme rozdeliť do troch fáz, počas ktorých dochádza k premene svalů na mäso. Prvá fáza sa nazýva tzv. *pre-rigor* fáza alebo fáza pred tuhnutím jatočného tela, trvá v rozpätí od 15 do 30 minút po porážke zvierat'a, počas ktorej sval zostáva excitabilný a môže reagovať na podnety nervovej sústavy (Chrystall a Devine, 1985). Druhá fáza sa nazýva fáza tuhnutia alebo aj fáza *rigor mortis*, počas ktorej dochádza k vyčerpaniu energeticky bohatých zložiek ako sú napr. ATP alebo glykogén. Doba vyčerpania týchto komponentov je rôzna a závisí od typu svalů, druhu zvierat'a a podmienok zmrazenia. V priebehu tejto fázy dochádza ku skracovaniu dĺžky sarkoméry čím sa znižuje elasticita svalů spôsobujúca zvýšenú tuhosť mäsa. Porovnávaním zvierat jedného plemena s rovnakým vekom boli zistené rozdielne hodnoty jemnosti mäsa, príčinou ktorých mohla byť úroveň kontrakcie sarkomer pri nástupe *rigor mortis* (Sentandreu et al., 2002). Tretiu fázu zrenia mäsa predstavuje tzv. fáza krehnutia, kedy vplyvom endogénnych proteáz dochádza k degradácii svalových proteínov nachádzajúcich sa v svalových myofibrilách. Koohmaraie (1992) charakterizuje tretiu fázu zrenia mäsa začiatkom proteolýzy svalových myofibril, denaturáciou kolagénu, deštrukciou spojiv a diasociáciou aktín-myozínového komplexu a asociáciou proteínov. Samotný proces krehnutia mäsa je závislý na čase a približne po 72 hodinách je hlavná časť procesu krehnutia mäsa kompletná.

**Faktory ovplyvňujúce jemnosť mäsa**

Odchýlky v jemnosti mäsa vznikajú v dôsledku genetickej variácie, biologických a fyziologických rozdielov, biofyzikálnych zmien počas porážky a chemických rozdielov vytvorených počas zretia *post mortem* (Koohmaraie, 1996). Početné výskumy dokázali, že preukazné zlepšenie jemnosti mäsa môže byť

dosiahnuté kontrolovaním fyziologických procesov pôsobiacich na krehkosť a procesov, ktoré sú ovplyvnené vonkajšími faktormi.

### Zloženie svalového vlákna

Samotné zloženie svalových vlákien vo svalce je závislé od funkcie konkrétnej svalovej partie a výrazne vplýva na stupeň jemnosti mäsa. Funkcia svalu u žijúceho zvieratá hrá dôležitú úlohu pre stanovenie rozdielneho stupňa jemnosti. Ako príklad môžeme uviesť prednú nohu a celú päť, ktoré sú používané prevažne na pohyb a preto obsahujú viac spojivového tkaniva, ktoré je tuhšie. Protikladom takéhoto mäsa je sviečková, ktorá sa považuje za najjemnejšie mäso hovädzieho dobytku. Latinský názov tohto svalu je *musculus psoas major* a jeho hlavnou funkciou je stabilizovať chrbát pri určitých pohyboch (Leveau, 2008). Svaly obsahujú tri proteínové frakcie a to myofibrilárne proteíny rozpustné v roztoku solí, proteíny spojivového tkaniva, ktoré sú rozpustné v kyseline a nakoniec sarkoplazmatické proteíny rozpustné vo vode (Koochmaraie et al., 2002). Najpočetnejšiu časť svalov tvoria štruktúrne myofibrilárne proteíny, ktorých degradácia tvorí základný proces zretia mäsa.

### Endogénne peptidázy

Zlepšenie stupňa krehkosti mäsa v podmienkach *post mortem* je vo všeobecnosti závislé od zjemnenia myofibrilárnej štruktúry svalu prostredníctvom endogénnych proteolytických enzýmov. Kostrové svalstvo tvorené svalovými myofibrilami obsahuje rôzne skupiny proteínov, ktorých degradácia je spojená s premenou svalu na mäso. Skupinu týchto proteínov tvoria aktín, myozín, troponín, tropomyozín, C-proteín, M-proteín a cytoskeletálne proteíny titín, nebulín, dezmin, dystrofin a vinculin (Huff-Lonergan, 1999; Hopkins a Thomson, 2001). Jednotlivé skupiny proteínov sú degradované špecifickými proteolytickými endonukleázami. Proteolýza niektorých proteínov nastáva už niekoľko minút po porážke a stupeň rozrušenia týchto proteínov (titín a nebulín) vplýva na finálnu krehkosť mäsa závislú od degradácie ďalších proteínov akými sú aktín a myozín. Pri degradácii jednotlivých proteínov hrá dôležitú úlohu spojivové tkanivo vo svalce tvoreného vrstvou endomyzia, perimyzia a epimyzia. Spojivové tkanivá udržiavajú integritu kontraktibilného aparátu a počas degradácie svalových myofibril odolávajú účinku proteáz (Hopkins, 2004).

Sentandreu et al. (2002) popísali vo svojej štúdiu jednotlivé rodiny peptidáz prítomných v kostrovom svalstve. Ouali (1992) zistil, že aktivitu jednotlivých skupín enzýmov pozitívne alebo negatívne ovplyvňujú fyzikálno-chemické podmienky (pH, osmotický tlak) vznikajúce vplyvom premeny svalu na mäso. Skupinu endogénnych peptidáz lokalizovaných v kostrovom svalstve tvoria kalpaíny, katepsíny, proteazómy, matrixové metalopeptidázy a serínové peptidázy.

Najviac preštudovanú skupinu endogénnych proteáz tvoria kalpaíny spolu s ich endogénnym inhibítorom kalpastatínom. Endogénny kalpaín-kalpastatínový komplex zohráva hlavnú úlohu pri proteolýze svalových proteínov počas zrenia v *post mortem*. Kalpaíny predstavujú všadeprítomné cytoplazmatické cysteínové proteázy, ktorých aktivita je viazaná na prítomnosť vápnika (Sorimachi et al., 1997). Plnia kľúčovú úlohu pri

zretí mäsa *post mortem* (Koochmaraie et al., 1996), kedy proteolyticky degradujú myofibrily svalových vlákien. Sú tvorené dvoma podjednotkami s molekulárnymi hmotnosťami 30 kDa a 80 kDa. Ich účinok inhibuje enzým kalpastatín, ktorý spolu s kalpaínmi tvorí nezastupiteľný primárny proteolytický enzýmový systém potrebný pri zretí mäsa (Koochmaraie et al., 1991).

Na základe koncentrácie vápnika špecifickej pre jednotlivé typy kalpaínov boli najviac preskúmané  $\mu$ -kalpaín (kalpaín 1) a m-kalpaín (kalpaín 2). Pre spustenie aktivity  $\mu$ -kalpaínu postačuje koncentrácia  $\text{Ca}^{2+}$  približne 50–100  $\mu\text{M}$ , zatiaľ čo pre navodenie aktivity pri m-kalpaíne je potrebná koncentrácia  $\text{Ca}^{2+}$  približne 1–2 mM (Suzuki a Sorimachi 1998; Goll et al., 2003). Tretí typ kalpaínu dostal pomenovanie kalpaín 3, ale podľa Veisetha a Koochmaraieho (2005) a Geesinka et al. (2005) nie je zahrnutý do procesu krehnutia mäsa.

Skúmaním aktivity kalpaínov počas procesu krehnutia mäsa sa zistila závislosť kalpaínov od prítomnosti vápenatých iónov potrebných k ich aktivácii. Testy prídavku chloridu vápenatého do jatočného tela skúmané vo viacerých štúdiách poskytli preukazný efekt na strižnú silu, pričom došlo k 32 % nárastu jemnosti mäsa v porovnaní s kontrolnými vzorkami bez prídavku chloridu vápenatého (Wheeler et al., 1991; Boleman et al., 1995; Lawrence et al., 2003). Na podporenie predchádzajúcich štúdií boli vykonané testy s prídavkom chloridu zinočnatého podaného injekčne pôsobiaceho ako inhibítor aktivity vápnika. Výsledky vzoriek hovädzej svaloviny, ktorým bola podaná injekcia chloridu zinočnatého zaznamenali drasticky vysoké hodnoty strižnej sily (Lawrence et al., 2003).

Inhibítorom aktivity kalpaínov je kalpastatín lokalizovaný taktiež vo svaloch. Kalpastatín má dôležitú úlohu pri regulácii exprese kalpaínov. Jedna molekula kalpastatínu môže inhibovať až štyri molekuly kalpaínu (Goll et al., 2003). Navyše množstvo vápnika potrebného na aktiváciu kalpastatínu je nižšie ako pri aktivácii oboch kalpaínov (Hopkins a Thomson, 2001). Úroveň inhibičnej aktivity kalpastatínu sa znižuje počas zrenia mäsa *post mortem*.

### Vek

Jemnosť mäsa klesá s pribúdajúcim vekom živého zvieratá, preto je mäso mladých zvierat jemnejšie (Reagan et al., 1976). Hlavným dôvodom poklesu jemnosti mäsa súvisiaceho so stúpajúcim vekom je zvýšenie kolagénových priečných väzieb vo svaloch alebo redukcia množstva rozpustného kolagénu (Lepetit, 2007).

### Plemeno

Rozdielne plemená alebo rozdielne genotypy v rámci jedného plemena sú príčinou rozdielnej fyziológie vo svaloch. V dôsledku toho môže byť teda rozdielna kvalita mäsa závislá od genotypu zvieratá. Napríklad mäso dobytku, ktorého predok bol *Bos indicus* má nižšiu jemnosť ako plemeno, ktorého predkom bol *Bos taurus*. Nižšia jemnosť mäsa pri *Bos indicus* je zapríčinená redukciou proteolýzy myofibrilárnych proteínov vo svaloch v spojitosti s vyššou aktivitou kalpastatínu, ktorý pôsobí ako inhibítor kalpaínov zodpovedných za proteolýzu mäsa (Whipple et al., 1990). Neskôr dospievajúce mäsové plemená ako belgické modré,



limousin, blonde d'aquitaine sú charakteristické nižším obsahom kolagénových vlákien, kompresie a strižnej sily surového a vareného mäsa, vyšším obsahom svalovej hmoty a nižším obsahom tuku v porovnaní s mliečnymi typmi plemien alebo s rannými mäsovými plemenami angus a japonský čierny dobytok.

### Metódy merania jemnosti mäsa

Jemnosť mäsa je najjednoduchšie merateľný faktor celkovej chutnosti hovädzieho mäsa. Stupeň jemnosti je meraný dvoma základnými metódami - Warner-Bratzlerová strižná sila a metóda senzorickej analýzy. Warner-Bratzlerová strižná sila (WBSF) predstavuje objektívnu metódu vyvinutú začiatkom tridsiatych rokov 20. storočia, pri ktorej sa zisťuje maximum sily potrebnej na prerezanie svalových vlákien vyjadrenej v librách alebo kilogramoch (Warris, 2004). Senzorická analýza môže byť vykonaná použitím panelov akými sú napríklad spotrebiteľský panel (Montgomery et al., 2002).

### Metódy zvyšujúce stupeň jemnosti mäsa

Na základe sledovania jednotlivých fyzikálnych, chemických a enzymatických procesov prebiehajúcich počas všetkých troch fáz zretia mäsa boli optimalizované metódy a postupy pozitívne zvyšujúce stupeň krehkosti mäsa. Podstata väčšiny z týchto metód spočíva v uvoľnení určitého množstva  $Ca^{2+}$  zo svaly, ktorý následne zvýši aktivitu kalpaínov nakoľko samotný proces zretia mäsa je z veľkej časti závislý na aktivite endogénnych peptidáz.

Medzi najviac preštudované metódy patria:

- *elektrická stimulácia jatočného tela* (Nour et al., 1994, Hwang a Thomson, 2001, Hwang et al., 2003, Lawries a Ledward, 2006),
- *zmrazenie jatočného tela* (Sorheim et al., 2000; Hopkins, 2004)
- *metóda využitia hydrodynamického tlaku* (Solomon et al., 1997),
- *metóda využitia ultrazvukových vln* (Hwang a Thomson, 2002).

### Genetické markery krehkosti mäsa

Napriek snahám mäsového priemyslu optimalizovať jemnosť mäsa, stále existuje veľké množstvo variácií medzi jednotlivcami, ktoré môžu byť vysvetlené najmä pôsobením dedičných faktorov. Navyše meranie jednotlivých parametrov kvality mäsa všeobecne dôležitých pre záujem konzumentov je veľmi nákladné. Práve z tohoto dôvodu sa v poslednej dobe začínajú využívať testy založené na genotypovaní zvierat na prítomnosť jednotlivých mutácií, pri ktorých bola preukazná asociácia medzi ich prítomnosťou a zlepšenou kvalitou hovädzieho mäsa.

Medzi najznámejšie kandidátske gény asociované s jemnosťou mäsa zvierat patria gény CAPN1 kódujúci proteázu  $\mu$ -kalpaín (EC 3.4.22.52) a CAST kódujúci vznik kalpastatínu.

### Gén CAPN1

Geesink et al. (2006) vo svojej práci potvrdili esenciálnu úlohu  $\mu$ -kalpaínu pre enzymatickú aktivitu *post mortem*. Goll et al. (2003) zistili, že v živých svaloch je pôsobenie kalpaínov blokované naviazaním na kalpastatín. Kalpaíny sa stávajú aktívne až v štádiu *post mortem* pričom

pravdepodobným dôvodom na spustenie aktivity kalpaínov je vyčerpanie energie ATP, ktorej pokles spôsobený nástupom *rigor mortis* vyvolá zastavenie reabsorbie vápnikových iónov v sarkoplazmatickom retikule. Namiesto toho je vápnik uvoľnený do sarkoplazmy, kde dochádza k inhibícii naviazania kalpastatínu na kalpaín. Vyčerpaním ATP a zvýšením úrovne vápnika nad hranicu, pri ktorej je kalpastatín schopný blokovať kalpaín, dochádza k nárastu proteolytickej aktivity kalpaínov (Warris, 2004).

K identifikácii génov kódujúcich enzýmy kalpaín-kalpastatín proteolytického systému bolo použité veľké množstvo kríženého dobytku. Smith et al. (2000) podrobným mapovaním lokalizoval gén CAPN1 ( $\mu$ -kalpaín) na 29. chromozóme. Doteraz bolo u bovinného CAPN1 génu popísaných 38 SNP (Page et al. 2002; 2004; White et al., 2005; Kubiak-Juszczuk et al., 2004), avšak väčšina z nich bola lokalizovaná v intrónových oblastiach génu CAPN1 s výnimkou dvoch SNP lokalizovaných v 9. exóne kde dochádza k zámene C/G výsledkom čoho bola zmena sekvencie aminokyselín Gly<sup>316</sup>/Ala<sup>316</sup> a v 14. exóne, kde došlo k substitúcii A/G s následnou zmenou sekvencie aminokyselín Val<sup>530</sup>/Ile<sup>530</sup>. Ďalšie analýzy krížencov hovädzieho dobytku potvrdili asociácie vyššej strižnej sily a prítomnosti glycínu a izoleucínu v sekvencii aminokyselín enzýmu  $\mu$ -kalpaín v prospech genotypov kódujúcich alanínovú a valínovú variantu v sekvencii aminokyselín enzýmu  $\mu$ -kalpaín (Page et al., 2002). Preferovaná alela C markeru CAPN316 bola dokázaná pri väčšine mäsových plemien, ale len s nízkou až strednou frekvenciou výskytu (Page et al., 2004). Prednedávnom bola objavená nová genetická variácia CAPN1 génu, pri ktorej bola popísaná asociácia medzi hodnotami strižnej sily a zretím mäsa *post mortem* v dobe od 7 do 21 dní. Nový polymorfizmus génu CAPN1 označovaný ako CAPN4751 spočíva v substitúcii C/T. Alela T bola spojená s vyššími hodnotami strižnej sily a s vyššou frekvenciou výskytu pri plemenách s pôvodom *Bos indicus*. Preto bol spomínaný marker CAPN4751 otestovaný aj pri plemenách s pôvodom *Bos taurus*, pričom bola zistená zvýšená frekvencia alely C, ktorá bola asociovaná s nižšími hodnotami strižnej sily (White et al., 2005).

### Gén CAST

Dôležitou súčasťou kalpaínového systému proteáz je ich endogénny inhibítor kalpastatín nájdený vo všetkých tkanivách obsahujúcich kalpaíny. Kalpastatín získaný z kostrového svalstva je jednoduchý polypeptid tvorený štyrmi opakujúcimi sa doménami 1, 2, 3 a 4 a N – terminálnou oblasťou označovanou ako doména L alebo XL (Maki et al., 1991), ktorá sa vyznačuje variabilnou veľkosťou (Goll et al., 1999). Otsuka a Goll (1987) zistili, že neporušená kalpastatínová molekula je schopná inhibovať najmenej štyri molekuly kalpaínu, práve vplyvom inhibičných aktivít domén 1 – 4. Z toho vyplýva, že kalpastatín plní dôležitú úlohu pri expresii kalpaínovej proteolytickej aktivity. Zaujímavosťou je, že kalpastatín k svojej aktivácii vyžaduje vápnik naviazaný na kalpaínoch. Množstvo vápnika potrebného k naviazaniu kalpastatínu na kalpaín je omnoho nižšie ako množstvo vápnika potrebného pre polovičnú aktivitu alebo polovičnú autolýzu m-kalpaínu a  $\mu$ -kalpaínu (Kapprell et

al., 1989). Otsuka a Goll (1987) zistili, že naviazanie kalpastatínu je reverzibilný proces a vplyvom vápnikových chelatónov (napr. EDTA) môže nastať diasociácia kalpastatínu od kalpaínu. Lonergan et al. (2001) zistili, že vo svaloch v *post mortem* je kalpastatín degradovaný. Rýchlosť degradácie a inaktivácie kalpastatínu je spojená s rýchlosťou proteolýzy a krehnutia pozorovaného v mäse (Geesink a Koohmaraie, 1999; Lonergan et al., 2001) čo predstavuje dobrý dôkaz o čiastočnom vplyve kalpaínu na degradáciu kalpastatínu. Presné faktory alebo podmienky, ktoré regulujú degradáciu kalpastatínu kalpaínom však nie sú známe (Montgomery et al., 2002).

Gén pre kalpastatín označovaný ako CAST môžeme na základe výsledkov početných štúdií vykonaných najmä na hovädzom dobytku považovať za kandidátsky gén pre jemnosť mäsa. Gén kódujúci vznik hovädzieho kalpastatínu je lokalizovaný na 7. chromozóme s relatívnou pozíciou 117,8 cM (Bishop et al., 1993; Kappes et al., 1997).

Barendse (2002) objavil v 3'UTR oblasti jeden z dvoch doposiaľ najdôležitejších polymorfizmov CAST génu. Podstatou jednonukleotidového polymorfizmu (SNP) je zámena G za A. Početné štúdie potvrdzujúce silnú

asociáciu tohto SNP s jemnosťou hovädzieho mäsa umožnili využitie spomínanej mutácie génu CAST v komerčnom teste GeneSTAR Tenderness, ktorý spolu s vybranými SNP  $\mu$ -kalpaínu CAPN316 a CAPN4751 tvoria jeden zo základných panelov pre predikciu jemnosti mäsa hovädzieho dobytku.

Druhé najvýznamnejšie SNP lokalizované v 5. intróne génu CAST popísal Schenkel et al. (2006). Nové SNP spočívajúce v zámene G za C bolo asociované so znížením hodnoty Warner-Bratzlerovej strižnej sily pri hovädzom mäse. SNP dostalo pomenovanie UoG-CAST je súčasťou druhého komerčného testu s označením Igenity TenderGENE. Súčasťou spomínaného komerčného testu na odhadnutie jemnosti mäsa na základe genetickej predispozície sú podobne ako v predchádzajúcom teste GeneSTAR Tenderness markery CAPN316 a CAPN4751 génu CAPN1 kódujúceho vznik  $\mu$ -kalpaínu.

Štúdia Van-Eennaama et al. (2007) potvrdila platnosť oboch komerčných testov GeneSTAR Tenderness a Igenity TenderGENE pri genotypovaní zvierat hovädzieho dobytku a tým potvrdila silnú asociáciu polymorfizmov génov CAST a CAPN1 s jemnosťou mäsa (tabuľka 1).

Genotypy			GeneSTAR Tenderness				Igenity TenderGene			
GeneSTAR T1 alebo Igenity UoG-CAST	T2 = CAPN316	T3 = CAPN4751	Odhad kg	SE	No.	%	Odhad kg	SE	No.	%
2 alebo CC	2 = CC	2 = CC	- 1,0	0,2	11	0,8	- 1,0	0,2	18	1,5
		1 = CT	- 0,8	0,2	9	0,7	- 0,5	0,3	8	0,7
		0 = TT	- 0,6	0,4	0	0,0	0,1	0,5	0	0,0
1 alebo CG	1 = CG	2 = CC	- 0,8	0,2	71	5,5	- 0,9	0,1	60	5,0
		1 = CT	- 0,6	0,1	80	6,1	- 0,7	0,1	123	10,2
		0 = TT	- 0,5	0,2	13	1,0	- 0,2	0,2	9	0,7
0 alebo GG	0 = GG	2 = CC	- 0,7	0,2	54	4,2	- 0,7	0,2	33	2,7
		1 = CT	- 0,5	0,1	143	11,0	- 0,6	0,1	181	15,0
		0 = TT	- 0,3	0,1	321	24,7	- 0,4	0,1	212	17,5
1 alebo CG	2 = CC	2 = CC	- 0,8	0,2	5	0,4	- 0,8	0,1	9	0,7
		1 = CT	- 0,7	0,2	3	0,2	- 0,3	0,2	1	0,1
		0 = TT	- 0,5	0,4	0	0,0	0,2	0,5	0	0,0
0 alebo GG	1 = CG	2 = CC	- 0,7	0,1	38	2,9	- 0,7	0,1	42	3,5
		1 = CT	- 0,5	0,1	25	1,9	- 0,5	0,1	74	6,1
		0 = TT	- 0,3	0,2	7	0,5	0,0	0,2	4	0,3
0 alebo GG	0 = GG	2 = CC	- 0,5	0,1	62	4,8	- 0,6	0,1	23	1,9
		1 = CT	- 0,3	0,1	53	4,1	- 0,4	0,1	91	7,5
		0 = TT	- 0,2	0,0	285	21,9	- 0,2	0,1	204	16,9
0 alebo GG	2 = CC	2 = CC	- 0,7	0,2	0	0,0	- 0,7	0,1	2	0,2
		1 = CT	- 0,5	0,2	1	0,1	- 0,1	0,2	1	0,1
		0 = TT	- 0,3	0,3	0	0,0	0,4	0,5	0	0,0
0 alebo GG	1 = CG	2 = CC	- 0,5	0,1	9	0,7	- 0,5	0,1	7	0,6
		1 = CT	- 0,3	0,1	7	0,5	- 0,3	0,1	9	0,7
		0 = TT	- 0,2	0,2	6	0,5	0,2	0,2	0	0,0
0 alebo GG	0 = GG	2 = CC	- 0,4	0,1	17	1,3	- 0,4	0,1	5	0,4
		1 = CT	- 0,2	0,1	15	1,2	- 0,2	0,1	30	2,5
		0 = TT	0,0	0,0	67	5,2	0,0	0,0	63	5,2

## ZÁVER

Cieľom tohoto príspevku bolo poskytnúť rozsiahly prehľad negetických a genetických faktorov vplývajúcich na proces zretia mäsa *post mortem* ako aj možnosti využitia technologických postupov pre produkciu jemnejšieho hovädzieho mäsa. Hlavným zámerom bolo poukázať na vplyv genetických markerov génov CAPN1 a CAST, ktorých

komerčné využitie sa už realizuje vo vyspelých krajinách s vysokou produkciou hovädzieho mäsa ako Austrália, Kanada a USA.

**Pod'akovanie:** Táto práca bola podporovaná Agentúrou na podporu výskumu a vývoja na základe zmluvy č. LPP-0220-09.

## LITERATÚRA

- BARENDSE, W. G. 2002. DNA markers for meat tenderness. International patent application No. PCT/AU02/00122. World Intellectual Property Org. Int. Publication No. WO 02/064820 A1.
- BISHOP, M. D., KAPPES, S. D., KEELE, J. W., STONE, R. T., SUNDEN, S. L. F., HAWKINS, G. A., SOLINAS TOLDO S., FRIES, R., GROSZ, M. D., YOO, J., BEATTIE, C. W. 1994. A genetic linkage map for cattle. In: *Genetics*, vol. 136, 1994, p. 619-639.
- BOLEMAN, S. J., BOLEMAN, S.L., BIDNER, T.D., MCMILLIN, K.W., MONLEZUN, C.J. 1995. Effects of post-mortem time of calcium chloride injection on beef tenderness and drip, cooking and total loss. In *Meat Science*, vol. 39, 1995, p. 35-41.
- BOLEMAN, S. J., BOLEMAN, S. L., MILLER, R. K., TAYLOR, J. F., CROSS, H. R., WHEELER, T. L., KOOHMARAIE, M., SHACKLEFORD, S. D., MILLER, M. F., WEST, R. L., JOHNSON, D. D., SAVELL, J. W., 1997. Consumer Evaluation of Beef of Known Categories of Tenderness. In *J. Anim. Sci.*, vol. 75, 1997, 1521-1524.
- GEESINK G. H., KOOHMARAIE, M. 1999. Effect of calpastatin on degradation of myofibrillar proteins by  $\mu$ -calpain under postmortem conditions. In *J. Animal Sci.*, vol. 77, 1999, p. 2685-2692.
- GEESINK, G. H., TAYLOR, R. G., KOOHMARAIE, M. 2005. Calpain 3/p94 is not involved in postmortem proteolysis. In *J. Anim. Sci.*, vol. 83, 2005, p. 1646-1652.
- GEESINK, G. H., KUCHAY, S., CHISHTI, A. H., KOOHMARAIE, M. 2006.  $\mu$ -calpain is essential for post-mortem proteolysis of muscle proteins. In *J. Anim. Sci.*, vol. 84, 2006, p. 2834-2840.
- GOLL, D. E., THOMPSON, V. F., LI, H., WEI, W., CONG, J. 2003. The calpain system. In *Physiological Reviews*, vol. 83, 2003, p. 731-801.
- BARENDSE, W. G. 2002. DNA markers for meat tenderness. International patent application No. PCT/AU02/00122. World Intellectual Property Org. Int. Publication No. WO 02/064820 A1.
- BISHOP, M. D., KAPPES, S. D., KEELE, J. W., STONE, R. T., SUNDEN, S. L. F., HAWKINS, G. A., SOLINAS TOLDO S., FRIES, R., GROSZ, M. D., YOO, J., BEATTIE, C. W. 1994. A genetic linkage map for cattle. In: *Genetics*, vol. 136, 1994, p. 619-639.
- BOLEMAN, S. J., BOLEMAN, S. L., BIDNER, T. D., MCMILLIN, K. W., MONLEZUN, C. J. 1995. Effects of post-mortem time of calcium chloride injection on beef tenderness and drip, cooking and total loss. In *Meat Science*, vol. 39, 1995, p. 35-41.
- BOLEMAN, S. J., BOLEMAN, S. L., MILLER, R. K., TAYLOR, J. F., CROSS, H. R., WHEELER, T. L., KOOHMARAIE, M., SHACKLEFORD, S. D., MILLER, M. F., WEST, R. L., JOHNSON, D. D., SAVELL, J. W., 1997. Consumer Evaluation of Beef of Known Categories of Tenderness. In *J. Anim. Sci.*, vol. 75, 1997, 1521-1524.
- GEESINK G. H., KOOHMARAIE, M. 1999. Effect of calpastatin on degradation of myofibrillar proteins by  $\mu$ -calpain under postmortem conditions. In *J. Animal Sci.*, vol. 77, 1999, p. 2685-2692.
- GEESINK, G. H., TAYLOR, R. G., KOOHMARAIE, M. 2005. Calpain 3/p94 is not involved in postmortem proteolysis. In *J. Anim. Sci.*, vol. 83, 2005, p. 1646-1652.
- GEESINK, G. H., KUCHAY, S., CHISHTI, A. H., KOOHMARAIE, M. 2006.  $\mu$ -calpain is essential for post-mortem proteolysis of muscle proteins. In *J. Anim. Sci.*, vol. 84, 2006, p. 2834-2840.
- GOLL, D. E., THOMPSON, V. F., LI, H., WEI, W., CONG, J., 2003. The calpain system. In *Physiological Reviews*, vol. 83, 2003, p. 731-801.
- HAUFFMAN, K. L., MILLER, M. F., HOOVER, L. C., WU, C.K., BRITTIN, H. C., RAMSEY, C. B. 1996. Effect of beef tenderness on consumer satisfaction with steaks consumed in the home and restaurant. In *J. Anim. Sci.*, vol. 74, 1996, p. 91-97.
- HOPKINS, D. L. 2004. Tenderizing mechanisms. In JENSEN, W. K., DEVINE, C., DIKEMAN, M.: *Encyclopedia of Meat Sciences*, 3rd ed. Academic Press, 2004, 1500 p. ISBN 978-0-12-464970-5.
- HOPKINS, D. L., THOMPSON, J. M. 2001. The relationship between tenderness, proteolysis, muscle contraction and dissociation of actomyosin. In *Meat Science* vol. 57, 2001, p. 1-12.
- HUFF-LONERGAN, E., LONERGAN, S. M. 1999. Postmortem mechanisms of meat tenderization: The roles of the structural proteins and the calpain system. In: XIONG, L. Y., HO, C. T., SHAHIDI, F. (eds.) *Quality attributes of muscle foods*. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, 1999, p.229-251.
- HWANG, I. H., THOMPSON, J. M. 2001. The effect of time and type of electrical stimulation on the calpain system and meat tenderness in beef longissimus dorsi muscle. In *Meat Science*, vol. 58, 2001, p. 135-144.
- HWANG, I. H., THOMPSON, J. M. 2002. A technique to quantify the extent of postmortem degradation of meat ultrastructure. In *Asian-Australasian Journal of Animal Science*, vol. 15, 2002, p. 111-116.
- HWANG, I. H., DEVINE, C. E., HOPKINS, D. L. 2003. The biochemical and physical effects of electrical stimulation on beef and sheep meat tenderness – a review. In *Meat Science*, vol. 65, 2003, p. 677-691.
- CHRYSTALL, B. B., DEVINE, C. E. 1985. Electrical stimulation: its early development in New Zealand. In *Advances in Meat Research*, vol. 1, 1985, p. 73-119.
- KAPPELL, H. P., GOLL, D. E. 1989. Effect of Ca<sup>2+</sup> on binding of the calpains to calpastatin. In *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 264, 1989, no. 30, p. 17888-17896.
- KOOHMARAIE, M., WHIPPLE, G., KRETCHMAR, D. H., CROUSE, J. D., MERSMAN, H. J. 1991. Postmortem proteolysis in *longissimus muscle* from beef, lamb and pork carcasses. In *J. Anim. Sci.*, vol. 69, p. 617-624.
- KOOHMARAIE, M. 1992. The role of Ca<sup>2+</sup>-dependent proteases (calpains) in post mortem proteolysis and meat tenderness. In *Biochimie*. vol. 74, 1999, p.239-245.
- KOOHMARAIE, M. 1996. Biochemical factors regulating the toughening and tenderization processes of meat. In *Meat Science*, vol. 43, p. 193-201.
- KOOHMARAIE, M., KENT, M. P., SHACKLEFORD, S. D., VEISETH, E., WHEELER, T. L. 2002. Meat tenderness and muscle growth: is there any relationship? In *Meat Science*, vol. 62, 2002, p. 345-352.
- KUBIAK-JUSZCZUK, E., SAKOWSKI, T., FLISIKOWSKI, K. 2004. Bovine  $\mu$ -calpain (CAPN1) gene: new SNP within intron 14. In *J. Appl. Genet.* vol. 45(4), 2004, p. 457-460.
- LAWRENCE, T. E., DIKEMAN, M. E., STEPHENS, J. W., OBUZ, E., DAVIS, J. R. 2003. In situ investigation of the calcium-induced proteolytic and salting-in mechanisms causing tenderization in calcium-enhanced muscle. In *Meat Science*. vol. 6, 2003, p. 69-75.
- LAWRIES, R. A., LEDWARD, D. A. 2006. The storage and preservation of meat: I temperature control. 194-203. (In:) Lawrie's meat science. 1966. Woodhead Publishing Limited. Cambridge. England. ISBN (13) 1-84569-159-2.
- LEPETIT, J. 2007. A theoretical approach of the relationship between collagen content, cross-links and meat tenderness. In *Meat Science*, vol. 76, 2007, p. 147-159.

- LEVEAU, C. 2008. *Candidate genes for beef quality –allele frequencies in Swedish beef cattle*. Examarbeit, Swedish University of Agricultural Sciences, dostupné na internete: [http://exepsilon.slu.se/archive/00002686/01/301\\_Carina\\_Leveau.pdf](http://exepsilon.slu.se/archive/00002686/01/301_Carina_Leveau.pdf)
- LONERGAN, S. M., HUFF-LONERGAN, E., WIEGAND, R. B. 2001. Postmortem proteolysis and tenderization of top loin steaks from brangus cattle. In *Journal of Muscle Foods*, vol. 12, 2001, p. 121-136.
- MAKI, M., MA, H., TAKANO, E. ADACHI, Y., LEE, J. W., HATANAKA, M., MURACHI, T., 1991. Calpastatins: biochemical and molecular biological studies. In *Biomedica Biochimica Acta*, vol. 50, 1991, p. 509-516.
- MILLER, M. F., HUFFMAN, K. L., GILBERT, S. Y., HAMMAN, L. L., RAMSEY, C.B. 1995. Retail consumer acceptance of beef tenderized with calcium chloride. In *J. Anim. Sci.*, vol. 73, 1995, p. 2308-2314.
- MONTGOMERY, J. L., CARR, S. M., KERTH, R. C. HILTON, G. G., PRICE, P. B., GALYEAN, L. M., HORST, L. R., MILLER, M. F. 2002. Effect of vitamin D3 supplementation level on the postmortem tenderization of beef from steers. In *J. Anim. Sci.*, vol. 80, 2002, p. 971-981.
- NOUR, A. Y. M., GOMIDE, L. A., MILLS, E. W. LEMENAGER, R. P., JUDGE, M. D. 1994. Influence of production and postmortem technologies on composition and palatability of USDA Select grade beef. In *J. Anim. Sci.*, vol. 72, 1994, p. 1224-1231.
- ONO, Y., SORIMACHI, H., SUZUKI, K. 1998. Structure and physiology of calpain, an enigmatic protease. In *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 245, 1998, p. 289-294.
- OTSUKA, Y., GOLL, E. D. 1987. Purification of the Ca<sup>2+</sup>-dependent proteinase inhibitor from bovine cardiac muscle and its interaction with the millimolar Ca<sup>2+</sup> dependent proteinase. In *J. Biol. Chem.* vol. 262, 1978, p. 5839-5851.
- OUALI, A. 1992. Proteolytic and physicochemical mechanisms involved in meat texture development. In *Biochimie*, vol. 74, 1992, p. 251-265.
- PAGE, B. T., CASAS, E., HEATON, M. P., CULLEN, N. G., HYNDMAN, D. L., MORRIS, C. A., CRAWFORD, A. M., WHEELER, T. L., KOOHMARAIE, M., KEELE, J. W., SMITH, T. P. L. 2002. Evaluation of single-nucleotide polymorphisms in CAPN1 for association with meat tenderness in cattle. In *J. Anim. Sci.*, vol. 80, 2002, p. 3077-3085.
- PAGE, B. T., CASAS, E., QUAAS, R. L., THALLMAN, R. M., WHEELER, T. L., SHACKLEFORD, S. D., KOOHMARAIE, M., WHITE, S. N., BENNETT, G. L., KEELE, J. W., DIKEMAN, M. E., SMITH, T. P. L. 2004. Association of markers in the bovine CAPN1 gene with meat tenderness in large crossbred populations that sample influential industry sires. In *J. Anim. Sci.*, vol. 82, 2004, p. 3474-3481.
- REAGAN, J. O., CARPENTER, Z. L., SMITH, G. C. 1976. Age-related traits affecting the tenderness of the bovine longissimus muscle. In *J. Anim. Sci.*, vol. 43, 1976, p. 1198-1205.
- SENTANDREU, M. A., COULIS, G., OUALI, A. 2002. Role of muscle endopeptidases and their inhibitors in meat tenderness. In *Trends in Food Science and Technology*, vol. 13, 2002, p. 400-421.
- SCHENKEL, F. S., MILLER, S. P., JIANG, Z., MANDELL, I. B., YE, X., LI, H., WILTON, J. W. 2006. Association of a single nucleotide polymorphism in the calpastatin gene with carcass and meat quality traits of beef cattle. In *J. Anim. Sci.*, vol. 84, 2006, p. 291-299.
- SMITH, T. P. L.; CASAS, E.; REXROAD, C. E.; KAPPES, S. M.; KEELE, J. W. 2000. Bovine CAPN1 maps to a region of BTA29 containing a quantitative trait locus for meat tenderness. In *J. Anim. Sci.*, vol. 78, 2000, p. 2589-2594.
- SOLOMON, M. B., LONG, J. B., EASTRIDGE, J. S. 1997. The Hydrodyne: a new process to improve beef tenderness In *J. Anim. Sci.*, vol. 75, 1997, p. 1534-1537.
- SØRHEIM, O., IDLAND, J., HALVORSEN, E. C., FRØYSTEIN, T., LEA, P., HILDRUM, K. I. 2001. Influence of beef carcass stretching and chilling rate on tenderness of *m. longissimus dorsi*. In *Meat Science*, vol. 57, 2001, p. 79-85.
- SORIMACHI, H., ISHIURA, S., SUZUKI, K. 1997. Structure and physiological function of calpains. In *Biochemical Journal*, vol. 328, 1997, p. 721-732.
- SUZUKI, K., SORIMACHI, H. 1998. A novel aspect of calpain activation. In *FEBS Lett* vol. 433, 1998, p. 1-4.
- VAN EENENNAAM, A. L., LI, J., THALLMAN, R. M. QUAAS, R. L., DIKEMAN, M. E., GILL, C. A., FRANKE, D. E., THOMAS, M. G. 2007. Validation of commercial DNA tests for quantitative beef quality traits. In *J. Anim. Sci.*, vol. 85 (4), 2007, p. 891-900.
- VEISETH, E., KOOHMARAIE, M. 2005. Beef tenderness: Significance of the calpain proteolytic system. In HOCQUETTE, J. F., GIGLI, S. *Indicators of milk and beef quality*. (Ed) EAAP publication. Wageningen, Wageningen Academic Publishers, 2005, p. 111-126.
- WARRIS, P. D. 2004. Meat science, an introductory text. CABI Publishing. Wallingford. ISBN 0-85199-424-5.
- WHEELER, T. L., KOOHMARAIE, M., CROUSE, J. D. 1991. Effects of calcium chloride injection and hot boning on the tenderness of round muscles. In *J. Anim. Sci.*, vol. 69, 1991, p. 4871-4875.
- WHIPPLE, G., KOOHMARAIE, M., DIKEMAN, M. E., CROUSE, J. D., HUNT, M. C., KLEMM, R. D. 1990. Evaluation of attributes that effect longissimus muscle tenderness in *Bos taurus* and *Bos indicus* cattle. In *J. Anim. Sci.*, vol. 68, 1990, p. 2716-2728.
- WHITE, S. N., CASAS, E., WHEELER, T. L., SHACKLEFORD, S. D., KOOHMARAIE, M., RILEY, D. G., CHASE, C. C., JOHNSON, D. D., KEELE, J. W., SMITH, T. P. L. 2005. A new single nucleotide polymorphism in CAPN1 extends the current tenderness marker test to include cattle of *Bos indicus*, *Bos taurus*, and crossbred descent. In *J. Anim. Sci.*, vol. 83, 2005, p. 2001-2008.

**Contact address:**

Ing. Michal Gábor, PhD., Slovak University of Agriculture, Faculty of Agrobiolgy and Food Resources, Department of Genetics and Breeding Biology, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovakia, E-mail: misogabor@yahoo.com

doc. Ing. Anna Trakovická, CSc., Slovak University of Agriculture, Faculty of Agrobiolgy and Food Resources, Department of Genetics and Breeding Biology, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovakia, E-mail: anna.trakovicka@uniag.sk

Ing. Martina Miluchová, PhD., Slovak University of Agriculture, Faculty of Agrobiolgy and Food Resources, Department of Genetics and Breeding Biology, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovakia, e-mail: martina.miluchova@centrum.sk

Ing. Nina Moravčíková, Slovak University of Agriculture, Faculty of Agrobiolgy and Food Resources, Department of Genetics and Breeding Biology, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovakia, E-mail :nina.moravcikova1@gmail.com

**EFFECT OF MODERATE RED WINE CONSUMPTION ON THE DEVELOPMENT AND PROGRESSION OF METABOLIC SYNDROME AS A COMPLEX RISK FACTOR FOR CARDIOVASCULAR DISEASE AND DIABETES MELLITUS II.***Martina Gažarová, Marta Habánová, Peter Chlebo, Jana Kopčeková***ABSTRACT**

Metabolic syndrome is characterized by a set of clinical symptoms that are related to the development of cardiovascular disease. These abdominal obesity, which is the strongest associate with the metabolic syndrome and clinically manifested increasing waist circumference and ratio of waist to hip, atherogenic dyslipidaemia, which is reflected in the routine diagnosis of increased levels of triglycerides and reduced levels of HDL-cholesterol, high blood pressure, insulin resistance and/or various forms of glucose intolerance, proinflammatory and prothrombotic state. Epidemiological, experimental and clinical investigations have shown that diets supplemented with moderate quantities of alcoholic beverages lead to biochemical changes that are widely regarded to prevent cardiovascular diseases. Red wine contains naturally rich sources of antioxidants which may protect the body from oxidative stress. We investigated the relationship between red wine intake and lipids profile, glucose, blood pressure and WHR index changes. Participants consumed 200 ml of red wine Frankovka modra (VÍNO-MASARYK, s.r.o., Skalica) each day during supper for six weeks and were encouraged to maintain their usual diet and exercise habits. Daily intake of Frankovka modra during six weeks was associated with lower plasma levels of total cholesterol ( $5.66 \pm 1.12$  vs  $5.36 \pm 1.04$ ), triglycerides ( $1.68 \pm 0.23$  vs  $1.47 \pm 0.66$ ), LDL-cholesterol ( $3.46 \pm 0.81$  vs  $3.26 \pm 0.76$ ) and glucose ( $5.35 \pm 0.82$  vs  $5.26 \pm 0.78$ ). On the contrary we recorded higher level of „good“ HDL cholesterol ( $1.42 \pm 0.63$  vs  $1.80 \pm 0.58$ ). Systolic and diastolic blood pressure was also decreased and diastolic blood pressure after six weeks of consumption of red wine decreased statistically significantly. Research results have shown that moderate consumption of red wine have a positive impact on changes waist and ultimately to the Waist to Hip Ratio. Our study demonstrates a positive association between moderate wine consumption and risk of cardiovascular disease and metabolic syndrome.

**Keywords:** metabolic syndrome, cardiovascular disease, HDL-cholesterol, LDL-cholesterol, triglyceride, blood pressure, glucose, WHR

**ÚVOD**

V roku 1988 Reaven jednoznačne preukázal, že u mnohých jedincov sa súbežne vyskytujú rôzne rizikové faktory pre vznik a rozvoj kardiovaskulárnych ochorení (napr. dyslipidémia, hypertenzia, hyperglykémia), pričom túto situáciu nazval syndrómom X. Iní autori nazývajú tento syndróm metabolický syndróm, zdôrazňujúc úlohu metabolických rizikových faktorov. Experti identifikujú ako primárny klinický dôsledok metabolického syndrómu kardiovaskulárne ochorenia, no výrazná väčšina jedincov s týmto syndrómom má inzulínovú rezistenciu, čo potvrdzuje aj zvýšené riziko rozvoja diabetu 2. typu. Okrem týchto civilizačných ochorení majú pacienti zrejme aj predpoklady k výskytu iných ochorení, ako sú napríklad syndróm polycystických ovárií, steatóza pečene, žlčové kamene a syndróm spánkového apnoe (Kreze et al., 2004). Panel expertov ATP III (2002) identifikoval šesť prejavov metabolického syndrómu, ktoré majú vzťah k rozvoju kardiovaskulárnych ochorení – abdominálnu obezitu, ktorá sa najsilnejšie asocjuje s metabolickým syndrómom a klinicky sa prejavuje zväčšením obvodu pásu a pomeru pás/boky, aterogénnu dyslipidémiu, ktorá sa v rutínnej diagnostike prejavuje zvýšenou hladinou triacylglycerolov a zníženou hladinou HDL cholesterolu, zvýšený krvný tlak, inzulínovú rezistenciu a/alebo rôzne formy intolerancie glukózy, subklinický zápal a protrombotický stav. Ischemická choroba srdca je najdôležitejšou klinickou manifestáciou vo vzťahu k morbidite a mortalite na ochorenia periférnych artérií. Úmrtosť na kardiovaskulárne ochorenia a ICHS varíruje medzi

rôznymi krajinami, najvyššia je v Rusku a najnižšia v Japonsku, kardiovaskulárna mortalita má stúpajúci trend najmä v ekonomicky menej rozvinutých krajinách východnej Európy. Na Slovensku zomiera na choroby obehovej sústavy takmer 1000 ľudí/100 000 obyvateľov. Podiel na celkovom počte úmrtí v SR je 50 % mužov a 60 % žien (Jurkovičová, 2005). Hlavnými rizikovými faktormi ischemickej choroby srdca sú fajčenie, hypertenzia, zvýšená hladina LDL a nízka hladina HDL cholesterolu, rodinná anamnéza včasného nástupu ischemickej choroby srdca a vek. Medzi ďalšie potenciálne rizikové faktory patria zvýšené hladiny triacylglycerolov a malých denzných častíc LDL v cirkulácii.

O priaznivých zdravotných účinkoch vína sa vedelo už v najstarších dobách, kedy už v staroveku a stredoveku lekári odporúčali svojim pacientom umiernenú konzumáciu vína. Príčinou odštartovania súčasných výskumov zdravotného pôsobenia vína bol tzv. Francúzsky paradox, ktorý poukazoval na asi 3-krát nižšiu chorobnosť srdca a ciev u Francúzov v porovnaní s Američanmi (Slezák, 2003). Koncom 20. storočia sa vedcom podarilo potvrdiť, že víno je v primeraných dávkach liekom. V súčasnosti je už teda dobre známe a mnohými štúdiami potvrdené, že umiernená a pravidelná konzumácia alkoholu, predovšetkým vína, má priaznivý účinok na zdravie človeka (Stampfer et al., 2005; Jelski, Szmítkowski, 2007). Víno, zvlášť červené, je komplexným nápojom, a je ťažké jednoznačne určiť, ktoré komponenty sú zodpovedné za jeho benefičné účinky na

ľudský organizmus. Jednoznačne je však isté, že víno vďaka svojej vlastnosti synergickému pôsobeniu alkoholu a nealkoholických zložiek – polyfenolov (Bastianetto, 2002). Vytvorenie podmienok zabraňujúcich nadbytočnú tvorbu a hromadenie toxických voľných radikálov sa stáva základom jednak pri profylaxii a jednak pri zvyšovaní efektivity liečby civilizačných ochorení, vrátane kardiovaskulárnych ochorení (Jurkovičová, 2005). Víno je posledné desaťročia predmetom rôznych štúdií, pričom sa sleduje efekt jeho konzumácie vo vzťahu k rôznym ochoreniam. Mnohé z týchto štúdií nielenže naznačujú, ale dokonca aj potvrdzujú priaznivejšie účinky vína na zdravie človeka oproti iným alkoholickým nápojom.

Cieľom našej práce bolo sledovanie vplyvu konzumácie červeného vína na vybrané biochemické ukazovatele krvného séra (lipidové spektrum – hladinu celkového cholesterolu, HDL cholesterolu, LDL cholesterolu, triacylglycerolov a glukózy), antropometrické ukazovatele a vplyv konzumácie vína na systolický a diastolický tlak krvi vo vzťahu ku kardiovaskulárnym ochoreniam a metabolickému syndrómu.

## MATERIÁL A METÓDY

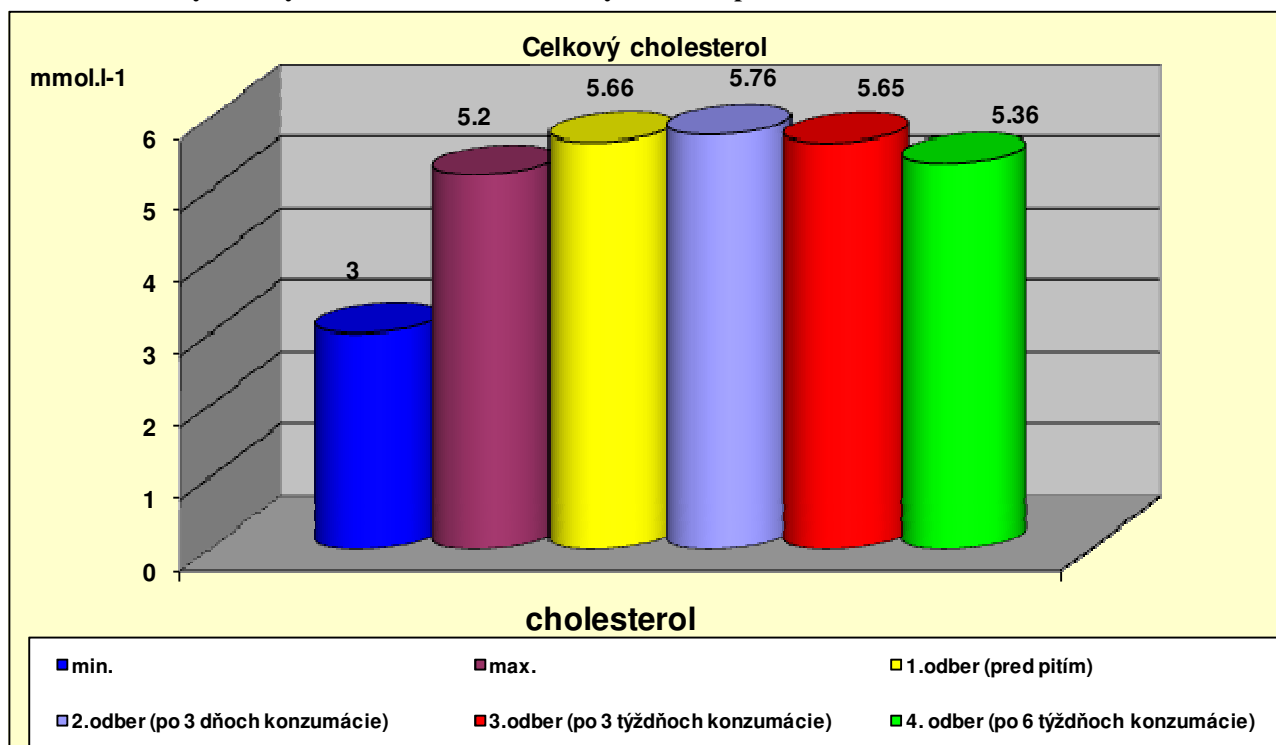
K testovaniu sme použili červené víno Frankovka modrá z Malokarpatskej vinohradníckej oblasti (VÍNO-MASARYK, s.r.o., Skalica). Podľa chemického rozboru bolo vo víne 13,50 obj. % alkoholu. Výskum spočíval v pravidelnej konzumácii odporúčaných dávok vína podľa vopred stanovených podmienok počas doby 6 týždňov (7 dní v týždni). Zúčastnilo sa ho 24 probandov (11 žien a 13 mužov) vo veku 28 – 64 rokov. Konzumácia vína prebiehala vždy počas večere po celodennej abstinencii. Dávka alkoholu bola určená na 200 ml bez rozdielu pohlavia. Konzumovanú stravu sme žiadnym spôsobom neovplyvňovali, probandi sa stravovali bez zmeny svojich stravovacích návykov a tiež bez zmeny svojho životného

štýlu. Na začiatku, pred zahájením konzumácie vína, sme probandom zmerali tlak krvi, antropometrické parametre a odobrali vzorku krvi. Ďalšie odbery krvi, ako aj meranie krvného tlaku sme uskutočnili po troch dňoch a troch týždňoch od začatia konzumácie. Posledný odber krvi a meranie antropometrických parametrov sme vykonali bezprostredne po skončení konzumácie vína (po šiestich týždňoch). Prvý odber (pred zahájením konzumácie vína) sme použili ako kontrolu, pričom výsledky sme porovnávali aj s minimálnou a maximálnou hranicou referenčných hodnôt. Krv sme odoberali nalačno štandardným spôsobom (1 EDTA a 2 sérum gélové skúmavky). Získané vzorky krvi sme približne po 30 min. centrifugovali, sérum gélové skúmavky pri 3000 otáčkach počas 8 minút a EDTA pri 1600 otáčkach počas 10 min. Po separovaní krvného séra sme vzorky skladovali pri teplote – 80 °C do uskutočnenia analýzy a následne po rozmrazení sme stanovovali hladinu celkového cholesterolu, triacylglycerolov, LDL cholesterolu, HDL cholesterolu a glukózy s použitím dostupných komerčných setov od firmy Ecomed. Analýzy sme vykonali pomocou biochemického analyzátoru Lisa 200. Systolický a diastolický tlak sme merali digitálnym tlakomerom štandardným spôsobom pred každým odberom.

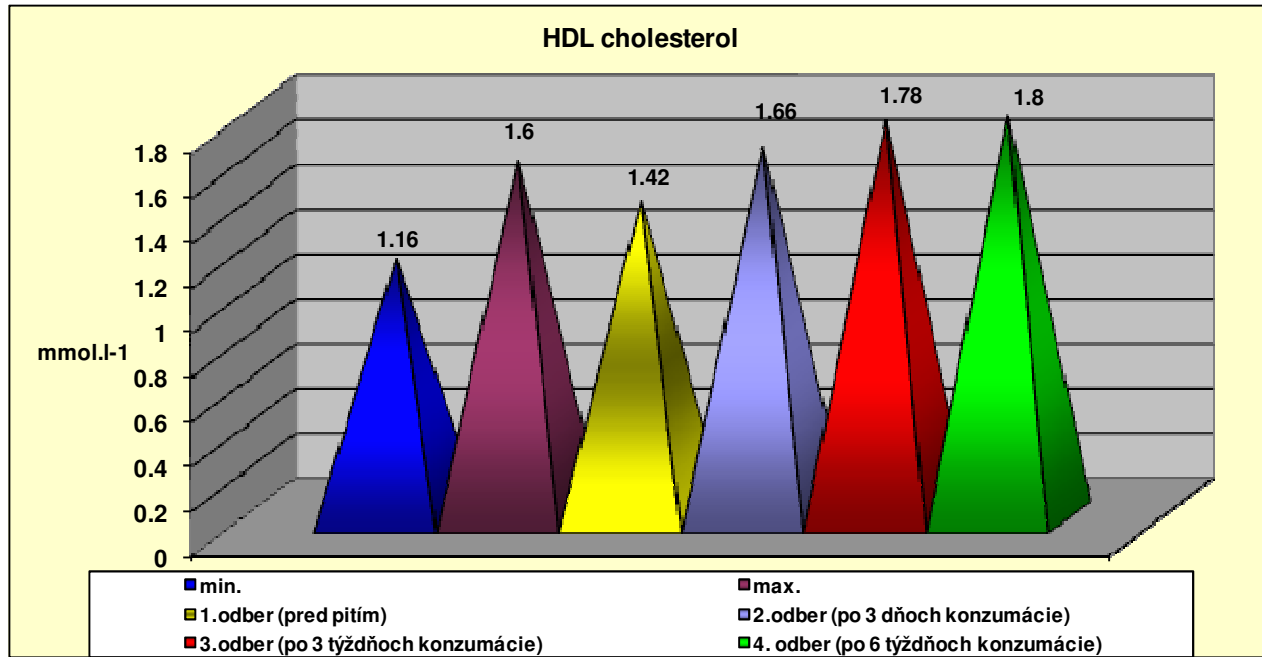
## VÝSLEDKY A DISKUSIA

Najpravdepodobnejšou príčinou prudko rastúcej prevalence metabolického syndrómu je epidémia obezity. Prispieva k zvýšeniu hladiny triacylglycerolov a cholesterolu, k hypertenzii, k nízkej hladine HDL cholesterolu a k hyperglykémii. Framinghamská štúdia ako jedna z prvých štúdií poukázala na obezitu ako nezávislý kardiovaskulárny rizikový faktor (Castelli et al., 1986). Manson et al. (1995) pozorovali pri vzostupe hmotnosti o viac ako 20 kg zvýšenie kardiovaskulárnej mortality viac ako sedemnásobne.

Obrázok 1 Zmeny hladiny celkového cholesterolu v dynamike experimentu



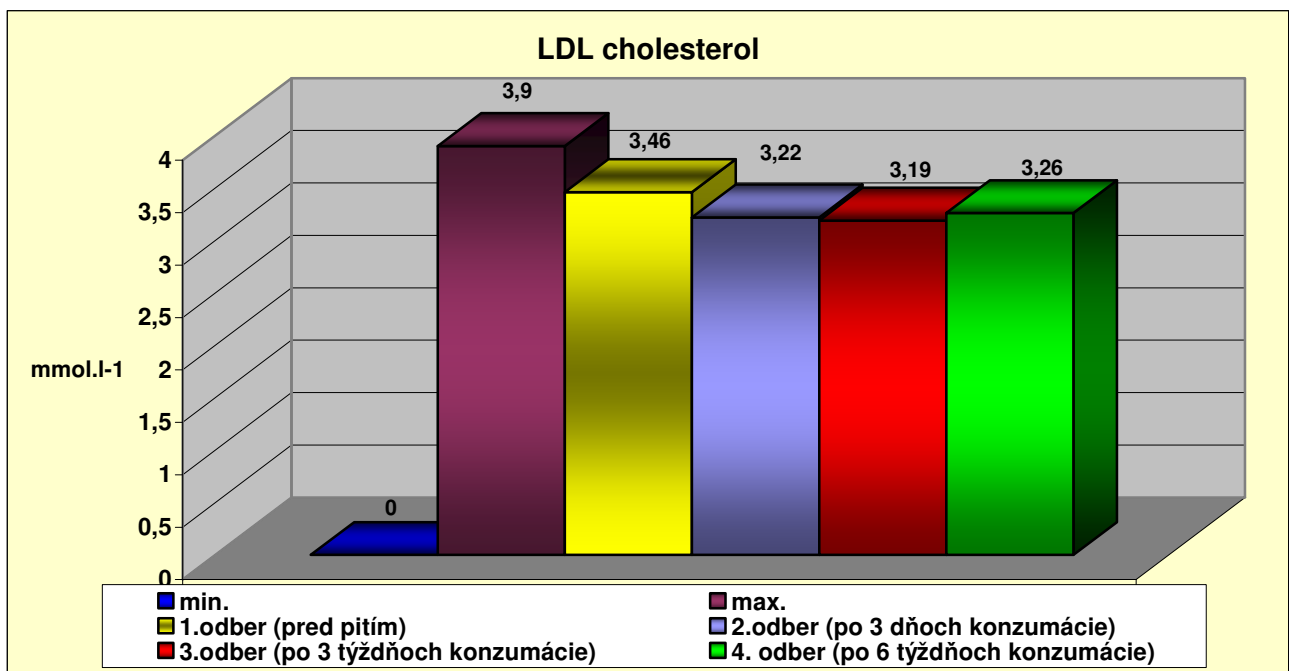
Obrázok 2 Zmeny hladiny HDL cholesterolu dynamike experimentu



Pre posúdenie klinickej závažnosti obezity je dôležité určiť jej typ, pretože androidná obezita predstavuje výrazne vyššie riziko metabolických i kardiovaskulárnych komplikácií ako gynoidná obezita. Ako uvádza **Kreze et al. (2004)**, ženy s androidnou distribúciou tuku sú osemkrát viac ohrozené úmrtím na ischemickú chorobu srdca ako ženy s gynoidnou distribúciou tuku. Na presné identifikovanie androidného, najrizikovejšieho somatotypu obezity, sa používa pomer pás/boky (Waist to Hip Ratio, WHR). Pomer vyšší ako 1 u mužov a vyšší ako 0,85 u žien svedčí o androidnej obezite. U probandov zúčastnených výskumu sme pred začatím konzumácie vína zistili priemernú hodnotu WHR indexu  $0,87 \pm 0,08$ . U osôb ženského pohlavia mal index hodnotu  $0,80 \pm 0,07$ , u mužského pohlavia  $0,93 \pm 0,03$ . Po ukončení konzumácie

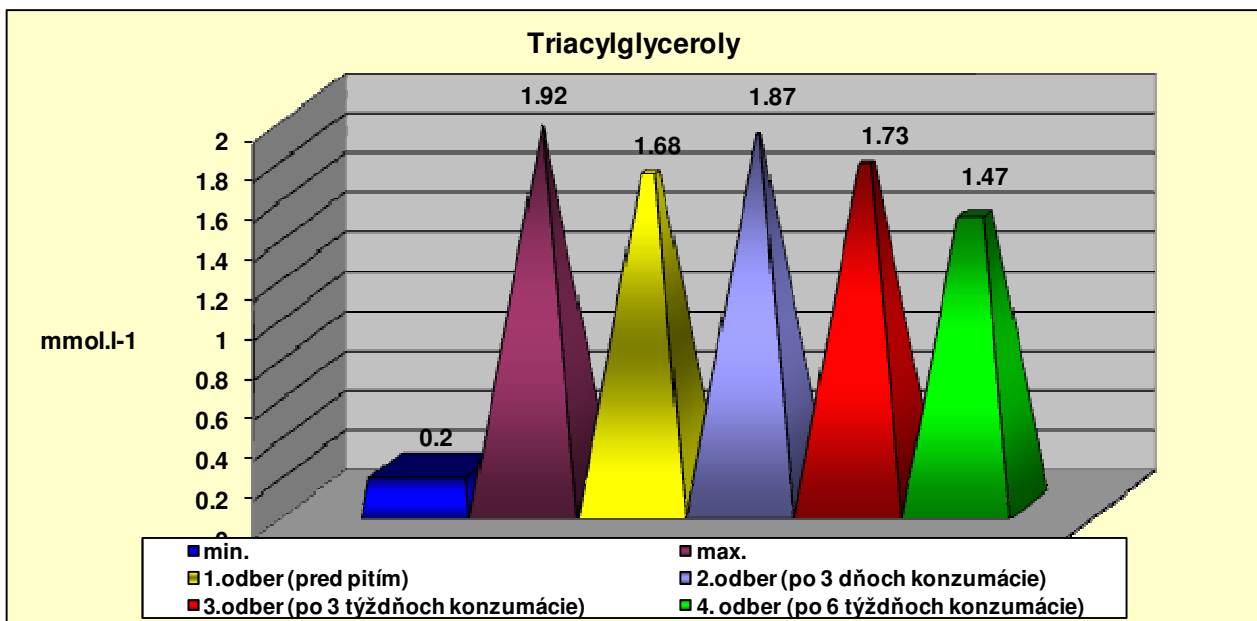
vína sme zistili nepatrný pokles nameraných hodnôt, pričom u všetkých probandov sa WHR index znížil na hodnotu  $0,86 \pm 0,08$ , u ženského pohlavia na  $0,79 \pm 0,07$  a mužského  $0,92 \pm 0,03$ . Jednoduchším ukazovateľom je obvod pásu, ktorý by mal byť u mužov menší ako 94 cm, u žien menší ako 80 cm. Na vysoké riziko vzniku pridružených ochorení upozorňuje obvod pásu väčší ako 102 cm u mužov a väčší ako 88 cm u žien. U žien sme pred konzumáciou namerali priemerný obvod pásu  $79,64 \pm 11,66$ , ktorý sa po skončení výskumu znížil na hodnotu  $78,55 \pm 11,50$ . U mužského pohlavia sme zistili hodnoty  $100,62 \pm 6,87$  pred konzumáciou oproti  $99,15 \pm 6,31$  po skončení konzumácie vína. Tento pokles obvodu pásu sme zaznamenali u 15 probandov, z toho u piatich žien a desiatich mužov. U štyroch participantov sa obvod pásu

Obrázok 3 Zmeny hladiny LDL cholesterolu v dynamike experimentu





Obrázok 4 Zmeny hladiny triacylglycerolov v dynamike experimentu



nezmenil. U piatich participantov sa nemenil ani obvod bokov, pričom k pozitívnej zmene došlo u jedenástich z nich, z toho u piatich žien a šiestich mužov.

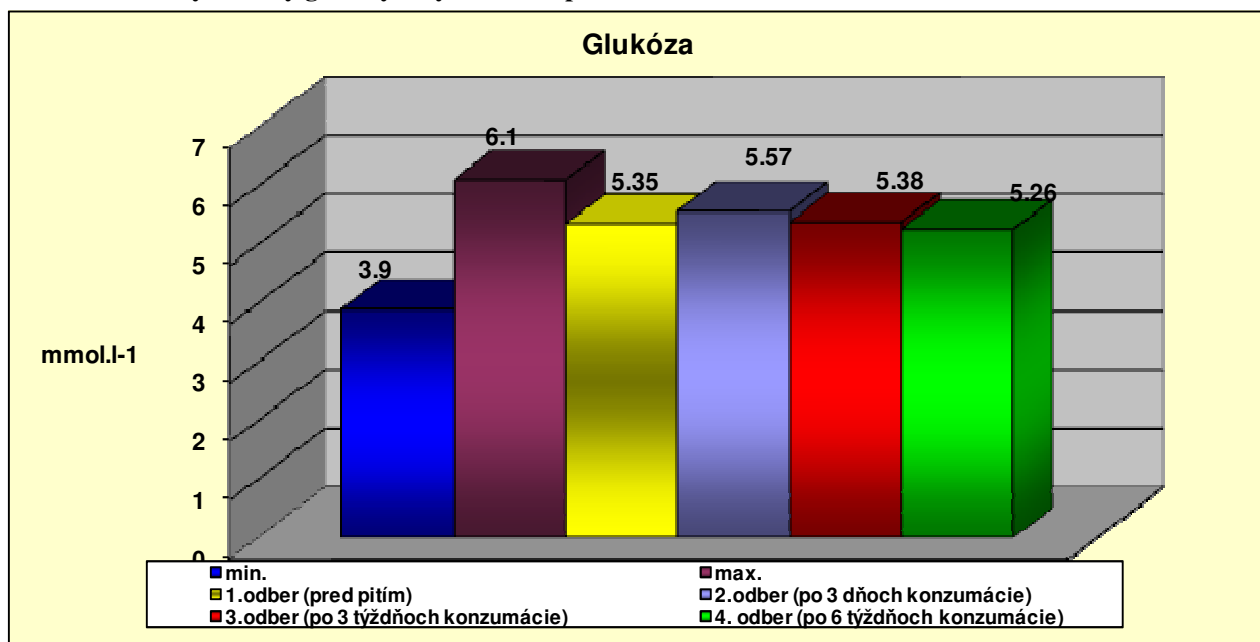
Výsledky výskumu ukázali, že dlhodobější konzumácia suchého červeného vína bola sprevádzaná pozitívnymi zmenami aj hlavných biochemických ukazovateľov. Pre posúdenie rizika vzniku najmä srdcovo-cievnych ochorení a metabolického syndrómu pod vplyvom príjmu alkoholického nápoja bol pre nás dôležitý hlavne priebeh zmien hladiny dôležitých ukazovateľov lipidového profilu a glukózy. Zistili sme, že hladiny sledovaných parametrov sa v dynamike príjmu vína v priebehu šiestich týždňov pozitívne menili v smere s klesajúcou tendenciou. Oproti kontrole sme po šiestich týždňoch konzumácie zaznamenali štatisticky preukazný pokles v prípade celkového cholesterolu a LDL cholesterolu ( $p < 0,05$ ), pričom ich hladiny klesali z počiatočných  $5,66 \pm 1,12$  mmol.l<sup>-1</sup> na  $5,36 \pm 1,04$  mmol.l<sup>-1</sup> pre celkový cholesterol a z  $3,46 \pm 0,81$  mmol.l<sup>-1</sup> na  $3,26 \pm 0,76$  mmol.l<sup>-1</sup> pre LDL

cholesterol (obr. 1 a 3). Je potrebné tiež spomenúť, že hladina celkového cholesterolu sa u probandov počas celého experimentu nachádzala nad hornou hranicou referenčných hodnôt, ale je dôležité, že šesťtýždňová konzumácia červeného vína mala za následok jeho štatisticky významný pokles na spomínanú hodnotu, ktorá sa najviac približovala k hornej kritickej hranici normy.

Veľmi dôležitý je fakt, že pokles samotného celkového cholesterolu a LDL cholesterolu potvrdzuje antiaterogénny účinok konzumovaného vína ako biologicky účinného produktu. Potvrdením tejto myšlienky je fakt paralelného nárastu hladiny „dobrého“ HDL cholesterolu v dynamike experimentu (obr. 2), ktorý pôsobí protektívne pri ukladaní cholesterolu v intíme krvných ciev.

Jeho hladina vzrástla po šesťtýždňovej konzumácii Frankovky modrej z počiatočných  $1,42 \pm 0,63$  mmol.l<sup>-1</sup> na  $1,80 \pm 0,58$  mmol.l<sup>-1</sup>, pričom tento rozdiel bol veľmi vysoko preukazný ( $p < 0,0001$ ). Miller et al. (1992) uvádzajú, že u pacientov s hodnotami HDL cholesterolu menšími ako

Obrázok 5 Zmeny hladiny glukózy v dynamike experimentu



0,9 mmol.l<sup>-1</sup> je až o 30 % vyšší výskyt kardiovaskulárnych príhod ako u pacientov s hodnotami HDL cholesterolu väčšími ako 0,9 mmol.l<sup>-1</sup>, pričom pokles HDL cholesterolu o 0,13 mmol.l<sup>-1</sup> pod hodnotou <1,1 mmol.l<sup>-1</sup> znamená vzostup kardiovaskulárnych príhod o 25 %. Zvýšenie HDL cholesterolu o 0,026 mmol.l<sup>-1</sup> zodpovedá redukcii kardiovaskulárnych príhod o 2 % u mužov a o 3 % u žien, pričom riziko klesá pri vzostupe HDL cholesterolu nad 1,0 mmol.l<sup>-1</sup> (Gordon et al., 1989). Tieto závery podporila aj post hoc analýza primárne preventívnej štúdie Helsinki Heart Study s gemfibrozilom, v ktorej zvýšenie HDL cholesterolu o 1 % korešpondovalo so znížením kardiovaskulárnych príhod o 3 % (Manninen et al., 1998).

V prípade triacylglycerolov sme po počiatočnom náraste jeho hladiny po troch dňoch a troch týždňoch konzumácie zaznamenali na záver jeho pokles na hodnotu 1,47±0,66 mmol.l<sup>-1</sup>, ktorá bola oproti kontrole nižšia, i keď štatisticky nepotvrdená (obr. 4). Z hľadiska zdravia sú však aj minimálne pozitívne posuny v hladine látok ohrozujúcich endogénnu stabilitu významné a zdraviu prospešné.

Pri sledovaní glukózy sme rovnako ako iní autori (Šamánek, Urbanová, 2003; Joosten et al., 2008) opäť zaznamenali pozitívny pokles. Zistené hladiny glukózy (obr. 5) počas šiestich týždňov konzumácie vína nevykazovali výrazné odchýlky, i keď spočiatku sme (podobne ako u iných sledovaných parametrov v druhom odbere po troch dňoch od začatia konzumácie) pozorovali mierny nárast s následným znížením hladiny glukózy z počiatočných 5,35±0,82 mmol.l<sup>-1</sup> na konečných 5,26±0,78 mmol.l<sup>-1</sup>. Avšak tento biochemický parameter považujeme za stabilný vo vzťahu ku konzumácii červeného vína, všetky namerané hodnoty sa pohybovali v rozmedzí referenčných hodnôt.

Veľmi prekvapujúci bol stúpajúci trend hladiny celkového cholesterolu, triacylglycerolov a glukózy po troch dňoch konzumácie, ktorý sa v priebehu nasledujúcich necelých šiestich týždňov zmenil na pozitívne klesajúci. Z tohto pohľadu by sme mohli na základe získaných výsledkov po skončení experimentu predpokladať, že v záujme stabilizácie hladiny daných parametrov je potrebná dlhodobejšia konzumácia vína, a že práve krátkodobý príjem malých dávok alkoholického

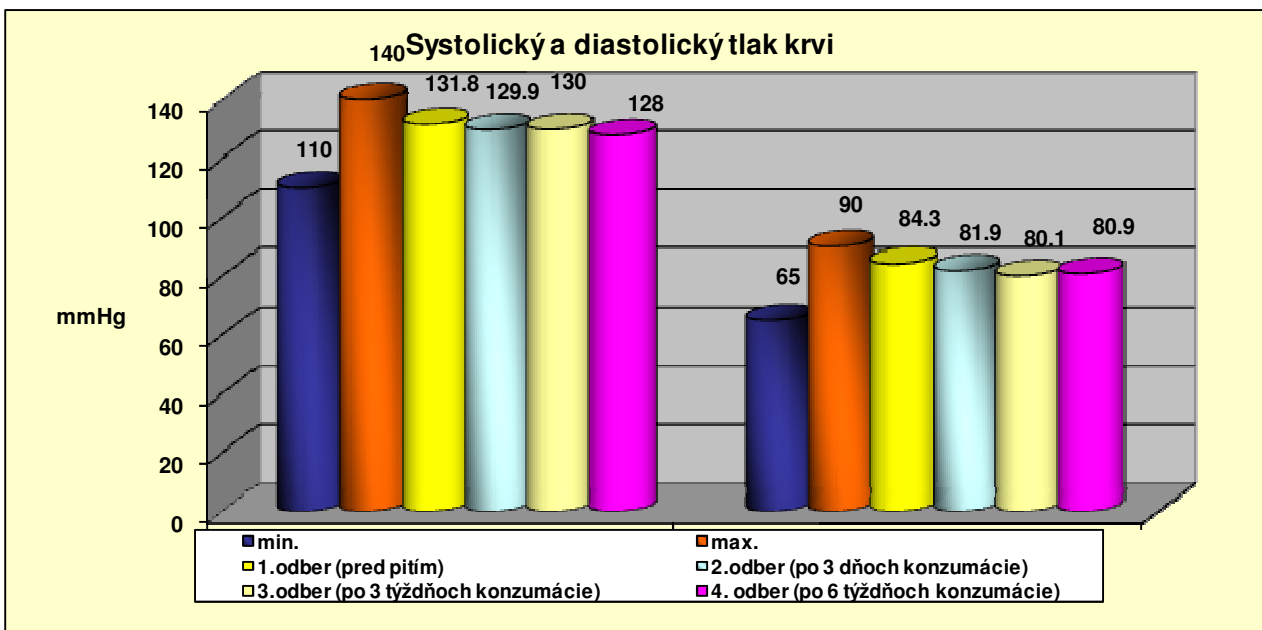
nápoja má vplyv na zmeny sledovaných ukazovateľov nežiaducim smerom. Tieto výsledky hovoria v prospech umiernenej konzumácie malého množstva červeného vína, ktorá nie je problémom z hľadiska škodlivosti na zdravie, ale z hľadiska problémov súvisiacich s kultúrou pitia.

Vzájomná prepojenosť metabolizmu všetkých sledovaných parametrov lipidového profilu a glukózy a hodnotami tlaku krvi sú jednoznačné. Podobne ako u ostatných parametrov sme ani pri sledovaní zmien tlaku krvi nezaznamenali negatívne vplyvy konzumácie vína (obr. 6). V dynamike experimentu sme zistili takmer paralelný pokles tlaku systolického a štatisticky vysoko výrazné zníženie diastolického tlaku po troch týždňoch konzumácie Frankovky modrej (80,1±10,77 mmHg; p<0,01) a jeho štatisticky významný pokles po šiestich týždňoch (80,9 ± 10,37 mmHg, p<0,05) oproti kontrole (84,3 ± 11,47 mmHg).

Treba však poznamenať, že kým na začiatku sa systolický tlak krvi blížil skôr k hornej hranici a presahoval hodnotu 120 mmHg, na konci experimentu sme zaznamenali mierny pokles, i keď jeho hodnota stále prevyšovala optimálnu hodnotu tlaku. Systolický tlak zistený na konci experimentu klesol v porovnaní so systolickým tlakom nameraným pred zahájením konzumácie o takmer 3 %. Zvýšená konzumácia alkoholu môže spôsobiť progresívne zvyšovanie tlaku krvi (približne 1 mmHg.100 ml<sup>-1</sup> etanolu týždenne). V našom prípade sa však potvrdila závislosť krivky v tvare J, t.j. nízke dávky alkoholu nezvyšujú tlak, resp. môžu pôsobiť hypotenzívne. V známej štúdii HOT sa potvrdilo, že pokles diastolického tlaku až na hodnotu 82 mmHg zaznamenal významnú redukcii veľkých kardiovaskulárnych príhod (Zanchetti et al., 2003), čo pre probandov zúčastnených v našom experimente znamená veľké pozitívum vzhľadom na zníženie počiatočnej hodnoty 84,25 mmHg o takmer 4 % na hodnotu 80,92 %. Na základe toho môžeme vyvrátiť historicky tradičnú predstavu o hypertenzívnom účinku konzumácie vín, najmä červených.

Po komplexnom vyhodnotení výsledkov sme dospeli k záveru, že šesťtýždňová konzumácia červeného vína nemala na zdravotný stav probandov negatívne účinky, práve naopak, u väčšiny zúčastnených participantov došlo

Obrázok 6 Zmeny systolického a diastolického tlaku krvi v dynamike experimentu



k žiadanému poklesu, prípadne nárastu hladín a hodnôt sledovaných parametrov. U prevažnej väčšiny participantov sme pozorovali pozitívne zmeny všetkých deviatich vyšetovaných rizikových faktorov.

### ZÁVER

Z vyššie uvedeného vyplýva, že zistené zmeny biochemických a fyziologických parametrov poukazujú na proces ozdravenia probandov ako reflexie na umiernenú konzumáciu Frankovky modrej. Na základe zhodnotených výsledkov môžeme konštatovať, že každodenné pitie malého množstva Frankovky modrej má priaznivý vplyv na rizikové faktory aterosklerózy. Nielenže sme zaznamenali očakávané zvýšenie HDL cholesterolu, ale z hľadiska rizika kardiovaskulárnych ochorení aj veľmi priaznivé zníženie celkového cholesterolu, nebezpečného LDL cholesterolu, triacylglycerolov a z pohľadu rizika *diabetes mellitus* aj zníženie hladiny glukózy. K priaznivému účinku šesťtýždňovej konzumácie červeného vína môžeme pripísať aj pokles tak systolického, ako aj diastolického tlaku krvi. Okrem biochemických zmien spôsobila umiernená konzumácia vína aj pozitívne povzbudzovanie psychiky s navodením príjemných pocitov, uvoľnením a potlačením zlej nálady v prospech mentálnej pohody a sociálnej komunikácie. Konzumácia malých dávok vína však môže byť odporúčaná len subjektom bez predispozície závislosti od alkoholu a bez pozitívnej rodinnej anamnézy s presným uvedením dodržiavania umiernenosti v konzumácii vína v súlade s princípom neuškodit' vlastnému organizmu.

### LITERATÚRA

BASTIANETTO, S. 2002. Red wine consumption and brain aging. In *Nutrition*, vol. 18, 2002, no. 4, p. 432-433.

CASTELLI, W. P., GARRISON, R. J., WILSON, P. W., ABBOTT, R. D., KALOUSDIAN, S. KANNEL, W. B. 1986. Incidence of coronary heart disease and lipoprotein cholesterol levels. The Framingham Study. In *JAMA*, 1986, 256(20): 2835-2838.

GORDON, D. J., PROBSTFIELD, J. L., GARRISON, R. J., NEATON, J. D., CASTELLI, W. P., KNOKE, J. D., JACOBS, D. R., BANGDIWALA, S., TYROLER, H. A. 1989. High-density lipoprotein and cardiovascular disease. Four prospective American Studies. In *Circulation*, vol. 79, 1989, p. 8-15.

JELSKI, W., SZMITKOWSKI, M. 2007. Effect of ethanol on metabolic syndrome. In *Pol. Arch. Med. Wewn.*, vol. 117, 2007, no. 7, p. 306-311.

JOOSTEN, M. M., BEULENS, J. W. J., KERSTEN, S., HENDRIKS, H. F. J. 2008. Moderate alcohol consumption increases insulin sensitivity and ADIPOQ expression in postmenopausal women: a randomised, crossover trial. In *Diabetologia*, 2008, no. 51, p. 1375 - 1381.

JURKOVIČOVÁ, J. 2005. *Vieme zdravo žiť?* Bratislava: Univerzita Komenského v Bratislave, 2005. 166 s. ISBN 80-223-2132-X.

KREZE, A., LANGER, P., KLIMEŠ, I., STÁRKA, L., PAYER, J., MICHÁLEK, J. 2004. *Všeobecná a klinická endokrinológia*. Bratislava: Academic Electronic Press, 2005. 896 s. ISBN 80-88880-58-0.

MANNINEN V., ELO M. O., FRICK M.H., HAAPA K., HEINONEN O. P., HEINSALMI P., HELO P., HUTTUNEN J. K., KAITANIEMI P., KOSKINEN P., MÄENPÄÄ H., MÄLKÖNEN M., MÄNTTÄRI M., NOROLA S., PASTERNAK A., PIKKARAINEN J., ROMO M., SJÖBLOM T., NIKKILÄ E. A. 1998. Lipid alterations and decline in the incidence of coronary heart disease in the

Helsinki Heart Study. In *JAMA*, vol. 260, 1998, no. 5, p. 641-651.

MANSON, J. E., WILLET, W. C., STAMPFER, M. J., COLDITZ, G. A., HUNTER, D. J., HANKINSON, S. E., HENNEKENS, C.H., SPEIZER, F.E. 1995. Body weight and mortality among women. In *New England Journal of Medicine*, 1995, 333: 677-685.

MILLER, M., SEIDLER, A., KWITEROVICH, J. R., PEARSON, T.A. 1992. Long Term predictors of subsequent cardiovascular events with coronary artery disease and „desirable“ levels of plasma total cholesterol. In *Circulation*, 1992, vol. 86, p. 1165-1170.

SLEZÁK, F. 2003. Víno a zdravie. In *Vinič a víno*, roč. 3, 2003, č. 1, s. 19-20. ISSN 1335-7514.

STAMPFER, M. ET AL. 2005. Effects of Moderate Alcohol Consumption on Cognitive Function in Women. In *Engl. J. Med.*, 2005, p. 352-353.

ŠAMÁNEK, M., URBANOVÁ, Z. 2003. *Pít či nepít?* Praha: Radix, 2003. 68 s. ISBN 80-86031-46-2.

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). Final report. 2002. In *Circulation*, 2002, 106: 3143-3421.

ZANCHETTI, A., HANSSON, L., CLEMENT, D., ELMFELDT, D., JULIUS, S., ROSENTHAL, T., WAEBER, B., WEDEL, H. 2003. Benefits and risks of more intensive blood pressure lowering in hypertensive patients of the HOT Study with different risk profiles: does a J-shaped curve exist in smokers? In *Journal of Hypertension*, 2003, 21:797-804.

### Acknowledgments:

This work has been supported by the Excellence Center for Agrobiodiversity Conservation and Benefit Plus project implemented under the Operational Programme Research and Development financed by European Fund for Regional Development (ITMS 26220120032), (50 %) and was part of the grant KEGA 3/5082/07 (25 %) and the research project VEGA 1/0102/10 (25 %).

### Contact address:

Ing. Martina Gažarová, PhD., Slovak University of Agriculture, Faculty of Agrobiolgy and Food Resources, Department of Human Nutrition, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovakia, Tel.: +4213764144281, E-mail: martina.gazarova@gmail.com

Ing. Marta Habánová, PhD., Slovak University of Agriculture, Faculty of Agrobiolgy and Food Resources, Department of Human Nutrition, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovakia, Tel.: +421376414467, E-mail: Marta.Habanova@uniag.sk

MUDr. Peter Chlebo, PhD., Slovak University of Agriculture, Faculty of Agrobiolgy and Food Resources, Department of Human Nutrition, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovakia, Tel.: +4213764144883, E-mail: Peter.Chlebo@uniag.sk

Ing. Jana Kopčeková, PhD., Slovak University of Agriculture, Faculty of Agrobiolgy and Food Resources, Department of Human Nutrition, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovakia, Tel.: +4213764144249, E-mail: Jana.Kopcekova@uniag.sk

## CONTAMINATION OF RAISIN BY FILAMENTOUS FUNGI – POTENTIAL PRODUCERS OF OCHRATOXIN A

Lusine Hakobyan, Karine Grigoryan, Ara Kirakosyan

### ABSTRACT

The forty-one samples of Armenian made and eleven samples of imported raisins collected in several markets in Yerevan were studied. The sample collections were carried out during of years 2004 to 2008. Thirty two species of filamentous fungi from *Aspergillus*, *Penicillium*, *Alternaria* *Trichoderma* and *Syncephalastrum* genera were isolated and identified. Among species isolated from studied samples species belonging to *Aspergillus* genera have a very high frequency of occurrence, 65.2% of all investigated filamentous fungi. Species from *Nigri* section show the highest occurrence: 66.7% of all isolated fungi belonging to *Aspergillus* genera. Species *A. carbonarius* and *A. niger* were dominated among isolated fungi from section *Nigri*. Both Armenian and imported samples of raisin had a high contamination level by these fungi which are potential producers of ochratoxin A. In Armenian samples were detected two more ochratoxigenic species belonging to *Aspergillus* section *Nigri*: *A. sclerotioniger* and *A. lacticoffeatus*. But their frequency of occurrence was low. Thirty seven strains of *A. flavus* were isolated, 92% of them were isolated from Armenian samples. Influence of pH and aw on contamination level of raisin by fungi was studied. It was revealed that highest contamination level by filamentous fungi occurred in raisins with relatively high aw value. Contamination level of raisin doesn't depend on pH.

**Keywords:** raisin, ochratoxin A, water activity, contamination, filamentous fungi

### INTRODUCTION

Many researchers reported that dried fruits are often contaminated with species from *Aspergillus Nigri* section (Alghalibi et al. 2004, Almeida, Alaburda, Ruvieri et al. 2007, Iamanaka, Taniwaki et al. 2005, Macdonald et al. 1999, Magnoli et al. 2004, Varga, Kocsube, Koncz et al. 2006). Barkai-Golan and Paster (2008) have shown that species of *Aspergillus*, *Penicillium* and *Alternaria* are major species presented in dried fruits. In wines, raisins and other grape-based products ochratoxin A is predominant. This mycotoxin has been associated with *A. carbonarius* and, to a lesser extent with *A. tubingensis* or *A. niger*. Studies of 60 samples of dried fruits (raisins, dates and figs) carried out by Saeed, Alghalibi and Abdul-Rahman (2004) in Yemen Republic have shown high level of fungal contamination. 23 species and one variety belonging to 15 genera including *A. niger*, *A. flavus*, *A. fumigatus*, *A. ochraceus*, *Penicillium chrysogenum* and *Rhizopus stolonifer* were dominated among species isolated from dried fruits. The analyses of samples of dried vine fruit in Argentina (Magnoli et al., 2004) revealed six species of *Aspergillus* section *Nigri*. The predominant species were *A. niger* var. *niger*, *A. niger* var. *awamory* and *A. carbonarius*. The frequency of occurrence of these species was lower in white dried vine fruit than in black dried vine fruit.

Samson, Houbraken, Kuijpers et al. (2004) showed that some species belonging to *Aspergillus Nigri* section are ochratoxin A producers. Fifteen species from *Nigri* section were isolated and identified in different food products. Four of them were producers of ochratoxin A. Ochratoxin A producing species from section *Nigri* occurring on grapes, raisins and in wine include *A. carbonarius* and to a lesser extent *A. niger*. Four species recovered from coffee, *A. carbonarius*, *A. niger*, *A. lacticoffeatus* and *A. sclerotioniger* produce ochratoxin A. Other species of section *Nigri* including *A. japonicus* and *A. tubingensis* also occurred. *A. niger* occurred very often

in dried fruits (black sultanas, white sultanas, dates, dried plums, dried figs and apricots), especially in dried vine fruits as reported in (Iamanaka et al., 2005). This specie is ochratoxigenic. The contamination level by *A. niger* in black sultanas, plums, figs, dates and white sultanas were 22.0, 8.0, 4.0, 1.5 and 0.5%, respectively. Thirty three (26.3%) samples of 117 analyzed contained more than 5  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  of ochratoxin A.

Valero, Sanchis, Ramos et al. (2007) isolated 11 fungi: *Alternaria alternata*, *Cladosporium herbarum*, *Eurotium amstelodami*, *Penicillium janthinellum*, *P. decumbens*, *Trichoderma harzianum*, *Candida* sp., *Aspergillus carbonarius* OTA-negative, *A. carbonarius* OTA-positive, *A. niger* var. *niger*. and *A. japonicus* var. *aculeatus* from grapes and sun-dried grapes at different growth conditions (aw - 0.82-0.97 and TO- 20-40 OC). They showed that *Aspergillus* section *Nigri* is dominant.

According to Rita et al. (2006) there are 19 accepted taxonomies of the black aspergilla. Moreover, identification of species of *Aspergillus* section *Nigri* is often problematic because of their morphological similarity to each other. New *Aspergillus* strains of the section *Nigri*, which did not produce detectable amounts of ochratoxin A (OTA) but have a similar morphology to *A. carbonarius*, were isolated from wine grapes and dried vine fruit. The strains described belong to a new species, named *A. ibericus*.

As shown by Crespo, Sánchez, Ramón et al. (2007) black *Aspergillus* species (section *Nigri*) are main source of OTA contamination in grapes and also in dried grapes worldwide. Most of the isolates that produced ochratoxin A belong to *A. carbonarius* species. Romero, Comerio, Larumbe et al. (2005) have isolated ochratoxin A producer fungi from dried vine fruits even after surface disinfection. Species from *Aspergillus* section *Nigri* ("black aspergilli") were dominant. *Aspergillus* (50.2%), *Eurotium* (21.4%) and *Penicillium* (13.5%) genera have relatively low frequency. OTA was found in only 3 of 293

isolated strains of *A. niger*. *A. carbonarius* have less frequency but 96% of 48 strains were ochratoxigenic. Naresh and David (2007) reported that in northern Europe the major species of fungi producing ochratoxin A are *P. verrucosum*, *A. ochraceus* and species from *Aspergillus section Nigri*, especially *A. carbonarius*.

OTA was detected in grape, grape juice and dried vine fruit in many countries: Morocco (Zinedine et al., 2007), Australia (Su-Lin, Ailsa and Eileen, 2005), France, (Macdonald et al., 1999, Bejaoui, Mathieu, Taillandier et al., 2006), Hungary (Varga et al., 2006), Brazil (Almeida et al., 2007), Argentina (Romero et al., 2005, Rocha Rosa et al., 2002), Greece (Tjamos, Antoniou, Kazantzidou, et al., 2004), Portugal (Rita, Mendonça and Venâncio, 2005, Rita, Lourenc, Ali'Pio and Venancio 2006), Turkey (Turk, Rengin, APkun et al., 2004), Spain (Esteban, Abarca, Bragulat et al., 2006), Egypt (Zohri and Abdel-Gawad, 2007) and others. In some cases the level of OTA in products was exceeded maximum allowed quantity.

## MATERIAL AND METHODS

### Sampling

11 samples of imported and 41 samples of Armenian black and white raisins realizing in markets of Yerevan were studied. The sampling has been carried out between 2004 and 2008 by dot method (SANCO/1208/2005-rev. 1).

### Mycological analyses of raisin

Samples were sterilized with 3% solution of sodium hypochlorite for 15 minutes. After surface disinfection samples were washed with fresh distillate water. The analyses were carried out with direct plating and dilution plating methods. For plating method direction food particles were placed directly on solidified agar media. For dilution 1:10, 10g of sample was dissolved in 90 ml sterilized water and mixed for 15 minutes (Pitt and Hocking, 1997). For isolation of filamentous fungi CYA (Chapek-Yeast Agar medium, HiMedia Ltd.), GYA (Glucose-Yeast Agar medium, HiMedia Ltd.), and MEA (Malt-Extract Agar medium, HiMedia Ltd.) were used. The plates were incubated at 28° C for 7 days (NF ISO 7954 - 88). After incubation the colony forming unit (CFU) was accounted according to NF ISO 7698-91, and frequency of occurrence was detected (El-Kady, Abdel-Hafez and El-Maraghy, 1982).

The growing fungi were identified morphologically based on macro- and microscopic characteristics using following manual: Raper and Fennell (1977), Pitt (1979), Samson, Hoekstra, Frisvad and Filtenborg (1995), Samson, Noonim, Meijer, Houbraken, Frisva and Varga (2007).

### Determination of aw, pH and sulfur dioxide

Determination of aw was spent with AquaLab (Decagon Devices, Pullman, WA, USA). Definition of pH was spent with pH-meter (Oakton, USA). Sulfur dioxide in samples of raisin was determined by aspiration method (Wood, Foster, Damant et al., 2004).

## RESULTS AND DISCUSSION

### Fungal flora of raisin

A comparative analysis of 41 samples of Armenian raisin and 11 samples of imported raisin from Iran were carried out. 32 species of filamentous fungi belonging to two classes: *Zygomycetes* and *Hyphomycetes*, and 6 genera: *Mucor*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Alternaria*, *Trichoderma* and *Syncephalastrum*, were isolated and identified (Table 1).

Table 1 The classification of isolated fungi from studied samples

Class	Order	Family	Genera	Quality of species
<i>Zygomycetes</i>	<i>Mucorales</i>	<i>Mucoraceae</i>	<i>Mucor</i>	2
		<i>Piptocephalidaceae</i>	<i>Syncephalastrum</i>	1
<i>Hyphomycetes</i>	<i>Hyphomycetales</i>	<i>Moniliaceae</i>	<i>Aspergillus</i>	15
			<i>Penicillium</i>	12
			<i>Trichoderma</i>	1
		<i>Dematiaceae</i>	<i>Alternaria</i>	1

The most dominant fungal species were *A. carbonarius* (58,8%) and species from *Mucor* genera (52,9%): *M. racemosus* and *M. mucedo*. Species *A. sclerotii carbonarius* (29.4%), *A. tubingensis* (29.4%), *A. foetidus* (29.4%), *A. flavus* (23.5%), *P. variabile* (29.4%) and *P. lanosum* (23.5%) were with average frequency of occurrence (Table 2 and 3). Studied samples of raisin have a high contamination level by fungi from *Mucor* genera. The presence of these fungi is a result of secondary contamination of raisin. These fungi were detected only on surface of samples. Surface disinfection of samples with 3% solution of sodium hypochlorite inhibited the growth of species of *M. mucedo* and *M. racemosus*.

Table 2 Fungi isolated from Armenian and imported raisin during of 2004 to 2008 years.

Species of fungi	Frequency of occurrence (%)
<b>Penicillium</b>	
<i>P. ciatophora</i>	11.8
<i>P. corymbiferum</i>	5.9
<i>P. lanosum</i>	23.5
<i>P. variabile</i>	29.4
<i>P. clavigerum</i>	3.57
<i>P. cyclopium</i>	3.57
<i>P. puberulum</i>	3.57
<i>P. velutinum</i>	14.3
<i>P. diversum</i>	7
<i>P. rubrum</i>	3.57
<i>P. steckii</i>	3.57
<i>P. brevicompactum</i>	3.57
<b>Mucor</b>	
<i>M. mucedo</i>	27.8
<i>M. racemosus</i>	32.1
<i>Trichoderma viride</i>	3.57
<i>Syncephalastrum racemosus</i>	3
<i>Alternaria alternata</i>	3

The other species of section *Aspergillus Nigri*: *A. japonicus* (8%), *A. aculeatus* (17.7%), *A. uvarum* (5.9%), *A. lacticoffeatus* (6%) have a lower frequency of occurrence. Species belonging to *Aspergillus* genera

(65.2%) were most prevalent among all isolated species. 15 species from *Aspergillus* genera were isolated, 10 of them (66.7%) belonged to section *Nigri*.

The comparative analyses of local and imported raisin have shown that contamination level of Armenian samples was much higher than Iranian samples. No filamentous fungi were identified in some imported samples. The quantity of species isolated from Armenian samples and belonging to *Aspergillus* genera exceeds the quantity of species isolated from imported raisin samples. Only 6 species of *Aspergillus* genera were isolated from imported raisin and 14 from local samples (Table 3).

**Table 3 The results of comparative analyze of species of *Aspergillus* genera isolated from local and imported raisin**

Species of <i>Aspergillus</i> genera	Frequency of occurrence (%)	Armenian samples	Imported samples
<i>A. niger</i>	47	+	+
<i>A. sclerotioniger</i>	17.7	+	-
<i>A. carbonarius</i>	58.8	+	+
<i>A. sclerotii carbonarius</i>	29.4	+	-
<i>A. tubingensis</i>	29.4	+	+
<i>A. foetidus</i>	29.4	+	-
<i>A. lacticoffeatus</i>	6	+	-
<i>A. uvarum</i>	5.9	-	+
<i>A. aculeatus</i>	17.7	+	-
<i>A. japonicus</i>	8	-	+
<i>A. fumigatus</i>	11.8	+	-
<i>A. ochraceus</i>	5.9	+	-
<i>A. flavus</i>	23.8	+	+
<i>A. nomius</i>	11.8	+	-
<i>A. orizea</i>	5.9	+	-

Species *A. niger* var. *niger*, *A. carbonarius*, *A. sclerotii carbonarius*, *A. foetidus* and *A. tubingensis* occurred nearly in all samples. But these fungi were detected at a higher frequency in locally produced raisin rather than in imported (Table 4).

**Table 4 The frequency of occurrence of species belonging to section *Nigri* in Armenian and imported samples**

Species from section <i>Aspergillus Nigri</i>	The frequency of occurrence in Armenian raisin (%)	The frequency of occurrence in imported raisin (%)
<i>A. niger</i>	61.5	59.5
<i>A. sclerotioniger</i>	21	-
<i>A. carbonarius</i>	59	35
<i>A. sclerotii carbonarius</i>	29	-
<i>A. tubingensis</i>	43	42
<i>A. foetidus</i>	50	-
<i>A. uvarum</i>	-	7
<i>A. japonicus</i>	-	17
<i>A. aculeatus</i>	7.6	-
<i>A. lacticoffeatus</i>	7.6	-

Species of *Aspergillus* section *Nigri* are difficult to identify because of their morphological similarity to each

other. Several morphological characteristics, particularly conidia size allows to separate species of *A. carbonarius* (7–9 µm) and *A. niger* (3–5 µm) from others.

According to Samson et al. (2007) not only specie *A. carbonarius* is potential producer of ochratoxin A but also species of *A. niger*, *A. lacticoffeatus* and *A. sclerotioniger* among filamentous fungi from *Aspergillus Nigri* section. These species were found in studied samples. The contamination of raisin by fungi was quite high especially by pathogenic fungi *A. carbonarius* and *A. niger*. The frequency of occurrence of *A. carbonarius* was higher in Armenian raisins - 59%, rather than in imported raisins - 35%. 39 strains of *A. carbonarius* were isolated, 26 of which from Armenian and 10 from imported samples.

*A. foetidus*, *A. sclerotioniger* and *A. sclerotii carbonarius* species were identified only in locally produced samples. Among ochratoxigenic species only *A. niger* and *A. carbonarius* were detected in imported samples. Toxicogenic fungi occurred more frequently in locally produced raisin (Figure 1).

The results showed that the contamination level of raisin by filamentous fungi sharply increases every year and new species from *Aspergillus* genera are appeared. In our samples of 2007-2008 years frequency of occurrence of *A. carbonarius*, *A. foetidus* and *A. tubingensis* species is comparatively higher than in samples collected between 2004 and 2006. The occurrence of ochratoxigenic fungi *A. carbonarius* has sharply increased (from 70 to 80 %) recently in both locally produced and imported samples (Figure 2).

Species belonging to *Aspergillus flavi* section: *A. flavus* and *A. nomius* have average frequency of occurrence. These species are potential producers of mycotoxins from aflotoxins group. Specie *A. flavus* has been found in both Armenian and imported raisin (23.5% frequency). *A. nomius* was detected only in local samples at a low frequency (17%). Contamination level of raisin by *A. flavus* has also been raised during of recent years. In 2007 to 2008, for example, high contamination level of raisin by *A. flavus* was observed especially in local samples (Figure 3). 37 strains of *A. flavus* were isolated, 82% of which from Armenian raisin.

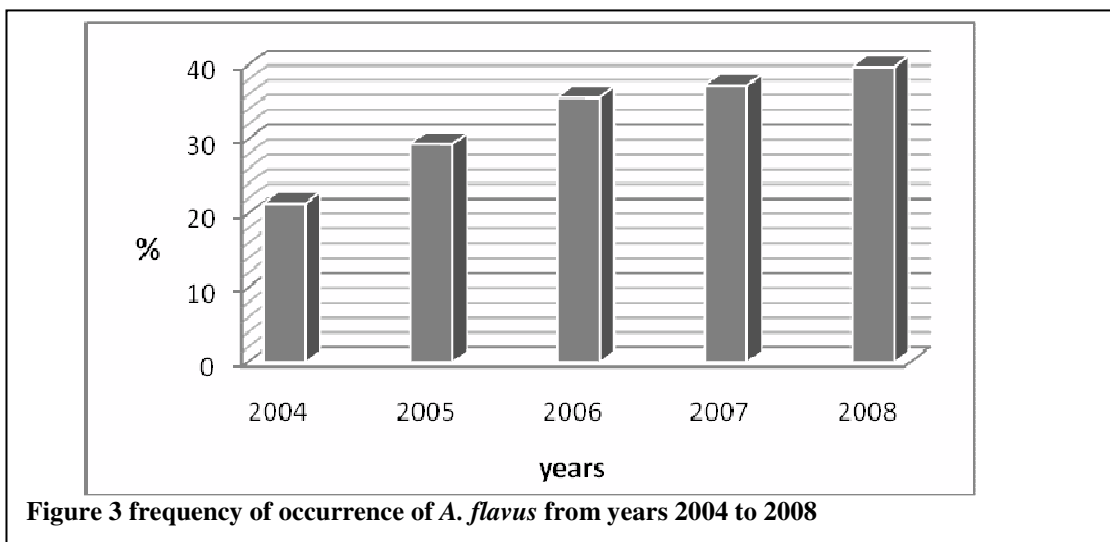
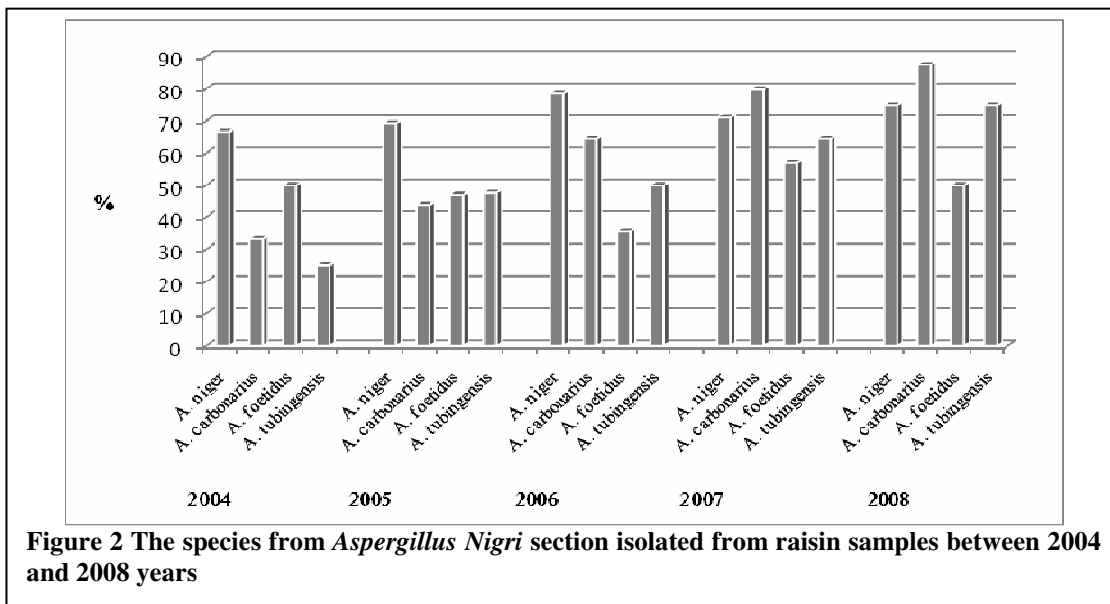
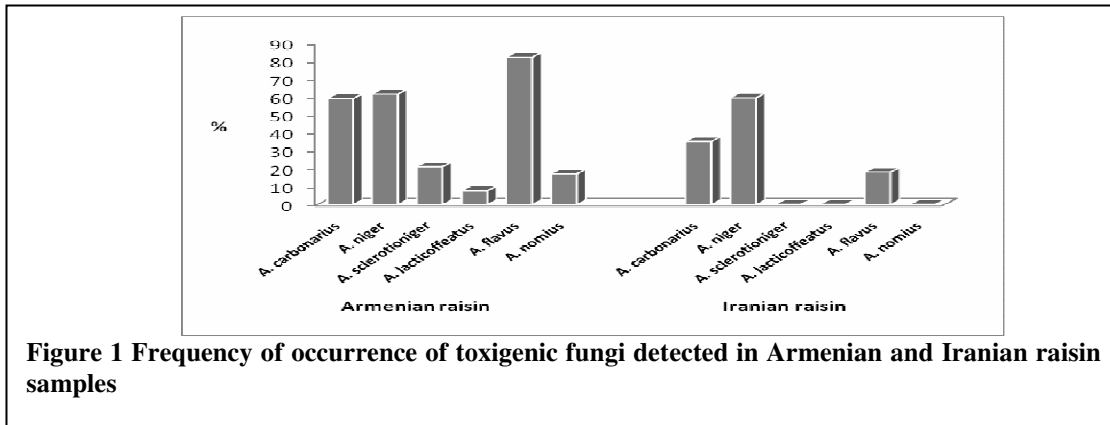
*Influence of pH, aw and sulfur dioxide content on contamination level*

For growth of filamentous fungi and mycotoxin production some growth factors such as pH, water activity (aw) and others are considered. Therefore, influence of pH and aw on contamination level of raisin by fungi was studied (Table 5).

The correlation between pH and contamination level is not simple. As such contamination level of raisin doesn't depend on pH. Values of pH of analyzed samples were 4.42- 4.8 which is favorable for growth and sporulation of fungi (including toxicogenic).

A positive correlation between water activity and contamination level of Armenian raisin by filamentous fungi is revealed. These results are presented in table 5. The highest contamination levels are detected in samples of Armenian raisin with relatively high value of aw.





Colony forming units (cfu.g<sup>-1</sup>) of Iranian samples was possible because Iranian raisins have a high content of sulfur dioxide. "Free" SO<sub>2</sub> in Iranian gold raisin is about 45 to 80 mg/kg, which can inhibit fungal growth. Total SO<sub>2</sub> was about 900-1200 mg/kg. It is noteworthy, however the quantity of sulfur dioxide in samples of Iranian gold raisin did not exceed the maximum allowed level such as 2000 mg.kg<sup>-1</sup> (Christensen, 2000). Sulfur dioxide was not detected in Armenian black raisins. Armenian black raisins were not treated with sulfur dioxide as commonly used to prevent natural color development. Subsequently, the frequency of occurrence of filamentous fungi was high in these samples.

It can be implied that the contamination of raisins by filamentous fungi can be prevented by use of control environmental conditions.

**Table 5 The Influence of pH, aw and SO<sub>2</sub> on contamination level of raisin by filamentous fungi**

Samples	pH	aw	Level of contamination by fungi (cfu.g <sup>-1</sup> )	SO <sub>2</sub> mg.kg <sup>-1</sup>	
				Free SO <sub>2</sub>	Total SO <sub>2</sub>
Iranian	4.60	0.437	20	45	950
Iranian	4.42	0.432	10	62	900
Iranian	4.58	0.560	40	65	1100
Iranian	4.50	0.437	-	80	1200
Iranian	4.71	0.780	30	60	1000
Iranian	4.51	0.560	10	75	1200
Iranian	4.75	0.781	30	60	1000
Iranian	4.60	0.620	30	65	1100
Armenian	4.80	0.479	60	-	-
Armenian	4.75	0.485	70	-	-
Armenian	4.70	0.850	150	-	-
Armenian	4.50	0.901	170	-	-
Armenian	4.70	0.850	140	-	-
Armenian	4.67	0.459	40	-	-

'-' not detected

## CONCLUSION

As a result of this and many other reports it is obvious that raisin is a favorable substrate for fungi, particularly for potential producers of mycotoxins such as ochratoxin A (*A. carbonarius*, *A. niger*). Six species of potential producers of mycotoxins, *A. carbonarius*, *A. niger*, *A. sclerotioniger*, *A. lacticoffeatus*, *A. flavus* and *A. nomius*, were isolated. *A. sclerotioniger*, *A. lacticoffeatus* and *A. nomius* occurred only in Armenian samples of raisin (Figure 1). In connection with climate change in recent years in Armenia the contamination level of raisin by potential ochratoxigenic fungi such as *A. carbonarius* has been increased. The frequency of occurrence of *A. niger* is turned to be very high. In 2004 it was about 66.7%, compare to 75% for recent five years (Figure 2). However, the occurrence of *A. carbonarius* has risen to 54.2%. Potential producer of aflatoxin A species such as *A. flavus* and *A. nomius* have occurred more often in raisin. And contamination of raisin by these species of toxigenic fungus has also risen within recent years, which is an actual and serious problem in Armenia.

## REFERENCES

ALMEDIA, P. A., ALABURDA, J., RUVIERI, V., SABINO, M. 2007. Ochratoxin A in raisins samples marketed

very low - 0 to 40, despite of high water activity. This is in São Paulo, Brazil. In Revista. – ISSN, vol. 38, 2007, p. 14-20.

BARKAI-GOLAN, R., PASTER, N. 2008. Mouldy fruits and vegetables as a source of mycotoxins: part 1. In *World Mycotoxin Journal*, vol. 1, 2008, no. 2, p. 147-159.

BEJAOU, H., MATHIEU, F., TAILLANDIER, P., LEBR IHI, A. 2006. Black aspergilli and ochratoxin A production in French vineyards. In *International journal of food microbiology*, vol. 111, 2006, no. 1, p. 46-52.

CRESPO, A., SA'NCHEZ, M., RAMO'N, D., MARTINEZ-CULEBRAS, P. V. 2007. Molecular characterization of *Aspergillus* isolates responsible for OTA contamination in grapes and wine. In XII International IUPAC Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins. Istanbul. Turkey. 2008, 5-9 August.

CHRISTENSEN, P. 2000. In Raisin production manual. Agriculture & Natural Resources. University of California, 2008, p. 214-225.

EL-KADY, I. A., ABDEL-HAFEZ, J. N., EL-MARAGHY, S. S. 1982. Contribution to the fungal flora of cereal grains in Egypt. In *Journal Mycopathologia*, 1982, no. 77, p. 103-109.

ESTEBAN, A., ABARCA, M. L., BRAGULAT, M. R., CABANES, F. J. 2006. Effect of pH on ochratoxin A production by *Aspergillus niger* aggregate species. In *Food Additives and Contaminants*, vol. 23, 2006, no. 6, p. 616-622(7).

IAMANAKA, B. T., TANIWAKI, M. H., MENEZES, H. C., VICENTE, E., FUGARO, M. H. 2005. Incidence of toxigenic fungi and ochratoxin A in dried fruits sold in Brazil. In *Food Additive and Contaminant*. vol. 22, 2005, no 12, p.1258-1263.

MACDONALD, S., WILSON, P., BARNES, K., DAMANT, A., MASSEY, R., MORTBY, E., SHEPHERD, M. J. 1999. Ochratoxin A in dried vine fruit: method development and survey. In *Food Additives and Contaminants*. vol. 16, 1999, no 6, p. 253-260(8).

MAGNOLY, C., ASTOREC, A., PONSONE, L., COMBINA, M., PALACIO, G., ROSA, C. A. R., DALCERO, A. M. 2004. Survey of mycoflora and ochratoxin A in dried vine fruits from Argentina markets. In *Letters in Applied Microbiology*, vol. 39, 2004, no 4, p. 326-331(6).

NARESH, M. and DAVID, A., 2007. Conditions of formation of ochratoxin A in drying, transport and in different commodities. In *Food Additives & Contaminants: Part A*, vol. 22, 2007, Issue 1, p. 10 – 16.

PITT, J. I., HOCKING, A. D. 1997. Fungi and Food Spoilage. Blackie Academic and Professional, London. 1997, p. 350.

RAPER K. B. and FENNELL, D. I. 1977. The genus *Aspergillus*. Krieger Publishing Company. Huntington, New York, USA.

RITA, S., MENDONCA, C. and VENANCIO, A. 2005. Fungi and ochratoxin A detected in healthy grapes for wine production. In *Letters in Applied Microbiology*, vol. 42, 2005, no 1, p. 42 – 47.

RITA, S., LOURENC, A., ALI'PIO, P., VENANCIO, A., 2006. Influence of the region of origin on the mycobiota of grapes with emphasis on *Aspergillus* and *Penicillium* species. In *Mycological Research*. vol. 110, 2006, p. 971-978.

RITA, S., CABANES, F. J., PERRONE, G., CASTELLA', G., VENANCIO, A., MULE', G., KOZAKIEWICZ, Z., 2006. *Aspergillus ibericus*: a new species of

- section Nigri isolated from grapes. In *Mycology*, vol. 98, 2006, no.2, p. 295-306.
- ROMERO, S. M., COMERIO, R. M., LARUMBE, G., RITIENI, A., VAAMONDE, G., FERNA'NDEZ, P. V., 2005. Toxigenic fungi isolated from dried vine fruits in Argentina. In *International journal of food microbiology*; vol. 104, 2005, no.1, p. 43-9.
- ROSA, C. A. R., PALACIOS, V., COMBINA, M., FRAGA, M. E., REKSON, A. O., MAGNOLY, C. E., DALCERO, A. M., 2002. Potential ochratoxin A producers from wine grapes in Argentina and Brazil. In *Food Additives & Contaminants: Part A*, vol. 19, 2002, no. 4, p. 408 – 414.
- SAEED, M. S., ALGHALIBI, M. S. and ABDULRAHMAN, M. S., 2004. Mycoflora and mycotoxin contamination of some dried fruits in Yemen Republic. Biology Department, Faculty of Science, Sana'a University, Sana'a, Yemen. In *Univ. Bull. Environ. Res.*, vol. 7, 2004, no. 2, p. 235-243.
- SAMSON, R. A., HOEKSTRA, E. S., FRISVAD, J., FILTENBORG, O. 1995. In *Introduction to Food-borne fungi*. 4th ed. Cenraalbureau Voor Schimmelcultures, Baarn, Nether-Lands. 1995, p.450.
- SAMSON, R. A., HOUBRACEN, J. A., KUIJPERS, F. A., FRANK, J. M., FRISVAD, J. C. 2004. New ochratoxin A or sclerotium producing species in *Aspergillus section Nigri*. In *Studies in Mycology*. vol. 50, 2004, p. 45–61.
- SAMSON, R. A., NOONIM, P., MEIJER, M., HOUBRAKEN, J., FRISVAD, J. C., VARGA, J. 2007. Diagnostic tools to identify black aspergilli. In *Mycology*. vol. 59, 2007, no. 13, p.129-145.
- SU-LIN, L. L., AILSA, D. H., and EILEEN, S. S. 2006. Survival and growth of *Aspergillus carbonarius* on wine grapes before harvest. In *International Journal of Food Microbiology*, vol. 111, 2006, no 1, p. S83-S87.
- TJAMOS, S. E., ANTONIOU, P. P., KAZANTAIDOU, A., ANTONOPOULOS, D. F., PAPAGEORGIOU, I., TJAMOS, E. C. 2004. *Aspergillus niger* and *Aspergillus carbonarius* in Corinth Raisin and Wine-Producing Vineyards in Greece: Population Composition, Ochratoxin A Production and Chemical Control. In *Journal of Phytopathology*. vol. 152, 2004, no. 4, p. 250 – 255.
- TURK, J. B., RENGİN, E., AÞKUN, T., SARIG, L. N., EVRİM, Z. T., HAFİZE, E. 2004. Colonial and Morphological Characteristics of Some *Aspergillus* Fr.:Fr. Species Isolated from Vineyards in Manisa and Üzmir Provinces (Turkey). *Turk. In Journal Botany*, vol. 28, 2004, p. 287-298.
- VALERO, A., SANCHIS, V., RAMOS, A. J., MARIN, S. 2007. Studies on the interaction between grape-associated filamentous fungi on a synthetic medium. In *Int. Journal of Food Microbiology*. vol. 113, 2007, no. 3, p. 271-276.
- VARGA, J., KOCSUBE, S., KONCZ, Z., TEREN, J. 2006. Mycobiota and ochratoxin a in raisins purchased in Hungary. In *Acta alimentaria* ISSN 0139-3006 CODEN ACALDI. vol. 35, 2006, no. 3, p. 289-294.
- ZINDENDINE, A., SORIANO, J. M., JUAN, C., MOJEMMI, B., MOLT, J. C., BOUKLOUZE, A., CHERRAH, Y., IIDRISSI, L., AOUD, R., MAES, J. 2007. Incidence of ochratoxin A in rice and dried fruits from Rabat and Sal area, Morocco. In *Food Additives & Contaminants: part A*, vol. 24, 2007, no. 3, p. 285 – 291.
- ZOHRI, A. A., ABDEL-GAWAD, M. K. 2007. Survey of mycoflora and mycotoxins of some dried fruits in Egypt. In *Journal of Basic Microbiology*. vol. 33, 2007, no. 4, p. 279-288.
- WOOD, R., FOSTER, L., DAMANT, A., KEY, P. 2004 . Analytical methods for food additives. Woodhead Publ. In *Food Science & Technology*. CRC, 2004, p 208.
- Controle de la qualite des produits alimentaires controle microbiologique. 1993. NF ISO 7954-88. Directives generales pour le denombrement des levures et moisissures.
- Controle de la qualite des produits alimentaires controle microbiologique. 1993. NF ISO 7698-91. Directives generales pour le denombrement des levures et moisissures.
- Guidance Document for Competent Authorities for the Control of compliance with EU Legislation on Aflatoxins Version 16/10/2006, SANCO/1208/2005-rev.1.P.1-44.

**Contact address:**

- Lusine Hakobyan, Department of Biology, Faculty of Biology, Yerevan State University, Armenia, E-mail: lusinehl@yahoo.com
- Karine Grigoryan, Department of Biology, Faculty of Biology, Yerevan State University, Armenia, E-mail: foodlab@inbox.ru
- Ara Kirakosyan, Department of Cardiac Surgery, University of Michigan, Ann Arbor, USA. E-mail: akirakos@umich.edu

## ANTIOXIDANT EFFECTS OF HERBAL EXTRACTS AND THEIR FOOD APPLICATION.

*Eva Ivanišová, Martina Fikselová, Vladimír Vietoris, Martin Mellen*

### ABSTRACT

Herbal extracts are considered as a good sources of antioxidant compounds. This work describes antioxidant effect of 15 kinds of herbs. Three different antioxidant assays were used, Trolox equivalent antiradical activity (TEAC), test based on deoxyribose oxidation and DPPH method. The TEAC values ranged from 0.38mM to 0.77 mM. Deoxyribose assay showed antioxidant activity of selected extracts expressed as the inhibition of formation of oxidative products of deoxyribose from 2.68 to 50.05 %. The DPPH method values ranged from 6.47 to 73.80 %.

Extracts of *Prunus spinosa* L., *Euphrasia rostkoviana* Hayne were the best antioxidants confirmed by all methods. *Scrophularia nodosa* L. extract showed the weak antioxidant effect determined by all selected methods. Phenolic content was in relation to the antioxidant effect of herbs, very high significancy between DPPH and polyphenols content was found. To improve selected properties of apple juice (taste, smell, functional properties) by addition of medicinal herbs was achieved in this work. Antioxidant effect of apple juice variants with herbs additions determined by DPPH method was high and ranged from 73 to 78.49 %. Herbal extracts can be utilised in selected combinations to improve sensory and functional properties of some kinds of beverages.

**Keywords:** additive, herb, antioxidant effect, TEAC, deoxyribose test, DPPH

### INTRODUCTION

Dietary habits influence the risk of developing a variety of diseases, especially cancer and heart diseases. Epidemiologic observations and laboratory studies have indicated that tea consumption may have beneficial effects in reducing certain types of cancer in some populations (Mukhtar, Ahmad, 2000).

The traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer demonstrated significantly stronger antioxidant activity and contained much more phenolic compounds than common vegetables and fruits. A positive and significant correlation existed between antioxidant activity and total phenolic content, revealing that phenolic compounds were the dominant antioxidant components in the tested medicinal herbs. Phenolic acids, flavonoids, tannins, coumarins, lignans, quinones, stilbenes, and curcuminoids were identified as major types of phenolic compounds. The investigation of the inter-relationship between phenolic compounds and antioxidant/anticancer activity will be a promising field to understand and elucidate possible mechanisms for the functionality of traditional Chinese medicines for cancer prevention and treatment (Cai et al., 2004).

Plant extracts contain polyphenols (natural antioxidants), which are believed to be effective nutrients in the prevention of oxidative stress-related diseases such as cancer and heart diseases. These extracts, possibly mainly due to their phenolic content, retard oxidative degradation of lipids (Proestos et al., 2008).

Herbs are important sources of compounds, that can work as antioxidant or antimicrobial agents (Yanishlieva et al. 2006), so herbal extracts are being used in cosmetics, food industry (Djeridane et al, 2006) and medicine (Hinneburg, 2006, Yanishlieva et al., 2006). Many of pharmaceutical products are based on substances derived from plants.

In the present, fresh fruit and vegetable juices are very popular and their improvement with natural functional (herbal) additives to increase their nutritional and sensory value is one of the trends in the soft industry.

The aims of this work were to compare antioxidant effect of water herbal extracts evaluated by different assays - TEAC (Trolox Equivalent Antiradical Capacity) and deoxyribose test (dR test), DPPH and to test their use to enrich soft drinks (apple juice).

### MATERIAL AND METHODOLOGY

Herbs and their parts were analysed: acacia (*Robinia pseudo-acacia* L.) – flower, euphrasia (*Euphrasia rostkoviana* Hayne)- flowering top, silverweed (*Potentilla anserina* L.) – leaf, black thorn (*Prunus spinosa* L.) – flower, yarrow (*Achillea millefolium* L.) – flowering top, figwort (*Scrophularia nodosa* L.) – flowering top, gowan (*Bellis perennis* L.) – flower, yellow chamomile (*Anthemis tinctoria* L.) – flower, wild garlic (*Allium ursinum* L.) – leaf, tarragon (*Artemisia dracuncululus* L.) – flowering top, horse-chestnut (*Aesculus hippocastanum* L.) – flower, betony (*Stachys officinalis* L.) – flowering top, germander (*Teucrium chamaedry* L.) – flowering top, bedstraw (*Galium verum* L.)- flowering top, verbena (*Verbena officinalis* L.) - flowering top.

All herbs were collected in Lieštany area (Slovakia).

Medicinal herbs of *Rubus idaeus*, *Tilia cordata*, *Agrimonia eupatoria*, *Centaurium erythraea*, *Mentha piperita*, *Calendula officinalis*, *Origanum vulgare* were used in purpose to obtain special health benefits for their application into the apple juices.

To compare the antioxidant effects were used also synthetic antioxidants- BHT (3,5 – Di-tert-butyl-4-hydroxytoluene) fy Supelco USA and ascorbic acid (C<sub>8</sub>H<sub>8</sub>O<sub>6</sub>) Lachema, Neratovice, Czech republic.

#### Herbal extracts preparation

Dry and homogenized herbs (2 g) were extracted with 200 ml of boiled distilled water during 5 min of infusion time. Extracts were filtrated and used for measure.

#### Methods

##### 1. Deoxyribose test

Reaction was realised in medium of 50 mM potassium phosphate buffer (PBS) pH 7.4 (55 µl) after addition 5 µl

10 mM EDTA (ethylenediamine-tetraacetic acid), 5 µl 10mM FeCl<sub>3</sub>, 5 µl 10 mM ascorbic acid, 180 µl 10mM deoxyribose, 200 µl herbal extract and 50 µl 10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Compound was mixed and incubated during 1 hour at 37 °C. Afterwards 0.5 ml 10 % TCA (trichloroacetic acid) and 0.5 ml 1 % TBA (thiobarbituric acid) were added. Mixture was incubated during 10 minutes at 90°C. Sample was cooled and measured by spectrophotometer (UV – 161 Shimadzu, Tokio, Japan) at 532 nm.

Antioxidant activity was expressed as:  $[1-(dRA / dR)] \times 100$  (%)

dR – absorbancy without antioxidant

dRA – absorbancy with antioxidant

## 2. TEAC/ABTS test

Radical preparation: 3.3 mg potassium persulphate (K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>) was dissolved in 5 ml deionized water and added to 17.2 mg ABTS [2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid)], then was mixed in the test tube and stored in the dark during 14 hours.

After that time 1 ml of the radical solution was mixed with 60 ml deionized water, 50µl of herbal extract was added and mixed rigorously. Decrease of absorbancy at 734 nm (UV – 1601 Shimadzu, Tokio, Japan) during 600 s was observed. Adjusted value of extract in 600 s was expressed by the calibration curve of Trolox concentration (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid).

## 3. DPPH

The method of BRAND – WILLIAMS et al. (1995) was modified and used. Herbal extract (0.1 ml) was added to 3.9 ml DPPH' ethanolic solution (25 mg. l<sup>-1</sup>), mixed and absorbancy decrease was measured at 515 nm during 10 min of reaction time - spectrophotometrically.

**Calculation:** Efficiency of plant extracts as antioxidants was calculated:

$$\% \text{ inhibition} = \frac{(A_C - A_{At})}{A_C} \cdot 100$$

A<sub>C</sub> – control absorbancy of DPPH solution (time = 0 min)  
A<sub>At</sub> – absorbancy of solution after reaction with antioxidant (time = 10 min)

## 4. TOTAL POLYPHENOLS (TP)

The contents of total phenolic compounds in water extracts were estimated using the Folin- Ciocalteu reagent. Tanin was used as the standard solution.

## 5. APPLE JUICE CHARACTERISATION WITH MEDICINAL EXTRACTS ADDITION

Apple juice (100 %) was obtained from the small fruit producer in Slovakia and used as control sample. Selected medicinal extracts (2 g/200ml) were added to replace the apple juice in the amounts 10-20 % in these variants:

A- 10 % *Rubus idaeus* + 10 % *Tilia cordata*

B- 10 % *Agrimonia eupatoria* + 10 % *Centaureum erythraea*

C- 10 % *Mentha piperita*

D- 10 % *Calendula officinalis* + 10 % *Origanum vulgare*

E - control (100 % apple juice)

Variants of apple juices were tested for the dry matter content (refractometrically), acidity by titration (%), antioxidant effect (DPPH method) and sensory analysis.

## 6. STATISTICAL ANALYSIS

Statistical processing was performed with use of non-parametric methods (Kendall's and Spearman's correlation analysis). Datas were computed in R language with use of R software environment for statistical computing.

## RESULTS AND DISCUSION

### Antioxidant effects of selected herbal extracts compared to different assays

Antioxidant effect of selected water extracts from herbs which are commonly cultivated in gardens, or in nature was observed and is shown in the table 1. Water as extraction solvent was used because of polyphenols characteristics, safety and also Buřičová and Rėblová

**Table 1 Antioxidant effect determined by different assays and phenolics content of selected herbs**

Extract	Antioxidant effect			Polyphenols (mg.dm <sup>-3</sup> )
	dR-test (%)	ABTS test (mM)	DPPH (%)	
<i>Euphrasia rostkoviana</i>	23.22	0.7684	73.80	201.76
<i>Achillea millefolium</i> L.	18.19	0.3844	14.38	55.70
<i>Potentilla anserina</i> L.	26.00	0.7711	30.43	65.81
<i>Scrophularia nodosa</i> L.	3.97	0.3842	6.47	16.31
<i>Bellis perennis</i> L.	34.09	0.4017	56.07	171.43
<i>Anthemis tinctoria</i> L.	10.33	0.4533	58.35	128.73
<i>Allium ursinum</i> L.	19.90	0.3880	7.23	62.44
<i>Artemisia dracunculus</i> L.	21.98	0.4653	38.58	128.73
<i>Prunus spinosa</i> L.	50.05	0.6035	73.40	189.41
<i>Robinia pseudo – acacia</i> L.	20.52	0.3917	9.04	79.29
<i>Aesculus hippocastanum</i> L.	32.72	0.5758	58.15	233.23
<i>Stachys officinalis</i> L.	17.86	0.3877	11.37	28.73
<i>Teucrium chamaedrys</i> L.	2.68	0.4480	35.91	93.90
<i>Galium verum</i> L.	4.87	0.3840	11.49	25.36
<i>Verbena officinalis</i> L.	28.66	0.3862	9.87	51.20

**Table 2** Characterisation of apple juices with herbal extracts addition

Variant	Sample	DPPH (%)	DPPH/mixture (%)	Rf (%)	Acidity (%)
A	Raspberry (10 %)	88	78.49	11	0.201
	Linden (10 %)	73.38			
B	Agrimony (10 %)	81.88	73.03	11.5	0.201
	Centaury (10 %)	14.74			
C	Mint (10 %)	78.12	76.76	12	0.241
D	Marigold (10 %)	28.24	76.21	11	0.201
	Oregano (10 %)	83.53			
E	100 % apple	76.33		14	0.241

(2008) found that the extraction of substances with the antioxidant activity was markedly more efficient using hot water than ethanol at laboratory temperatures.

Determination of antioxidant activity by ABTS radical showed the extracts of euphrasia (0.77 mM), silverweed (0.77 mM) and black thorn (0.60 mM) to be the best sources of antioxidants. Similarly use of DPPH radical showed the best antiradical effect at euphrasia (73.8 %) and black thorn (73.4 %) and the lowest at figwort (6.47 %). Assay based on oxidative damage of deoxyribose (dR) confirmed the black thorn as very strong antioxidant (50.05 %).

Figwort was confirmed as one of the weakest source of antioxidants compared to all selected antioxidant assays. The effect of individual extracts in the activity order is different considering different components presence (table 1). The reason could be the presence of compounds with different reactivity in given reaction medium and their different ability to eliminate present type of radical. Antioxidant effect of herbal extracts is described mainly due to polyphenolic compounds, which concentration and presentation is different in individual herbs. As rich sources of phenolics were estimated euphrasia, black thorn and gowan. Shi et al. (2009) describes that chlorogenic acid isomers are the key phenolic compounds responsible for antioxidant activity of the extract from *Prunus mume* flowers.

Statistical testing of our results showed very high significance between DPPH and polyphenols content (0.91

Spearman; 0.68 Kendal). Relationship between deoxyribose test and polyphenols was significant (0.61 Spearman; 0.47 Kendal) and between ABTS and phenolics was found middle significance (0.53 Spearman; 0.36 Kendal).

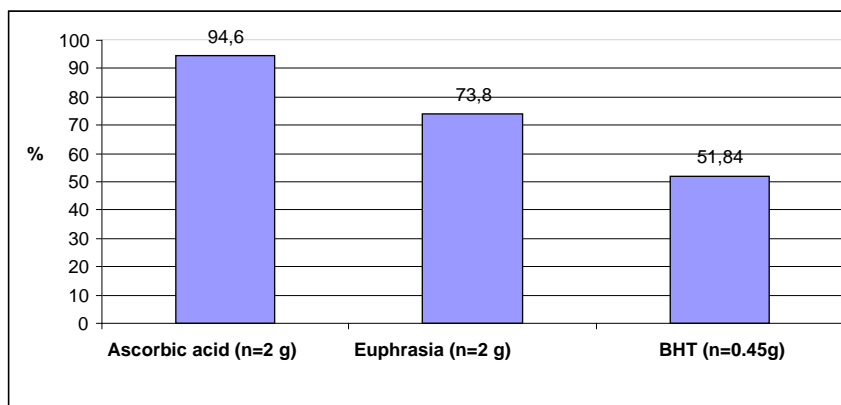
Antioxidant effect of ascorbic acid (2 g) determined by DPPH method was high (94.6 %) even compared to euphrasia, which was classified as one of the best antioxidant (73.8 %) sources. BHT was tested in low amounts (0.45 g BHT) and at this sample weight was determined 52 % inhibition of DPPH radical (fig. 1). Antioxidant effect of selected fenolic acids (not shown) determined by dR- test was found to be high (54.42 %) at rosmarinic and gallic (53.48 %) acids.

**Application of selected herbal extracts in apple juices**

Sensory evaluation showed that pure (100 %) apple juice was very sweet and sensorically not very well accepted. Some authors (Buřičová, Réblová, 2008) recommend selected plants (*Rosaceae*, *Lamiaceae*, *Tiliaceae*) for consumption in various kinds of beverages or as extracts to increase the nutritional value of different foods and diets. The aim of work was to improve properties of apple juice (taste, smell, functional properties) by addition of selected medicinal herbs in purpose of sensory and health improvements of juices.

By non-parametric testing it was found that with use of Friedman test concentrated apple juice (E variant) was

**Fig. 1** Antioxidant effects (% inhib.) of different types of antioxidants determined DPPH method





statistically significant worse ( $p = 0.0948$ ) compared to the rest of variants.

Method based on elimination of DPPH radical showed variant E - apple juice (100 %) as good source of antiradical compounds (76.33 %), probably because of polyphenols presence. Apple polyphenols can be divided into two big groups, group of phenolic acids including benzoic acids derivatives (e.g. gallic acid) and cinnamic acid derivatives (caffeic, ferulic, chlorogenic), and group of flavonoids including flavonols (quercetin), flavan-3-ols (catechin, epicatechin, procyanidins), dihydrochalcones and anthocyanins (Ondrejovič et al., 2009).

Regarding to the antioxidant effect of individual variants can be showed (table 2) that the best antioxidant effect was determined at variant A (raspberry and linden- 78.49 %) . Antioxidant effect of our juice variants was high and ranged from 73 to 78.49 %, probably because of use of good antioxidative extracts from herbs and good antioxidant effect of apple juice as well. Also Buřičová and Réblová (2008) state that considerable antioxidant activities were found in the extracts of plants from *Rosaceae* family (e.g. blackberry), *Lamiaceae* (oregano, mint), *Tiliaceae* (linden) and appear to be good and safe sources of antioxidants.

Dry matter content and acidity were found to be the highest at concentrated apple juice (variant E) and decreased with the additions of herbal extracts.

Mendelova et al. (2009) tested to improve sensory parameters of concentrated apple and sour cherry juices by mixing them in different proportions.

## CONCLUSION

Determination of antioxidant activity by ABTS radical showed the extracts of euphrasia, silverweed and black thorn to be the best sources of antioxidants. Similarly use of DPPH radical showed the best antiradical effect at euphrasia and black thorn, assay based on oxidative damage of deoxyribose (dR) confirmed the black thorn as very strong antioxidant. Figwort was confirmed as one of the weakest source of antioxidants compared to all selected antioxidant assays. While all herbal extracts showed some antioxidant effect, achieved results in individual kinds of herbs compared to different methods indicate some differences in the activity (effect) order evaluated by different methods. The reason could be the presence of compounds with different reactivity in given reaction medium and their different ability to eliminate present type of radical.

To improve properties of apple juice (taste, smell, functional properties) by addition of selected medicinal herbs (10 %) was achieved in this work. Antioxidant effect of apple juice variants with herbs additions was high and ranged from 73 to 78.49 %. Herbal extracts can be utilised as potential food additives to avoid oxidative changes in the food products and in selected combinations to improve sensory and functional properties of some kinds of beverages.

## REFERENCES

BRAND-WILLIAMS, W., CUVELIER, M. E., BERSET, C., 1995. Use of Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. In *Lebensm. – Wiss. U.-Technol.*, vol. 28, p. 25-30.

BUŘIČOVÁ L., RÉBLOVÁ Z., 2008. Czech medicinal plants as possible sources of antioxidants. In *Czech J. Food Sci.*, vol. 26, p. 132–138.

CAI Y., QIONG LUO Q., SUN M., CORKE H., 2004. Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. In *Life Sciences*, vol. 74, p. 2157-2184.

DJERIDANE M., YOUSFI B., NADJEMI D., BOUTASSOUNA P., STOCKER -N. VIDAL., 2006. Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. In *Food Chemistry*, vol. 97, p. 654–660.

HINNEBURG I., DAMIEN DORMAN H. J., RAIMO HILTUNEN R., 2006. Antioxidant activities of extracts from selected culinary herbs and spices. In *Food Chemistry*, vol. 97, p. 122-129.

MENDELOVÁ A., FIKSELOVÁ M., MAREČEK J., 2009. Hodnotenie vybraných ukazovateľov kvality ovocných šťiav. In *Acta fytotechnica et zootechnica*, vol. 12, p. 433 – 437.

MUKHTAR H., NIHAL AHMAD, N., 2000. Tea polyphenols: prevention of cancer and optimizing health. In *Am J Clin Nutr*, vol. 71, p. 1698S–1702S.

ONDREJOVIČ M., MALIAR T., POLÍVKA Ľ., ŠILHÁR S., 2009. Polyfenoly jabĺk. In *Chem. Listy*, vol. 103, p. 394–400.

PROESTOS CH., BOZIARIS, I. S., KAPSOKEFALOU M., KOMAITIS, M., 2008. Natural Antioxidant Constituents from Selected Aromatic Plants and Their Antimicrobial Activity Against Selected Pathogenic Microorganisms. In *Food Technol. Biotechnol.*, vol. 46, p. 151–156.

SHI J., GONG J., LIU J., WU X., ZHANG Y., 2009. Antioxidant capacity of extract from edible flowers of *Prunus mume* in China and its active components. In *Food Science and Technology*, vol. 42, p. 477-482.

YANISHILIEVA N. V., MARINOVA E., POKORNY J., 2006. Natural antioxidants from herbs and spices. In *European Journal of Lipid Science and Technology*, vol. 108, p. 776-793.

**Special thanks** to Mr. František Mrazik MSc, from Agropol Vlčany for granting of this research by samples.

## Contact address:

Ing. Eva Ivanířová, Faculty of Biotechnology and Food Science, Slovak University of Agriculture, Tr. A. Hlinku 2, Nitra, 949 76, E-mail: eva.ivanisova@post.sk

Ing. Martina Fikselová, PhD., Faculty of Biotechnology and Food Science, Slovak University of Agriculture, Tr. A. Hlinku 2, Nitra, 949 76, E-mail: martina.fikselova@gmail.com

Ing. Vladimír Vietoris, PhD., Faculty of Biotechnology and Food Science, Slovak University of Agriculture, Tr. A. Hlinku 2, Nitra, 949 76, E-mail: vladimir.vietoris@uniag.sk

Ing. Mgr. Martin Mellen, PhD., Slovak University of Agriculture in Nitra, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Department of Storage and Processing Plant Products, Tr. A. Hlinku 2, 94976 Nitra E-mail: martin.mellen@gmail.com

## COMPARISON OF OCCURENCE LACTIC ACID BACTERIA IN CHOSEN YOGURTS

*Libuša Lengyelová, Dagmar Kozelová, Ľudmila Trstenovičová, Silvia Pintérová*

### ABSTRACT

The yogurt is healthy food, which contains at least 100 million cultures per gram. Probiotic bacteria have been proven to reduce the effects of some gastrointestinal problems, probiotics can greatly reduce lactose intolerance, have also been proven to prevent colon cancers, there are also a natural immune system booster. In our research we detected numbers of lactic acid bacteria in yogurts in slovak market. There were classical yogurts, yogurts with probiotics, yogurts with fat and non fat. We numbered lactic acid bacteria from and after expiration, in agars MRS and Lee's. In examined yogurts we detected from expiration from  $78.10^7$  to  $169.10^7$  and after expiration from  $59.10^7$  to  $133.10^7$  lactic acid bacteria in 1 ml of yogurt. In agreement with Food Codex of SR (2010) of rules all these yogurts satisfy number of lactic acid bacteria.

**Keywords:** yogurt, lactic acid bacteria, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus bulgaricus*

### ÚVOD

Jogurt je kyslomliečny výrobok, ktorý pochádza z Turecka. Kyslomliečne výrobky, vrátane jogurtov, sú výrobky vyrobené z pasterizovaného kravského, ovčieho alebo kozieho mlieka v procese fermentácie s vhodnými, zdravotne neškodnými, taxonomicky určenými mikroorganizmami (Drbohlav, 2000). Na kvalitu a bezpečnosť kyslomliečnych výrobkov vplyva podľa Zeleňákovej a Goliana (2008) aj kvalita základnej suroviny. Základnou surovinou na výrobu kyslomliečnych výrobkov je mlieko. Mlieko ako produkt mliečnej žľazy cicavcov svojou vyváženou skladbou živín a vysokým obsahom vody je veľmi vhodným prostredím pre rast mikroorganizmov, ktoré svojou metabolickou činnosťou môžu kvalitu mlieka a biologickú hodnotu jeho i výrobkov z neho ovplyvniť priaznivo alebo nepriaznivo (Horník, 1996). V surovom kravskom mlieku prítomnosť rezíduí inhibičných látok (RIL) predstavuje riziko pre ľudské zdravie a ovplyvňuje technológiu výroby mliečnych výrobkov. Výskyt RIL má byť podľa legislatívy v množstve menšom ako je ich maximálny reziduálny limit (MRL). Nevhodné mikroorganizmy sa môžu do produktu dostať cez kontakt s výrobnými povrchmi, kde sa môžu adherovať alebo vytvárať biofilmy (Salustiano et al., 2004). Minimalizovaním mikrobiálnej kontaminácie a elimináciou tvorby biofilmov na potravinárskych zariadeniach a povrchoch ako aj uplatňovaním efektívnych a účinných sanitačných postupov je možné podľa Čapla et al. (2010) dosiahnuť výrobu bezpečných potravín.

V prvovýrobe a mliekarenských prevádzkach sa používajú rôzne rýchle testy pre stanovenie RIL ako Delvotest® SP-NT, Beta STAR, SNAP test, Copan Test, Twinsensor BT, Charm BLUE YELLOW, Eclipse Test. Citlivosť rýchlych testov je buď na úrovni MRL, alebo je ešte vyššia (Zajác a Čapla, 2010).

V Slovenskej republike bolo v rámci skúšania mlieka na RIL za účelom preplácania v roku 2009 vyšetrených 23 313 vzoriek surového kravského mlieka. Z uvedeného počtu vzoriek bolo 23 286 vzoriek negatívnych, počet pozitívnych vzoriek bol 27. Percento pozitívnych vzoriek z celkového počtu vyšetrených vzoriek bolo 0,116 %. Pokles počtu pozitívnych vzoriek od roku 2001 je možné pripísať kontrole RIL pomocou rýchlych testov, ktorá sa postupne zavádza na farmách (Zajác et al., 2007; 2010).

Pravidelnú kontrolu mlieka a mliečnych výrobkov orgánmi úradnej kontroly, ako aj samotnými mliekárňami považujeme za nevyhnutnú. Podľa Zeleňákovej a Goliana (2008) nové kontrolné limity, smernice spolu s novými kvalitatívnymi stratégiami a spotrebiteľskými požiadavkami na bezpečné a nefalšované potraviny si vyžadujú senzitívnejšie analytické metódy. Zeleňáková et al. (2008) laboratórne skúšali, hodnotili a porovnávali kvalitatívne parametre štyroch druhov ELISA testov, založených na špecifickej detekcii kravských resp. kozích imunoglobulínov, vo vzorkách mlieka pomocou špecifických protilátok. Autori ďalej uvádzajú, že vzájomné falšovanie ovčieho, kozieho a kravského mlieka sa môže stať vážnym problémom vo výrobe, pretože spôsobuje technologické problémy pri spracovaní, jeho následkom sú aj hygienické a výživové nedostatky, ako i ekonomické straty. Vyšetrenia vybraného druhu mliečnych výrobkov na detekciu mikroorganizmov klasickou platňovou metódou a screeningovou metódou 3M™ Petrifilm™ uskutočnili a porovnali Lopašovský et al. (2009), podľa ktorých sú obe použité metódy spoľahlivé.

Charakteristickým znakom kyslomliečnych výrobkov je prítomnosť živých mikroorganizmov, špecifických pre konkrétny druh výrobku. Zvyčajne ide o monokultúry alebo o zmesnú kultúru mikroorganizmov. Mikroorganizmy musia byť vo finálnom výrobku v nadbytku, čo predstavuje najmenej  $10^7$  živých charakteristických mikroorganizmov v 1ml alebo v 1g kyslomliečnych výrobkov.

Pri výrobe jogurtov sa do mlieka pridáva základná zmesná jogurtová kultúra s použitím bakteriálnych kmeňov *Lactobacillus delbrueckii, subsp. bulgaricus* a *Streptococcus salivarius, subsp. thermophilus*. Vo výrobku musia byť oba mikroorganizmy živé a v optimálnom vzájomnom pomere na metabiózu, väčšinou 1 : 1 alebo 1 : 2. Probiotické jogurty sa vyrábajú pridaním probiotickej kultúry k základnej zmesnej kultúre. K probiotickým baktériám patria: *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium bifidum*, *Enterococcus faecium* a ďalšie (Axelson, 1998). Tieto živé kultúry pôsobením enzýmov vyvolávajú charakteristické biochemické zmeny mlieka a mliečnych výrobkov

sprevádzané znížením pH, vyzrážaním bielkovín a tvorbou aromatických látok. Zdravotne priaznivé vlastnosti sa však pripisujú najmä probiotickým baktériám z rodov *Bifidobacterium* a *Lactobacillus* (Drábeková a Lengyelová, 2004).

Na začiatku procesu produkujú baktérie *Streptococcus salivarius*, *subsp. thermophilus* rastové látky, ktoré stimulujú rast *Lactobacillus delbrueckii*, *subsp. bulgaricus*. Naopak *Lactobacillus delbrueckii*, *subsp. bulgaricus* svojou proteolytickou aktivitou uvoľňuje z mlieka aminokyseliny a umožňuje tak činnosť *Streptococcus salivarius*, *subsp. thermophilus* po spotrebovaní dôležitých aminokyselín v mlieku. Ich vzájomný vzťah sa priaznivo prejavuje aj vo vlastnostiach jogurtu. Ide napríklad o tvorbu typickej arómy, ktorej hlavnou zložkou je acetaldehyd produkovaný baktériami *Lactobacillus delbrueckii*, *subsp. bulgaricus*. Kyselina mliečna, ktorá je počas fermentácie produkovaná uvedenými mliečnymi baktériami, znižuje pH prostredia, čím pôsobí ako konzervant, lebo účinne zabraňuje rastu a rozmnožovaniu hnilobných a patogénnych baktérií. Vďaka tomu sú kyslomliečne výrobky ľahšie stráviteľné ako mlieko. Navyše tieto baktérie pomáhajú upraviť tráviace problémy. Podľa Heriana (2001) jogurt a fermentované mlieka sú pre spotrebiteľa úplne bezpečné, pretože pri pH 3,8 – 4,2 sú všetky vegetatívne patogénne mikroorganizmy (*Listeria monocytogenes*, *E. coli*, *Salmonella* a iné) usmrtené ešte skôr ako sa dostane výrobok do obchodu. Optimálne pH v jogurte podľa Guequim-Kana et al. (2007) je možné zabezpečiť kultiváciou mliečnych baktérií pri teplote 38 – 44°C.

V poslednom desaťročí sa zvýšil počet experimentov a štúdií dokumentujúcich priaznivý terapeutický účinok probiotík pri niektorých chorobných stavoch. Probiotiká možno definovať ako nepatogénne mikroorganizmy, ktoré pri požití vyvíjajú pozitívny vplyv na zdravie alebo fyziológiu hostiteľa (Fuller, 1989). Z hľadiska využitia probiotík v praxi je mimoriadne významný ich lokálny, celkový a biomedicínsky účinok, inhibičný efekt voči patogénom, optimalizačný vplyv na tráviace procesy a anticholesterolová aktivita. Majú pozitívny vplyv na imunitný systém a pôsobia antimutagénne, antigenotoxicky a antikarcinogénne (Saxelin et al., 2005, Petrof et al., 2004, O'Sullivan, 2001, Neu a Caicedo, 2005). Medzi prospešné mikroorganizmy a teda medzi probiotiká patria najmä baktérie mliečneho kvasenia a bifidobaktérie. Tieto mikroorganizmy sú prospešné tak pre ľudí ako aj pre zvieratá a preto sú stále pozorne skúmané mechanizmy ich pôsobenia v hostiteľskom organizme. Bakteriálne kultúry obsiahnuté v kyslomliečnych výrobkoch, teda aj v jogurtoch, majú pozitívny vplyv na zloženie črevnej mikroflóry, zmierňujú symptómy intolerancie na laktózu (Corral et al., 2006), uľahčujú vstrebávanie minerálnych látok, majú významný vplyv na metabolizmus lipidov a žľových kyselín. Pri svojej relatívne nízkej energetickej hodnote sú bohatým zdrojom plnohodnotných bielkovín, vápniku, fosforu a rôznych vitamínov skupiny B.

„Terapeutické minimum“ probiotického výrobku je  $1 \cdot 10^5$  KTJ.ml<sup>-1</sup>. Aby sa u človeka dosiahlo akýchkoľvek kladných účinkov je nevyhnutná denná konzumácia živých buniek v množstve  $1 \cdot 10^6$  -  $1 \cdot 10^9$  KTJ.ml<sup>-1</sup> (Lee a Salminen, 1995).

Za probiotické možno považovať iba tie jogurty, ktorých zdravie a vitalitu podporujúce účinky boli potvrdené oficiálnymi a prísnymi klinickými skúškami. Štúdie musia dokázať schopnosť probiotickej kultúry prežiť prechod tráviacim systémom a preventívne či liečebné účinky na zdravie.

Okrem toho, že jogurty obsahujú zdraviu prospešné mliečne baktérie, tak obsahujú aj vitamíny a množstvo minerálnych látok. Preto sú dôležitou súčasťou potravy hlavne pre deti a starších ľudí (Zahoor et al., 2003).

### MATERIÁL A METÓDY

V práci sme sa zamerali na zisťovanie počtu mliečnych baktérií v jogurtoch na slovenskom trhu. Laboratórnym skúšaním sme zisťovali počty mliečnych baktérií pred dátumom spotreby a po dátume spotreby. Okrem zisťovania mikroorganizmov sme tieto počty porovnávali navzájom. To znamená, že výsledky sme porovnávali aj vzhľadom na druh jogurtu, ale aj vzhľadom na médium, ktoré sme používali. Hlavným cieľom práce bolo zistiť, či skúmané jogurty obsahujú mliečne baktérie v stanovenom počte podľa Potravinového kódexu SR.

Mliečne baktérie sme kultivovali na dvoch agarových pôdach od HIMEDIA – MRS agar (M 641) a Lee's agar (M 602), pričom na určenie KTJ (kolónie tvoriace jednotky) sme použili platňovú zriedovaciu metódu v súlade s STN 56 0094. Skúmali sme 4 druhy jogurtov (od výrobcov Danone a Rajo), z toho 2 druhy jogurtov bez obsahu probiotických kultúr (A, B) a 2 druhy probiotických jogurtov (C, D). Celkom sme analyzovali 80 vzoriek jogurtov na trhu.

Vzorky jogurtov sme nakupovali vždy po dva kusy toho istého dátumu spotreby. Prvú vzorku sme analyzovali po zakúpení a druhú vzorku prvý deň po dátume spotreby. Každý jogurt sme pred vyšetrením dôkladne premiešali krúživými pohybmi alebo pretrepaním. Po sterilnom otvorení za dodržania všetkých podmienok aseptiky, sme sterilnou tyčinkou odobrali požadované množstvo. Odmerané množstvo vzorky sme vo vhodnej sterilnej nádobe zmiešali s deväťnásobným množstvom sterilného fyziologického roztoku s peptónom (STN 56 0094). Zmes sme dôkladne premiešali.

Riedenie takto získané sa označuje ako I. alebo základné a z neho sa vychádza pri ďalšom spracovaní vzorky. Vzorky sa riedia tak, aby vyrastené kolónie boli dobre izolované a počítateľné. Vychádzali sme z I. riedenia ( $1:10$ , resp.  $10^{-1}$ ). Druhé riedenie ( $1:100$ ,  $10^{-2}$ ) sme pripravili tak, že 1 ml I. riedenia sme zmiešali s 9 ml sterilného fyziologického roztoku v sterilnej skúmavke. Ďalšie riedenia ( $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ , ...) sme pripravili rovnakým spôsobom z predchádzajúcich riedení. Pri experimente sme použili riedenia  $10^{-6}$  a  $10^{-7}$ , ktoré boli z hľadiska počítania kolónií najvhodnejšie.

Aby sa zabránilo chybám, ktoré ovplyvňujú výsledok a vznikajú predovšetkým pri riedení je treba dodržiavať nasledovné zásady:

- použiť čisté nepoškodené pipety,
- riedené a riediace tekutiny odmeriavať presne a zabrániť primiešaniu tekutiny z povrchu pipety,
- obsah každej skúmavky dôkladne premiešať,
- na prípravu každého riedenia použiť novú pipetu.

Živné médiá sme sterilizovali v autokláve (NŮVE OT 012) pri 121 °C po dobu 20 minút. Mikroorganizmy sme očkovali (EKOSTAR FLOW HF BH) zalieváním tak, že sme napipetovali 1 ml vhodného riedenia do prázdnej sterilnej Petriho misky a čo najrýchlejšie sme zaliali 40 – 45 °C teplou živnou pôdou. Ihneď po zaliatí sme živnú pôdu dokonale rozmiešali so vzorkou krúživými pohybmi misky a nechali stuhnúť. Po stuhnutí sme naočkované pôdy vložili do anaerostatu hore dnom a použili sme

### VÝSLEDKY A DISKUSIA

Počet mliečnych baktérií vo všetkých štyroch nami analyzovaných druhoch jogurtov sa pohybujú v nasledovnom rozmedzí - minimálne v počte  $7,3 \cdot 10^8$  KJT v 1 ml výrobku pred dátumom spotreby a minimálne  $5,9 \cdot 10^8$  KJT po dátume spotreby. Podrobnosti uskutočnených porovnaní 80 vzoriek jogurtov sa nachádzajú v tabuľkách 1-3.

**Tabuľka 1** Porovnanie počtu mliečnych baktérií (KTJ.ml<sup>-1</sup>) v jogurtoch pred a po dátume spotreby

jogurt	MRS pred d. s.	MRS po d. s.	Lee's pred d. s.	Lee's po d. s.
A	121,5. 10 <sup>7</sup>	67,0. 10 <sup>7</sup>	153,3. 10 <sup>7</sup>	125,3. 10 <sup>7</sup>
	p=0,000 <sup>++</sup>		p=0,043 <sup>+</sup>	
B	101,1. 10 <sup>7</sup>	82,0. 10 <sup>7</sup>	149,4. 10 <sup>7</sup>	117,1. 10 <sup>7</sup>
	p=0,010 <sup>+</sup>		p=0,024 <sup>+</sup>	
C	123,0. 10 <sup>7</sup>	115,1. 10 <sup>7</sup>	168,8. 10 <sup>7</sup>	132,7. 10 <sup>7</sup>
	p=0,076 <sup>+</sup>		p=0,047 <sup>+</sup>	
D	72,7. 10 <sup>7</sup>	58,7. 10 <sup>7</sup>	144,8. 10 <sup>7</sup>	111,5. 10 <sup>7</sup>
	p=0,023 <sup>+</sup>		p=0,004 <sup>++</sup>	

Vysvetlivky: d. s. – dátum spotreby

V klasických jogurtoch bez uvedenej probiotickej kultúry sme dospeli k týmto výsledkom: V 1 ml jogurtu A na MRS médiu sme zaznamenali priemerný počet mliečnych baktérií pred expiráciou 121,5. 10<sup>7</sup> KJT a po expirácii sa ich počet znížil na 67. 10<sup>7</sup> KJT. Počet mliečnych baktérií na Lee's médiu v jogurte A dosiahol hodnotu pred expiráciou 153,3. 10<sup>7</sup> KJT a po expirácii 125,3. 10<sup>7</sup> KJT. Priemerné hodnoty počtov mliečnych baktérií na MRS médiu v jogurte B predstavovali pred expiráciou 101,1. 10<sup>7</sup> KJT a po expirácii 82. 10<sup>7</sup> KJT. Počet týchto baktérií na Lee's médiu bol pred expiráciou 149,4. 10<sup>7</sup> KJT a po expirácii 117,1. 10<sup>7</sup> KJT.

V probiotických jogurtoch sme zistili nasledovné výsledky: Priemerný počet mliečnych baktérií v 1 ml jogurtu C na MRS médiu bol pred expiráciou 123.10<sup>7</sup> KJT a po expirácii 115,1.10<sup>7</sup> KJT. Počet týchto baktérií v 1ml vzorky na Lee's médiu bol pred expiráciou 168,8.10<sup>7</sup> KJT a po expirácii 132,7.10<sup>7</sup> KJT. Priemerný počet mliečnych baktérií v 1 ml jogurtu D na MRS agare dosiahol hodnotu pred expiráciou 72,7.10<sup>7</sup> KJT a po expirácii 58,7.10<sup>7</sup> KJT. Počet mliečnych baktérií v 1 ml vzorky na Lee's médiu bol pred expiráciou 144,8.10<sup>7</sup> KJT a po expirácii 111,5.10<sup>7</sup> KJT.

Zistili sme štatisticky významný rozdiel v počte KTJ.ml<sup>-1</sup> pred a po expirácii vo všetkých študovaných druhoch jogurtov (tab. 1).

V našej práci sme porovnávali aj počty baktérií medzi jogurtami s probiotickou kultúrou a bez obsahu

reagenciu podľa metodiky výrobcu anaerostatu (MERCK). Anaerostat sme uložili do termostatu (TCH 100) s udržiavanou teplotou 37 °C na 72 hodín.

Po inkubácii sme počítali vyvinuté kolónie za predpokladu, že každá kolónia zodpovedá jednej bunke, z ktorej vyrástla. Počet mikroorganizmov sme potom prepočítali na 1 ml pôvodnej suspenzie jogurtu.

Na štatistické vyhodnotenie získaných údajov sme použili aritmetický priemer, smerodajnú odchýlku a t-test.

probiotickej kultúry u dvoch výrobcov a zistili sme taktiež významné rozdiely v ich počte u oboch skupín na MRS agare, na Lee's médiu rozdiely neboli štatisticky preukazné (tab. 2).

Čo sa týka počtov skúmaných mikroorganizmov na dvoch rôznych agaroch, boli zistené nasledovné štatisticky preukazné rozdiely: u všetkých štyroch druhov jogurtov pred dátumom spotreby a u troch zo štyroch aj po dátume spotreby. Pritom vo všetkých siedmich prípadoch išlo o významne vyššie počty KJT na Lee's agare (tab. 3).

Čo sa týka rozdielov v počte KJT vykultivovaných na dvoch spomínaných agaroch (s vyšším počtom na Lee's agare), vysvetľujeme to tým, že pokiaľ Lee's agar je určený na kultiváciu *Streptococcus thermophilus* a *Lactobacillus bulgaricus*, MRS agar je popisovaný väčšinou ako živné médium pre baktérie rodu *Lactobacillus* – i keď niekde sa uvádza len všeobecne ako pôda pre mliečne baktérie a pri mikroskopickom pozorovaní sme okrem laktobacilov zistili prítomné aj streptokoky. No zrejme nerastú na MRS agare v takom počte ako na Lee's médiu.

**Tabuľka 2** Porovnanie počtu mliečnych baktérií (KTJ.ml<sup>-1</sup>) v jogurtoch od rôznych výrobcov

	jogurty bez obsahu prob. kultúr		probiotické jogurty	
	A	B	C	D
MRS pred d. s.	121,5. 10 <sup>7</sup>	101,1. 10 <sup>7</sup>	123,0. 10 <sup>7</sup>	72,7. 10 <sup>7</sup>
	p=0,022 <sup>+</sup>		p=0,000 <sup>++</sup>	
MRS po d. s.	67,0. 10 <sup>7</sup>	82,0. 10 <sup>7</sup>	115,1. 10 <sup>7</sup>	58,7. 10 <sup>7</sup>
	p=0,019 <sup>+</sup>		p=0,000 <sup>++</sup>	
Lee's pred d. s.	153,3. 10 <sup>7</sup>	149,4. 10 <sup>7</sup>	168,8. 10 <sup>7</sup>	144,8. 10 <sup>7</sup>
	p=0,762		p=0,155	
Lee's po d. s.	125,3. 10 <sup>7</sup>	117,1. 10 <sup>7</sup>	132,7. 10 <sup>7</sup>	111,5. 10 <sup>7</sup>
	p=0,545		p=0,077	

Vysvetlivky: d. s. – dátum spotreby

**Tabuľka 3** Porovnanie počtu mliečnych baktérií (KTJ.ml<sup>-1</sup>) kultivovaných na dvoch rôznych médiách

jogurt	MRS pred d. s.	Lee's pred d. s.	MRS po d. s.	Lee's po d. s.
A	121,5. 10 <sup>7</sup>	153,3. 10 <sup>7</sup>	67,0. 10 <sup>7</sup>	125,3. 10 <sup>7</sup>
	p=0,014 <sup>+</sup>		p=0,000 <sup>++</sup>	
B	101,1. 10 <sup>7</sup>	149,4. 10 <sup>7</sup>	82,0. 10 <sup>7</sup>	117,1. 10 <sup>7</sup>
	p=0,000 <sup>++</sup>		p=0,006 <sup>++</sup>	
C	123,0. 10 <sup>7</sup>	168,8. 10 <sup>7</sup>	115,1. 10 <sup>7</sup>	132,7. 10 <sup>7</sup>
	p=0,005 <sup>++</sup>		p=0,098	
D	72,7. 10 <sup>7</sup>	144,8. 10 <sup>7</sup>	58,7. 10 <sup>7</sup>	111,5. 10 <sup>7</sup>
	p=0,000 <sup>++</sup>		p=0,000 <sup>++</sup>	

Vysvetlivky: d. s. – dátum spotreby

**Golian (1998)** o probiotických mikroorganizmoch uvádza, že pre zdravotný prínos je nevyhnutné, aby vo finálnom výrobku na konci skladovacej doby bol celkový počet buniek minimálne  $10^6$  v 1 ml.

Z dostupnej literatúry vyplýva, že počty ušľachtilých mikroorganizmov počas skladovania jogurtov sa buď len mierne zvyšujú, alebo naopak môže dochádzať k ich poklesu. Životaschopnosť baktérií v kyslom prostredí pri nízkych teplotách závisí na druhu baktérie a pre daný druh sa líši kmeň od kmeňa. Rozdielne výsledky počtov mliečnych baktérií závisia od typu kultúry, tiež od prítomnosti látok v mlieku alebo smotane, ktoré inhibujú rast kultúr. Rozdiely u výrobcov môžu byť spôsobené aj použitím inej technológie výroby. Pri stanovovaní baktérií rodu *Lactobacillus* zohráva dôležitú úlohu aj živné médium použité k ich stanoveniu.

Zmeny v počtoch ušľachtilých mikroorganizmov v troch kyslomliečnych výrobkoch testoval aj **Drbohlav (2000)**. V prvom type výrobku, ktorý obsahoval jogurtovú kultúru a bifidobaktérie po 8 dňoch skladovania pri 8°C zaznamenal mierny pokles počtu živých mikroorganizmov v 1 grame (z  $8,2 \cdot 10^7$  na  $7,6 \cdot 10^7$ ). Podobne za rovnakých podmienok skladovania zistil pokles živých mikroorganizmov aj vo výrobkoch, ktoré obsahovali jogurtovú kultúru a *Streptococcus faecium*.

**Jamrichová (1998)** na základe výsledkov svojich experimentálnych prác odporúča pre stanovenie laktobacilov jogurtovej kultúry MRS médium.

Skúmaním počtu mliečnych baktérií v jogurtoch sa venoval aj **Zahoor et. al. (2003)**. Pre svoj výskum použil MRS agar. Prvú vzorku jogurtu analyzoval hneď po zakúpení a analýzu robil potom vždy po 15 dňoch. Výsledky, ktoré zistil uvádzame v tabuľke 4. Tiež potvrdil teóriu, že počet mliečnych baktérií v jogurte v závislosti od času klesá. Ale tento skúmaný jogurt by nevyhovoval požiadavke Potravinového kódexu, podľa ktorého by malo byť v jogurte najmenej  $10^7$  mliečnych baktérií.

Podľa **Kačániovej et al. (2010)** sa životaschopnosť bifidobaktérií rýchlo stráca aj v probio jogurtoch. Uvádza to v príspevku, kde sledovali počet bifidobaktérií v probiotických tyčinkách. V nich sa podľa výsledkov po 7 dňoch uskladnenia pri teplote 4°C počet živých bifidobaktérií zníži o 2 rády. Po 14 dňoch skladovania aj pri nízkych teplotách živé baktérie sa tam vyskytujú už len v zanedbateľnom počte. My sme ale vo svojom výskume nezistili pokles baktérií až o 2 rády. Možno je to preto, lebo v jogurtoch sú vhodnejšie podmienky pre baktérie, na rozdiel od podmienok v probiotických tyčinkách.

Počet mliečnych baktérií v jogurtoch zisťovali aj **Páleníková (2009)** a **Asztalos (2009)**. Páleníková zisťovala počet mliečnych baktérií v probiotických jogurtoch (probio a activia) a Asztalos v jogurtoch bez pridania špeciálnych probiotických kultúr (dva druhy smotanových jogurtov). Pri kultivácii použili také isté živné pôdy ako sme použili aj my (MRS agar a Lee's agar). Sledovali zmeny počtu mliečnych baktérií pred a po expirácii jogurtu. Podobne zistili významné rozdiely v počte mliečnych baktérií medzi skúmanými druhmi jogurtov, v dobe po výrobe a po dobe spotreby a tiež rozdiely na živných médiách (MRS a Lee's agar).

Počty mliečnych baktérií vo všetkých jogurtoch aj napriek významným rozdielom medzi jednotlivými druhmi

jogurtov spĺňali podmienky pre kyslomliečne výrobky podľa **Potravinového kódexu SR (2010)**.

Pokles počtu mliečnych baktérií počas doby spotreby súvisí zrejme s ich postupným odumieraním vplyvom zmeny prostredia. Na zmenu počtu ušľachtilých mikroorganizmov v priebehu skladovania kyslomliečnych výrobkov poukazuje aj **Drbohlav (2000)**. Hodnotením mikrobiologickej kvality jogurtov sa zaoberala aj **Bobková et al. (2008)**, ktorá zisťovala prítomnosť nežiaducich mikroorganizmov a na základe jej zistení tieto jogurty spĺňali požiadavky predpísané legislatívou.

**Tabuľka 4** Počet mliečnych baktérií v jogurte v závislosti od času (**Zahoor, 2003**)

deň výskumu	0	15	30	45	60
Počet ml. baktérií v 1 ml vzorky jogurtu	$9,9 \cdot 10^6$	$9,6 \cdot 10^6$	$4,9 \cdot 10^6$	$4,2 \cdot 10^6$	$3,5 \cdot 10^6$

**Tabuľka 5** Nadbytok živých charakteristických mikroorganizmov v kyslomliečnych výrobkoch podľa Potravinového kódexu SR, III. časť, 6. hl., výnos MPSR a MZSR 2143/2006-100 (2010).

Kyslomliečne výrobky	Mikroorganizmy podľa odseku 1 až 7 (KTJ. g <sup>-1</sup> , spolu)	Mikroorganizmy uvedené v názve alebo označení (KTJ. g <sup>-1</sup> , spolu)	Kvasinky KTJ.g <sup>-1</sup>
Fermentované mlieko	$10^7$	$10^6$	
Jogurt, jogurt s náhradnou (alternatívnou) kultúrou a acidofilné mlieko	$10^7$	$10^6$	
Kefír	$10^7$		$10^4$
Kefírové mlieko	$10^7$		$10^2$

## ZÁVER

Na vzorke 80 jogurtov od 2 slovenských výrobcov sme zistili v čase pred dátumom spotreby od  $78 \cdot 10^7$  do  $169 \cdot 10^7$  KTJ a v čase po dátume spotreby od  $59 \cdot 10^7$  do  $133 \cdot 10^7$  KTJ mliečnych baktérií v 1 ml. Na základe týchto výsledkov sme dospeli k záveru, že všetky jogurty splnili požiadavky Potravinového kódexu SR, a to nie len pred ale aj po dátume spotreby. I napriek tomu odporúčame dodržiavať konzumáciu do dátumu spotreby z dôvodu možnej kontaminácie inými nežiaducimi mikroorganizmami.

## LITERATÚRA

ASZTALOS, C. 2009. Výskyt mliečnych baktérií v jogurtoch a ich význam vo výžive. Diplomová práca. Nitra: UKF, 2009, 64 p.

AXELSON, L. 1998. Lactic acid bacteria: classification and physiology. In: *Salminen S, Von Wright A (eds) Lactic acid bacteria: microbiology and functional aspects*. Marcel Dekker, New York, 1998, p. 1–71.

BOBKOVÁ, A., ZELENÁKOVÁ, L., LOPAŠOVSKÝ, L., PAVELKOVÁ, A., ŽIDEK, R., BOBKO, M. 2008. Hodnotenie mikrobiologickej kvality smotanových jogurtov. In *Bezpečnosť a kontrola potravín. Zborník prác*

- z medzinárodnej vedeckej konferencie, Nitra : SPU, 2008, p. 33-38, ISBN 978-80-552-0027-9.
- CORRAL, J. M., BAÑUELOS, O., ADRIO, J. L., VELASCO, J. 2006. Cloning and characterization of a  $\beta$ -galactosidase encoding region in *Lactobacillus coryniformis* CECT 5711. In *Applied Microbiology and Biotechnology*. vol. 73, 2006, no. 3, p. 640-646.
- ČAPLA, J., ZAJÁC, P., VIETORIS, V., BAJZÍK, P. 2010. New methodologies for biofilms control in food industry. In *Potravinárstvo*, vol. 4, 2010, no. 3, p. 10-13, ISSN 1338-0230.
- DRÁBEKOVÁ, J., LENGYELOVÁ, L. 2004. Jogurt ako súčasť zdravej výživy. In *Zborník z vedecko-metodickej konferencie Výchova k zdraviu a zdravému životnému štýlu*. FPV UKF Nitra, 2004, Edícia Prírodovedec č.143, ISBN 80-8050-739-2, p. 65-70.
- DRBOHLAV, J. 2000. Mikroflora s dieteticko-ochrannými vlastnosťami v mliečnych výrobkoch. In *Zpravodaj – mlékařské listy*, 2000, p. 16-18.
- FULLER, R. 1989. Probiotics in man and animals. In *J Appl Bacteriol*, vol. 66, 1989, no. 5, p. 365-378.
- GOLIAN, J. 2010. *Ochorenia z potravín*. Nitra: Slovenská poľnohospodárska univerzita, 1998, 123 p., ISBN 80-7123-519-5.
- GUEQUIM-KANA, E.B., OLOKE, J.K., LATEEF, A., ZEBAZE-KANA, M.G. 2007. Novel optimal temperature profile for acidification process of *Lactobacillus bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* in yoghurt fermentation using artificial neural network and genetic algorithm. In *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, vol. 34, 2007, no. 7, p. 491-496.
- HERIAN, K. 2001. Problematika zabezpečovania kvality výroby mliečnych výrobkov. In *Hygiena alimentorum XXII: Mlieko a mliečne výrobky na začiatku nového milénia. Zborník prednášok a posterov*. Košice : UVL 2001, p. 23-28.
- HORNÍK, A. 1996. *Špeciálna mikrobiológia*. Nitra: VŠP, 1996, 72 p., ISBN 80-7137-301-X.
- JAMRICOVÁ, S. 1998. Fermentované výrobky s probiotickými kultúrami - výživa, legislatíva, technológia. In *Mliekarstvo*, vol. 29, 1998, no. 2, p. 24-27.
- JOHNS, P., PEREIRA, S. L., LEONARD, A. E., MUKERJI, P., SHALWITZ, R. A., DOWLATI, L., PHILLIPS, R. R., BERGANA, M. S., HOLTON, J. D., DAS, T. 2007. Cytoprotective Agent in *Lactobacillus bulgaricus* Extracts. In *Current Microbiology*, vol. 54, no. 2, p. 131-135, ISSN 1432-0991.
- KAČÁNIOVÁ, M., ANGELOVIČOVÁ, M., NOVÁKOVÁ, I., POCHOP, J., LIPTAJOVÁ, D., KLIMENT, M., KUNOVÁ, S. 2010. Prežiteľnosť baktérií v probiotických tyčinkách. In *Potravinárstvo*, vol. 4, no. 2, p. 402-409, ISSN 1337-0960.
- LEE, Y. K., SALMINEN, S. 1995. The coming of age probiotics. In *Trends in Food Science & Technology*, vol. 6, 1995, no. 7, p. 241 - 244.
- LOPAŠOVSKÝ, L., KUŠNIEROVÁ, M., BAŠNÁKOVÁ, M., ZELENÁKOVÁ, L., BOBKOVÁ, A., ANGELOVIČOVÁ, M., KOZELOVÁ, D. 2009. Porovnanie screeningovej metódy 3M™ Petrifilm™ a klasickej platňovej metódy pri mikrobiologickom vyšetrení zmrzlín. In *Zoonózy - spoločná ochrana zdravia ľudí a zdravia zvierat [elektronický dokument] : zborník prác z 2. vedeckého kongresu, Bratislava, 27.-29.10.2009*. Bratislava : MP SR, p. 80.
- NEU, J., CAICEDO, R. 2005. Probiotics: Protecting the intestinal ecosystem? In *J Pediatr*. vol. 147, 2005, no. 2, p. 143-146.
- O'SULLIVAN, D. J. 2001. Screening of intestinal microflora for effective probiotic bacteria. In *J Agric Food Chem.*, vol. 49, 2001, no. 4, p. 1751-1760.
- PÁLENÍKOVÁ, D. 2009. Zisťovanie počtu mliečnych baktérií v probiotických jogurtoch. Diplomová práca. Nitra: UKF, 2009, 60 p.
- PETROF, E. O., KOJIMA, K., ROPELESKI, M. J., MUSCH, M. W., TAO, Y., DE SIMONE, C., CHANG, E. B. 2004. Probiotics inhibit nuclear factor- $\kappa$ B and induce heat shock proteins in colonic epithelial cells through proteasome inhibition. In *Gastroenterology*. vol. 127, 2004, no. 5, p. 1474-1487.
- POTRAVINOVÝ KÓDEX SLOVENSKEJ REPUBLIKY. 2010. Výnos Ministerstva pôdohospodárstva Slovenskej republiky a Ministerstva zdravotníctva Slovenskej republiky zo 14. augusta 2006 č. 2143/2006-100, ktorým sa vydáva hlava Potravinového kódexu Slovenskej republiky upravujúca mlieko a výrobky z mlieka.
- SALUSTIANO, V. C., ANDRADE, N., BRANDA, O. 2004. Microbiological Aspects of milk processing plant. In *Journal of Food Safety*, vol. 24, 2004, no. 3, p. 160-166.
- SAXELIN, M., TYNKKYNEN, S., MATTILA-SANDHOLM, T., DE VOS, W. M. 2005. Probiotic and other functional microbes: From markets to mechanisms. In *Curr Opin Biotechnol*, vol. 16, 2005, no. 2, p. 204-211.
- ZAHOOR, T., RAHMAN, S.U., FAROOQ, U. 2003. Viability of *Lactobacillus bulgaricus* as Yoghurt Culture Under Different Preservation Methods. In *International Journal of Agriculture and Biolog*, vol. 5, 2003, no. 1, p. 46-48.
- ZAJÁC, P., ČAPLA, J. 2010. Prehľad výskytu rezíduí inhibičných látok v surovom kravskom mlieku v Slovenskej republike za roky 2001 až 2009. In: *Bezpečnosť a kontrola potravín : Zborník prác z medzinárodnej vedeckej konferencie, Nitra, 24.- 25. marec 2010*. Nitra : SPU, p. 199-200. ISBN 978-80-552-0350-8.
- ZAJÁC, P., GOLIAN, J., NOVÁKOVÁ, R. 2007. Vplyv zvýšeného počtu somatických buniek na zdravotnú neškodnosť surového kravského mlieka. In *Potravinárstvo*, vol. 1, no. 1, p. 10-15, ISSN 1337-0960,
- ZELENÁKOVÁ, L., GOLIAN, J. 2008. *Aplikácia ELISA testov na detekciu falšovania mlieka a syrov*. Nitra : SPU, 2008, 98 p., ISBN 978-80-552-0075-0.
- ZELENÁKOVÁ, L., GOLIAN, J., ZAJÁC, P. 2008. Application of ELISA tests for the detection of goat milk in shep milk. In *Milchwissenschaft*. vol. 63, 2008, no. 2, p. 137-141, ISSN 0026-3788.

**Acknowledgments:**

This article was the project: CGA I-07-301-01 (Importance Lactid Acid Bacteria and their integration into the educational process).



**Contact address:**

Libuša Lengyelová, Department of Botany and Genetics,  
Faculty of Natural Sciences Constantine the Philosopher  
University in Nitra, Nábřežie mládeže 91, 949 74 Nitra  
Slovakia, E-mail: llengyelova@ukf.sk

Dagmar Kozelová, Department of Hygiene and Food  
Safety, Faculty of Biotechnology and Food Science,  
Slovak University of Agriculture, E-mail:  
dagmar.kozelova@uniag.sk

Ludmila Trstenovičová, Elementary and infant school,  
Uľany nad Žitavou, Hlavná 199,  
941 03 Uľany nad Žitavou; Slovakia, E-mail:  
trstenovicova@gmail.com

Silvia Pintérová, Elementary and infant school, Veľký  
Kýr, Školská 7, 941 07 Veľký Kýr; Slovakia, E-mail:  
spinterova@azet.sk

## QUALITY OF BROILER'S PRODUCTION ON THE FARM IN THE APPLICATION OF WELFARE

Ján Medved', Mária Angelovičová

### ABSTRACT

Two experiments were carried out in practical conditions on the farm for fattening of chickens. In the hall with deep litter, which were carried out experiments, was installations with breeding technology of Big Dutchman with automatic feeding, watering, automatically set to light and temperature regimes. During both experiments were observed recommended microclimate conditions and the length of light and ventilation in the hall. The concentration of broilers per one square meter was 27.22, respectively. 29.34 kg. Their vitality was 94.2 and 95.6%. The average body weight of chickens at the end of the experiment (day 42) were 1986.65 and 2074.29 g, with a statistically proved differences between experiments ( $P < 0.01$ ). The average carcass weight of broilers in the live weight 1800.0 g were 1384.67 and 1407.0 g, while the difference was not statistically proved ( $P > 0.05$ ).

**Keywords:** broiler, breeding condition, viability, production, carcass

### ÚVOD

Výroba hydinového mäsa je vo formujúcom sa trhovom prostredí relatívne stabilným odvetvím. Uvedenú skutočnosť dokumentujú niekoľkoročné vyrovnané trhové a cenové trendy, prijateľná cena a trvalý záujem spotrebiteľov o hydinové mäso. Modely budúcnosti produkčných systémov chovu hospodárskych zvierat, vrátane výkrmových kurčiat, sú založené na uplatňovaní predovšetkým požiadaviek globalizácie trhu a kvality produktov, predovšetkým potravín. Orientácia šľachtenia pre tieto atribúty musí využívať vývoj a poznanie v oblasti biológie, biotechnológií, výživy pri rôznych chovateľských technológiách, welfare a etiky chovu zvierat, politiky, ekonomiky, legislatívy a požiadaviek spoločnosti (Bulla et al., 2006). Postupy vo výžive výkrmových kurčiat priamo závisia od dostupných surovín ich ceny a kvality z hľadiska zabezpečovania nutričných látok. Sú známe poznatky, že fyzikálne vlastnosti krmív a ich štruktúra majú vplyv na príjem krmiva a nutričnú hodnotu. Charakter krmiva, ako múčka, granuly alebo celozrnná krmná zmes o rôznych veľkostiach častíc ovplyvňuje úžitkovosť zvierat (Reddy, 1999; Ziggers, 1999; Halarampu, 2000; Medel et al., 1999; Wiseman, 2000). Vysoký stupeň intenzifikácie výkrmu kurčiat je však v centre záujmu spoločnosti pre ochranu zvierat z hľadiska zabezpečenia welfare kurčiat počas výkrmu. Prehustenie chovných objektov môže zapríčiniť problémy kurčiat s pohybovou sústavou, nedostatočný vývin vnútorných orgánov a zníženie rastovej schopnosti (Van der Sluis, 2005). Pri hodnotení zdravotného stavu výkrmových kurčiat v závislosti od veľkosti chovnej plochy bolo zistené, že prsné otlaky sa u nich vyskytli vo veku 35 a 42 dní, ktoré so zvyšujúcou sa plochou klietky mali zostupnú tendenciu (Chmelničná a Solčianska, 2007). Kontrola podmienok prostredia, najmä teploty, vlhkosti, kvality vzduchu a podstielky je kľúčovým faktorom welfare výkrmových kurčiat. To neznamená, že hustota obsadenia nie je dôležitá, ale znižovanie hustoty obsadenia bez úpravy podmienok prostredia nie je dostačujúce (Jones et al., 2005). Rozdiely v podmienkach prostredia pre kurčatá majú väčší dopad na welfare ako samotná hustota obsadenia (Dawkins et al., 2004).

Cieľom práce bolo sledovanie a hodnotenie produkcie výkrmových kurčiat na farme pri uplatňovaní princípov welfare a kvality jatočného tela v laboratórnych podmienkach.

### MATERIÁL A METÓDY

Boli vykonané dva experimenty s finálnym výkrmovým typom kurčiat Ross 308 na hydinarskej farme zameranej na produkciu kurčacieho mäsa. V hale určenej pre výkrm 24 tisíc kurčiat bola hlboká podstielka, ktorú tvorila pomiaganá pšeničná slama. Hrúbka vrstvy podstielky meraná na 20 rozličných miestach bola 14,0-15,5 cm. Koncentrácia kurčiat na jednotku plochy bola 27,22 kg.m<sup>2</sup> a 29,34 27,22 kg.m<sup>2</sup>. Chovná technológia bola Big dutchman, ktorú tvorili krmná a napájacia technológia, automatický systém teplotného a svetelného režimu nastavený podľa odporúčaných hodnôt pre tento finálny výkrmový typ kurčiat. Vetrací systém bol umiestnený na strope, ktorý bol nastavený na automatické zapínanie a vypínanie podľa teploty v hale, prašnosti, vlhkosti a koncentrácie plynov v pravidelných časových intervaloch. Kurčatá boli kŕmené komerčne vyrábanymi kŕmivými zmesami HYD – 01 od 1. do 15. dňa veku kurčiat (štartérová fáza), HYD – 02 od 16. do 35. dňa veku kurčiat (rastová fáza) a HYD – 03 od 36. do 42. dňa veku kurčiat (finálna fáza). Obsah živín a metabolizovateľnej energie bol vybilancovaný v súlade s požiadavkami týchto kurčiat. Prístup ku krmivu a vode bol neobmedzený. Kurčatá a jatočné telo boli vážené na váhach typu Kern ECB 20K20. Pre sledovanie produkcie bolo náhodne vybraných 500 ks výkrmových kurčiat a hmotnosti jatočne opracovaného tela po 12 ks o živej hmotnosti 1800,0 g v každom experimente. Výsledky boli spracované v systémovom programe SAS, verzia 8.2.

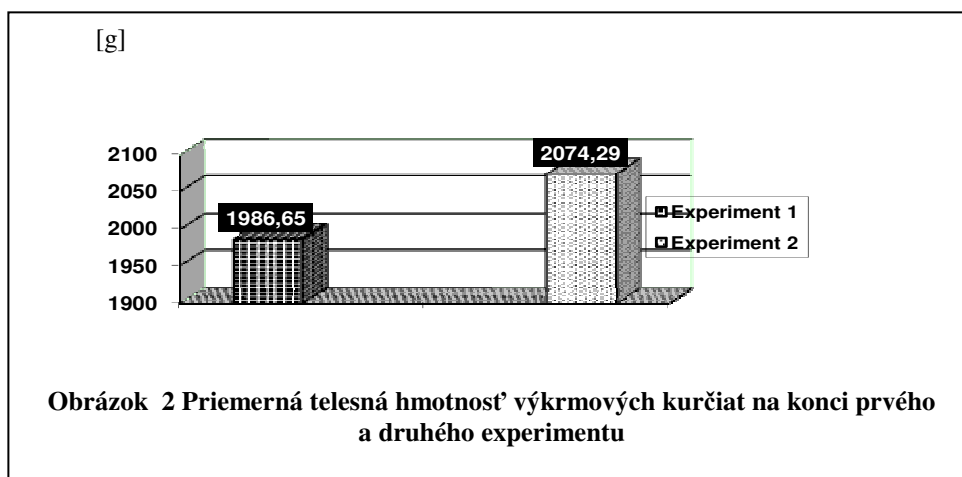
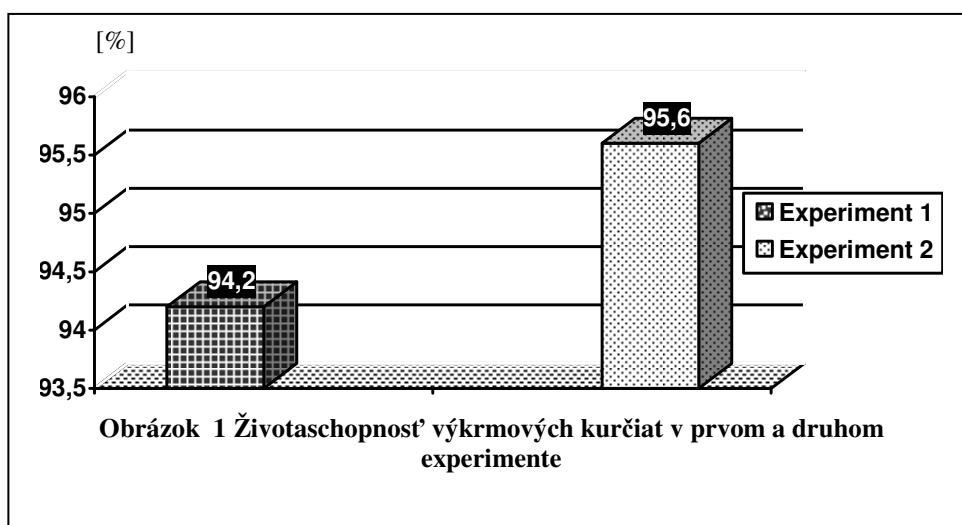
### VÝSLEDKY

#### Životaschopnosť výkrmových kurčiat

V každom experimente bolo v hale na hlbokaj podstielke na začiatku 24000 ks jednodňových kurčiat. Dennou kontrolou sa zaznamenal úhyn výkrmových kurčiat počas prvého experimentu 1392 ks, t. j. 5,80 %. Počas druhého experimentu uhynulo 1056 ks výkrmových kurčiat, t. j. 4,40 %. Na konci prvého experimentu bolo v hale 22608

ks výkrmových kurčiat a na konci druhého experimentu 22944 ks výkrmových kurčiat. Na základe výsledkov výpočtu sme zistili 94,2 % životaschopnosť výkrmových

kurčiat v prvom experimente a 95,6 % životaschopnosť výkrmových kurčiat v druhom experimente.

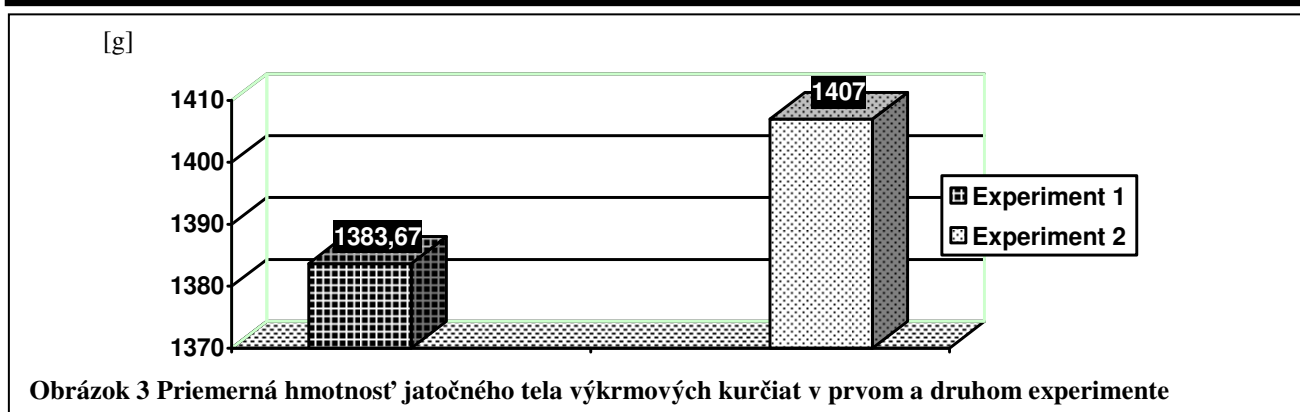


Tabuľka 1 Matematicko-štatistické vyhodnotenie telesnej hmotnosti výkrmových kurčiat na konci prvého a druhého experimentu

Experiment	n	Minimálna hodnota [g]	Maximálna hodnota [g]	s [g]	$v_k$ [%]	t-test $P_{0,01}$
1	500	1519,00	2683,00	290,08	14,60	
2	500	1214,00	2800,00	387,55	18,68	2,85 <sup>++</sup>

Aj napriek tomu, že telesná hmotnosť jednodňových kurčiat v druhom experimente bola štatisticky preukazne nižšia ( $P < 0,01$ ) 37,5 g v porovnaní s telesnou hmotnosťou jednodňových kurčiat v prvom experimente 39,0 g, na konci výkrmového obdobia sa v druhom experimente telesná hmotnosť týchto výkrmových kurčiat štatisticky preukazne zvýšila ( $P < 0,01$ ) na 2074,29 g oproti telesnej hmotnosti výkrmových kurčiat prvého experimentu 1986,65 g. V druhom experimente sa zaznamenala najvyššia telesná hmotnosť kurčiat 2800,0 g oproti

najvyššej telesnej hmotnosti kurčiat v prvom experimente 2683,0 g. Najnižšia telesná hmotnosť kurčiat bola 1214,0 g v druhom experimente a 1519,0 g v prvom experimente. Väčšie kolísanie hodnôt telesnej hmotnosti výkrmových kurčiat bolo na konci druhého experimentu v porovnaní s telesnou hmotnosťou výkrmových kurčiat prvého experimentu (výsledky druhého experimentu  $s = 387,55$  g a  $v_k = 18,68$  % oproti výsledkom prvého experimentu  $s = 290,08$  g a  $v_k = 14,60$  %).



Tabuľka 2 Matematicko-štatistické vyhodnotenie hmotnosti jatočného tela výkrmových kurčiat v prvom a druhom experimente

Experiment	n	Živá hmotnosť [g]	Minimálna hodnota [g]	Maximálna hodnota [g]	s [g]	$v_k$ [%]	t-test $P_{0,05}$
1	12	1800,0	1265,0	1480,0	77,84	5,63	
2	12	1800,0	1280,0	1505,0	83,06	5,90	0,71

Na technologickú rozrábku boli vybrané kurčatá o živej hmotnosti 1800,0 g v prvom aj druhom experimente. Priemerná hmotnosť jatočne opracovaného tela výkrmových kurčiat v prvom experimente bola 1383,67 g, čo je o 23,33 g nižšia, štatisticky nepreukazne ( $P > 0,05$ ) v porovnaní s hmotnosťou jatočne opracovaného tela výkrmových kurčiat v druhom experimente. Minimálna hmotnosť jatočne opracovaného tela kurčiat vážiacich 1800,0 g bola 1265,0 (prvý experiment), resp. 1280,0 g (druhý experiment) a maximálna hmotnosť 1480,0 g (prvý experiment), resp. 1505,0 g (druhý experiment). Väčšie kolísanie hodnôt hmotnosti jatočne opracovaného tela výkrmových kurčiat bolo v druhom experimente (výsledky druhého experimentu  $s = 83,06$  g a  $v_k = 5,90$  % oproti výsledkom prvého experimentu  $s = 77,84$  g a  $v_k = 5,63$  %).

## DISKUSIA

Chov hydiny sa uskutočňuje na samostatných špecializovaných veľkokapacitných farmách odchovu, chovu a výkrmu s koncentráciou niekoľko tisíc kusov (Angelovičová et al., 2005). Podobnou problematikou sme sa zaoberali aj v predložennom článku. Špecifickým cieľom opatrenia pre zlepšenie životných podmienok vo výkrme brojlerov je znížiť zaťaženosť podlahovej plochy na hlbokoj podstielke pod 30 kg telesnej hmotnosti zvierat na  $m^2$  a tak zlepšiť hygienické podmienky (Debreceni a Juhás, 2007). Tým, že výkrm kurčiat bol uskutočnený na hlbokoj podstielke, ako stelivový materiál bola použitá pšeničná slama, ktorá bola mechanicky upravená miaganím. V hale bola použitá chovná technológia Big dutchman. Boli dodržané odporúčané klimatické podmienky a svetelný režim pre finálny výkrmový typ kurčiat Ross 308. Rovnako bol dodržaný systém výživy s neobmedzeným prístupom kurčiat ku krmivu a vode. Koncentrácia výkrmových kurčiat pri zohľadnení živej hmotnosti na konci experimentu bola v našich experimentoch 27,22, resp. 29,34  $kg \cdot m^{-2}$ . Thomas et al. (2004) experimentovali s piatimi rozdielnymi

hustotami obsadenia vo výkrme kurčiat a zistili, že kurčatá pri nižších hustotách obsadenia rástli rýchlejšie. Podľa autorov nemala hustota obsadenia žiadny vplyv na spotrebu krmiva, mortalitu a jatočné ukazovatele. Výkrmové kurčatá počas 7 až 8 týždňov výkrmu dosiahnu priemernú telesnú hmotnosť 1,6 až 1,8 kg (Para et al., 2004) alebo za 36 dní 2,14 až 2,17 kg (Angelovičová et al., 2005). Počet odborníkov, ktorí skúmali produkciu výkrmových kurčiat v zmysle welfare za 42 dní výkrmu je mnoho. Výsledky, ktoré dosiahli sú približne rovnaké a pohybujú sa v rozmedzí 2,0 až 2,2 kg. Rovnako aj konverzia krmiva je pod 2,0 (na 1 kg prírastku telesnej hmotnosti) (Rutkowski et al., 2000; Świerczewska et al., 2000; Osek et al., 2001; Pawlak et al., 2005). Za 42 dní nášho experimentu finálny výkrmový typ kurčiat Ross 308 vážil 1,99, resp. 2,07 kg. Simeonová a Ingr (2000) uskutočnili pokus s výkrmom brojlerových kurčiat typu AVIAN 34. Skúmali u nich vplyv dĺžky výkrmu na telesnú hmotnosť a jatočnú výťažnosť a výťažnosť jatočných častí. Pri dĺžke výkrmu 42 dní (spolu slipečky a kohútiky) zistili priemernú hmotnosť jatočne opracovaného tela bez drobkov 1420,0 g. Podobnú hmotnosť jatočne opracovaného tela sme zaznamenali aj v našich experimentoch. Pri priemernej živej hmotnosti finálneho výkrmového typu kurčiat 1800,0 g bola zaznamenaná priemerná hmotnosť jatočne opracovaného tela v prvom experimente 1383,67 g a v druhom experimente 1407,0 g. Aj Baghaei et al. (2009) sledovali v štyroch skupinách u výkrmového typu kurčiat Ross 308 telesnú hmotnosť a hmotnosť jatočného tela. Za 42 dní kurčatá dosiahli v prvej skupine telesnú hmotnosť  $2468,0 \pm 43,59$  g a hmotnosť jatočného tela  $1590,0 \pm 78,15$  g, v druhej skupine kurčatá vážili  $2305,55 \pm 45,11$  g a jatočné telo  $1413,45 \pm 73,56$  g, v tretej skupine vážili  $2363,75 \pm 69,29$  g a jatočné telo  $1571,75 \pm 54,56$  g a vo štvrtej skupine  $2290,0 \pm 22,64$  g a jatočné telo  $1463,25 \pm 44,19$  g.

## ZÁVER

V experimentoch boli dosiahnuté výsledky, ktoré možno odporučiť pre ďalší rozvoj vedy a prax. Vo výskume problematiky chovu výkrmových kurčiat, ich produkcie je vhodné a potrebné riešiť úlohy v konkrétnych podmienkach chovu v kombinácii s laboratórnymi podmienkami. Pri uplatňovaní princípov welfare možno v praktických podmienkach na farme v hale s hlbokou podstielkou dosiahnuť životaschopnosť výkrmových kurčiat 94,2, resp. 95,6 % a telesnú hmotnosť za 42 dní výkrmu 1986,65, resp. 2074,29 g. Rozdiel hmotnosti výkrmových kurčiat medzi experimentmi bol štatisticky preukazný ( $P < 0,01$ ). Priemerná hmotnosť jatočného tela výkrmových kurčiat o živej hmotnosti 1800,0 g bola 1383,67 a 1407,0 g, pričom rozdiel nebol štatisticky preukazný ( $P > 0,05$ ).

## Acknowledgments:

This work was supported by grant project VEGA 1/0509/08

## LITERATÚRA

ANGELOVIČOVÁ, M., MELEN, M., ANGELOVIČ, M. 2005. Použitie jódovaného oleja vo výžive výkrmových kurčiat. In *6<sup>th</sup> Kabrtovy dietetické dny*. Brno : VFU, 2005, s. 74-82.

BAGHAEI, M., ASHAYERIZADEH, A., ESLAMI, M., BOJARPOUR, M., ROSHANFEKR, H., MIRZADEH, K. H. 2009. Betaine (Betafin®) Replacement for Methionine in Diet on Growth Performance and Carcass Characteristics of Broiler Chickens. In *Research J. of Biolog. Sci.*, vol. 4, 2009, no. 9, p. 1037-1040.

BULLA, J., CHRENEK, P., ANGELOVIČOVÁ, M., LADYKOVÁ, M., ČURLEJ, J. 2006. Biotechnology, food quality and farm animals welfare. In *Biotechnology 2006*. České Budějovice : JU, 2006, p. 137-138.

DAWKINS, M. S., DONNELLY, C. A., JONES, T. A. 2004. Chicken welfare is influenced more by housing conditions than by stocking density. In *Nature*, 2004, p. 342-344.

DEBRECÉNI, O., JUHÁS, P. 2007. Súčasný stav welfare hospodárskych zvierat v Slovenskej republike a programy jeho riešenia. In *Agri-Environment and Animal Welfare* [CD ROM], Nitra : SPU, 2007, s. 379-386. ISBN 978-80-8069-962-8.

HALARAMPU, S. G. 2000. Resistant starch: a review of the physical properties and biological impact of RS3. In *Carbohydrate Polymers*, 2000, č. 41, p. 285-292.

CHMELNIČNÁ, L., SOLČIANSKA, L. 2007. Rastová schopnosť kurčiat pri rozdielnej ploche kletky. In *Agri-Environment and Animal Welfare* [CD ROM], Nitra : SPU, 2007, s. 466-473. ISBN 978-80-8069-962-8.

JONES, T. A., DONNELLY, C. A., DAWKINS, M. S. 2005. Environmental and management factors affecting the welfare of chickens on commercial farms in the United Kingdom and Denmark stocked at five densities. In *Poult. Sci.*, vol. 84, 2005, p. 1155-1165.

MEDEL, P., SALADO, S., DE BLAS, J. C., MATEOS, G. G. 1999. Processed cereals in diets for early – weaned piglets. In *Anim. Feed Sci. and Technology*, 1999, no. 24, p. 145-156.

OSEK, M., JANOCHA, A., KLOCEK, B., WASIŁOWSKI, Z. 2001. Wpływ mieszanek zawierających różne tłuszcze na wskaźniki produkcyjne i jakość mięsa kurcząt rzeźnych. In *Rośliny Oleiste*, vol. 1, 2001, p. 153-163.

PARA, L., JURÍŠ, P., SABA, L., ONDRAŠOVIČOVÁ, O., ONDRAŠOVIČ, M. 2004. Hygiena v úžitkových chovoch hydiny. In *Slovenský veterinársky časopis*, 2004, no. 2, p. 28-30.

PAWLAK, A., GORNOWICZ, E., DZIADEK, K. 2005. Wpływ rodzaju białka w mieszankach paszowych na wskaźniki użytkowości i jakości mięsa kurcząt brojlerów. In *Rocz. Nauk. Zoot.*, vol. 32, 2005, p. 115-123.

REDDY, C. V. 1999. Improving the Nutritional quality of feed. In *Poultry International*, 1999, no. 3, p. 36-44.

RUTKOWSKI, A., FRĄTCZAK, M., WIĄZ, M. 2000. Zastosowanie preparatów enzymatycznych Avizyme 1 w dietach kukurydziano-rzepakowych i kukurydziano sojowych pozbawionych białka zwierzęcego w żywieniu kurcząt rzeźnych. In *Materiały Konferencyjne, Komisja Żywieniowa*. Rogów : KNZ PAN, 2000, 36 p.

SIMEONOVÁ, J., INGR, I. 2000. Výkrm kohoutků a slepiček do vyššího věku a hmotnosti ve vztahu k výtěžnosti masa a jatečních částí. In *Maso*, vol. 11, 2000, no. 5, p. 13-16.

ŚWIERCZEWSKA, E., NIEMIEC, J., MROCZEK, J., SIENICKA, A., GRZYBOWSKA, A., GROCHALSKA, D. 2000. Wpływ żywienia kurcząt mieszankami różniącymi się zawartością białka na wyniki produkcyjne, skład tkankowy i skład chemiczny mięsa. In *Zesz. Nauk. PTZ, Chów i Hodowla Drobni*, vol. 49, 2000, p. 365-375.

THOMAS, D. G., RAVINDRAN, V., THOMAS, D. V., CAMDEN, B. J., COTTAM, Y. H., MOREL, P. CH., COOK, C. J. 2004. Influence of stocking density on the performance, carcass characteristics and selected welfare indicators of broiler chickens. 2004. In *New Zealand Veterinary J.*, vol. 52, 2004, p. 76-81.

VAN DER SLUIS, W. 2005. EU farmers to upgrade broiler welfare standarts. In *World Poult.*, 2005, no. 7, p. 37.

WISEMAN, J. 2000. Correlation between physical measurements and dietary energy values of wheat for poultry and pigs. In *Anim. Feed Sci. and Technology*, 2000, no. 33, p. 1-11.

ZIGGERS, D. 1999. The importance of particle size in layer fed. In *Feed Technology*, 1999, no. 3, p. 14-20.

## 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, Tel.: +421/37/6415805, e-mail: maria.angelovicova@uniag.sk

Ing. Ján Medveď, Poultry farm Zámotie, Company Ltd., Predajná 976 63, Tel.: +421/048/619 2120, e-mail: jan.medved@zoznam.sk

## PROTEINS OF POTATOES IN RELATION TO THE CONTENT OF CADMIUM IN THEIR TUBERS

Janette Musilová, Judita Bystrická

### ABSTRACT

In the work the influence of cadmium in soil on the range of cumulating in tubers of potatoes and in proteins of potatoes grown under model conditions of pot trial experiment and under the real conditions of locality Imeľ in Danube Lowland was surveyed. Under conditions of pot trial the increased contents in tubers positively correlated with contents of cadmium applied into soil; the highest content of Cd was assessed in variety Junior (from 0.211 mg.kg<sup>-1</sup> FM in 1<sup>st</sup> variant to 0.715 mg.kg<sup>-1</sup> FM in 4<sup>th</sup> variant). The influence of increased content of Cd was manifested statistically significant in the content of proteins also in the content of Cd in protein fractions (1<sup>st</sup> var. 0.026 (Asterix) – 0.045 (Agria) mg.kg<sup>-1</sup> FM; 2<sup>nd</sup> var. 0.047 (Livera) – 0.085 (Asterix) mg.kg<sup>-1</sup> FM; 3<sup>rd</sup> var. 0.06 (Livera) – 0.117 (Junior) mg.kg<sup>-1</sup> FM; 4<sup>th</sup> var. 0.068 (Livera) – 0.142 (Asterix) mg.kg<sup>-1</sup> FM). Contents of Cd in potatoes from locality Imeľ did not exceed the value 0.1 mg.kg<sup>-1</sup> FM defined in Food Codex of the Slovak Republic. The average contents of proteins were in range from 1.19 % (Victoria) to 1.489 % (Adora), the average content of Cd cumulated in proteins was the highest in variety Vivaldi (1.317 µg.kg<sup>-1</sup> FM). Positive correlation was confirmed between the content of Cd in potato tubers and in proteins only in Livera variety.

**Keywords:** potatoe, cadmium, protein

### ÚVOD

Bielkoviny sa zaraďujú spolu s lipidmi a sacharidmi k hlavným živinám. Patria k najdôležitejším zložkám ľudskej výživy. V organizme sú po hydrolyze na aminokyseliny využívané na obnovu a výstavbu tkanív a tiež čiastočne ako zdroj energie (Velíšek, 2002). Sú nevyhnutnou zložkou potravy, pretože sú hlavným zdrojom dusíka, vrátane esenciálnych aminokyselín (Davídek et al., 1983).

Dusíkaté látky patria medzi najdôležitejšie komponenty zemiakovej hľuzy. Predstavujú zhruba 11,7 % jej energetického obsahu. Tvoria ich bielkoviny, aminokyseliny, amidy, rôzne bázy, anorganické zlúčeniny a pod. Najdôležitejšou zložkou dusíkatého komplexu je čistá bielkovina, ktorá je tvorená prevažne albumínmi a globulínmi. Bielkovina zemiakov je z biologického hľadiska jednou z najhodnotnejších bielkovín predovšetkým preto, že obsahuje nevyhnutné aminokyseliny. Podľa Bártu et al. (2000) kvalita bielkovín zemiakových hľúz dosahuje 70 – 85 % kvality vaječných bielkovín. Oproti ostatným hlavným rastlinným bielkovinám je zemiaková bielkovina významným zdrojom lyzínu. Je vhodná najmä pre ľudí s malou fyzickou záťažou. Súčasťou zemiakovej bielkoviny je i tuberín s vyšším obsahom leucínu (13 %). Obsah hrubého proteínu kolíše od 1,6 do 2,9 %. V sušine je to od 5,8 do

11,8 %. Z hodnoty hrubého proteínu tvoria čisté bielkoviny asi 50 – 70 % a obsah esenciálnych aminokyselín sa v bielkovine pohybuje okolo 40 % všetkých aminokyselín (Kourek et al., 1996). Z voľných aminokyselín bolo v zemiakoch identifikovaných 21. Amidickú zložku tvorí asparagín a glutamín. Obidva amidy majú veľký význam v metabolizme dusíka hľuzy (Šmálik, 1987).

Bielkoviny zemiakovej hľuzy obsahujú vysoké množstvá esenciálnych aminokyselín – lyzín, leucín, treonín, fenylalanín a valín (tabuľka 1). Ako limitujúce sú v bielkovinách hľúz uvádzané sírne aminokyseliny, najmä metionín. Potenciálne limitujúci je izoleucín. (Kapoor et al., 1975; Woolfe, 1987; Bárta, Čurn, 2004). Schulzová, Hajšlová (2007) uvádzajú ako hlavnú aminokyselinu zemiakov asparagín (približne 52 %). Táto aminokyselina je prekurzorom toxického akrylamidu, ktorý vzniká pri niektorých tepelných prípravách zemiakov (smaženie, pečenie). Zastúpenie asparagínu a ďalších voľných aminokyselín (Asp, Glu, Gln) a ich celkový obsah závisí v prvom rade na odrode, významný je i vplyv poveternostných podmienok (variabilita medzi jednotlivými rokmi, teplota, zrážky); rozdiel v obsahu voľných aminokyselín nie je v ekologicky a konvenčne pestovaných zemiakoch významný.

Tabuľka 1 Aminokyselinové zloženie bielkoviny zemiakovej hľuzy v % (USDA, 2009; Vreugdenhil et al., 2007)

aminokyselina	USDA	Vreugdenhil et al.	aminokyselina	USDA	Vreugdenhil et al.
Alanín	0,064	4,62 - 5,32	Lyzín	0,126	6,70 - 10,1
Arginín	0,095	4,74 - 5,70	Metionín	0,033	1,20 - 2,15
Kyselina asparágová	0,506	11,9 - 13,9	Fenylalanín	0,092	4,80 - 6,53
Cysteín	0,026* cystín	0,20 - 1,25	Prolín	0,074	4,70 - 4,83
Kyselina glutámová	0,347	10,2 - 11,8	Serín	0,090	4,90 - 5,92
Glycín	0,062	4,30 - 6,05	Treonín	0,075	4,60 - 6,50
Histidín	0,045	2,10 - 2,50	Tryptofán	0,032	0,30 - 1,85
Izoleucín	0,084	3,73 - 5,80	Tyrozín	0,077	4,50 - 5,68
Leucín	0,124	9,70 - 10,3	Valín	0,117	4,88 - 7,40



## MATERIÁL A METÓDY

Cieľom práce bolo posúdiť na základe kumulácie kadmia v zemiakových hľuzách jeho vplyv na tvorbu bielkovín a kumuláciu v bielkovinách zemiakov.

Porovnávali sme zemiaky dopestované v modelových podmienkach vegetačných nádobových pokusov (VNP) so stupňovanou metalickou záťažou pôdy kadmium so zemiakmi dopestovanými v prirodzených podmienkach nekontaminovaných pôd (Podunajská nížina, lokalita Imeľ – Stará zem).

Odrody zemiakov:

veľmi skoré: Junior (VNP), Adora, Vivaldi (Imeľ),

skoré: Livera (VNP, Imeľ), Courage (Imeľ),  
stredne skoré: Agria (VNP), Victoria (Imeľ),  
stredne neskoré – neskoré: Asterix (VNP).

Pôda:

Pôdu použitú vo VNP, odobratú z lokality Výčapy-Opatovce, možno charakterizovať ako stredne ťažkú, piesočnato-hlinitú, silno kyslú, so strednou zásobou humusu, veľmi nízkym obsahom P, dobrým obsahom K a Mg, relatívne čistú z hľadiska obsahu prístupných foriem rizikových prvkov (tabuľka 2).

**Tabuľka 2 Charakteristika zeminy použitej vo vegetačných nádobových pokusoch**

agrochemická charakteristika				obsah živín (mg.kg <sup>-1</sup> )			
pH/H <sub>2</sub> O	pH/KCl	C <sub>ox</sub> (%)	humus (%)	P	K	Ca	Mg
5,98	4,63	1,527	2,633	19,86	215,5	1459,5	265,0
obsah Cd (mg.kg <sup>-1</sup> ) v pôde stanovený v rôznych extrakčných činidlách							
Lúčavka kráľovská			HNO <sub>3</sub>		NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>		
0,9			0,22		0,027		
<i>Limitná hodnota *</i>			<i>Referenčná hodnota A<sub>1</sub>**</i>		<i>Kritická hodnota *</i>		
0,4			0,3		0,1		

Vysvetlivky: \*Zákon č. 220/2004 Z.z. Kritériá pre identifikáciu rizikových oblastí kontaminácie pôd a metodické postupy ich hodnotenia. \*\*Rozhodnutie MP SR o najvyšších prípustných hodnotách škodlivých látok v pôde a o určených organizáciách oprávnených zisťovať skutočné hodnoty týchto látok č. 531/1994-540.

Pozemok Stará zem, z ktorého boli odobraté vzorky z 30 odberných miest (obrázok 1), má rozlohu 62,5 ha a nachádza sa na katastrálnom území obce Imeľ, medzi tokmi riek Nitra a Žitava, v pôdno-ekologickej oblasti Podunajskej nížiny. Táto oblasť je charakteristická regionálnym znečistením ovzdušia bez veľkých a stredných emisných lokálnych zdrojov. Ku kontaminácii pôd dochádzalo najmä v období transformácie, keď boli aplikované vysoké dávky priemyselných hnojív a pesticídov (Musilová et al., 2006).

Bonitovaná pôdno-ekologická jednotka tohto pozemku je 0040001, pôdny typ: černozem čiernicová – karbonátová, pôdny druh: ľahká – piesočnatá.

Obsah živín, stanovený v odobratých pôdnych vzorkách sa pohybuje v rozmedzí 1050 – 5250 mg.kg<sup>-1</sup> N, 45,1 – 636,4 mg.kg<sup>-1</sup> P, 146,5 – 647,5 mg.kg<sup>-1</sup> K, 19,5 – 198,0 mg.kg<sup>-1</sup> Mg. Z uvedených výsledkov vyplýva, že ide o pôdu s nízkym až veľmi vysokým obsahom fosforu, veľmi nízkym až dobrým obsahom horčíka a stredným až veľmi vysokým obsahom draslíka (Bielek, 1996).

Napriek tomu že až v 47 % vzoriek pôdy bol obsah Cd, stanovený v pôdnom extrakte lúčavkou kráľovskou, vyšší ako limitná hodnota určená Zákonom 220/2004 a viac ako 53 % odberových miest vykazovalo vyššie obsahy Cd, ako bola limitná hodnota A<sub>1</sub> určená Rozhodnutím MP SR č. 531/1994-540 zodpovedajúca požadovanej (fónovej) koncentrácii daného rizikového prvku v pôde, zvýšené obsahy Cd pre rastliny predstavujú menšie riziko, ako prítomnosť mobilných foriem kadmia v pôde. Uvedené formy Cd sú pre rastliny aktuálne neprístupné, ich bioprístupnosť však môže byť ovplyvnená zmenou pôdnych vlastností (Vollmannová et al., 2002).

Z pohľadu obsahu mobilných foriem Cd možno pôdu charakterizovať ako nekontaminovanú, ani na jednom odbernom mieste obsah Cd neprekročil kritickú hodnotu pre Cd (0,1 mg.kg<sup>-1</sup> pôdy), stanovenú Zákonom 220/2004. Ani

stanovený podlimitný obsah Cd a ďalších ťažkých kovov v pôde však nezaručuje, že rastliny na tejto pôde pestované, budú vždy obsahovať ich tolerovateľné množstvo. Preto je z hygienického hľadiska rozhodujúce, či sa tieto prvky kumulujú v častiach využívaných ku konzumácii (Zrůst, 2003).

*Vegetačné nádobové pokusy*

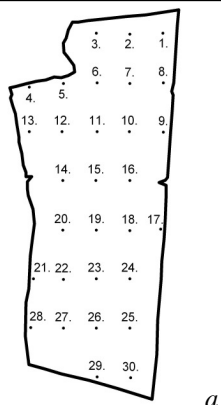
V modelových podmienkach vegetačných nádobových pokusov sme sledovali mieru kumulácie kadmia v ľuľku zemiakovom v závislosti od miery kontaminácie pôdy týmto prvkom. Kadmium bolo aplikované vo forme roztokov vodorozpusnej soli CdCl<sub>2</sub>·2,5H<sub>2</sub>O v množstve 0 – 3 – 5 – 10 mg.kg<sup>-1</sup> pôdy vo variantoch 1 – 4.

Do nádob sme navažovali 25 kg zmesi zeminy a piesku v pomere 21:4. V každom variante sme použili 4 odrody zemiakov; do nádob sme vysádzali po 3 hľuzy, pre všetky odrody boli 4 opakovania. Po založení pokusu aj počas celej vegetácie boli nádoby so zemiakmi zalievané na 70 % vodnú kapacitu. Vlhkosť pôdy sme stanovovali pomocou vlhkomera WET Senzor, typ WET 1.

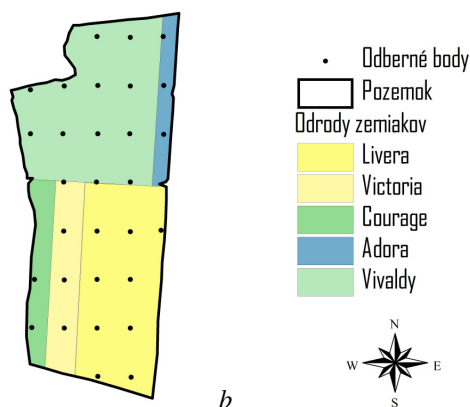
*Imeľ*

Určenie odberných miest pre pôdu i rastlinu sme získali pomocou navigačného zariadenia GPS MAP 60 Cx GARMIN (GPS), rozmiestnenie jednotlivých odrôd je znázornené na obrázku 2 (Musilová et al., 2009). Vzorky pôdy z lokality Imeľ boli odobraté v pôdnom horizonte 0 – 0,2 m podľa záväznej metodiky pomocou pedologickej vrtnej sondy GeoSampler fy. Fisher.

Zemiaky boli, rovnako ako v prípade VNP, zberané v konzumnej zrelosti.



Obrázok 1 Odborné miesta zemiakov (Imeľ – Stará zem)



Obrázok 2 Odrody zemiakov (Imeľ – Stará zem)

**Analytické metódy**

Stanovenie pôdnej reakcie, obsahu prístupných živín a kadmia v pôde

- agrochemická charakteristika pôdy (aktívna pôdna reakcia pH/H<sub>2</sub>O, výmenná pôdna reakcia pH/KCl, C<sub>ox</sub> (%) – oxidimetricky metódou podľa Ťurina a % humusu – prepočtom % C<sub>ox</sub>);
- obsahy živín (P, K, Ca, Mg) – stanovené metódou podľa Mehlicha (Mehlich II);
- pseudototálne obsahy Cd – stanovené vo výluhu lúčavkou kráľovskou (**Zákon 220/2004**);
- obsahy potenciálne mobilizovateľných foriem Cd (**Rozhodnutie MP SR 531/1994-540**) – stanovené vo výluhu HNO<sub>3</sub> (c = 2 mol.dm<sup>-3</sup>);
- obsahy mobilných foriem Cd (**Zákon 220/2004** – kritické hodnoty vo vzťahu pôda – rastlina) – stanovené v pôdnom extrakte NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> (c = 1 mol.dm<sup>-3</sup>);
- analytickou metódou stanovenia obsahov makroelementov a rizikových kovov bola plameňová atómová absorpčná spektrometria (AAS Varian AA Spectr DUO 240FS/240Z/UltrAA). Výsledky boli vyhodnotené v zmysle príslušných legislatívnych predpisov.

Stanovenie obsahu kadmia v konzumných častiach ľuľka zemiakového

- Zemiaky boli zberané v štádiu konzumnej zrelosti. Obsahy kadmia sme stanovili po zhomogenizovaní vzoriek a nasledujúcej mineralizácii mokrym spôsobom

metódou AAS (AAS Varian AA Spectr DUO 240FS/240Z/UltrAA).

*Izolácia bielkovinových frakcií, ich analýza na obsah kadmia*

- Frakcie obsahujúce bielkoviny sme získali postupnou extrakciou delipidovanej vzorky za použitia rôznych extrakčných činidiel;
- extrakciou vzorky v destilovanej vode a následnou filtráciou sme získali nerozpustný podiel Z1 a filtrát F1, z ktorého sme po pridaní Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> filtráciou oddelili zrazeninu obsahujúcu albumíny a časť globulínov;
- z nerozpustného podielu Z1 sme po extrakcii NaCl (c = 1 mol.dm<sup>-3</sup>) získali filtrát F2 a zvyšok Z2, ktorý sme odložili na ďalšie spracovanie; vo filtráte F2 sme v ňom vyextrahované globulíny vyzrážali tanínom, oddelili od supernatantu extrakciou a kvantitatívne preniesli na filter s albumínmi a globulínmi;
- po extrakcii zvyšku Z2 etanolom, vytrepání a vákuovej filtrácii sme získali zvyšok Z3, ktorý sme odložili na ďalšiu extrakciu, a filtrát F3, v ktorom sme tanínom vyzrážali gliadíny; veľmi malé množstvo koloidnej zrazeniny sme odcentrifugovali a kvantitatívne preniesli na filter s albumínmi a globulínmi;
- zvyšok Z3 sme extrahovali NaOH (c = 0,05 mol.dm<sup>-3</sup>) a vákuovo odfiltrovali cez vopred odvážený filtračný papier;
- bielkovinová frakciu sme vo filtráte F4 vyzrážali nasýteným roztokom tanínu a po centrifugácii kvantitatívne preniesli na filter s albumínmi, globulínmi a gliadínmi.

Jednotlivé frakcie boli separované modifikovanou metódou podľa Osborne (**Michalík, 1982**), obsahy rizikových prvkov boli po mineralizácii stanovené metódou AAS (AAS Varian AA Spectr DUO 240FS/240Z/UltrAA).

**VÝSLEDKY A DISKUSIA**

Rovnako, ako ďalšie charakteristické vlastnosti zemiakov (obsah škrobu, vitamínu C, polyfenolových zlúčenín, atď.), i obsah bielkovín je odrodovou záležitosťou. Významný vplyv dusíkatých hnojív, ale i vplyv odrody, pestovateľskej lokality a ročníka na obsah bielkovín v hľuzách zemiakov potvrdzuje vo svojich výsledkoch **Bárta et al. (2000)**, zvýšený obsah bielkovín, škrobu, vitamínu C a súčasne znížený obsah glykoalkaloidov v zemiakových hľuzách dosiahol **Plaza et al. (2004)** organickým hnojením. V zemiakoch dopestovaných v podmienkach vegetačných nádobových pokusov bol obsah bielkovín 2,547±1,52 % (tabuľka 3). Rozdiely v kumulácii Cd v zemiakových hľuzách rôznych odrôd sú štatisticky preukazné. Rovnaké výsledky uvádza i **Rop et al. (2009)**. Medzi jednotlivými odrodami bol štatisticky preukazný rozdiel v obsahu bielkovín nielen v kontrolných variantoch, ale i vo variantoch so zvýšenými obsahmi Cd v zemiakových hľuzách (tabuľka 4). Odrody vykazovali i štatisticky významný rozdiel v miere kumulácie rizikových ťažkých kovov v bielkovinovej frakcii, kde iba pri najvyšších aplikovaných dávkach Cd do pôdy (4. variant) boli rozdiely v kumulácii týchto prvkov štatisticky nevýznamné (tabuľka 5).

## potravinárstvo

**Tabuľka 3 Obsah Cd v zemiakoch ( $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ), vo frakcii bielkovín v 1 kg ČH ( $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) a obsah bielkovín (%) v zemiakoch z VNP so stupňujúcou sa kontamináciou pôdy kadmium**

odroda	var.	Cd v ČH	Cd v bielkovinách	% bielkovín	var.	Cd v ČH	Cd v bielkovinách	% bielkovín
Junior	1	0,211	0,040	1,460	3	0,572	0,117	1,334
Livera		0,133	0,030	2,657		0,624	0,060	1,302
Agria		0,121	0,045	1,365		0,538	0,075	2,115
Asterix		0,111	0,026	2,519		0,527	0,112	1,891
Junior	2	0,482	0,061	3,676	4	0,715	0,126	2,098
Livera		0,472	0,047	2,588		0,706	0,068	2,516
Agria		0,398	0,056	2,751		0,685	0,107	2,517
Asterix		0,388	0,085	1,027		0,634	0,142	4,066

*PK SR: 0,1  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  ČH*

**Tabuľka 4 Štatistické ukazovatele sledovaných odrôd zemiakov: obsah Cd v čerstvej hmote zemiakových hlúz ( $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) – obsah bielkovín (%)**

ANOVA Table for *hmot\_B* by *odroda*

variant	Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
1	Between groups	12,5554	3	4,18513	73,96	0,0000
	Within groups	0,67902	12	0,056585		
	Total (Corr.)	13,2344	15			
2	Between groups	32,622	3	10,874	77,35	0,0000
	Within groups	1,68695	12	0,140579		
	Total (Corr.)	34,309	15			
3	Between groups	4,44818	3	1,48273	31,54	0,0000
	Within groups	0,564156	12	0,047013		
	Total (Corr.)	5,01234	15			
4	Between groups	20,3145	3	6,77149	58,01	0,0000
	Within groups	1,4007	12	0,116725		
	Total (Corr.)	21,7152	15			

Multiple Range Tests for *hmot\_B* by *odroda*, Method: 95,0 percent LSD

Odroda	var.	Count	Mean	Homogeneous Groups	odroda	var.	Count	Mean	Homogeneous Groups
Junior	1	4	2,19025	X	Livera	3	4	1,9535	X
Livera		4	3,985	X	Junior		4	2,0015	X
Agria		4	2,0475	X	Asterix		4	2,83708	X
Asterix		4	3,77825	X	Agria		4	3,172	X
Asterix	2	4	1,53975	X	Junior	4	4	3,147	X
Livera		4	3,8815	X	Livera		4	3,774	X
Agria		4	4,126	X	Agria		4	3,77468	X
Junior		4	5,51425	X	Asterix		4	6,09933	X

Contrast	var.	Sig.	Difference	+/- Limits	var.	Sig.	Difference	+/- Limits	
Agria - Asterix	1	*	-1,73075	0,366485	3	*	0,334925	0,334053	
Agria - Junior				0,366485			*	1,1705	0,334053
Agria - Livera		*	-1,9375	0,366485		*	1,2185	0,334053	
Asterix - Junior		*	1,588	0,366485		*	0,835575	0,334053	
Asterix - Livera				0,366485		*	0,883575	0,334053	
Junior - Livera		*	-1,79475	0,366485			0,048	0,334053	
Agria - Asterix	2	*	2,58625	0,577653	4	*	-2,32465	0,526366	
Agria - Junior		*	-1,38825	0,577653		*	0,627675	0,526366	
Agria - Livera				0,577653			0,000675	0,526366	
Asterix - Junior		*	-3,9745	0,577653		*	2,95233	0,526366	
Asterix - Livera		*	-2,34175	0,577653		*	2,32533	0,526366	
Junior - Livera		*	1,63275	0,577653		*	-0,627	0,526366	

\* denotes a statistically significant difference

## potravinárstvo

**Tabuľka 5** Štatistické ukazovatele sledovaných odrôd zemiakov: obsah Cd v čerstvej hmote zemiakových hl'úz (mg.kg<sup>-1</sup>) – obsah Cd v bielkovinách (mg.kg<sup>-1</sup>), ANOVA Table for hmot<sub>B</sub> by odroda

variant	Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
1	Between groups	0,00364838	3	0,00121613	7,40	0,0046
	Within groups	0,00197078	12	0,000164232		
	Total (Corr.)	0,00561916	15			
2	Between groups	0,0126925	3	0,00423084	15,64	0,0002
	Within groups	0,0032452	12	0,000270434		
	Total (Corr.)	0,0159377	15			
3	Between groups	0,0378827	3	0,0126276	5,90	0,0103
	Within groups	0,0257026	12	0,00214188		
	Total (Corr.)	0,0635853	15			
4	Between groups	0,0491918	3	0,0163973	1,68	0,2237
	Within groups	0,117035	12	0,00975292		
	Total (Corr.)	0,166227	15			

**Multiple Range Tests for hmot<sub>B</sub> by odroda, Method: 95,0 percent LSD**

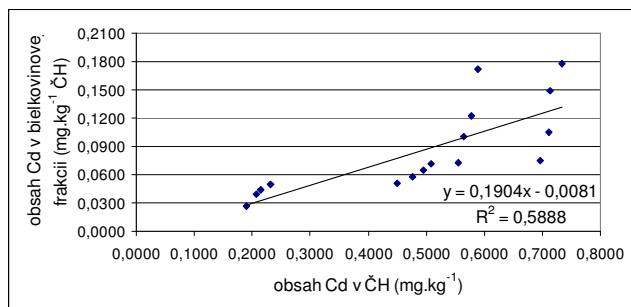
odroda	var.	Count	Mean	Homogeneous Groups	odroda	var.	Count	Mean	Homogeneous Groups
Asterix	1	4	0,05155	X	Livera	3	4	0,1189	X
Livera		4	0,06045	XX	Agria		4	0,14925	X
Junior		4	0,080091	XX	Asterix		4	0,223275	X
Agria		4	0,089475	X	Junior		4	0,2341	X
Livera	2	4	0,093775	X					
Agria		4	0,112375	XX					
Junior		4	0,1218	X					
Asterix		4	0,17005	X					

Contrast	var.	Sig.	Difference	+/- Limits	var.	Sig.	Difference	+/- Limits	
Agria - Asterix	1	*	0,037925	0,019744	3	*	-0,074025	0,0713023	
Agria - Junior				0,00938405		0,019744	*	-0,08485	0,0713023
Agria - Livera		*	0,029025	0,019744				0,03035	0,0713023
Asterix - Junior		*	-0,028541	0,019744				-0,010825	0,0713023
Asterix - Livera				-0,0089		0,019744	*	0,104375	0,0713023
Junior - Livera				0,019641		0,019744	*	0,1152	0,0713023
Agria - Asterix	2	*	-0,057675	0,0253359					
Agria - Junior				-0,009425	0,0253359				
Agria - Livera				0,0186	0,0253359				
Asterix - Junior		*	0,04825	0,0253359					
Asterix - Livera		*	0,076275	0,0253359					
Junior - Livera		*	0,028025	0,0253359					

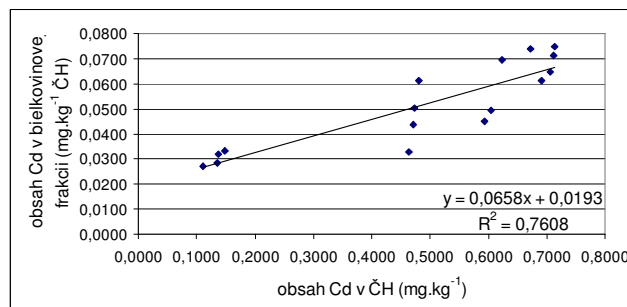
\* denotes a statistically significant difference

Vo všetkých prípadoch je hodnota P-value < α (0,05), taktiež hodnota Signifikantné F (Junior 5,21.10<sup>-4</sup>, Livera 1,056.10<sup>-5</sup>,

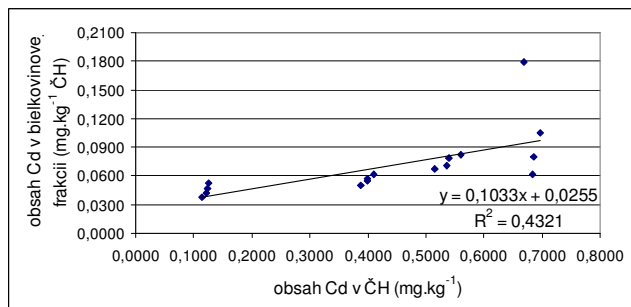
Agria 5,659.10<sup>-3</sup>, Asterix 4,543.10<sup>-5</sup>) < ako hladina významnosti α. Zvolená regresná priamka je vo všetkých



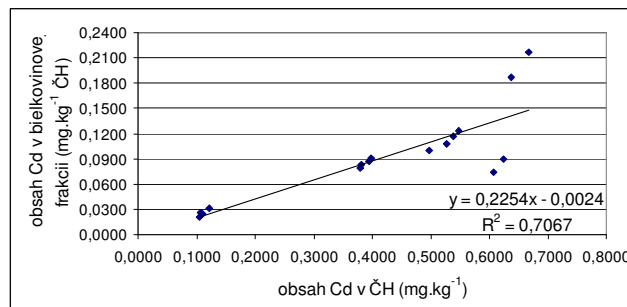
Graf 1 Štatistická závislosť obsahu kadmia v bielkovinovej frakcii od množstva kumulovaného Cd v ČH (Junior)



Graf 2 Štatistická závislosť obsahu kadmia v bielkovinovej frakcii od množstva kumulovaného Cd v ČH (Livera)



Graf 3 Štatistická závislosť obsahu kadmia v bielkovinovej frakcii od množstva kumulovaného Cd v ČH (Agria)



Graf 4 Štatistická závislosť obsahu kadmia v bielkovinovej frakcii od množstva kumulovaného Cd v ČH (Asterix)

Obsah bielkovín v zemiakoch dosahuje hodnotu asi 2 %, pričom svojou kvalitou sa zemiaková bielkovina približuje vaječnej bielkovine a z biologického hľadiska je jednou z najhodnotnejších bielkovín rastlinného pôvodu (Francia, 2002). Po sójových produktoch zaujímajú zemiakové bielkoviny druhé najvýznamnejšie miesto medzi bielkovinami rastlinného pôvodu (Houba et al., 2007).

Priemerné obsahy bielkovín v zemiakoch pestovaných v poľných podmienkach (lokality Imeľ) sa nelíšia od obsahov bielkovín v kontrolných variantoch jednotlivých odrôd z vegetačných nádobových pokusov. Obsah bielkovín v zemiakoch bol v rozmedzí od 1,062 % (odroda Victoria) do 2,232 % (odroda Livera) (tabuľka 6).

Tabuľka 6 Obsah Cd v zemiakoch ( $\text{mg.kg}^{-1}$ ), vo frakcii bielkovín v 1 kg ČH ( $\mu\text{g.kg}^{-1}$ ) a obsah bielkovín (%) v zemiakoch z lokality Imeľ – Stará zem

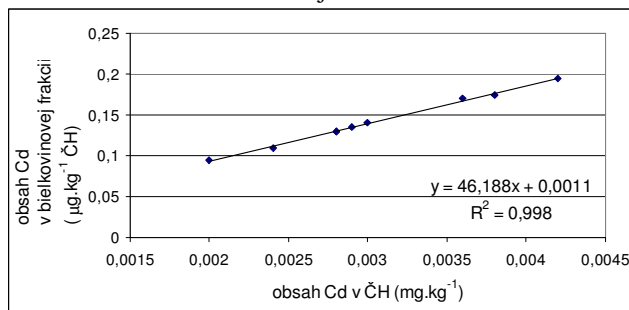
o. m.	odroda	Cd		%	o. m.	odroda	Cd		%
		v ČH	v bielkovinách				v ČH	v bielkovinách	
1	Adora	0,0018	0,105	1,493	16	Vivaldi	0,0029	0,135	1,366
2	Vivaldi	0,0021	1,320	1,320	17	Livera	0,0028	0,130	1,129
3	Vivaldi	0,0021	1,186	1,186	18	Livera	0,0030	0,140	1,098
4	Vivaldi	0,0027	1,144	1,144	19	Livera	0,0020	0,095	1,470
5	Vivaldi	0,0021	1,267	1,267	20	Victoria	0,0024	0,125	1,180
6	Vivaldi	0,0026	1,365	1,365	21	Courage	0,0016	0,070	1,280
7	Vivaldi	0,0028	1,994	1,994	22	Victoria	0,0019	0,100	1,310
8	Adora	0,0024	1,602	1,602	23	Livera	0,0038	0,175	1,222
9	Adora	0,0019	1,372	1,372	24	Livera	0,0029	0,135	1,205
10	Vivaldi	0,0035	1,364	1,364	25	Livera	0,0024	0,110	1,155
11	Vivaldi	0,0036	1,661	1,661	26	Livera	0,0028	0,130	1,140
12	Vivaldi	0,0029	1,928	1,928	27	Victoria	0,0017	0,075	1,062
13	Vivaldi	0,0029	1,130	1,130	28	Courage	0,0018	0,085	1,168
14	Victoria	0,0024	1,208	1,208	29	Livera	0,0042	0,195	1,190
15	Vivaldi	0,0026	1,306	1,306	30	Livera	0,0036	0,170	2,232

Najnižšie priemerné obsahy bielkovín boli stanovené v odrode Victoria a zvyšovali sa v poradí: Victoria (1,190). Obsahy Cd v bielkovinách zemiakov z lokality Imeľ boli v porovnaní s obsahmi Cd v bielkovinovej frakcii zemiakov z VNP rádo vo nižšie, čo zodpovedá i výrazne nižším obsahom Cd v hlúzach zemiakov z tejto lokality.

(%) < Courage (1,224 %) < Livera (1,316 %) < Vivaldi (1,419 %) < Adora (1,489 %).

Najnižšie obsahy Cd v bielkovinách boli stanovené v odrode Courage ( $\bar{\phi}$  0,0775  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  ČH) a najvyššie v odrode Vivaldi ( $\bar{\phi}$  1,317  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  ČH).

Napriek tomu, že v zemiakoch obsahy Cd neprekročili hygienické limity dané PK SR, potvrdila sa štatisticky preukazná závislosť medzi obsahmi tohto rizikového kovu v čerstvej hmote a v bielkovinovej frakcii zemiakov v odrode Livera (Cd:  $R = 0,999$ ;  $P\text{-value} = 9,55.10^{-11}$ ) (graf 5). Obsahy Cd v ČH ostatných odrôd nemali štatisticky preukazný vplyv na obsah bielkovín ani na kumuláciu Cd v bielkovinovej frakcii.



**Graf 5** Štatistická závislosť obsahu kadmia v bielkovinovej frakcii od množstva kumulovaného Cd v ČH (Livera)

V odolnosti rastlín voči pôsobeniu ťažkých kovov existujú veľké rozdiely nielen medzi druhmi, ale i vo vnútri toho istého druhu. Jednou z účinných aklimačných reakcií je tvorba špecifických zlúčenín – fytochelátinov (polypeptidy štruktúrne príbuzné glutationu – vznikajú spojením 2 – 8 molekúl kyseliny  $\gamma$ -Glu a Cys s 1 molekulou Gly) – schopných inaktivovať ťažké kovy väzbou do chelátových komplexov (Procházka et al., 1998).

## ZÁVER

V modelových podmienkach stupňovanej metalickej záťaže pôdy kadmium sa potvrdila nielen silná pozitívna závislosť medzi aplikovaným množstvom ťažkého kovu a jeho kumuláciou v zemiakovej hlúze, ale i medzi obsahom Cd v hlúzach zemiakov a obsahom bielkovín. Zvyšujúce sa obsahy Cd v čerstvej hmote boli v pozitívnej korelácii s obsahmi Cd v bielkovinách.

V prirodzených podmienkach nekontaminovaných pôd nepredstavuje obsah kadmia pre rast a vývoj zemiakových hlúz riziko. Tento fakt potvrdzujú vo svojich prácach mnohí autori, ako aj naše výsledky získané analýzou zemiakov pestovaných v lokalite Imeľ. Napriek zvýšeným obsahom kadmia v pôde sa tieto nepremietli do ich zvýšenej kumulácie hlúzami zemiakov. Potvrdilo sa, že pri vyššom obsahu rizikových obsahov v pôde, než sú ich limitné hodnoty, nemusí vždy dochádzať k ich transferu do pestovaných plodín, avšak ani ich stanovený podlimitný obsah v pôde nezaručuje, že rastliny pestované na tejto pôde budú vždy obsahovať ich tolerovateľné množstvo. Štatisticky preukazná závislosť medzi obsahmi Cd v čerstvej hmote a bielkovinovej frakcii zemiakov pestovaných v lokalite Imeľ sa prejavila iba v odrode Livera. V ostatných odrodách sa obsah kadmia nepremietol do jeho kumulácie bielkovinami. Rovnako sa nepotvrdila závislosť medzi obsahmi Cd a obsahmi bielkovín v zemiakoch.

## LITERATÚRA

- BÁRTA, J., DIVIŠ, J., ČURN, V. 2000. Dusíkaté látky bramborových hlíz a jejich ovlivnění dusíkatým hnojivem. In Bramborářství, vol.VIII, 2000, no 2, p. 11-12. ISSN 1211-2429.
- BÁRTA, J., ČURN, V. 2004. Bílkoviny hlíz bramboru (*Solanum tuberosum* L.) – klasifikace, charakteristika, význam. In Chemické listy, 98, 2004, p. 373-378. ISSN 1213-7103.
- BIELEK, P. 1996. Ochrana pôdy. Kódex správnej poľnohospodárskej praxe. VÚPÚ : Bratislava, 1996. ISBN 80-85361-21-3.
- DAVÍDEK, J., JANÍČEK, G., POKORNÝ, J. 1983. Chemie potravin. Vyd. SNTL Alfa, Praha. 632 p.
- FRANČÁK, J. 2002. Mechanizácia pestovania, zberu a pozerového spracovania zemiakov. Vyd. ÚVTIP Nitra, 2002. 103. p. ISBN 80-89088-09-0.
- HOUBA, M. 2007. Poznejte pěstujte používejte brambory. Vydala firma Europlant šlechtitelská spol. s r. o. Praha. 150 s. ISBN 978-80-239-9419-3.
- KAPOOR, A. C., DESBOROUGH, S. L., LI, P. H. 1975. Potato tuber proteins and their nutritional quality. In Potato Research, vol. 18, 1975, no. 3, p. 469-478. ISSN 1871-4528.
- KOUREK, R., KOUTNÍK, V., KRAČMAR, S. 1996. Vliv půdní aplikace selenu na spektrum aminokyselin u bramborových hlíz. In Bramborářství, vol. IV, 1996, no. 5, p. 8-10. ISSN 1211-2429.
- MICHALÍK, I. 1982. Návod na cvičenia z biochémie a fyziológie rastlín. VŠP : Nitra, 2. neprepracované vydanie. 1982, 164 p.
- MUSILOVÁ, J., TREBICHALSKÝ, P., BAJČAN, D. 2006. Pôdne obsahy ťažkých kovov v regiónoch Podunajskej nížiny s lokálnym znečistením. In Environmentálne inžinierstvo, Vedecká konferencia s medzinárodnou účasťou, Košice 12. – 13. september 2006. ISBN 80-8073-607-3.
- MUSILOVÁ, J., TÓTH, T., ÁRVAY, J. 2009. Contents of Heavy Metals in Different Saccharides Fractions of Potato Tubers. In Czech J. Food Sci., vol. 27, 2009, Special Issue, p. 382-385. ISSN 1212-1800.
- FOOD CODEX OF THE SLOVAK REPUBLIC, Výnos MPSR a MZSR č. 608/3/2004-100, príloha č.1 k desiatej hlave druhej časti PKSR
- PLAZA, A., CEGLAREK, F., BURACZYNSKA, D. 2004. Tuber yield and quality of potato fertilised with intercrop companion crops and straw. In Electronic Journal of Polish Agricultural University, vol. 7, 2004, No. 1, 10 pp. ISSN 1505-0297.
- PROCHÁZKA, S., MACHÁČKOVÁ, I., KREKULE, J., ŠEBÁNEK, J., GLOSER, J. HAVEL, L., NÁTR, L., PRÁŠIL, S., SLADKÝ, Z., ŠANTRÚČEK, J., TESAŘOVÁ, M., VYSKUT, B. Fyziologie rostlin. Academia. 1998. p. 422-427. ISBN 80-200-0586-2.
- ROP, O., VALÁŠEK, P., KRAMÁŘOVÁ, D., JURÍKOVÁ, T. 2009. Distribution of toxic elements in potato plants. In Potravinárstvo, vol.3, 2009, no. 1, p. 43-45. ISSN 13337-0960
- ROZHODNUTIE MP SR o najvyšších prípustných hodnotách škodlivých látok v pôde a o určení organizácií oprávnených zisťovať skutočné hodnoty týchto látok č. 531/1994-540.
- SCHULZOVÁ, V., HAJŠLOVÁ, J. 2007. Kvalita ekologicky a konvenčne pestovaných brambor. In Ekologické земедělství 2007. Sborník z Mezinárodní vědecké konference u příležitosti 15 let ekologického



zemědělství v České republice, Praha, 6.-7.2.2007, p. 137-139.

ŠMÁLIK, M. 1987. Zemiaky. Vyd. Příroda, Bratislava. 1987, 304 p.

United States Department of Agricultural, National Nutrient Database for Standard Reference, 2009

VELÍŠEK, J. 2002. Chemie potravin I. Vyd. OSSIS – Tábor. 344 p. ISBN 80-86659-00-3.

VOLLMANNOVÁ, A., LAHUČKÝ, L., TOMÁŠ, J., HEGEDŮSOVÁ, A., JOMOVÁ, K. 2002. The arrangement of extremely acid soil reaction in relationship to Cd, Pb, Cr and Ni intake by the plants. In Ekológia (Bratislava), vol. 21, 2002, no. 4, p. 442-448. ISSN 1335-342X.

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. 857 p. ISBN-13: 978-0-444-51018-1.

WOOLFE, J. A. 1987. The Potato in the Human Diet. Cambridge University Press, Cambridge. 1987, 231 pp.

ZÁKON č. 220/2004 Z.z. Kritériá pre identifikáciu rizikových oblastí kontaminácie pôd a metodické postupy ich hodnotenia.

ZRŮST, J. 2003. Riziko pěstování brambor v půdách kontaminovaných těžkými kovy. Vydal Vědecký výbor fyto-sanitární a životního prostředí, Praha, 36 p.

**Contact address:** Doc. Ing. Janette Musilová, PhD. Department of Chemistry, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Slovak University of Agriculture in Nitra, Tr. Andreja Hlinku 2, 949 76 Nitra. Tel.: 037 6414606, e-mail: janette.musilova@uniag.sk

Ing. Judita Bystrická, PhD. Department of Chemistry, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Slovak University of Agriculture in Nitra, Tr. Andreja Hlinku 2, 949 76 Nitra. Tel.: 037 6414353, e-mail: judita.bystricka@centrum.sk

**SENSITIVITY TO ANTIBIOTICS IN STRAINS OF *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* ISOLATED FROM COW'S MILK**

Jana Pukáčová, Lucia Poľáková, Eva Dudriková

**ABSTRACT**

Strains of *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) were isolated from individual milk samples of 500 lacting cows from different areas in Slovakia (PH 1 – Košice region, 300 samples; PH 2 – Žilina region, 200 samples). The statistical significance between both dairy farms included in the experiment in the presence of genus *Staphylococcus* isolated on Baird-Parker agar from milk samples was  $p < 0,0001^{***}$ . Totally, 122 milk samples were positive for the presence of *Staphylococcus aureus* (83 Košice regions, 52 Žilina regions). All 122 isolates of *S. aureus* were sensitive for the methicilin as detected by interpretative criteria developed by NCCLS (2002). For 122 *S. aureus* isolates, we compared antibiotic susceptibility results determined by the standardized agar diffusion assay with the PCR assay for the detection of antibiotic resistance *mecA* gene. For all isolates, we found a correlation between the results of the PCR and those of classical resistance testing. The obtained results were confirmed by PCR analysis, according to which, any of our tested isolate of *S. aureus* from all 122 individual milk samples from both experimental dairy farms were not positive for the presence of *mecA* gene coding the methicilin resistance.

**Keywords:** milk, antibiotic resistance, *mecA* gene, PCR

**ÚVOD**

Bezpečnosť potravín je kľúčovým faktorom, ktorý vedie k tomu, aby sa vyrábali kvalitné potraviny bez škodlivých účinkov na zdravie ľudí. Rastúce nároky spotrebiteľov na zdravé, výživné a vhodné potraviny vedú k neustálemu zdokonaľovaniu už existujúcich techník a k novému vývoju v spracovaní potravín ako aj k návrhom produkovať bezpečné potraviny, ktoré si zachovávajú nutričnú a senzorickú kvalitu. Žiadaným faktorom v procese spracovania potravín je zvýšiť potravinovú bezpečnosť, zlepšiť mikrobiologické a chemické vlastnosti potravín a odstrániť nežiaduce toxické zložky. Na identifikácii konkrétneho rizika so stanovením preventívnych ochranných opatrení je založený HACCP systém kvality a hygienickej a zdravotnej bezpečnosti vyrábaných produktov, ktorý má prvoradý význam v potravinárskom priemysle, počnúc od výroby až po spotrebu.

Z hľadiska technológie získavania a spracovania mlieka v mliekarskom priemysle predstavujú závažné mikrobiologické nebezpečenstvo baktérie *Staphylococcus aureus*. Z mnohých metabolitov produkovaných stafylokokmi najväčšie riziko pre zdravie konzumentov predstavujú enterotoxíny, ktoré po požití môžu vyvolať otravu potravinami - stafylokokovú enterotoxikózu (LeLoir et al., 2003; Lembo et al., 2003; Hage a Tran, 2004; Smitandí a Sternesjö, 2004).

*Staphylococcus aureus* sa vyskytuje v prachu, vo vzduchu, vo vode a v odpadových vodách, môže infikovať mlieko pri dojení, pochádza z mliečnej žľazy pri jej ochoreniach (Pyörälä, 2002), alebo sa do mlieka dostane kontamináciou z rúk, tváre, dutiny ústnej a nosovej pracovníkov prichádzajúcich s mliekom do styku v rôznych fázach jeho výroby a spracovania (Garcia et al., 1980; Bramley et al., 1984). Stafylokoky sa obvyčajne zisťujú u 30 - 50 % zdravých ľudí v nosnej dutine, na koži býva výskyt nižší (5 - 30 %). Stafylokoky adaptované na zvieratá môžu byť preukázané ako nosičské kmene u zdravých ľudí, najmä u tých, čo častejšie prichádzajú do

úzkého styku so zvieratami a môžu sa podieľať pri vzniku infekcií napr. zápalov mliečnej žľazy (Anderson, 1990; Cardoso et al., 1999; Burdová, 2001).

Na základe mnohých štúdií sa konštatovalo, že pretrvávajúca doslova harmonický vzťah medzi hosťiteľom a stafylokokmi, ktoré bežne perzistujú na koži, v nose, ústach a hrdle (Minor a Marth, 1972; 1976). Bohužiaľ táto harmónia sa naruší v prípade, že sa stafylokoky stávajú príčinným činiteľom vyvolávajúcim rôzne infekcie na rôznych miestach tela (Cunningham et al., 1996; Beekhuizen et al., 1997; Crossley a Archer, 1997).

*Staphylococcus aureus* sa v surovom mlieku vyskytuje dosť pravidelne, i keď v nízkych počtoch v porovnaní s inými druhmi a skupinami mikroorganizmov. Prítomnosť bakteriálnych látok, ostatnej konkurenčnej mikroflóry a chladenie mlieka zabraňujú jeho pomnoženiu a syntéze enterotoxínov (Tsen et al., 1997; Shoshani et al., 1999). Nízke počty *Staphylococcus aureus* v mlieku nie sú nebezpečné z hľadiska enterotoxikózy, ale môžu spôsobiť infekciu u ľudí s imunosupresiou, najmä detí. K stafylokokovej intoxikácii dochádza obvyčajne po skonžumovaní menej ako 1 µg toxínu v kontaminovanej potrave, čo v prípade dobrého producenta toxínu predstavuje asi  $10^5$ - $10^6$  zárodkov enterotoxigénnych kmeňov *Staphylococcus aureus* v jednom grame potraviny (Soomro et al., 2003; Jorgensen et al., 2005).

*Staphylococcus aureus* má značný patogénny potenciál a veľká schopnosť adaptability na vonkajšie faktory prostredia spôsobuje, že sa stáva čoraz odolnejší voči antibiotikám. Selektívne tlaky prostredia, ako aj nadmerné používanie antibiotík, významne prispeli k budovaniu stafylokokovej rezistencie. Na začiatku šesťdesiatych rokov (1961) sa objavili prvé kmene rezistentné voči meticylínu a ostatným beta-laktámovým antibiotikám, tradične nazývané meticylín rezistentné kmene *S. aureus* (MRSA) (Kiššová, 2008).

V sedemdesiatych rokoch sa MRSA kmene stali prakticky po celom svete hlavnou príčinou

nozokomiálnych infekcií. Opakovaná liečba antibiotikami indukuje expresiu *mecA* kmeňov a dochádza k rýchlemu šíreniu v nemocniciach. *Staphylococcus aureus* reprezentuje kolonizátora a patogéna nielen pre ľudí, ale aj pre živočchy. Lee (2003) poukázal na fakt, že kontaminované potraviny živočíšneho pôvodu, mlieko a mliečne výrobky, predstavujú riziko infekcie MRSA pre ľudí. Gény kódujúce meticilínovú rezistenciu sú umiestnené na jedinom mobilnom genetickom elemente, a to na stafylokokovej chromozómovej kazete *SCCmec*. Do dnešnej doby bolo popísaných 6 druhov *SCCmec*. Tieto elementy sa môžu zabudovať do genómu MRSA a pretvoriť ho na rezistentný druh. Ich rozvoj prispieva k narastaniu počtu infekcií spôsobených MRSA po celom svete (Oliveira et al., 2006).

Cieľom práce bolo vyhodnotiť zbierku izolátov *Staphylococcus aureus* z individuálnych vzoriek surového mlieka získaného na dvoch vybraných produkčných hospodárstvach z rôznych oblastí Slovenska (Košícký kraj a Žilinský kraj) a u týchto izolátov popísať citlivosť k vybraným antibiotikám a prítomnosť génu kódujúceho rezistenciu na meticilín.

### MATERIÁL A METÓDY

V práci sme použili zbierku izolátov *S. aureus* zo vzoriek surového kravského mlieka od 500 dojníc v rôznom štádiu laktácie, u ktorých klinickým vyšetrením mliečnej žľazy a NK-testom neboli zistené zápalové procesy. Vzorky surového mlieka boli odobraté na produkčnom hospodárstve (PH 1) situovanom v Košíckom kraji (n = 300) a na katastrálnom území produkčného hospodárstva (PH 2) situovaného v Žilinskom kraji (n = 200). Vzorky mlieka (rovnaké diely z každej štvrti, cca 10 ml), získané počas večerného dojenja boli odobraté asepticky po vydojení prvých strekov mlieka, zmiešané *anapartes* a ihneď uložené do chladiaceho boxu pri teplote + 4 °C až + 6 °C do spracovania. Vzorky boli spracované ihneď po príchode do laboratória.

Vo vzorkách surového mlieka sme *S. aureus* stanovili na Baired-Parkerovom agare (HiMedia, India) podľa EN ISO 6888-1:1999. Vyrastené suspektné kolónie sme prekultivovali na krvný agar obsahujúci 5 % baraních erytrocytov a inkubovali 24 hod. pri teplote 37 °C. Tieto 24 hod. kultúry sme použili na ďalšie testy: cytidín deaminázový test, založený na deaminácii cytidínu na rozlíšenie *S. aureus* od ďalších stafylokokov (Krasuski et al., 2007); Sevatest Stafylo PK (Imuna, Šarišské Michaľany) predstavuje plazmakoagulázový test na testovanie prítomnosti voľnej koagulázy skúmavkovou reakciou; Staphytest 16, ktorým sme identifikovali zástupcov rodu *Staphylococcus* (Lachema Brno, ČR). Získané izoláty *S. aureus* uvedenými testami sme potvrdili molekulárnou metódou PCR (Martineau et al., 1998; Strommenger et al., 2003; Hein et al., 2005).

Na detekciu *mecA* génu, ktorý kóduje meticilínovú rezistenciu, sme použili PCR reakciu podľa Strommengera et al. (2003), ktorou sa amplifikuje 532 bp dlhá časť tohto génu.

V objeme 50 µl reakčnej zmesi bol 1 µl genomickej DNA, 10 mmol.l<sup>-1</sup> Tris-HCl (pH 8,8), 3 mmol.l<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub>, 200 µmol.l<sup>-1</sup> dNTP, 12,5 pmol.l<sup>-1</sup> každého primeru a 1

jednotka *Taq* DNA polymerázy (Ecoli s.r.o.). Primery použité v PCR na amplifikáciu *mecA* génu sú uvedené v Tab. 1. Na amplifikáciu *mecA* génu sme použili nasledovné podmienky:

Iniciačná denaturácia pri 94 °C po dobu 3 min.,

30 cyklov:

94 °C, 30 s.,

55 °C, 30 s.,

72 °C, 30 s.,

Po poslednom cykle nasledovala ešte finálna extenzia 4 min. pri 72 °C.

Tab. 1 Primery použité v PCR na amplifikáciu *mecA* génu (Zdroj: Strommenger et al., 2003)

Gén	Primer	Nukleotidová sekvencia 5' – 3'	Veľkosť produktu
<i>mecA</i>	mecA-F	AAA ATC GAT GGT AAA GGT TGG C	532 bp
	mecA-R	AGT TCT GCA GTA CCG GAT TTG C	

PCR produkty sme analyzovali pomocou elektroforézy v 1 % agarózových géloch (Invitrogen), ponorených v TAE tlmivom roztoku, ktorý mal nasledovné zloženie: 242 g TRIS, 57,1 ml kyselina octová ľadová, 100 ml 0,5 mol.l<sup>-1</sup> EDTA (pH 8,0), doplnená destilovanou vodou do 1 l (Sambrook et al., 1989). Elektroforéza prebiehala približne 45 min. pri 120 V (Zdroj napätia Consort EV 243, UK). Agarózové gély sme po elektroforéze ofarbili etídium bromidom (10 mg/ml) a následne vizualizovali pomocou UV lampy. Na základe pohyblivosti v agarózových géloch sme porovnávaním so 100 bp štandardom (Sigma) určili veľkosť fragmentov.

Izoláty *S. aureus* sme testovali na citlivosť voči vybranej škále antibiotík difúznou diskovou metódou (NCCLS, 2002) na Müeller-Hintonovom agare. Suspenziu pripravenú z testovaného izolátu sme vatovým tampónom naniesli na povrch Müeller-Hinton pôdy. Pomocou dávkovača antibiotických diskov Oxoid sme naniesli jednotlivé antibiotické disky a platne sme inkubovali 16 - 24 hod. pri 37 °C. Po inkubácii sme odmerali priemery inhibičných zón rastu baktérií v milimetroch a porovnali ich s hraničnými veľkosťami inhibičných zón, ktoré sú stanovené pre jednotlivé antibiotiká. Výsledok ukazuje, či je kmeň citlivý (C), rezistentný (R) alebo stredne citlivý (MC) na testované antibiotikum.

Na testovanie antibiotikorezistencie sme použili nasledovné testovacie disky (Oxoid) s týmto množstvom účinnej látky: amoxicillin-clavulanat (20 µg + 10 µg), ampicillin (10 µg), erythromycin (15 µg), lincomycin (10 µg), methicillin (10 µg), neomycin (30 µg), novobiocin (30 µg), oxacillin (5 µg), penicillin (10 IU), streptomycin (10 µg) a tetracycline (30 µg).

Na štatistické porovnanie výsledkov našej experimentálnej práce sme použili analýzu rozptylu ANOVA a metódu testu dobrej zhody chí-kvadrát a Tukeyov porovnávací test (Microsoft Excel 2007 a GraphPad Prism 5).

**VÝSLEDKY A DISKUSIA**

Celkovo sme odobrali päťsto individuálnych vzoriek surového kravského mlieka, a to 300 ks z produkčného hospodárstva situovaného v Košickom kraji (PH 1) a 200 ks vzoriek z produkčného hospodárstva nachádzajúceho sa v Žilinskom kraji (PH 2). Z 500 individuálnych vzoriek surového kravského mlieka bolo 53,2 % bakteriologicky

pozitívnych (Tab. 2). Z týchto vzoriek surového kravského mlieka bol klasickou mikrobiologickou metódou izolovaný rod *Staphylococcus* v 122 vzorkách mlieka. Medzi sledovanými produkčnými hospodárstvami bola zistená štatisticky významnosť v pozitívite vzoriek mlieka na rod *Staphylococcus*  $p < 0,0001^{***}$  (Tab. 3).

**Tab. 2** Prehľad bakteriologického vyšetrenia surového kravského mlieka v PH 1 (Košický kraj) a PH 2 (Žilinský kraj) Zdroj: Vlastná tabuľka

kraj	PH 1		PH 2	
	počet	(%)	počet	(%)
vyšetrené spolu	300	100	200	100
pozitívne celkom	181	60,33	85	42,5
negatívne celkom	119	33,67	115	57,5
vyšetrené spolu	500 (100%)			
pozitívne celkom	266 (53,2 %)			
negatívne celkom	234 (46,8 %)			

**Tab. 3** Prehľad bakteriologického vyšetrenia surového kravského mlieka v PH 1 (Košický kraj) a PH 2 (Žilinský kraj) so zameraním na druh *Staphylococcus aureus* (Zdroj: Vlastná tabuľka)

rod	PH 1 (n = 181)		PH 2 (n = 85)		spolu (n = 266)		štatistická významnosť $p < 0,0001$ ***
	počet	%	počet	%	počet	%	
<i>S. aureus</i>	83	47,73	39	24,38	122	45,86	

Izolované a identifikované kmene *S. aureus* klasickými metódami sme uskladnili vo forme glycerínovej konzervy pri teplote  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  až do ďalšieho laboratórneho spracovania PCR metódou.

Celkovú genomickú DNA sme izolovali metódou podľa Heina et al. (2005). Po príslušnej izolácii sme supernatant použili ako zdroj celkovej DNA na identifikáciu *S. aureus*. PCR metódou, pomocou primerov Sauni 1 a Sauni 2, ktoré amplifikujú 16S rDNA gén prítomný iba u kmeňov stafylokokov a primerov Sau 1 a Sau 2, ktoré amplifikujú špecifické sekvencie prítomné iba u kmeňov *S. aureus*, sme potvrdili, že sa jedná o izoláty *S. aureus*.

Pomocou multiplexovej polymerázovej reťazovej reakcie sme sledovali prítomnosť *mecA* génu, ako génu, ktorý kóduje meticilínovú rezistenciu. Ani jeden nami potvrdený kmeň *S. aureus* izolovaný zo surového kravského mlieka experimentálnych dojníc z obidvoch produkčných hospodárstiev, nebol nositeľom génu *mecA*, ktorý určuje meticilínovú rezistenciu.

Izoláty *S. aureus* sme testovali na citlivosť voči vybranej škále antibiotík difúznou diskovou metódou na Müller-Hintovom agare tak, ako to uvádza N CCLS (2002).

Výsledky *in vitro* citlivosti izolátov *S. aureus* diskovou metódou sú uvedené v Tab. 4. Z Tab. 4 vyplýva, že všetky izoláty *S. aureus* boli citlivé voči meticilínu a oxacilínu (100 %), nad 90 % bola citlivosť zistená pri antibiotiku typu amoxicilín-klavulanát (95,90 %). Linkomycín a streptomycín boli účinné na 86,89 %, resp. 83,61 % izolátov *S. aureus* zo vzoriek mlieka experimentálnych dojníc. U ostatných sledovaných antibiotík bola citlivosť na izoláty *S. aureus* nižšia a napr. penicilín bol účinný len u 54,92 % izolátov *S. aureus* z individuálnych vzoriek mlieka dojníc získaných na obidvoch produkčných hospodárstvách. Na penicilín a ampicilín bolo 26,22 % resp. 16,40 % izolátov *S. aureus* zo vzoriek mlieka experimentálnych dojníc rezistentných. Na tetracyklín resp. erytromycín bolo citlivých 75,41 % resp. 72,95 % nami izolovaných kmeňov *S. aureus* z individuálnych vzoriek surového kravského mlieka.

Štatistické hodnotenie *in vitro* citlivosti izolátov *S. aureus* diskovou metódou zo vzoriek surového kravského mlieka experimentálnych dojníc odobratých v sledovaných produkčných hospodárstvách je uvedené v Tab. 5.

## potravinárstvo

**Tab. 4** *In vitro* citlivosť koagulázapozitívnych kmeňov *S. aureus* izolovaných z individuálnych vzoriek surového kravského mlieka od 122 dojníc (Zdroj: Vlastná tabuľka)

účinná látka antibiotika (koncentrácia) PH 1 = 83 PH 2 = 39		<i>S. aureus</i> (n = 122)					
		C		R		MC	
		Počet	(%)	Počet	(%)	Počet	(%)
Amoxicillin-Clavulanat (20 µg + 10 µg)	<b>spolu</b>	<b>117</b>	<b>95,90</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>5</b>	4,10
	PH1	80	96,39	0	0	3	3,62
	PH 2	37	94,87	0	0	2	5,13
Ampicillin (10 µg)	<b>spolu</b>	<b>83</b>	<b>68,03</b>	<b>20</b>	<b>16,40</b>	<b>19</b>	<b>15,57</b>
	PH1	47	56,63	19	22,89	17	20,48
	PH 2	36	92,31	1	2,56	2	5,13
Erythromycin (15 µg)	<b>spolu</b>	<b>89</b>	<b>72,95</b>	<b>18</b>	<b>14,75</b>	<b>15</b>	<b>12,30</b>
	PH1	58	69,88	13	15,66	12	14,46
	PH 2	31	79,49	5	12,83	3	7,69
Lincomycin (10 µg)	<b>spolu</b>	<b>106</b>	<b>86,89</b>	<b>16</b>	<b>13,11</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
	PH1	67	80,72	16	19,28	0	0
	PH 2	39	100	0	0	0	0
Methicillin (10 µg)	<b>spolu</b>	<b>122</b>	<b>100</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
	PH1	83	100	0	0	0	0
	PH 2	39	100	0	0	0	0
Neomycin (30 µg)	<b>spolu</b>	<b>90</b>	<b>73,77</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>32</b>	<b>26,23</b>
	PH1	67	80,72	0	0	16	19,28
	PH 2	23	58,97	0	0	16	41,03
Novobiocin (30 µg)	<b>spolu</b>	<b>82</b>	<b>67,21</b>	<b>28</b>	<b>22,95</b>	<b>12</b>	<b>9,84</b>
	PH1	59	71,08	20	24,10	4	4,82
	PH 2	23	58,98	8	20,51	8	20,51
Oxacillin (5 µg)	<b>spolu</b>	<b>122</b>	<b>100</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
	PH1	83	100	0	0	0	0
	PH 2	39	100	0	0	0	0
Penicillin (10 IU)	<b>spolu</b>	<b>67</b>	<b>54,92</b>	<b>32</b>	<b>26,22</b>	<b>23</b>	<b>18,86</b>
	PH1	49	59,03	18	21,69	16	19,28
	PH 2	18	2,56	14	35,89	7	17,95
Streptomycin (10 µg)	<b>spolu</b>	<b>102</b>	<b>83,61</b>	<b>20</b>	<b>16,39</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
	PH1	63	75,90	20	24,10	0	0
	PH 2	39	100	0	0	0	0
Tetracycline (30 µg)	<b>spolu</b>	<b>92</b>	<b>75,41</b>	<b>30</b>	<b>24,59</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
	PH1	64	77,11	19	22,89	0	0
	PH 2	28	71,79	11	28,21	0	0

C - citlivý; R - rezistentný, MC - stredne citlivý, PH 1 - Košický kraj, PH 2 - Žilinský kraj

Z Tab. 5 vyplýva, že pri porovnaní štatistickej významnosti citlivosti, strednej citlivosti, resp. rezistencie izolátov *S. aureus* zo vzoriek surového mlieka experimentálnych dojníc na sledované antibiotiká pomocou diskovej metódy boli zistené rozdiely na úrovni  $p < 0,0001^{***}$  pre ampicilín (citlivý),  $p < 0,0001^{***}$  pre streptomycín (citlivý). Všetkých 39 izolátov *S. aureus* (100 %) získaných zo vzoriek mlieka z PH 2 bolo na streptomycín citlivých. V skupine izolátov *S. aureus* zo

vzoriek mlieka odobraných na PH 1 bolo na streptomycín citlivých 75,90 % testovaných kmeňov *S. aureus*, čo je o 24,10 % menej.

Rozdiely v rezistencii izolátov *S. aureus* zo vzoriek surového mlieka experimentálnych dojníc na sledované antibiotiká pomocou diskovej metódy boli zistené na hladine významnosti  $p < 0,0035^{**}$  pre ampicilín a  $p < 0,0026^{**}$  pre linkomycín.

Tab. 5 Štatistické hodnotenie *in vitro* citlivosti izolátov *S. aureus* izolovaných z individuálnych vzoriek surového kravského mlieka v PH 1 a PH 2 (Zdroj: Vlastná tabuľka)

účinná látka antibiotika (koncentrácia)	<i>S. aureus</i> subsp. <i>aureus</i> (n =122)		
	C	R	MC
Amoxicillin-Clavulanat (20 µg + 10 µg)	p < 0,6543 ns	-	p < 0,0035 **
Ampicillin (10 µg)	p < 0,0001 ***	p < 0,0035 **	p < 0,0328 *
Erythromycin (15 µg)	p < 0,3821 ns	p < 0,7890 ns	p < 0,3827 ns
Lincomycin (10 µg)	p < 0,0026 **	p < 0,0026 **	-
Methicillin (10 µg)	-	-	-
Neomycin (30 µg)	p < 0,0151 *	-	p < 0,0151 *
Novobiocin (30 µg)	p < 0,2168 ns	p < 0,8181 ns	p < 0,0178 *
Oxacillin (5 µg)	-	-	-
Penicillin (10 IU)	p < 0,2418 ns	p < 0,1228 ns	-
Streptomycin (10 µg)	p < 0,0003 ***	-	-
Tetracycline (30 µg)	p < 0,6525 ns	-	-

C - citlivý; R - rezistentný, MC - stredne citlivý; PH 1 - Košický kraj, PH 2 - Žilinský kraj

Niektoré izoláty *S. aureus* zo vzoriek mlieka experimentálnych dojníc vykazovali strednú citlivosť na niektoré testované antibiotiká zvolenou metódou. Rozdiely boli pozorované aj medzi sledovanými produkčnými hospodárstvami, na ktorých prebiehal experiment. Jednalo sa najmä o amoxicilín-klavulanát (p < 0,0035<sup>(\*\*)</sup>), ampicilín (p < 0,0328<sup>(\*\*)</sup>), neomycín (p < 0,0151<sup>(\*)</sup>) a novobiocín (p < 0,0178<sup>(\*)</sup>). Pri erytromycíne nebola zistená štatistická významnosť p < 0,3827<sup>(ns)</sup> v strednej citlivosti tohto antibiotika na testované izoláty *S. aureus* z mlieka experimentálnych dojníc.

Najznámejší zástupca *Staphylococcus aureus* býva opakovane spájaný s etiológiou množstva infekcií a intoxikácií u zvierat a ľudí (Ball, 2002; Choi et al., 2006; Johnson et al., 2007). Predstavuje prakticky všadeprítomnú, pomerne ľahko a rýchlo zmeneným podmienkam prispôsobujúcu sa baktériu (Foster, 2004).

Venovať sa problematike výskytu *S. aureus* v surovom kravskom mlieku vrátane štúdia, či daný kmeň *S. aureus* je nositeľom génov nesúcich rezistenciu na vybrané antibiotiká, ako je napr. metilín má svoje opodstatnenie aj v súčasnosti, nakoľko tento patogénny mikroorganizmus pre mliečnu žľazu môže vyvolávať ochorenia pre človeka práve tým, že niektoré kmeň *S. aureus* vylučujú do mlieka enterotoxíny a ohrozujú zdravie konzumenta, resp. vznikajú problémy v humánnej medicíne pri liečbe ľudí antibiotikami v dôsledku sa zvyšovania rezistencie u kmeňov *S. aureus* (Vasil', 2001, 2008).

Závažným celosvetovým problémom sa hlavne v poslednom desaťročí stáva nárast rezistencie mikroorganizmov k antimikrobiálnym látkam. Pravdepodobnou príčinou tohto nepriaznivého trendu je

nadmerné a nie vždy vhodne indikované podávanie týchto látok. Nárast rezistentných izolátov je zaznamenávaný aj u stafylokokov a týka sa nielen humánnej medicíny, ale aj veterinárneho lekárstva (Karpíšková et al., 2009).

Úžasná schopnosť adaptability *S. aureus* na vonkajšie faktory prostredia, ako aj nadmerné používanie antibiotík, významne prispeli k budovaniu stafylokokovej rezistencie. Vlastníctvo faktorov virulencie udeľuje tomuto druhu schopnosť vyvolať široké spektrum infekcií. Baktérie *S. aureus* sú príčinou drobných kožných zápalov, alimentárnych intoxikácií, až po život ohrozujúce pneumónie, osteomyelitídy, syndrómy toxického šoku, bakteriálne endokarditídy a septické stavy. Nachádzame ich ako nosičské kmene na nosovej sliznici, asi u tretiny ľudskej populácie, na koži, v prostredí, ale aj v potravinách (Líšková a kol., 2001).

Za posledných 50 rokov *S. aureus* úspešne odolával antimikrobiálnej chemoterapii a prekonal všetky terapeutické prostriedky (Hiramatsu et al., 2001).

Na prelome 21. storočia boli odhalené jeho genómové sekvencie a vedci začali využívať genetické poznatky v liečbe a prevencii stafylokokových infekcií. Zavedenie penicilínu do klinickej praxe v roku 1942, pomohlo obmedziť rozširovanie stafylokokov, avšak už v roku 1947 sa objavil prvý rezistentný kmeň. Ako uvádza Jevons (1961), v roku 1959 sa podarilo vyvinúť nové polosyntetické beta-laktámové antibiotikum – metilín a už v roku 1961 bol zaznamenaný vo Veľkej Británii prvý výskyt metilín-rezistentný *S. aureus*, ktorý sa začal pomaly rozširovať. Novú nádej priniesol v 80-tych rokoch objav vankomycínu, ktorý sa však začal nekontrolovane predpisovať a používať, čo viedlo k vzniku rezistencie aj na vankomycín (Hattori et al., 2001; Hiramatsu et al., 1997).



Multirezistentné kmene *S. aureus* sa častejšie vyskytujú v humánnej medicíne, aj keď nárast týchto izolátov sa čoraz častejšie zaznamenáva aj vo veterinárnom lekárstve a prevalencia týchto kmeňov je rôzna v rôznych regiónoch (**Karpíšková et al., 2009**).

Ako uvádzajú vo svojej štúdií Gentilini et al. (2000), 64 % izolátov získaných z bovinných mastitíd bolo rezistentných na jedno alebo viac antibiotík, pričom žiadne z týchto izolátov neboli rezistentné na oxacilín, cefalosporín a kombináciu ampicilín-sulbaktám. Na penicilín, gentamicín a erytromycín zaznamenali 40,3 % rezistenciu. Vyššiu rezistenciu humánnych izolátov *S. aureus* popísali **Normano et al. (2007)**, 58,7 % na ampicilín, 42 % na erytromycín a 34,9 % izolátov bolo rezistentných na tetracyklín. Podobne vysokú rezistenciu v izolátoch

*S. aureus* z bovinných mastitíd na erytromycín (93,1 %), linkomycín (45,8 %), spiramycín (41,7 %) a klindamycín (36,1 %) zaznamenali **Wang et al. (2008)**.

V našej práci sme u koagulázopozitívnych kmeňov *S. aureus* izolovaných z individuálnych vzoriek surového kravského mlieka zistili, že všetky izoláty *S. aureus* boli citlivé voči metilicínu a oxacilínu (100 %), nad 90 % bola citlivosť zistená pri antibiotiku typu amoxicilín-klavulanát (95,90 %). Linkomycín a streptomycín boli účinné na 86,89 %, resp. 83,61 % izolátov *S. aureus* zo vzoriek mlieka experimentálnych dojníc. U ostatných sledovaných antibiotík bola citlivosť na izoláty *S. aureus* nižšia a napr. penicilín bol účinný len u 54,92 % izolátov *S. aureus* z individuálnych vzoriek mlieka dojníc získaných na obidvoch produkčných hospodárstvach.

Na penicilín a ampicilín bolo 26,22 % resp. 16,40 % izolátov *S. aureus* zo vzoriek mlieka experimentálnych dojníc rezistentných. Na tetracyklín resp. erytromycín bolo citlivých 75,41 % resp. 72,95 % nami izolovaných kmeňov *S. aureus* z individuálnych vzoriek surového kravského mlieka. Naše dosiahnuté výsledky sa zhodujú aj s výsledkami, ktoré udáva **Vasil' et al. (2007)**.

Metódou PCR sme rovnako zistili, že izoláty *S. aureus* nie sú nositeľmi génu *mecA*, ktorý určuje metilicínovú rezistenciu. Tieto naše údaje sú v rozpore s údajmi **Leeho (2003)**, ktorý u kmeňov *S. aureus* izolovaných z kráv uvádza až 53 % izolátov pozitívnych pre *mecA* gén. **Lee (2003)** popísal najväčší počet pozitívnych izolátov MRSA u hovädzieho dobytku v Kórei, pričom väčšina kmeňov pochádzala z mlieka, ale len časť kráv s pozitívnymi nálezmi *S. aureus* vykazovala známky mastitídy. Tieto výsledky na jednej strane korelujú s našimi výsledkami, ktoré sme zistili pri izolácii *S. aureus* z parenchýmu mliečnej žľazy aj napriek tomu, že u nami izolovaných kmeňov *S. aureus* sme nezistili PCR metódou gén pre rezistenciu na metilicín a na druhej strane, kmene boli na metilicín citlivé. V Maďarsku boli zistené výsledky, ktoré poukázali na to, že MRSA kmene *S. aureus* boli izolované z mlieka kráv so známkami subklinickej mastitídy (**Juhász-Kaszanyitzky, 2007**).

Kontaminované potraviny živočíšneho pôvodu vrátane mlieka, predstavujú riziko infekcie MRSA pre ľudí len vzácnne, ale aj tu existuje potenciálne nebezpečenstvo prenosu týchto kmeňov na pracovníkov v potravinárstve. Izoláty MRSA kmeňov boli zistené vo vzorkách mlieka a syrov (**Lee, 2003; Normanno, 2007; van Loo, 2007**).

Prítomnosť *S. aureus* bola preukázaná napríklad v kravskom mlieku a v mliečnych výrobkoch v Taliansku; kontaminované boli najmä syry – mozzarella a pecorino (**Normanno et al., 2005; Firinu et al., 2003**).

**Kerouanton et al. (2007)** zistili, že z 33 izolátov *S. aureus* izolovaných od ľudí a oviec pri podozrení na otravu jedlom boli dva izoláty (6 %) rezistentné na metilicín. Ako uvádza **Jones et al. (2002)**, aj keď už boli popísané dva prípady ochorenia z kontaminovaných potravín MRSA, v ktorých bol zdrojom kontaminácie potravinársky pracovník kolonizovaný týmito baktériami, vznik ochorenia v súvislosti s konzumáciou potravín kontaminovaných MRSA sa však zatiaľ nepovažuje za príliš pravdepodobný.

Kmene MRSA sú veľkým globálnym klinickým a ekonomickým problémom.

V sedemdesiatych rokoch sa v humánnej medicíne MRSA kmene stali prakticky po celom svete hlavnou príčinou nozokomiálnych infekcií. Opakovaná liečba antibiotikami indukuje expresiu *mecA* kmeňov a dochádza k rýchlemu šíreniu stafylokokov v nemocniciach. Dôležitý je fakt, že tieto kmene kolonizujú nemocničný personál, ktorý je potenciálnym zdrojom nákazy pre pacientov. Osídľujú aj dýchací trakt a sekréty z pľúc sa môžu prenášať kašľaním a kýchaním (**Gosbell et al., 2001**).

Epidemiologický význam MRSA vo svete stále stúpa. Napríklad v USA stúpol výskyt MRSA z 2,4 v roku 1975 na alarmujúcich 40 - 60 % po roku 1990. V Európe udávajú škandinávské krajiny výskyt stále okolo 1 %, naopak Španielsko, Taliansko, Francúzsko viac ako 30 %. V roku 2006 zaznamenali v Taliansku až 40 % prevalenciu tohto patogéna (**Normanno et al., 2007**).

Ako uvádza **Karpíšková et al. (2009)** v Českej republike bol prvý krát v nemocniciach zaznamenaný výskyt MRSA v roku 2001, kedy bolo hlásených 6 %, v roku 2005 to bol už viac ako dvojnásobok (13 %).

V slovenských nemocniciach podľa dostupných výsledkov z rôznych monitorovacích štúdií (ESAR, EARSS) sa výskyt MRSA pohybuje v intervale 5 - 8 %. U kmeňov *S. aureus* získaných z komunitných respiračných infekcií je výskyt MRSA približne 0,5 % (**Líšková et al., 2004**). Kmene MRSA spôsobujú v nemocničných zariadeniach závažné problémy, často vykazujú rezistenciu k celej rade antimikrobiálnych látok a tým značne komplikujú prípadnú liečbu pacientov.

Rozvoj rezistencie k β-laktámovým antibiotikám a jej široké spektrum u MRSA má ničivý dopad na liečbu stafylokokových infekcií a je spôsobená modifikáciou proteínu PBP2a, ktorý sa vyznačuje nízkou afinitou k β-laktámovým antibiotikám, ktorými sú napríklad oxacilín, kloxacilín, dikloxacilín, floxacilín, metilicín, a nafcilín a k penicilínom rezistentným voči penicilináze (**Katayama, 2000; Hartman a Tomasz, 1981; Archer et al., 1994**).

Podstata rezistencie spočíva v tom, že v prítomnosti β-laktámových antibiotík jedine PBP2a zostáva aktívny, ostatné PBP sú inaktivované, pretože majú vysokú afinitu k týmto antibiotikám a rýchlo sa acylujú aj za nízkej koncentrácie antibiotika. PBP2a katalyzuje zosieťovanie peptidoglykánových monomérov v bunkovej stene a preberá tak úlohu v jej syntéze (**Berger-Bächi a Rohrer, 2002**). Ako uvádza **Pinho et al. (2001)**, vysoký stupeň rezistencie je dosiahnutý, len keď PBP2a spolupracuje s transglykozyázovou doménou (TGáza) natívneho proteínu PBP2 necitlivou k penicilínu.

Modifikácia proteínu PBP2a u stafylokokov je kódovaná génom *mecA*, ktorý sa nachádza na stafylokokovej chromozómálnej kazete (SCC*mec*) a je horizontálne prenosný (Katayama, 2000). Tento spôsob prenosu je hlavným mechanizmom, uplatňujúcim sa pri šírení rezistencie na meticilín, medzi rôznymi druhmi stafylokokov (Silva, 2001).

Stafylokoková chromozómová kazeta SCC*mec* je významným stafylokokovým ostrovom patogenity SAPI (21-67 kb), ktorý je špecificky začlenený do chromozómu v mieste *attB*SCC blízko začiatku replikácie (Ito et al., 1999). SCC*mec* je preferovaným miestom, kde sa začleňujú mobilné genetické elementy. Integráciou SCC*mec* do genómu *S. aureus* vzniká meticilín-rezistentný kmeň, ktorý je odolný voči takmer všetkým β-laktámovým antibiotikám (Hiramatsu et al., 2001), ktoré sa používajú tak v humánnej ako aj veterinárnej medicíne.

MRSA kmene dlhodobo prežívajú v prostredí a môžu byť zdrojom vzniku a šírenia rezistencie na ďalšie mikroorganizmy. V posledných rokoch sa stále častejšie používajú čistiace prípravky s antibakteriálnym účinkom, ktoré môžu podobne ako antibiotiká blokovать špecifické receptory pre syntézu mastných kyselín. Niektoré štúdie uvádzajú, že časté používanie antibakteriálnych prostriedkov v prostredí môže viesť k zvýšeniu rezistencie mikroorganizmov k antibiotikám, napríklad izoláty *S. aureus* s nižšou citlivosťou na kationaktívny tenzid - benzalkoniumchlorid, sú tiež rezistentné k beta-laktámovým antibiotikám. Je teda pravdepodobné, že časté požívanie tejto látky v prostredí môže prispievať aj k častejšiemu výskytu MRSA v prostredí (Karpíšková et al., 2009).

### ZÁVER

Základom výroby kvalitného mlieka, ako východiskovej suroviny pre ďalšie spracovanie, je dobrý zdravotný stav mliečnej žľazy dojníc, pričom práve ochorenie mliečnej žľazy je v dnešnej dobe najväčším zdravotným problémom v chovoch dojníc a chovateľ, aby mohol produkovať mlieko vysokej kvality, musí ho získavať od zdravých jedincov (Bradley, 2002). Všeobecne je známe, že častý výskyt zápalov mliečnej žľazy dojníc, je aj v súčasnosti jedným z dôležitých faktorov, ktorý nielen negatívne ovplyvňuje celkový zdravotný stav dojníc, ale výrazne zasahuje aj do oblasti kvality mlieka.

Infekčná mastitída kráv (*Mastitis infectiosa bovum*) je podľa Medzinárodnej mliekárenskej federácie (IDF, 1971) definovaná ako zápalová zmena mliečnej žľazy, ktorá je okrem fyzikálnych, chemických a mikrobiologických zmien charakterizovaná aj vzostupom počtu somatických buniek, obzvlášť leukocytov v mlieku a patologickými zmenami v tkanive mliečnej žľazy (Vasiľ, 2001).

Uvádza sa, že *S. aureus* je najčastejšie izolovaným pôvodcom mastitíd vo svete (Hutton et al., 1990; Bradley a Green, 2002), mastitídy vyvolané zárodkami *S. aureus* sa na Slovensku vyskytujú v rozpätí od 10,0 do 25,0 % v závislosti na lokalite (Vasiľ, 2001).

Vzhľadom k tomu, že v súčasnej dobe, pokiaľ je nám známe, nie sú k dispozícii štatistické údaje o pôvodcoch mastitíd kráv na Slovensku, nakoľko "Program prevencie

a tlmenia mastitíd" bol na Slovensku posledný krát vypracovaný v roku 1991 a to na roky 1992 – 1993. Od tejto doby nie sú k dispozícii prehľadné a potrebné údaje. V surovom kravskom mlieku bol v rôznych štúdiách potvrdený výskyt 4 - 12 % toxínogénnych kmeňov *S. aureus*, vyššie percento sa vyskytlo len medzi izolátmi z akútnych mastitíd. Vo Francúzsku v regióne Cammembert boli zo 62 % vzoriek surového kravského mlieka izolované stafylokoky, ale aj iní autori izolovali stafylokoky až zo 61 % odobratých vzoriek surového mlieka (Desmaures et al., 1997; Ombui et al., 1992).

Konkrétna situácia výskytu jednotlivých bakteriálnych pôvodcov mastitíd je v rôznych chovoch dojníc rozdielna a závisí od troch biosystémov – dojnica, prostredie, mikroorganizmy a od uplatňovania protimastitídnych programov (Hofírek a Haas, 2003).

Zabezpečovanie racionálnej výživy ľudskej populácie kladie zvýšené nároky na dosahovanie dobrej kvantitatívnej, ale najmä kvalitatívnej úrovne surového kravského mlieka. Kvalita mlieka ako vstupnej suroviny je súborom všetkých vlastností mlieka, ktoré sú významné pre konzumentov i spracovateľov, čiže spĺňajú potravinársko-technologické, nutrično-fyziologické a hygienické hľadiská. Tieto hľadiská sa koncentrujú na hygienické požiadavky, optimálne chemické zloženie, na vyhovujúce chemické, fyzikálne, technologické a senzorické vlastnosti surového mlieka ako suroviny na ďalšie spracovanie pre výživu ľudí.

Aj napriek tomu, že v nami izolovaných a potvrdených kmeňoch *S. aureus* z individuálnych vzoriek surového kravského mlieka od experimentálnych dojníc sme ani v jednom prípade nezistili metódou PCR, že izoláty *S. aureus* sú nositeľmi génu *mecA*, ktorý určuje meticilínovú rezistenciu, je potrebné sa tejto problematike venovať aj naďalej, a to najmä v súvislosti s možným vznikom ekologických mliečnych fariem, resp. už aj dnes na niektorých miestach Slovenska prebiehajúcim predajom mlieka priamo z farmy prostredníctvom mliečnych automatov.

### Acknowledgments:

This work was supported by grant project KEGA MŠ SR 3/128-001UVL-4/2010 a VEGA VEGA MŠ SR č. 1/0638/09.

### LITERATÚRA

ANDERSON, J. C. 1990. *Staphylococcus*. In Gyles, C. L. and Thoen, C. O. (eds) Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals. Iowa State University Press, Ames, IA, 1990, 2nd edn, p. 14-20.

ARCHER, G. L., NIEMEYER, D. M., THANASSI, J. A., PUCCI, M. J. 1994. Dissemination among *staphylococci* of DNA sequences associated with methicillin resistance. In *Antimicrob. Agents Chemother.*, 38, 1994, p. 447-454.

BALL, D. 2002. Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* now a major pathogen in PEG site infections. In *Am. J. Gastroent.*, 97, (7) 2002, p. 1713-1716.

BEEKHUIZEN, H., GEVEL, J. S., OLSSON, B., BENTEN, I. J., FURTH, R. 1997. Infection of human vascular endothelial cells with *Staphylococcus aureus* induces hyperadhesiveness for human monocytes and granulocytes. In 38, *J. Immunol.*, 158 (2), 1997, p. 774-782.

BERGER-BÄCHI, B., ROHRER, S. 2002. Factors influencing methicillin resistance in *staphylococci*. In *Arch. Microbiol.*, 178, 2002, p. 165-171.

- BRADLEY, A. J. 2002. Bovine mastitis: An Evolving Disease. In *Veterinary J.*, 164, 2002, p. 116-128.
- BRADLEY, A. J., GREEN, M. J. 2002. The Changing of *E. coli* Mastitis. *Satelit Symposium, XXII WBC*. Hannover: Novel Aspects of Mastitis Therapy, 2002, p. 4-11.
- BRAMLEY, A. J., MCKINNON, C. H., STAKER, R. T., SIMPKIN, D. L. 1984. The effect of udder infection on the bacterial flora of the bulk milk of ten dairy herds. In *J. Appl. Bacteriol.*, 57, 1984, p. 317-323.
- BURDOVÁ, O. 2001. *Hygiena a technológia mlieka a mliečnych výrobkov*. Košice: UVL, 2001, 342 p.
- CARDOSO, H. F., SILVA, N., SENA, M. J., CAMARO, L. S. 1999. Production of enterotoxins and toxic shock syndrome toxin by *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Brazil. In *Let. Appl. Microbiol.*, 29, (5) 1999, p. 347-349.
- CROSSLEY, K. B., ARCHER, G. L. 1997. *The staphylococci in human disease*. New York: Churchill Livingstone. 1997.
- CUNNINGHAM, R., COCKAYNE, A., HUMPHREYS, H. 1996. Clinical and molecular aspects of the pathogenesis of *Staphylococcus aureus* bone and joint infections. In *J. Med. Microbiol.*, 44, 1996, p. 157-164.
- DESMASURES, A., BAZIN, F., GUEGUEN, M. 1997. Microbiological composition of raw milk from selected farms in the Camembert region of Normandy. In *J. Appl. Microbiol.*, 83, 1997, p. 53-58.
- EN ISO 6888-1:1999, Mikrobiológia – Stanovenie počtu koagulázapozitívnych stafylokokov (*Staphylococcus aureus* a ďalšie druhy), horizontálna metóda s použitím Baird-Parkerovho agarového média.
- FIRINU, A., VIRGILIO, S., MULA, G., POGGIO, A., ZUCCON, D., PIRINO, T., SIAS, S., NORMANNO, G., DAMBROSIO, A., QUAGLIA, N. C. et al. 2003. Presenza e caratterizzazione enterotossica di *Staphylococcus aureus* in alimenti di origine animale. *Industrie Alimentari XLII*, 2003, p. 613-617.
- FOSTER, T. J. 2004. The *Staphylococcus aureus* „superbug“. In *J. Clinin. Invest.*, 114, (12) 2004, p. 1693-1696.
- GARCIA, M. L., MORENO, B., BERGDOLL, M. S. 1980. Characterization of staphylococci isolated from mastitic cows in Spain. In *Appl. Environm. Microbiol.*, 1980, p. 548-553.
- GOSBELL I. B., MERCER J. L., NEVILLE S. A. 2001. Non-multiresistant and multiresistant methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in community-acquired infections. In *Med. J.*, 174, 2001, p. 627-630.
- HAGE, K., TRAN, T. N. 2004. Isolation of *Staphylococcus aureus* from ron & postenrised milk. In *California State Sci. Fair J.*, 2004, p. 1311,
- HARTMAN, B., TOMASZ, A. 1981. Altered penicillin-binding proteins in methicillin-resistant strains of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. In Agents Chemother.*, 19, 1981, p. 726-735.
- HATTORI, M., OGASAWARA, N., HAYASHI, H., HIRAMATSU, K. 2001. Whole genome sequencing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. In *Lancet*, 357, 2001, p. 1225-1240.
- HEIN, I., JORGENSEN, H. J., LONCAREVIC, S., WAGNER, M. 2005. Quantification of *Staphylococcus aureus* in unpasteurised bovine and caprine milk by real-time PCR. In *Res. Microbiol.*, vol. 156, no. 4, 2005, p. 554-563.
- HIRAMATSU, K., HANAKI, H., INO, T., YABUTA, K., OGURI, T., TNOVER, F.C. 1997. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strain with reduced vancomycin susceptibility. In *J. Antimicrob. Chemother.*, 40, 1997, p. 135-136.
- HIRAMATSU, K., CUI, L., KURODA, M., ITO, T. 2001. The emergence and evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. In *Trends Microbiol.*, 9, 2001, p. 486-493.
- HOFÍREK, B., HAAS, D. 2003. Kategorizace zdraví mléčné žlázy, klinické formy mastitid a jejich terapie. In *Sborník referátů odborného semináře Mastitidy skotu*. Brno 3. 5. 2003, 31, p. 10-23.
- HUTTON, C. T., FOX, L. K., HANCOCK, D. D. 1990. Mastitis control practices: Differences between herds with high and low milk somatic cell counts. In *J. Dairy Sci.*, 73, 1990, p. 1135.
- CHOI, C. S., YIN, C. S., BAKAR, A. A. 2006. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus* among healthy adults. In *J. Microbiol. Immunol. Infect.*, 39, 2006, p. 458-464.
- INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION 1971. A monograph on bovine mastitis. Part 1. Economist, aetiology and diagnosis, *International Dairy Federation Annual Bulletin*, 1971.
- ITO, T., KATAYAMA, Y., HIRAMATSU, K. 1999. Cloning and nucleotide sequence determination of the entire mec DNA of pre-methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* N315. In *Antimicrob. Agents Chemother.* 43, 1999, p. 1449-1458.
- JEVONS, M. P. 1961. 'Celbenin'- resistant staphylococci. In *Br. Med. J.*, 1, 1961, p. 124-125.
- JOHNSTON, C. P., STOKES, A. K., ROSS, T. 2007. *Staphylococcus aureus* colonization among healthcare workers at a tertiary care hospital. In *Infect. Control Hosp. Epidemiol.*, 28, 2007, p. 1404-1407.
- JONES, T. F., KELLUM, M. E., PORTER, S. S., BELL, M., SCHAFFNER, W. 2002. An outbreak of community-acquired foodborne illness caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. In *Emerging Infectious Diseases*, 8, 2002, p. 82-84.
- JØRGENSEN, H. J., MØRK, T., HØGÅSEN, H. R., RØRVIK, L. M. 2005. Enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in bulk milk in Norway. In *J. Appl. Microbiol.*, 99, (1) 2005, p. 158-166.
- JUHÁSZ-KASZANYITZKY, E., JANOSI, S., SOMOGYI, P., DAN, A., GRAAF-VAN, BLOOIS, L., DUIJKEREN, E., WAGENAAR, J. A. 2007. MRSA transmission between cows and humans. *Emerging Infectious Diseases*, 13, 2007, p. 630-632.
- KARPÍŠKOVÁ, R., ŠTÁSTKOVÁ, Z., KARPÍŠKOVÁ, S. 2009. Nálezy metilicilin rezistentních *Staphylococcus aureus* u zvířat. In *Veterinářství*, 59, 2009, p. 34-38.
- KATAYAMA, Y., ITO, T., HIRAMATSU, K. 2000. A new class of genetic element, staphylococcus cassette chromosome mec, encodes methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. In *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44, 2000, p. 1549-1555.
- KEROUANTON, 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. In *Int. J. Food Microbiol.* 115, 2007, 3, p. 369-375.
- KIŠŠOVÁ, M. 2008. Molekulárna podstata rezistencie kmeňov *Staphylococcus aureus* na metilicilín: Bakalárska práca, Brno: Masarykova univerzita, 2008, 57 p.
- KRASUSKI, A., MICHNOWSKA-SWINCOW, E., JARZEMBOWSKI, T. 2007. Cytidine deamination assay to differentiate *Staphylococcus aureus* from other staphylococci. In *Let. Appl. Microbiol.*, 45, (5) 2007, p. 497-503.

- LEE, J. H. 2003. Methicillin (oxacillin)-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from major food animals and their potential transmission to humans. In *Appl. Environ. Microbiol.*, 69, 2003, p. 6489-6494.
- LE LOIR, Y., BARON, F., GAUTIER, M. 2003. *Staphylococcus aureus* and food poisoning. In *Genet. Mol. Res.*, 312, (1) 2003, p. 63-76.
- LEMBO, A., KALIS, C., KIRSCHNING, C. J., MITOLO, V., JIRILLO, E., WAGNER, H., GALANOS, C., FREUDENBERG, M. A. Differential contribution of Toll-like receptors 4 and 2 to the cytokine response to *Salmonella enteritica* serovar *Typhimurium* and *Staphylococcus aureus* in mice. In *Infect. Immun.*, 71, (10), 2003, p. 6058-6062.
- LÍŠKOVÁ, A., DUBAJOVÁ, V., GLOSOVÁ, L., HANZEN, J., HUPKOVÁ, H., MACĚKOVÁ, L., MOLOKÁČOVÁ, M., NOVÁKOVÁ, E., PURGELOVÁ, A. 2004. Mení sa stav citlivosti najčastejších respiračných patogénov na antiinfekčné liečivá? In *Lekársky Obzor*, 53 (10), 2004, p. 369-371.
- MARTINEAU, F., PICARD, F. J., ROY, P. H., QUELLETTE, M., BERGERON, M. G. 1998. Species-specific and ubiquitous-DNA-based assays for rapid identification of *Staphylococcus aureus*. In *J. Clin. Microbiol.*, 36, 3, 1998, p. 618-623.
- MINOR, T. E., MARTH, E. H. 1976. *Staphylococci* and their significance in food. Elsevier Scient. Publ. Inc., Amsterdam, 1976, p. 99-125.
- MINOR, T. E., MARTH, E. H. 1972. *Staphylococcus aureus* and staphylococcal food intoxications. A review III. *Staphylococci* in dairy food. In *J. Milk Food Technol.*, 35, 1972, p. 77-81.
- NATIONAL COMMITTEE for CLINICAL LABORATORY STANDARDS (NCCLS) M31-A2. 2002. Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility test for bacteria isolated from animals approved standards. NCCLS, Wayne, Pa, USA, 2002.
- NORMANNO, G., CORRENTE, M., SALANDRA, G., DAMBROSIO, A., QUAGLIA, N. C., PARISI, A., GRECO, G., BELLACICCO, A. L., VIRGILIO, S., CELANO, G. V. 2007. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in foods of animal origin product in Italy. In *International J. Food Microbiology*, 117, 2007, p. 219-222.
- OLIVEIRA, D. C., MILHEIRICO, C., DE LENCASTRE, H. 2006. Redefining a structural variant of *staphylococcal* cassette chromosome *mec*, SCC*mec* type VI. *Antimicrob. In Agents Chemother.* 50, 2006, p. 3457-3459.
- OMBUI, J. N., ARIMI, S. M., KAYIHURA M. 1992. Raw milk as a source of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* and enterotoxins in consumer milk. In *East. Afr. Med. J.*, 69, 1992, p. 123-125.
- PINHO, M., DE LENCASTRE, H., TOMASZ, A. 2001. An acquired and a native penicillin-binding protein cooperate in building the cell wall of drug-resistant *staphylococci*. In *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98, 2001, p. 10886-10891.
- PYÖRÄLÄ, S. 2002. New strategies to prevent mastitis. In *Reprod. Domest. Anim.*, 37, (4) 2002, p. 211-216.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E. F., MANIATIS, T. 1989. *Molecular Cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor. New York, 253 p.
- SHOSHANI, E., LEITNER, G., HANOCHI, B., SARAN, A., SHPIGEL, N. Y., BERMAN, A. 1999. Mammary infection with *Staphylococcus aureus* in cows: progress from inoculation to chronic infection and its detection. In *J. Dairy Res.*, 97, (2) 1999, p. 155-169.
- SILVA, F. R. 2001. Isolation and molecular characterization of methicillin resistant coagulase negative staphylococci from nasal flora of healthy humans at three community institutions in Rio de Janeiro City. In *Epidemiology and Infection*, 127, 2001, p. 57-62.
- SMITANDI, A., STERNESJÖ, A. 2004. Prevalence of multidrug resistant *Staphylococcus aureus* in milk from large- and small-scale producers in Kenya. In *J. Dairy Sci.*, 87, 2004, p. 4145-4149.
- SOOMRO, A. H., ARAIN, M. A., KHASKHELI, M., BHUTTO, B., MEMON, A.Q. 2003. Isolation of *Staphylococcus aureus* from milk products sold at sweet-meat shops of Hyderabad (Pakistan). In *On Line J. Biol. Sci.*, 3, (1), 2003, p. 91-94.
- STROMMINGER, B., KETTLITZ, C., WERNER, G., WITTE, W. 2003. Multiplex PCR assay for simultaneous detection of nine clinically relevant antibiotic resistance genes in *Staphylococcus aureus*. In *J. Clin. Microbiol.*, 41, (9) 2003, p. 4089-4094.
- TSEN, H. Y., Yu, G. K., HU, H. H. 1997. Comparison of type enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* strains isolated from geographically far distant locations by pulsed field gel electrophoresis. In *J. Appl. Microbiol.*, 82, (4), 1997, p. 485-493.
- VAN LOO, I. H., DIEDEREN, B. M., SAVELKOUL, P. H., WOUDEBERG, J. H., ROSENDAAL, R., VANBELKUM, A., LEMMENS-DEN TOOM, N., VERHULST, C., VANKEULEN, P. H., KLUYTMANS, J. A. 2007. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in meat products, the Netherlands. In *Emerging Infectious Diseases*, 13, 2007, p. 1753-1755.
- VASIE, M. 2001. *Mastitidy*. In: Choroby hovädzieho dobytku. Prešov: Vydavateľstvo M & M, 2001, s. 673-717.
- VASIE, M. 2007. Comparison of etiology of environmental mastitis in two herds of dairy cows. In *Slovak J. Anim. Sci.*, 40, (3), 2007, p. 132-140.
- VASIE, M., ELEČKO, J., FOTTA, M., BÍREŠ, J. 2008. Možnosti ovplyvnenia výskytu mastitíd u dojníc chovaných vo veľkovýrobných podmienkach. In: Zb. Ekológia a veterinárna medicína. UVL Košice, 2008, p. 303-308. ISBN 978-80-8077-084-6.
- WANG, Y., WU, C. M., LU, L. M., REN, G. W., CAO, X. Y., SHEN, J. Z. 2008. Macrolide-lincosamide-resistant phenotypes and genotypes of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine clinical mastitis. In *Vet. Microbiol.*, 130, (1-2), 2008, p. 118-125.

**Contact address:**

MVDr. Pukáčová Jana, Regional Veterinary and Food Administration Dolný Kubín, Pelhřimovská 2055/7, 02601 Dolný Kubín, Slovakia, E-mail: jana.pukacova@gmail.com

MVDr. Lucia Poľaková, University of Veterinary Medicine and Pharmacy, Institute of Hygiene and technology of milk, Komenského 73, 041 81 Košice, Slovakia, E-mail: polakova@uvm.sk

doc. MVDr. Eva Dudriková, PhD., University of Veterinary Medicine and Pharmacy, Institute of Hygiene and technology of milk, Komenského 73, 041 81 Košice, Slovakia, E-mail: dudrikova@uvm.sk

**POLYPHENOLS IN CHOSEN SPECIES OF LEGUMENS – A REVIEW***Mária Timoracká, Alena Vollmannová, Judita Bystrická***ABSTRACT**

Legumes belongs to the most important grain for human consumption. They have been cultivated for thousands of years, and have played an important role in the traditional diets of many regions throughout the world. The most legumes are widely consumed in fresh and processed forms. The traditional way of legume preparation includes soaking in water following by cooking and are usually consumed boiled as soup, occasionally as roasted grains too.

Legume are widely known for their nutraceutical value, but there is relatively little information about their polyphenols content (with the exception of soya). In spite of the fact that phenolics in general are not the substances with nutritious value, the interest in them is still persisting for their positive effects on human health. For these reasons this short review is focused on summary of legume polyphenols – identification and quantification of phenolic acids, flavonoids and tannins in raw or processed legumes and their role in these crops. Monitoring and surveying of the changes of polyphenolic compounds contents thus complete knowledge about bioactive substances content in legumes species. And seeing that legumes are considered an ideal complement to cereals in diets, they gain increasing attention as functional food items.

**Keywords:** legume, polyphenol, extraction

**ÚVOD**

Vzhľadom na vzrastajúci záujem odbornej, ale i laickej verejnosti o vzťahy medzi stravou a zdravím človeka, sa v poslednom období venuje zvýšená pozornosť potravinám s preukázateľným a účinným antioxidantným pôsobením. Medzi neesenciálnymi potravinovými antioxidantmi je najpočetnejšie zastúpená skupina fenolických a polyfenolických látok. Primárnym záujmom vedeckého výskumu je zistenie výskytu polyfenolov v našej strave, bilancia ich potravinového príjmu, objasnenie vzťahu medzi príjmom fenolických látok a vývojom zdravotného stavu populácie a ich možného spolupôsobenia v prevencii niektorých druhov ochorení spájaných s oxidačným stresom. Táto problematika je v súčasnom období riešená v prácach mnohých zahraničných odborníkov a v tejto súvislosti sú výskumu podrobené aj strukoviny.

Vo svete sa pozornosť zameriava na sóju a výrobky z nej, z dôvodu variabilnosti možných úprav a obsahu potenciálnych chemoprotektívnych látok pôsobiacich preventívne proti civilizačným chorobám. Na Slovensku sa pestovanie strukovín orientuje vo väčšej miere na hrach a fazuľu, či už v plnej zrelosti alebo vo forme nezrelých strukov, pričom ročná spotreba je 1,2 - 2 kg strukovín na jedného obyvateľa (Chrenková et al., 2003), kým v ostatných štátoch Európy je to 2,2 - 3,4 kg strukovín na jedného obyvateľa (Kusnyer, 1992).

O obsahu fenolických látok v semenách strukovín je málo publikovaných prác. Rovnako znalosti o ich zložení nie sú úplne skompletizované. Preto sme sa v tejto práci referate zamerali na poskytnutie prehľadu o obsahu bioaktívnych látok v troch druhoch strukovín – v hrachu a vo fazuli ako tradičných slovenských strukovín, ale tiež v sóji pre jej globálne využitie. Uvedené druhy strukovín svojou fenolickou skladbou a pestrou paletou výrobkov ponúkajú zaujímavú inšpiráciu pre výživu konzumentov.

**PREHLAD LITERATÚRY****1. Fenolické kyseliny v strukovinách**

Fenolické kyseliny patria do skupiny fenolových antioxidantov bežne sa vyskytujúcich v rastlinnej ríši.

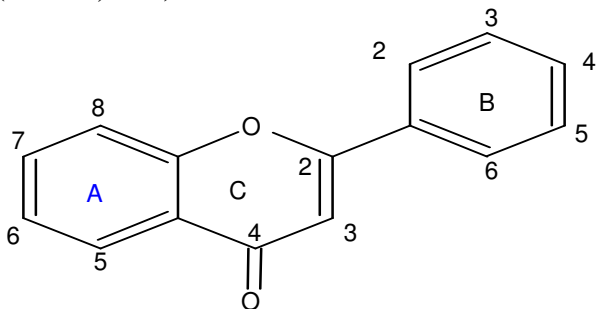
I keď sú štruktúrne odlišné od formálneho zloženia flavonoidov, s ohľadom na ich biochemickú príbuznosť a častý spoločný výskyt sa zaraďujú medzi polyfenolické látky. Z hľadiska chemickej štruktúry sú fenolické kyseliny odvodené od kyseliny benzoovej a kyseliny škoricovej (Liu, 2004). V rastlinách sa nachádzajú buď vo forme voľnej, rozpustnej konjugovanej (esterovo viazané na sacharidové zložky) alebo viazanej (spojené kovalentnými väzbami so zložkami bunkovej steny). Technologické spracovanie potravín tepelnou úpravou, pasterizáciou a mrazením prispieva k uvoľňovaniu fenolických kyselín z väzieb (Liu, 2004), ale celkový obsah kyselín sa tepelným spracovaním mení len v nepatrnej miere (Luthria, Pastor-Corrales, 2006). Straty vylúhovaním do namáčacej vody tvoria menej ako 2 % z celkového podielu kyselín. Koncentrácia voľných kyselín v ovocí a rastlinných materiáloch sa zvyšuje aj fermentačným procesom a skladovaním (Dávidek, 1983).

Fenolické kyseliny prispievajú k charakteristickej kyslej a adstringentnej chuti strukovín. Sú lokalizované v osemeni a ich obsah závisí od typu a druhu strukoviny (Hagerman et al., 1998). Troszyńska a Ciska (2002) sledovali zloženie a obsah fenolických kyselín v semenách bielych a farebných typov hrachu. Celkový obsah fenolických kyselín (voľných aj viazaných) bol vyšší vo farebných odrodách hrachu (78,53 mg.kg<sup>-1</sup> sušiny), v porovnaní s odrodami hrachu s bielym osemením (17,17 mg.kg<sup>-1</sup> sušiny). Vo farebných typoch analyzovaných vzoriek prevládali deriváty kyseliny hydroxybenzoovej (kyselina protokatechová, syringová, vanilová), zatiaľ čo v prípade bielych odrôd hrachu mali dominantné postavenie deriváty kyseliny škoricovej (kyselina ferulová, p-kumárová). Fenolické kyseliny sa v oboch typoch hrachu nachádzali vo forme voľnej, ako aj esterovo viazané. Glykozidová väzba bola dokázaná iba v prípade kyseliny protokatechovej. Koncentrácia voľných kyselín bola približne šesťkrát vyššia (46,36 mg.kg<sup>-1</sup> sušiny) vo farebných hrachoch ako v bielych typoch (7,75 mg.kg<sup>-1</sup> sušiny), a aj obsah esterovo viazaných kyselín bol asi trikrát vyšší (16,45 mg.kg<sup>-1</sup> sušiny) vo farebných odrodách ako v bielych odrodách hrachu (5,31 mg.kg<sup>-1</sup> sušiny). Podľa Orsáka et al. (2000) sú v semenách hrachu prítomné kyseliny 2,3-dihydroxybenzoová, m-hydroxybenzoová, vanilová a sinapová. Troszyńska et al. (2006) v

acetónových extraktoch fazule, šošovice a zeleného hrášku identifikovali kyselinu p-kumárovú, ferulovú a sinapovú, v extrakte zeleného hrášku aj kyselinu kávovú a vanilovú. **Luthria a Pastor-Corrales (2006)** potvrdili prítomnosť kyseliny ferulovej, p-kumárovej a sinapovej v pätnástich odrodách suchej fazule. V dvoch odrodách bola v merateľnom množstve detegovaná aj kyselina kávová. Celkový obsah fenolických kyselín sa pohyboval v rozmedzí 191 až 483 mg.kg<sup>-1</sup> suchej vzorky. Najvyššie zastúpenie vo všetkých vzorkách mala kyselina ferulová. Dominantné postavenie kyseliny ferulovej v súbore suchých semien strukovín potvrdili aj iní autori (**Amarowicz a Pegg 2008; Kalogeropoulos et al., 2010**). Antioxidačnými zložkami sóje, sójovej múky a sójových bielkovinových koncentrátov sú, okrem izoflavónov, deriváty kyseliny škoricovej. **Schmidt et al. (2003)** uvádzajú, že metanolickej extrakt odtučnenej sójovej múky obsahuje 45 mg.kg<sup>-1</sup> voľných a 161 mg.kg<sup>-1</sup> esterovo viazaných fenolických kyselín. V sóji bola identifikovaná kyselina chlorogénová, izochlorogénová, kávová a sinapová.

## 2. Flavonoidy v strukovinách

Flavonoidy sú významnou samostatnou skupinou polyfenolických látok nachádzajúcich sa v potravinách. Tvoria jednu z najpočetnejších skupín rastlinných pätnásťuhlíkových polyfenolických látok s formálnym zložením C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> (Obr. 1). Vo svojej molekule obsahujú dve benzénové jadrá (A, B) spojené trojuhlíkovým reťazcom, ktorý je kondenzovaný do formy pyrónu (kruh C). Podľa pripojenia kruhu B na heterocyklické jadro sa fenolické látky nazývajú flavonoidy (C<sub>2</sub> pozícia) a izoflavóny (C<sub>3</sub> pozícia) (**Beecher, 2003**).



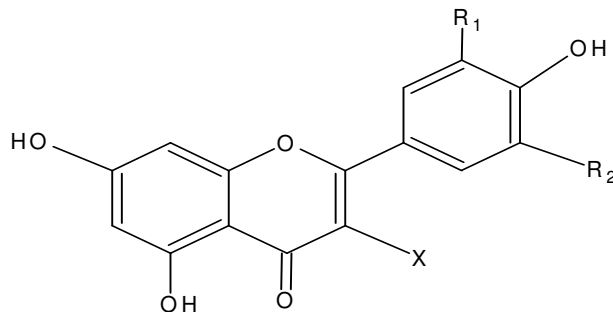
Obrázok 1 Chemická štruktúra flavonoidov

Flavonoidy tvoria štruktúrne heterogénny súbor látok, ktorý sa delí podľa miery substitúcie hydroxylových skupín a stupňa oxidácie heterocyklu do 6 tried: flavonoly, flavóny, flavanóny, flavanoly, antokyaniidny a izoflavóny (Bravo, 1998). Niektorí autori (**Dávidek, 1983; Hagerman et al., 1998**) uvádzajú aj ďalšie triedy - leukoantokyaniidny a flavanonoly, ktoré sú však pre ich menší výskyt v rastlinných materiáloch menej významné.

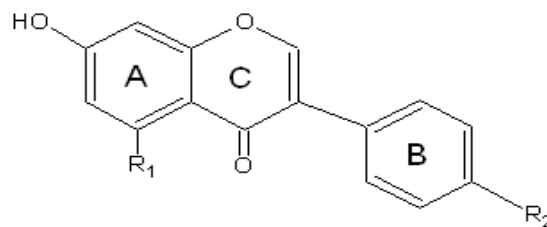
### 2.1. Flavóny a flavonoly

Flavóny a flavonoly tvoria významnú skupinu flavonoidných látok. V rastlinných materiáloch sa ako

aglykóny vyskytujú zriedkavo, rozšírenejšie sú v glykozidovej forme, so sacharidom viazaným v polohe C<sub>3</sub>, resp. v polohe C<sub>7</sub>. Flavonoly a flavóny majú podobnú štruktúru kruhu C s dvojitou väzbou medzi C<sub>2</sub> a C<sub>3</sub>. Flavóny, na rozdiel od flavonolov, nemajú v pozícii C<sub>3</sub> hydroxylovú skupinu (Obr. 2).



Flavonoly: X = OH, Flavóny: X = H, kemferol R<sub>1</sub> = H, R<sub>2</sub> = H, apigenín R<sub>1</sub> = H, R<sub>2</sub> = H, kvercetín R<sub>1</sub> = OH, R<sub>2</sub> = H, luteolín R<sub>1</sub> = OH, R<sub>2</sub> = H



daidzeín R<sub>1</sub> = H, R<sub>2</sub> = OH, genisteín R<sub>1</sub> = OH, R<sub>2</sub> = OH

Obrázok 2 Chemická štruktúra flavónov a flavonolov

Flavonoly a flavóny sú nerovnomerne distribuované prevažne v povrchových vrstvách plodov, pretože ich biosyntéza je stimulovaná svetlom (**Aherna et al., 2002**). Rozdiely v koncentrácii flavonolov sú podmienené intenzitou slnečného žiarenia medzi jednotlivými kusmi ovocia z toho istého stromu, ako aj v plode samotnom (**Manach et al., 2004**). Flavonoly sú flavonoidy, ktoré sú stravou prijímané v najväčšej miere. Hlavnými predstaviteľmi tejto skupiny látok sú kemferol (3,5,7,4'-tetrahydroxyflavón), kvercetín (3,5,7,3',4'-pentahydroxyflavón) a myricetín (3,5,7,3',4',5'-hexahydroxyflavón). V rastlinách sú prítomné ako glykozidy, pričom sacharidovou zložkou je glukóza, ramnóza, ale aj galaktóza, arabinóza, xylóza alebo kyselina glukurónová. Z tejto skupiny látok je nutrične hodnotný rutín (kvercetín-3-β-rutinozid) (**Kreft et al., 1994**), ktorý je bohato zastúpený v pohánke, ľaskavci a ovocí s vysokým obsahom vitamínu C. Vyniká nielen svojimi antioxidačnými účinkami, ale aj schopnosťou znižovať fragilitu (lámavosť) kapilárnych vlásočníc. Flavóny sú menej bežné flavonoidné látky ako flavonoly. Najbežnejšími flavónmi sú luteolín (5,7,3',4'-tetrahydroxyflavón) a apigenín (5,7,4'-trihydroxyflavón). Flavóny boli identifikované v jedlých rastlinných zdrojoch a medzi najbohatšie zdroje patria zeler a petržlen (**Justesen et al., 1998**).

Z flavonolov sa v strukovinách vyskytuje kvercetín a kemferol, z flavónov je to apigenín. **Hempel a Bohm**

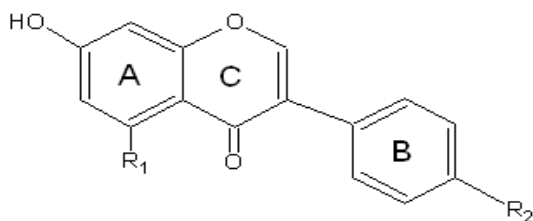


(1996) skúmali skladbu fenolických látok v šiestich variantoch žltej a zelenej fazule. Najzastúpenejšími flavonoidmi boli flavonoly kvercetín (19,1 – 183,5 mg.kg<sup>-1</sup> čerstvej hmoty) a kemferol (5,6 – 14,8 mg.kg<sup>-1</sup> čerstvej hmoty). **Price et al. (1998)** stanovili v štyroch variantoch zelenej fazule podstatne nižšie obsahy kvercetínu (1,0 – 2,0 mg.kg<sup>-1</sup> čerstvej hmoty) a kemferolu (0,3 – 0,7 mg.kg<sup>-1</sup> čerstvej hmoty) a súčasne zistili, že varením sa vylúhovalo 8,8 – 24,4 % stanovovaných flavonoidov. Podľa **Ewala et al. (1999)** blanšírovaná fazuľka obsahuje 13 mg kvercetínu a 2,4 mg kemferolu na kg jedlého podielu, a blanšírovaný hrášok iba 1,5 mg kvercetínu na kg jedlého podielu. Kemferol nebol detegovaný vo vzorkách hrášku. Ďalej zistili, že tepelná úprava (klasické varenie, varenie v mikrovlnnom prostredí) nemá vplyv na obsah flavonolov hrášku a fazuľky.

V oblasti analýzy potravín boli vypracované rôzne metódy stanovenia rôznych typov fenolických látok, ktoré ale nezahŕňajú kvantifikáciu niektorých flavonoidov. Z tohto dôvodu **Justesen et al. (1998)** vyvinula HPLC DAD metódu stanovenia flavónov a flavonolov v potravinách. V súbore vzoriek ovocia a zeleniny z obchodnej siete bolo zistené majoritné postavenie kvercetínu a kemferolu (v menšej miere ako kvercetín). V zelenej fazuli bol detegovaný iba kvercetín v množstve 16 mg.kg<sup>-1</sup> čerstvej hmoty. Flavóny luteolín a apigenín boli prítomné iba v zeleri, sladkej paprike (iba luteolín) a petržlene (iba apigenín). **Duenas et al. (2004)** prezentovali prítomnosť glykozidov luteolínu, kvercetínu i apigenínu v osemeni odrôd hrachu. **Troszyńska et al. (2002)** separovali 5 frakcií z acetónového extraktu hrachových semien s cieľom určiť flavonoidy zodpovedné za antioxidačnú aktivitu semien hrachu. Použitím metódy HPLC boli identifikované glykozidy apigenínu, kemferolu a kvercetínu. Prítomnosť kvercetínu a kemferolu bola zistená aj po kyslej hydrolýze semien iných typov strukovín bohatých na polyfenoly (**Troszyńska et al., 2006**).

## 2.2. Izoflavóny

Izoflavóny sú látky štruktúrne analogické s endogénnymi estrogénmi človeka. Bežne sa zaraďujú medzi fytoestrogény. Vyznačujú sa preventívnym pôsobením proti niektorým druhom onkologických ochorení.



daidzeín R<sub>1</sub> = H, R<sub>2</sub> = OH, genisteín R<sub>1</sub> = OH, R<sub>2</sub> = OH  
**Obrázok 3 Chemická štruktúra izoflavónov**

Prítomnosť izoflavónov v rastlinnej ríši je limitovaná na čeľade *Fabaceae* a *Viciaceae*. Ich najbohatším zdrojom

je sója fazuľová (*Glycine max* L.). V menšej miere sa nachádzajú aj v rastlinách čeľade laskavcovité (*Amaranthaceae*), kosatcovité (*Iridaceae*), morušovníkovité (*Moraceae*) a ružovité (*Rosaceae*) (**Velíšek, 1991**). Izoflavóny ako konštitučné látky rastlín plnia funkciu v obrannom systéme a ich obsah sa zvyšuje následkom pôsobenia stresu.

Základná štruktúra izoflavónov sa od iných skupín flavonoidov líši polohou benzénového jadra (B-kruh) v pozícii C<sub>3</sub> heterocyklického kruhu (Obr. 3). V prírode sa nachádzajú voľné alebo O-glykozidicky viazané, kde tvoria aglykónovú časť. Izoflavóny sú polohové izoméry častejšie sa vyskytujúcich flavónov. V sójových bôboch sa nachádzajú izoflavóny daidzeín (7,4'-dihydroxyizoflavón), genisteín (5,7,4'-trihydroxyizoflavón), glyciteín (7,4'-dihydroxy-6-metoxizoflavón) a ich 7-β-glykozidy: daidzín, genistín, glycitín (**Wang et al., 1990**). Formononetín a biochanín A sú hlavnými izoflavónmi d'ateliny (**Franke et al., 1994**). Glykozidové jednotky môžu byť esterifikované acetylovou alebo malonylovou skupinou.

**Franke et al. (1998)** použili metódu HPLC na stanovenie obsahu izoflavónov v sójových produktoch a stanovili pomer daidzeín : genisteín : glyciteín (1 : 1 : 0,2). **Padjaitan et al. (2000)** stanovovali obsahy genisteínu a genistínu v 13 variantoch sóje. Variant s najvyšším obsahom genisteínu (19 mg.kg<sup>-1</sup>) a genistínu (420 mg.kg<sup>-1</sup>) bol podrobený vylúhovaniu kyselinou, alkoholom a horúcou vodou. Najväčší úbytok izoflavónov bol pozorovaný po vylúhovaní alkoholom (91,2 %), podstatne nižší bol pri použití vody (24,2 %) a najnižší pri vylúhovaní kyselinou (20,3 %). Sójový proteín izolovaný extrakciou etanolom obsahuje asi 50 % z pôvodného obsahu izoflavónov (**Wang, Murphy, 1994 b**). Obsah izoflavónov v semenách hrachu sledovali aj **Lapčík et al. (1999)**. V hrachu boli stanovené obsahy daidzeínu, formononetínu, izoformononetínu a prunetínu, pričom ich obsahy sa pohybovali v rozmedzí od niekoľkých nanogramov až po miligramy na gram suchej hmoty. **Mikelová et al. (2004)** zisťovali obsah izoflavónov v rôznych častiach sóje. Najvyššie zastúpenie mali glykozylované izoflavóny, daidzín a genistín, v semenách a koreňoch sóje. V ostatných častiach rastliny, ako je struk, listy, stonka, bola ich koncentrácia o 40 - 80 % nižšia. **Franke et al. (1994)** zisťovali celkový obsah izoflavónov v rôznych strukovinách a d'ateline. Vzorky boli podrobené kyslej hydrolýze. Vysoký obsah daidzeínu a genisteínu potvrdili v sóji a čiernej fazuli, zatiaľ čo d'atelina bola bohatá na kumesterol a formononetín. Obsah genisteínu a daidzeínu v strukoch čerstvej fazuľky bol pod hranicu detekcie.

Obsah izoflavónov v sójových semenách výrazne kolíše. Sójové semená obsahujú 580 - 3800 mg.kg<sup>-1</sup> izoflavónov v závislosti od odrody. Sójový nápoj obsahuje 30 - 175 mg.dm<sup>-3</sup> izoflavónov. Podľa **Wanga et al. (1990)** sa v sóji nachádza 314 mg.kg<sup>-1</sup> daidzeínu a 430 mg.kg<sup>-1</sup> genisteínu, zatiaľ čo **Franke et al. (1994)** udávajú obsah daidzeínu v rozmedzí 676,4 - 1006,5 mg.kg<sup>-1</sup> a genisteínu 940,2 - 1382,4 mg.kg<sup>-1</sup>. Podľa **Fukutakeho et al. (1996)** obsah genisteínu v sóji je 200,6 - 968,1 mg.kg<sup>-1</sup>, v sójovom nápoji 94,1 - 133,1 mg.kg<sup>-1</sup> genisteínu a tofú obsahuje 137,7 mg.kg<sup>-1</sup> genisteínu. Obsah genisteínu izolovaného z odtučnenej sójovej múky stanovili **Kováčová et al. (2003)** v rozmedzí 21 - 350 mg.kg<sup>-1</sup>, daidzeínu 20 - 270 mg.kg<sup>-1</sup>.

**Nakamura et al. (2000)** stanovili obsahy troch izoflavónov (daidzeín, genisteín, glyciteín) a ich 7- $\beta$ -glykozidov (daidzín, genistín, glycitín) v 11 odrodách sóje a 12 výrodkoch zo sóje. Zistili, že obsah izoflavónov závisí od odrody a krajiny pôvodu sóje. K podobným záverom došli aj **Wang a Murphy (1994 a)**, ktorí porovnávali skladbu izoflavónov a ich glykozylovaných foriem v japonských a amerických odrodách sóje. Zistili, že dominantnými zložkami rôznych odrôd sóje sú 6'-O-malonyldaidzín, daidzín a 6'-O-malonylgenistín, genistín, pričom japonské odrody vykázali vyšší pomer 6'-O-malonyl izoflavónov ku glykozidovaným formám ako americké odrody. **Wang a Murphy (1994 b)** uvádzajú, že malonylizoflavóny pôsobia ako antioxidanty počas skladovania pri teplote 37 °C. Sójové semená z Japonska a USA mali rovnaký obsah daidzeínu, ale až 27 %-ný rozdiel v obsahu genisteínu. Variabilita obsahu izoflavónov v sóji pravdepodobne závisí nielen od odrody, lokality pestovania plodiny, ale aj od klimatických podmienok počas vegetácie a ročníka zberu úrody. Z výsledkov ďalej vyplýva, že rok zberu má väčší vplyv na obsah izoflavónov ako lokalita (**Wang, Murphy, 1994 a**). Obsah izoflavónov do veľkej miery závisí aj od technologického spracovania sóje. Varením sa obsah daidzeínu a genisteínu nemení, ale praženie sójových bôbov vyvoláva straty okolo 15 % (daidzeín) až 21 % (genisteín). Pražením sa zvyšuje obsah acetylovaných izoflavónov (**Watanabe et al., 2002**) z dôvodu dekarboxylácie malonylových zvyškov. Zmrazením sójových semien klesol obsah izoflavónov o 20 - 30 % v porovnaní s čerstvými vzorkami. Skladovanie surových semien spôsobilo stratu až 75 % izoflavónov (**Moravcová, Kleinová, 2002**). Výroba tofu nemá vplyv na koncentráciu izoflavónov, ale výroba sójových párkov a tofu jogurtu zníži obsah izoflavónov až desaťnásobne (**Franke et al., 1994**). **Jeong a Hong (1997)** sledovali zmenu obsahu a antioxidačných vlastností izoflavónov pri výrobe fermentovanej sójovej pasty. Počas procesu fermentácie sa výrazne menil obsah genisteínu, pričom radikálne zníženie nastalo v počiatočnom stupni fermentácie. Podobný trend v zmene obsahu izoflavónov pri výrobe fermentovaných produktov sóje - miso a natto - zaznamenali aj **Fukutake et al. (1996)**. Zvýšenie hladiny obsahu genisteínu počas fermentácie naznačuje dekonjugáciu genistínu mikroorganizmami. Vysoká oxidačná stabilita fermentovanej sóje sa pripisuje práve prítomnosti aglykónov (**Schmidt et al., 2002**).

### 3. Triesloviny

V súčasnosti sa triesloviny uvádzajú aj pod názvom taníny. Z chemického hľadiska sú to látky nejednotného zloženia. Na základe ich štruktúry a odolnosti voči kyslej hydrolyze sa rozdeľujú na hydrolyzovateľné taníny a kondenzované taníny (**King, Young, 1999**). Hoci sú hydrolyzovateľné taníny pomerne rozšírené v plodinách, je im venovaná malá pozornosť z hľadiska ich účinkov na ľudské zdravie. Kondenzované taníny (proantokyaniďny) sú v rastlinách početnejšie distribuované v porovnaní s hydrolyzovateľnými tanínmi. Pôsobením kyselín sa nehydrolyzujú, ale tvoria

červenohnedé kondenzačné produkty, tzv. flobafén (**Takácsová, Príbela, 1991**). Hlavnými zložkami tejto skupiny polyfenolov sú optické antipódy [epi]katechíny. V rastlinných materiáloch sa nachádzajú v polymérnej forme.

Strukoviny sú bohatým zdrojom polyfenolických látok. **Xiaofang-Wang et al. (1998)** stanovovali obsah celkových polyfenolov a kondenzovaných tanínov v 17 vzorkách hrachu pestovaného v západnej Kanade. Stanovené obsahy celkových tanínov, vyjadrené ako katechín ekvivalent, sa pohybovali v rozmedzí 162 - 325 mg.kg<sup>-1</sup> suchej hmoty. Kondenzované taníny boli na úrovni stopových množstiev. **Barampama a Smirad (1993)** analyzovali štyri odrody suchej fazule zo štyroch rôznych lokalít Burundi, pričom potvrdili vzťah medzi obsahmi nutrientov a polyfenolických látok, vplyv odrody, ako aj lokality na obsah polyfenolov v semenách fazule. Stanovený obsah polyfenolov vyjadrený ako katechín bol 14,99 g.kg<sup>-1</sup>. **Truchlinski a Sembratowicz (1996)** stanovovali hodnoty tanínu v rôznych druhoch strukovín. Obsah tanínov sa pohyboval v rozmedzí 1,83 - 8,78 g.kg<sup>-1</sup> suchej hmoty v šošovici, 4,82 g.kg<sup>-1</sup> suchej hmoty v sóji a 5,61 g.kg<sup>-1</sup> suchej hmoty v bôbe. **Amarowitz et al. (2000)** stanovovali obsah kondenzovaných tanínov v hrachu a bôbe po extrakcii 70 % vodným roztokom acetónu. Stanovený obsah celkových polyfenolov v tanínových extraktoch bol 10 - 405 g katechínu na kg extraktu. **Chavan et al. (2001)** testovali rôzne rozpúšťadlá pre extrakciu tanínov zo semien hrachu. Ako rozpúšťadlá boli použité čistá destilovaná voda, resp. destilovaná voda s prídavkom HCl, 70 - 100 % metanol, resp. acidifikovaný metanol, 70 - 100 % acetón, resp. acidifikovaný acetón. Kondenzované taníny boli analyzované kolorimetricky a ich priemerná stanovená koncentrácia po extrakcii acidifikovaným acetónom bola 1,09 g.kg<sup>-1</sup>. Najvyššie výťažky polyfenolov v acetónových extraktoch potvrdili aj iní autori. **Bilbao a Ledesma (2000)** analyzovali 8 vzoriek strukovín (rôzne odrody hrachu a fazule) na obsah tanínov. Stanovené obsahy sa pohybovali v rozmedzí 32 - 130 mg.kg<sup>-1</sup>.

Vysoký obsah tanínov znižuje nutričnú kvalitu potravy a môže pôsobiť antinutrične. Taníny, ako antinutričné faktory, nemajú priamy toxický vplyv na organizmus, ale negatívne sa uplatňujú pri trávení bielkovín. Tvorba komplexu tanín - proteín vedie k inaktivácii tráviacich enzýmov a nerozpustnosti bielkovín, čím sa znižuje ich stráviteľnosť (**Chung et al., 1998**). K ďalším antinutričným účinkom tanínov sa zaraďuje aj zníženie absorpcie železa, glukózy a vitamínu B<sub>12</sub> (**Benešová et al., 1996**). Niektorým potravinám dodávajú taníny trpkú a adstringentnú chuť. V dôsledku ich reakcie s kovmi, a následnej tvorby zákalov a nežiadúcich farebných zmien, sa zhoršuje aj senzoričná hodnota potravín.

Ak je obsah polyfenolických látok v strukovinách príliš vysoký, redukuje sa rôznymi spôsobmi (extrakcia, namáčanie, fermentácia, pôsobenie chemikálií a kombinácia týchto procesov). **Mbithi - Mwiky et al. (2002)** navrhli klíčenie semien ako spôsob zlepšenia nutričnej kvality strukovín. Hodnoty antinutričných látok určovali každých 12 hodín po dobu 96 hodín v semenách fazule naklíčenej pri 30 °C. Vplyvom klíčenia sa obsah tanínov znížil na nedetekovateľné množstvá. **Davídek (1995)** zaznamenal pokles obsahu tanínu naklíčením semien strukovín po 7

dňoch o 30 %. Taníny sú odolné voči teplu a tepelným spracovaním sa ich účinok znižuje len málo (**Liener, 1994**). **Troszyńska a Ciska (2002)** sledovali vlastnosti tanínov po termickej úprave a potvrdili vysokú termostabilitu kondenzovaných tanínov prítomných v semenách farebného hrachu. **Alonso et al. (1998)** sledovali vplyv varu pri zvýšenom tlaku na obsah kondenzovaných tanínov a antinutričných látok v rôznych odrodách hrachu. V porovnaní s konvenčnými termickými metódami je tento spôsob oveľa efektívnejší pri redukcii obsahov antinutričných látok v semenách hrachu. **Saraj a Amin (1994)** sledovali vplyv namáčania, klíčenia, opekania a mletia na obsah polyfenolov v štyroch potravinách pripravených z cícera a fazule. Obsah celkových polyfenolov sa pohyboval v rozmedzí 16,85 – 27,05 mg.kg<sup>-1</sup> a vplyvom spracovania sa ich obsah redukoval na 43,5 až 51 % pôvodného obsahu. **Bilbao a Ladesma (2000)** sledovali zmeny koncentrácie antinutričných látok v hrachu a fazuli počas uskladnenia pri laboratórnej teplote. Obsah tanínov sa zredukoval na 64 - 70 % pôvodného obsahu.

Okrem negatívnych antinutričných účinkov vykazujú polyfenoly aj celý rad pozitívnych účinkov, najmä antibakteriálny, antitumorový a antimutagénny účinok, ktorý je spájaný s vysokou antioxidantnou aktivitou tanínov (**Chung et al., 1998**). **Hagerman et al. (1998)** uvádzajú, že taníny sú niekoľkonásobne (15 až 30 krát) účinnejšie v zhášaní peroxidových radikálov ako štruktúrne jednoduché fenolické látky. **Tsuda et al. (1994)** skúmali antioxidantnú aktivitu 35 odrôd jedlých fazúl. Červené a čierne odrody boli značne aktívne, zatiaľ čo biele odrody fazule vykázali veľmi nízku antioxidantnú aktivitu. V osemení fazúl boli identifikované antokyaníny, ktoré boli pravdepodobne zodpovedné za antioxidantné vlastnosti farebných odrôd. K zhodným výsledkom dospeli aj **Amarowicz et al. (1996)**. Vysokú antioxidantnú aktivitu stanovili v extraktoch z farebných druhov strukovín (hrach, peluška, hrachor, šošovica), zatiaľ čo biela fazuľa mala jednoznačne nízku aktivitu. V súlade s dosiahnutými výsledkami **Amarowicz et al. (1996)** skonštatovali, že antioxidantné zložky sú prítomné prevažne vo vonkajších vrstvách semien. Aj rozdiely v obsahu tanínov medzi odrodami súvisia s farbou vonkajšej vrstvy strukoviny. Biele odrody strukovín majú zvyčajne nižšiu koncentráciu tanínov ako tie isté druhy s farebnou obalovou vrstvou (**Díaz et al., 2010**).

**Troszyńska a Ciska (2002)** stanovovali obsah kondenzovaných tanínov v obaloch semien bielych a farebných variantov hrachu. Obsah kondenzovaných tanínov vyjadrený ako katechín bol 15,6 g v kg suchej hmoty farebného hrachu, zatiaľ čo v semenách bieleho hrachu boli na nedetekovateľnej úrovni. **Troszyńska et al. (2002)** sa domnievajú, že práve taníny prítomné v obaloch semien sú zodpovedné za preukázané antioxidantné vlastnosti strukovín. **Turkmen et al. (2005)** sledovali zmeny obsahu celkových polyfenolov, prepočítané na kyselinu galovú, a antioxidantnej aktivity pri rôznych tradičných tepelných úpravách čerstvého hrachu a zelenej fazule. Tepelnou kulinárskou úpravou sa antioxidantná aktivita v prípade hrášku významne nemení, ale fazuľka vykázala zvýšenie antioxidantných

vlastností nezávisle od spôsobu tepelného spracovania. Ďalej sa zistili preukázateľné rozdiely v obsahu polyfenolov v oboch strukovinách. Stanovené vyššie koncentrácie polyfenolov vo varenej fazuľke (40,52 – 46,33 mg.kg<sup>-1</sup> sušiny) v porovnaní s obsahom v čerstvej vzorke (35,53 mg.kg<sup>-1</sup> sušiny) môžu byť vysvetlené uvoľňovaním viazaných foriem fenolických zložiek v dôsledku tepelného účinku. V prípade hrášku (18,33 mg.kg<sup>-1</sup> sušiny) nastala po uvarení redukcia obsahu fenolických látok. **Xu a Chang (2008)** odporúčajú prípravu strukovín v pare nielen z dôvodu ochrany ich antioxidantných komponentov, ale aj skrátenia doby varenia. Štúdie ďalej ukazujú (**Barampama, Smirad, 1998; Boateng et al., 2008**), že strukoviny s tmavým farebným osemením majú po tepelnej úprave pražením relatívne vyšší obsah polyfenolov v porovnaní so svetlými strukovinami, v ktorých bol zaznamenaný pokles hladiny polyfenolov i antioxidantnej aktivity po pražení bobúľ.

Obalové vrstvy strukovín majú dôležitú úlohu v obrannom systéme semien, ktoré sú vystavené oxidačnému poškodeniu kyslíkom, UV žiarením alebo inými environmentálnymi faktormi. **Orsák et al. (2000)** sledovali zmeny celkového obsahu polyfenolov v semenách hrachu, naklíčených semenách hrachu a v jednotlivých vegetačných štádiách rastliny pôsobením UV-A žiarenia a  $\gamma$ -žiarenia. Počas klíčenia semien hrachu sa zvyšoval obsah celkových polyfenolov. Bola tiež preukázaná štatistická závislosť obsahu celkových polyfenolov od rastových fáz rastliny (nárast obsahu polyfenolov) a dávky UV-A žiarenia (nárast obsahu polyfenolov) a  $\gamma$ -žiarenia (pokles obsahu polyfenolov). **Sutivisedsak et al. (2010)** testovali vplyv mikrovlnného žiarenia na extrakciu polyfenolov fazule a zistili štatisticky preukázateľne vyšší podiel polyfenolov v extrakte v porovnaní s konvenčným spôsobom extrakcie uskutočneným za rovnakých extrakčných podmienok (výber extrakčného činidla, teplota extrakcie). Polyfenolické látky v semenách majú dôležitú úlohu aj pri kontrole dormancie a klíčenia i pri mechanizme prístupu kyslíka k embryu. Oxidáciou sekundárnych metabolitov polyfenoloxidázami sa redukuje zásobovanie embrya kyslíkom, pričom inhibičný účinok sa zvyšuje s teplotou. **Lachman et al. (1997, 1999)** sledovali zmeny obsahu polyfenolov v semenách hrachu po teste urýchleného stárnutia. Stresové oštiepenie hrachu zvýšenou vlhkosťou a teplotou spôsobilo preukázateľné zvýšenie obsahu celkových polyfenolov.

## ZÁVER

Polyfenoly síce nie sú vo všeobecnosti považované za látky s nutričnou hodnotou, ale záujem o ne rastie vzhľadom na ich priaznivé účinky na ľudské zdravie. Polyfenolové látky patria medzi zložky potravín s účinným antioxidantným pôsobením, čo môže byť jednou z ciest prevencie moderných civilizačných ochorení našej populácie. Medzi najbohatšie zdroje týchto látok, po ovocí a zelenine, patria aj strukoviny. V jednotlivých strukovinách sa nachádza široká škála fenolových zlúčenín. Prítomnosť fenolických kyselín, flavónov a flavonolov je charakteristická pre hrach a fazuľu, zatiaľ čo sója sa vyznačuje vysokým obsahom izoflavónov, patriacich do skupiny tzv. fytoestrogénov. Strukoviny, predovšetkým obalové vrstvy, obsahujú vysoký podiel polymerizovaných polyfenolov, tzv. tanínov, ktoré sa vyznačujú antioxidantnými a antimikrobiálnymi účinkami. Na druhej strane, vysoký obsah tanínov môže znižovať

nutričnú kvalitu strukoviny a môže pôsobiť antinutrične. Kulinárskymi a technologickými procesmi je však možné dosiahnuť efektívne zníženie obsahu týchto látok. Poznatky o obsahu jednotlivých fenolických látok v semenách strukovín nie sú úplne skompletizované a výsledky sú medzi literárnymi prameňmi variabilné. Určenie množstva polyfenolov je do určitej miery komplikované, pretože zmenu obsahu flavonoidov a fenolových kyselín do značnej miery indukujú pedoklimatické podmienky, ale i technologické spracovanie a skladovanie a rad ďalších faktorov, a tiež nedostatok štandardizovaných metód kvantifikácie.

V súčasnej dobe, keď existujú v ľudskej výžive vážne disproporcie v dôsledku zmeny životného štýlu a životnej úrovne obyvateľstva., je žiadúce zmeniť nesprávne stravovacie návyky smerom k zdravému životnému štýlu. Väčšie zastúpenie strukovín vo výžive znamená nielen racionálne využitie zdroja hodnotných a nevyhnutných živín, ale aj zabezpečenie nezanedbateľného príjmu polyfenolických látok potravou.

## LITERATÚRA

- AHERNA, S. A., BRIEN, N. M. 2002. Dietary flavonols: chemistry, food content, and metabolism. In *J. Nutrition*, vol. 18, 2002, no. 1, p. 75-81.
- ALONSO, R., ORUE, E., MARZO, F. 1998. Effect of extrusion and conventional processing methods on protein and antinutritional factor contents in pea seeds. In *Food Chemistry*, 63, 1998, no. 4, p. 505-512.
- AMAROWICZ, R., TROSZYŃSKA, A., KARAMAĆ, M., KOZŁOWSKA, H. 1996. In: TROSZYŃSKA, A., ESTERELLA, I., LOPEZAMORES, L., HERNANDEZ, T. 2002. Antioxidants activity of pea seed coat acetone extract. In *Lebensmittel, Wissenschaft und Technologie*, vol. 35, 2002, no. 2, p. 158-154.
- AMAROWICZ, R., NACZK, M., SHAHIDI, F. 2000. Antioxidant activity of condensed tannins of beach pea, canola hulls, evening primrose and faba bean. In *Journal of Food Lipids*, vol. 7, 2000, no. 3, p. 195-205.
- AMAROWICZ, R., PEGG R. B. 2008. Legumes as a source of natural antioxidants. In *European Journal of Lipid Science and Technology*, vol. 11, 2008, no. 8, p. 865-878.
- BARAMPAMA, Z., SIMARD, R.E. 1993. Nutrient composition, protein quality and antinutritional factors of some varieties of dry beans grown in Burundi. In *Food Chemistry*, 47, 1993, no. 2, p. 159-167.
- BEECHER, G. R. 2003. Overview of dietary flavonoids: nomenclature, occurrence and intake. In *Journal of Nutrition*, vol. 133, 2003, p. 3248S-3254S.
- BENEŠOVÁ, L. 1996. In *Potravinářství* 94. Praha : ÚZPI, 1996. 157 p.
- BILBAO, T., LADESMA, L. 2000. Antinutritional factors and toxic substances in legumes for human consumption. In *Alimentaria*, 313, 2000, p. 75-77.
- BOATENG, J., VERGHESE, M., WALKER, L. T., OGUTU, S. 2008. Effect of processing on antioxidant contents in selected dry beans (*Phaseolus* spp. L.). In *LWT - Food Science and Technology*, vol. 41, 2008, p. 1541-1547.
- BRAVO, L. 1998. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. In *Nutr. Rev.*, vol. 56, 1998, no. 11, p. 317-333.
- DAVÍDEK, J. 1995. Natural toxic compounds of foods. London, Tokyo : CRC Press, Boca Raton, Ann Arbor, 1995. 268 p.
- DAVIDEK, J. 1983. Chemie potravin. Praha : Státní nakladatelství technické literatury, 1983. 632 p.
- DÍAZ, A. M., CALDAS, G. V., BLAIR, M. W. 2010. Concentrations of condensed tannins and anthocyanins in common bean seed coats. In *Food Research International*, vol. 43, 2010, p. 595-601.
- DUENAS, M., ESTRELLA, I., HERNANDEZ, T. 2004. Occurrence of phenolic compounds in the seed coat and the cotyledon of peas (*Pisum sativum* L.). In *European Food Research and Technology*, vol. 219, 2004, no. 2, p. 116 – 123.
- EWALD, C., FJELKNER-MODIG, S., JOHANSSON, K., SJÖHOLM, I., ÅKESSON, B. 1999. Effect of processing on major flavonoids in processed onions, green beans, and peas. In *Food Chemistry*, 64, 1999, p. 231-235.
- FRANKE, A. A., CUSTER, L. J., CERNA, C. M., NARALA, K. K. 1994. Quantitation of phytoestrogens in legumes by HPLC. In *J. Agric. Food. Chem.*, vol. 42, 1994, p. 1905-1913.
- FRANKE, A. A., CUSTER, L. J., WANG, W., SHI, C. Y. 1998. HPLC analysis of isoflavonoids and other phenolic agents from food and from human fluids. In *Proceeding of the Society for Experimental Biology and Medicine*, vol. 217, 1998, no.3, p. 263-273.
- FUKUTAKE, M., TAKAHASHI, M., ISHIDA, K., KAWAMURA, H., SUGIMURA, T., WAKABAYASHI, K. 1996. Quantification of Genistein and Genistin in Soybeans and Soybean Products. In *Food and Chemical Toxicology*, vol. 34, 1996, p. 457-461.
- HAGERMAN, A. E., RIEDL, K. M., JONES, A., SOVIK, K. N., RITCHARD, N. T., HARTZFELD, P. W., RIECHEL, T. L. 1998. In: TROSZYŃSKA, A., CISKA, E. 2002. Phenolic compounds of seed coats of white and colored varieties of pea and their total antioxidant activity. In *Czech Journal of Food Science*, vol. 20, 2002, no. 1, p. 15-22.
- HEMPEL, J., BOHM, H. 1996. Quality and quantity of prevailing flavonoid glycosides of yellow and green French bean. In *J. Agric. Food Chemistry*, vol. 44, 1996, no. 8, p. 2114- 2116.
- CHAVAN, U. D., SHAHIDI, F., NACZK, M. 2001. Extraction of condensed tannins from beach pea as affected by different solvents. In *Food Chemistry*, vol. 75, 2001, no. 4, p. 509-512.
- CHRENKOVÁ M., ČEREŠŇÁKOVÁ, Z., SOMMER, A., NITRAYOVÁ, S. 2003. Strukoviny vo výžive ľudí. Konferencia s medzinárodnou účasťou: *Výživa a potraviny pre tretie tisícročie „Funkčné potraviny“*, SPU : Nitra, p. 144-146.
- CHUNG, K. T., WONG, T. Y., WEI, C. I., HUANG, Y. W., LIN, Y. 1998. Tannins and human health: a review. In *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, vol. 38, 1998, no. 6, p. 421-464.
- JEONG, S. L., HONG, S. CH. 1997. Composition and antioxidative characteristic of phenolic fraction isolated from soybean fermented food. In *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*, vol. 26, 1997, no.3, p. 383-389.
- JUSTESEN, U., KNUTHSEN, P., LETH, T. 1998. Quantitative analysis of flavonols, flavones, and flavanones in fruits, vegetables and beverages by high performance liquid chromatography with photo-diode array and mass spectrometric detection. In *Journal of Chromatography A*, 799, 1998, p. 101-110.
- KALOGEROPOULOS, N., CHIOU, A., IOANNOU, M., KARATHANOS, T., HASSAPIDOU, M., ANDRIKOPOULLOS, N. K. 2010. Nutritional evaluation and

- bioactive microconstituents (phytosterols, tocopherols, polyphenols, triterpenic acids) in cooked dry legumes usually consumed in the Mediterranean countries. In *Food Chemistry*, vol. 121, 2010, p. 682–690.
- KING, A., YOUNG, G. 1999. Characteristics and occurrence of phenolic phytochemical. In *J. Am. Diet. Assoc.*, vol. 2, 1999, p. 213-218.
- KOVÁČOVÁ, M., FODOROVÁ, M., TAKACSOVÁ, M., VOJTEKOVÁ, S. 2003. Štúdium antioxidačných účinkov izoflavónov sóje. In *Chemické listy*, vol. 97, 2003, no.8, p. 790.
- KREFT, I., BONAFACCIA, G., ZIGO, A. 1994. Secondary Metabolites of Buckwheat and their Importance in Human Nutrition. In *Prehrambeno-technol. Biotechnol.*, vol. 32, 1994, no. 4, p. 195-197.
- KUSNYER L. 1992. *Jedlá zo strukovín a sóje*. Osveta, Martin 1992. 201 p., ISBN 80-217-0244-3.
- LACHMAN, J., PIVEC, V., HOSNEDL, V. 1997. Changes in the content of polyphenols in barley grains and pea seeds after controlled accelerated ageing treatment. In *Scientia Agriculturae Bohemica*, vol. 28, 1997, no. 1, p. 17-30.
- LACHMAN, J., LAPČÍK, O., HOSNEDL, V., PROKINOVÁ, E., ORSÁK, M., PIVEC, V. 1999. Polyphenol and isoflavonoid levels in barley and pea seeds and seedlings influenced by their deterioration and *Epicoecum purpurascens* Ehrenb. ex Schlecht. elicitors. In *Scientia Agriculturae Bohemica*, vol. 30, 1999, no. 1, p. 1-13.
- LAPČÍK, O., HILL, M., ČERNÝ, I., LACHMAN, J., ALMAHARIK, N., ADLERCREUTZ, H. 1999. Immunoanalysis of isoflavonoids in *Pisum sativum* and *Vigna radiata*. In *Journal of Plant Science*, vol. 148, 1999, no. 2, p. 111-119.
- LIENER, I. E. 1994. Implications of antinutritional components in soybean foods. In *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, vol. 34, 1994, 1., p. 31-64.
- LUTHRIA, D. L., PASTOR-CORRALES, M. A. 2006. Phenolic acids content of fifteen dry edible bean (*Phaseolus vulgaris* L.) varieties. In *Journal of Food Composition and Analysis*, vol. 19, 2006, no. 2/3, p. 205-211.
- LIU, R. H. 2004. Potencial synergy of phytochemicals in cancer prevention: mechanism of action. In *Journal of Nutrition*, vol. 134, 2004, p. 3479S-3485S.
- MANACH, C., SCALBERT, A., MORAND, CH., RÉMÉSY, CH., JIMENÉZ, L. 2004. Polyphenols: food sources and bioavailability. In *American Journal of Clinical Nutrition*, vol. 79, 2004, no. 5, p. 727 – 747.
- MBITHI-MWIKVA, M. S., CAMP, J., RODRIGUEZ, R., HUYGHEBAERT, A. 2002. Effects of sprouting on nutrient and antinutrient composition of kidney beans. In *European Food Research and Technology*, vol. 212, 2002, no. 2, p. 188-191.
- MIKELOVÁ, R., KLEJDUS, B., ZEHNÁLEK, J., VACEK J., KIZEK, R. 2004. Chromatografické stanovení isoflavonu ve vegetativních a generativních částech rostlin sóje (*Glycine max.*). In *Biochemie*, vol. 14, 2004, no. 1, p. 13-15.
- MORAVCOVÁ, J., KLEINOVÁ, T. 2002. Fytoestrogeny ve výživě – přinášejí užitek nebo riziko? In *Chem. listy*, vol. 96, 2002, p. 282-289.
- NAKAMURA, Y., TSUI, S., TONOGAI, Y. 2000. Determination of the levels of isoflavonoids in soybean and soy-derived foods and estimation of isoflavonoids in the Japanese daily intake. In *Journal of AOAC International*, vol. 83, 2000, no. 3, p. 635-650.
- ORSÁK, M., LACHMAN, J., PIVEC, V. 2000. Effect of UV-A and gamma-irradiation on the polyphenol levels in barley and pea seeds, seedlings and plant. In *Scientia Agric. Bohemica*, vol. 31, 2000, p. 191-196.
- PADJAITAN, N., HETTIARACHCHY, N., JU, Z. U., CRANDALL, P., SNELLER, C., DOMBEK, D. 2000. Evaluation of genistin and genistein contents in soybean varieties and soyprotein concentrate prepared with three basic methods. In *Journal of Food Science*, vol. 65, 2000, no. 3, p. 399-402.
- PRICE, K. R., COLQUHOUN, I. J., BARNES, K. A., RHODES, M. J. C. 1998. Composition and content of flavonol glycosides in green beans and their fate during processing. In *J. Agric. Food Chem.*, vol. 46, 1998, no.12, p. 4898-4903.
- SAROJ, D., AMIN, CH. K. 1994. Some antinutritional factors and protein digestibility of home processes supplementary foods. Effect of domestic processing methods. In *International Journal of Tropical Agriculture*, vol. 12, 1994, no. 1/2, p. 148-157.
- SCHMIDT, Š., POKORNÝ, J., VAJDÁK, M., SEKRETÁR, S., GORDON, M. H. 2003. Oilseeds as a source of antioxidant. In *Bulletin of Food Research*, vol. 42, 2003, no. 3/4, p. 133-149.
- SUTIVISEDASAK, N., CHENG, H. N., WILLETT, J. L., LESCH, W. C., TANGSRUD, R., BISWAS, A. 2010. Microwave-assisted extraction of phenolics from bean (*Phaseolus vulgaris* L.). In *Food Research International*, vol. 43, 2010, p. 516-519.
- TAKÁCSOVÁ, M., PRÍBELA, A. 1991. *Chémia potravín*. Bratislava : STU, 1991. 235 p.
- TROSZYŃSKA, A., CISKA, E. 2002. Phenolic compounds of seed coats of white and coloured varieties of pea (*Pisum sativum* L.) and their total antioxidant activity. In *Czech J. Food Sci*, vol. 20, 2002, no. 1, p. 15-22.
- TROSZYŃSKA, A., ESTERELLA, I., LOPEZAMORES, L., HERNANDEZ, T. 2002. Antioxidants activity of pea seed coat acetone extract. In *Lebensmittel, Wissenschaft und Technologie*, vol. 35, 2002, no. 2, p. 154-158.
- TROSZYŃSKA, A., AMAROWICZ, R., LAMPARSKI, G., WOŁEJSZO, A., BARYŁKO-PIKIELNA, N. 2006. Investigation of astringency of extracts obtained from selected tannins-rich legume seeds. In *Food Quality and Preference*, vol. 17, 2006, p. 31-35.
- TRUCHLINSKI, J., SEMBRATOWICZ, I. 1996. Trypsin and tannin inhibitors content in the seeds of some new varieties of legume. In *Bromatologia i Chemia Toksykologiczna*, vol. 29, 1996, no. 3, p. 303-307.
- TSUDA, T., OHSHIMA, K., KAWAKISHI, S., OSAWA, T. 1994. Antioxidative pigments isolated from the seeds of *Phaseolus vulgaris* L. In *J. Agric. Food Chemistry*, vol. 42, 1994, p. 248-251.
- TURKMEN, N., SARI, F., VELIOGLU, Y. S. 2005. The effect of cooking methods on total phenolics and antioxidant activity of selected green vegetables. In *Food Chemistry*, 93, 2005, p. 713-718.
- VELÍŠEK, J. 1999. *Chemie potravín 3. Tábor (Pelhřimov) : OSSIS*, 1999. 368 p., ISBN 80-902391-5-3.
- WANG, G., MURPHY, P. 1990. A simplified HPLC methods for the determination of phytoestrogens in soybean and its processed products. In *J. Agric. Food Chem.*, vol. 38, 1990, p. 185-190.
- WANG, H., MURPHY, P. 1994. Isoflavone Composition of American and Japanese Soybeans in Iowa: Effects of Variety,

Crop Year, and Location. In *J. Agric. Food Chem.*, vol. 42, 1994, p. 1674-1677.

WANG, H., MURPHY, P. 1994 b. Isoflavone Content in Comercial Soybean Foods. In *J. Agric. Food Chem.*, vol. 42, 1994, p. 1666-1673.

WATANABE, S., UESUGI, S., KIKUCHI, Y. 2002. Isoflavones for prevention of cancer, cardiovascular diseases, gynecological problems and possible immune potentation. In *Biomedicine & Pharmacotherapy*, vol. 56, 2002, p. 302-312.

XIAOFANG-WANG, W., WARKENTIN, T. D., BRIGGS, C. J., OOMAH, B. D., CAMPBELL, C. G., WOODS, S. 1998. Total phenolics and condensed tannins in field pea and grass pea. In *Euphytica*, vol. 101, 1998, no. 1, p. 97-102.

XU, B., CHANG, S. K. C. 2008. Effect of soaking, boiling, and steaming on total phenolic content and antioxidant activities of cool season food legumes. In *Food Chemistry*, 110, 2008, p. 1-13.

**Contact address:**

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

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

Ing. Judita Bystrická, PhD., Department of Chemistry, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Slovak Agricultural University in Nitra, Tr. A. Hlinku 2, 94901 Nitra, e-mail: judita.bystricka@centrum.sk

## COMPONENTS OF THE HEALTHY EATING INDEX IN NUTRITION OF ADULT FEMALES

Katarína Fatrcová-Šramková

### ABSTRACT

To assess and monitor the nutrition and dietary status, the U.S. Department of Agriculture developed the Healthy Eating Index - HEI. The index consists of 10 components, each representing different aspects of a healthful diet. The aim of the study was to evaluate the nutrition in adult females and to analyze the actual nutrition according to selected four components (no. 6-9) of the Healthy Eating Index. Components 6 and 7 measure total fat and saturated fat consumption, respectively, as a percentage of total food intake (maximal 30 % and 10 % of total energy daily content respectively; in case of 31,3 % and 58,62 % females respectively). Components 8 and 9 measure total cholesterol (daily maximal 300 mg in case of 69,54 % participants) and sodium intake (maximal 2400 mg a day in case of 22,99 % probands).

**Keywords:** nutrition, Healthy Eating Index, component, adult population, females

### ÚVOD

Nutricionisti hľadajú najvhodnejšie zloženie stravy na udržanie zdravia človeka a v súčasnosti už existujú odporúčania týkajúce sa množstva i pororčného zloženia jednotlivých nutričných zložiek. Zloženie stravy ovplyvňujú rozličné socio-ekonomické aspekty a individuálna preferencia spotrebiteľa. Všeobecne sa pripúšťa, že zdravý človek môže konzumovať akúkoľvek potravinu adekvátnej kvality, ale je potrebné vedieť kedy, čo a v akých množstvách má byť v strave zastúpené. Nutričné faktory a faktory životného štýlu sa významne uplatňujú v prevencii neinfekčných chorôb (**Ministerstvo zdravotníctva SR, 2001**).

Strava s vysokým obsahom tuku, najmä s vysokým obsahom nasýteného tuku a sodíka, s nízkym obsahom vápnika a nízkym zastúpením potravín obsahujúcich vlákninu, ako sú ovocie, zelenina a celozrnné obilniny, súvisí so zvýšeným rizikom viacerých chronických ochorení. Strava je významným faktorom rizika kardiovaskulárnych chorôb, určitých typov rakoviny a cievnych mozgových príhod. Má významnú úlohu vo vývoji diabetu a hypertenzie. Nadhmotnosť je ďalší hlavný rizikový faktor koronárnych chorôb, cievnych mozgových príhod, nádorových ochorení, diabetu a hypertenzie a úzko súvisí s výživou a stravovaním. Rozmáhajúci sa problém nadhmotnosti zvyšuje prevalenciu chronických zdravotných problémov, a to najmä s posunom do mladších vekových populačných skupín. Strava je tiež rizikovým faktorom osteoporózy. Zlepšenie stravovania, predovšetkým adekvátny príjem vápnika, môže predísť 40-60 % osteoporotických fraktúr bedrového kĺbu.

USDA (U.S. Department of Agriculture) – Americké ministerstvo poľnohospodárstva (podporujúce zdravú a adekvátnu potravinovú bezpečnosť a propagujúce zdravý potravinový výber), a konkrétne Centrum pre nutričnú politiku a podporu, zaviedlo index zdravého stravovania (HEI – Healthy Eating Index) za účelom poskytnutia nového prostriedku na splnenie nutričných cieľov. HEI predstavoval prvý a jednoduchý model na zhrnutie a 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**). HEI bol prvýkrát vypočítaný v roku 1995

s použitím údajov z rokov 1989-90 (**U.S. Department of Agriculture, 1995**). Vychádzal z dvojdňových potravinových záznamov a 24-hodinových nutričných protokolov 7500 jedincov vo veku dva roky a viac (**Gibson, 2005**). Následne bol HEI aktualizovaný v roku 1998 na základe údajov z obdobia 1994-96 (**Bowman et al., 1998**) a v roku 2002 na základe údajov z rokov 1999-2000 z Federálnej vládnej národnej zdravotnej a nutričnej výskumnej správy 1999-2000 (**Basiotis et al., 2002**).

Index zdravého stravovania poskytuje celkový obraz o type a kvantite potravy, konzumovanej jednotlivcami, a o ich compliance so špecifickými nutričnými odporúčaniami, ktoré sú hodnotené rovnomerne s kombináciou informácií o určitých nutričtách a potravinových skupinách (**Gibson, 2005**). Index pozostáva z desiatich komponentov, ako uvádza tab. 1. Každý komponent indexu má maximálne skóre 10 a minimálne skóre 0. Maximálne celkové HEI skóre je 100. Vysoké skóre daného komponentu indikuje príjem približujúci sa odporúčanému rozsahu alebo množstvu, naopak nízke skóre komponentu indikuje slabšie dodržiavanie odporúčaného rozsahu alebo množstva. Desiat komponentov reprezentuje rôzne aspekty zdravej stravy:

Komponenty 1-5 merajú stupeň stravy jednotlivca, ktorý je v súlade s vydanými odporúčaniami pre päť základných potravinových skupín potravinovej pyramídy (Food Guide Pyramid), ako sú: cereálie (chlieb, obilniny, ryža a cestoviny), zelenina, ovocie, mlieko (mlieko, jogurty a syry) a mäso (mäso, hydina, ryby, strukoviny, vajcia a orechy).

Komponent 6 hodnotí celkový príjem tukov ako percentuálny podiel z celkového príjmu energie.

Komponent 7 hodnotí príjem saturovaných (nasýtených) tukov ako percentuálny podiel z celkového príjmu energie.

Komponent 8 sleduje celkový príjem cholesterolu.

Komponent 9 kontroluje celkový príjem sodíka.

Komponent 10 preveruje pestrosť stravy jednotlivca (**Basiotis et al., 2002**).

Potravinová pyramída znázorňuje nutričné odporúčania pre Američanov (Dietary Guidelines for Americaners) (**Dietary Guidelines Advisory Committee, 2000**), typy



**Tabuľka 1 Index zdravého stravovania - HEI (Healthy Eating Index) (Basiotis et al., 2002)**

Parameter	Interval hodnotenia <sup>1</sup>	Kritériá pre max. hodnotenie 10 b	Kritériá pre min. hodnotenie 0 b
<b>Skupina konzumovaných potravín</b>			
1. obilniny	0 – 10	6 – 11 porcií <sup>2</sup>	0 porcií
2. zelenina	0 – 10	3 – 5 porcie <sup>2</sup>	0 porcií
3. ovocie	0 – 10	2 – 4 porcie <sup>2</sup>	0 porcií
4. mlieko	0 – 10	2 – 3 porcie <sup>2</sup>	0 porcií
5. mäso	0 – 10	2 – 3 porcie <sup>2</sup>	0 porcií
<b>Výživové odporúčania</b>			
6. celkový tuk	0 – 10	30 % energie alebo menej	45 % alebo viac energie
7. nasýtený tuk	0 – 10	menej ako 10 % energie	15 % alebo viac energie
8. cholesterol	0 – 10	300 mg alebo menej	450 mg alebo viac
9. sodík	0 – 10	2400 mg alebo menej	4800 mg alebo menej
10. pestrosť	0 – 10	8 alebo viac rôznych položiek za deň	3 alebo menej rôznych položiek za deň

<sup>1</sup> Osoby s konzumáciou alebo príjmom medzi maximálnym a minimálnym rozsahom sú hodnotené úmerne prideleným skóre.

<sup>2</sup> Počet porcií závisí od denného odporúčaného príjmu vid' tab. 2. Všetky množstvá sú uvedené na jeden deň.

**Tabuľka 2 Odporúčaný počet porcií potravinovej pyramídy na deň pre kategórie podľa veku a pohlavia (Basiotis et al., 2002)**

Vek/pohlavie	Energia (kcal)	Obilniny	Zelenina	Ovocie	Mlieko	Mäso <sup>1</sup>
Deti, 2-3 <sup>2</sup>	1300	6	3	2	2	2
*	1600	6	3	2	2	2
Deti, 4-6	1800	7	3,3	2,3	2	2,1
Ženy, 51+	1900	7,4	3,5	2,5	2	2,2
Deti, 7-10	2000	7,8	3,7	2,7	2	2,3
Ženy, 11-24	2200	9	4	3	3	2,4
*	2200	9	4	3	2	2,4
Ženy, 25-50	2200	9	4	3	2	2,4
Muži, 51+	2300	9,1	4,2	3,2	2	2,5
Muži, 11-14	2500	9,9	4,5	3,5	3	2,6
*	2800	11	5	4	2	2,8
Muži, 19-24	2900	11	5	4	3	2,8
Muži, 25-50	2900	11	5	4	2	2,8
Muži, 15-18	3000	11	5	4	3	2,8

<sup>1</sup> Jedna porcia sa rovná 2,5 unciám chudého mäsa.

<sup>2</sup> Veľkosť porcií bola znížená na dve tretiny počtu porcií pre dospelých s výnimkou mlieka pre deti vo veku 2-3 roky.

\* Odporúčaný počet porcií za deň na energetickej hladine špecifikovanej v potravinovej pyramíde (USDA, 1996).

a množstvo konzumovaných potravín s cieľom zabezpečiť zdravú stravu. Odporúčaný počet porcií v pyramíde závisí od odporúčania energetickeho príjmu pre jednotlivca. Tab. 2 znázorňuje odporúčaný počet porcií pre rôzne skupiny podľa veku/pohlavia a pre energeticke hladiny 1600 kcal, 2200 kcal a 2800 kcal, t.j. 6700 kJ, 9200 kJ a 11700 kJ.

Maximálne skóre 10 sa prideluje pre každú z piatich potravinových skupín (komponentov HEI) vtedy, ak strava danej osoby spĺňa alebo prekračuje odporúčaný počet porcií (tab. 2). Pre každú z piatich skupín potravín sa prideluje bodové hodnotenie 0 bodov pre jednotlivé komponenty, keď osoba neskonzovala žiadnu položku z potravinovej skupiny. Stredné bodové hodnotenie (medzi 0 a 10 bodov) sa vypočítava úmerne k počtu skonzoovaných porcií alebo ich častí (Basiotis et al., 2002).

Odporúčanie porcií z potravinovej pyramídy (U.S. Department of Agriculture, 1997) pre rôzne úrovne energetickeho príjmu bolo využité ako základ aj pre interpoláciu odporúčaných porcií u ľudí s iným

odporúčaným príjmom energie (tab. 2) (Basiotis et al., 2002). Odporúčaný príjem energie pre deti vo veku 2 až 3 roky je menej ako 1600 kcal, resp. 6700 kJ. Pre deti bol zvolený odporúčaný minimálny počet porcií, ale veľkosť porcií bola znížená na dve tretiny dospelých porcie, okrem mlieka. Tento prístup je zhodný s odporúčaniami potravinovej pyramídy. Dospelí muži vo veku 15 až 50 rokov majú o niečo vyšší odporúčaný príjem energie ako 2800 kcal (National Research Council, 1989b). Pretože potravinová pyramída nezohľadňuje pridané porcie z potravinových skupín, výskumníci rozhodli, že počet porcií potravín pre týchto jedincov má byť znížený na maximálny odporúčaný potravinovou pyramídou. Horný limit pre príjem tukov, saturovaných tukov, cholesterolu a sodíka bol stanovený na základe konzultácií s nutričnými výskumníkmi a z výskumu distribúcie príjmu daného komponentu (Basiotis et al., 2002).

Napriek tomu, že nutričné odporúčania pre Američanov, potravinová pyramída a Národný výskumný výbor pre výživu a zdravie zdôraznil význam pestrosti stravy

## potravinárstvo

**Tabuľka 3** Komponenty indexu zdravého stravovania – 2005 (HEI-2005) a štandardy na skórovanie <sup>1</sup> (Guenther et al., 2006)

Komponent	Maximum bodov	Štandard pre maximálne skóre	Štandard pre minimálne skóre
Celkové ovocie (vrátane 100 % štiav)	5	≥ 0,8 šálky ekviv. na 1000 kcal (4200 kJ)	žiadne ovocie
Celé ovocie (nie šťavy)	5	≥ 0,4 šálky ekviv. na 1000 kcal (4200 kJ)	žiadne celé ovocie
Celková zelenina	5	≥ 1,1 šálky ekviv. na 1000 kcal (4200 kJ)	žiadna zelenina
Tmavozelená a oranžová zelenina a strukoviny <sup>2</sup>	5	≥ 0,4 šálky ekviv. na 1000 kcal (4200 kJ)	žiadna tmavozelená alebo oranžová zelenina alebo strukoviny
Celkové obilniny	5	≥ 3 oz. ekviv. na 1000 kcal (4200 kJ)	žiadne obilniny
Celozrnné obilniny	5	≥ 1,5 oz. ekviv. na 1000 kcal (4200 kJ)	žiadne celozrnné obilniny
Mlieko <sup>3</sup>	10	≥ 1,3 šálky ekviv. na 1000 kcal (4200 kJ)	žiadne mlieko
Mäso a fazuľa	10	≥ 2,5 oz. ekviv. na 1000 kcal (4200 kJ)	žiadne mäso alebo strukoviny
Oleje <sup>4</sup>	10	≥ 12 gramov na 1000 kcal (4200 kJ)	žiadne oleje
Saturovaný tuk	10	< 7 % energie <sup>5</sup>	≥ 15 % energie
Sodík	10	≤ 0,7 gramu na 1000 kcal (4200 kJ)	≥ 2 gramy na 1000 kcal (4200 kJ)
Energia z tuhých tukov, alkoholických nápojov a cukrov	20	≤ 20 % energie	≥ 50 % energie

<sup>1</sup> Príjem medzi minimálnou a maximálnou úrovňou je bodovaný proporcionálne, s výnimkou nasaturovaného tuku a sodíka (viď poznámka 5).

<sup>2</sup> Strukoviny sú započítané ako zelenina len vtedy, ak sú naplnené štandardy pre mäso a fazuľu.

<sup>3</sup> Vráťane všetkých mliečnych produktov ako mlieka, jogurtov, syra a aj vrátane sójových nápojov.

<sup>4</sup> Vráťane nehydrogenovaných rastlinných olejov a olejov v rybách, orechoch a semenách.

<sup>5</sup> Saturovaný tuk a sodík získava skóre 8 pri príjme, ktorý zodpovedá nutričným odporúčaniam 2005, < 10 % energie zo saturovaného tuku a 1,1 g sodíka na 1000 kcal.

(**National Research Council, 1989a**; U.S. Department of Agriculture, **1996**; **Dietary Guidelines Advisory Committee, 2000**), v súčasnosti neexistuje konsenzus, ako kvantifikovať pestrosť stravy. Nutričná pestrosť sa tak pre HEI hodnotí ako celkový počet rôznych potravín, ktoré osoba konzumovala za deň v dostatočnom množstve, t.j. v množstve zodpovedajúcom najmenej polovici porcie v potravinovej skupine. Všetky ingrediencie v „zloženej“ potravine sú hodnotené v ich príslušnej potravinovej kategórii. Potraviny, ktoré sa odlišujú len metódou prípravy, resp. technologickou úpravou, sú spolu zoskupené a zahrnuté ako jeden typ potraviny (napríklad pečené, fritované alebo varené zemiaky sú považované za jeden typ potraviny). Rôzne typy potravín sú hodnotené osobitne (napríklad každý druh ryby – makrela, tuniak a pstruh sú zohľadňované ako rôzne potraviny). Maximálne skóre 10 bodov je pridelené, ak osoba konzumuje najmenej polovicu porcie z každej z ôsmich alebo viacerých rôznych potravín za deň. Skóre nula zodpovedá najmenej polovici porcie z troch alebo menej rôznych potravín skonzumovaných za deň. Horný a dolný limit na hodnotenie pestrosti potravín bol stanovený na základe konzultácie s nutričnými výskumníkmi (**Basiotis et al., 2002**).

**Gibson (2005)** uvádza deskriptory pre HEI skóre, ktoré určilo USDA:

nad 80 bodov: dobré stravovanie

51-80 bodov: sú potrebné zmeny v stravovaní

pod 51 bodov: zlé stravovanie.

Výpočty HEI-skóre a ich aplikácie detailnejšie uvádzajú **Kennedy et al. (1995)** a **Bowman et al. (1998)**. HEI bolo

použitie na zhodnotenie kvality stravy amerických detí vo veku 2-9 rokov v roku 1989 a 1998, pričom sa vychádzalo z údajov v USDA správe potravinového príjmu jednotlivcov. Celkové HEI skóre pre stravu detí v 1989 ako aj 1998 bolo približne 70, čo poukázalo na to, že strava si vyžaduje zlepšenie. Prítom neboli zistené rozdiely v skóre pre jednotlivé komponenty HEI skóre v stravovaní detí v 1989 a 1998. V roku 1998 HEI skóre záviselo od veku: bolo najvyššie (74,4) pre deti vo veku 2 až 3 roky a signifikantne nižšie (68,0) pre deti vo veku 7 až 9 rokov (**Carlson et al., 2001**).

Skóre HEI bolo použité aj na zhodnotenie kvality stravy v rámci NHANES III, s využitím údajov zo správy 1999-2001. Dobré stravovanie malo len 10 % americkej populácie, 16 % malo zlé stravovanie a zvyšná populácia mala stravu, ktorá si vyžadovala úpravy. Viaceré podskupiny populácie mali riziko nižšej kvality stravovania. Boli to najmä muži vo veku 15-18 rokov, skupiny s nízkym finančným príjmom, nehispaníci Američania s africkým pôvodom a osoby s nízkym vzdelaním (**Basiotis et al., 2002**). 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. HEI bol upravený s ohľadom na Kanadské nutričné odporúčania 1990 (**Health Canada, 1990**).

Neskôr bol HEI hodnotený v súvislosti s plazmatickými biomarkermi. **Hann et al. (2001)** poukázali v štúdiu na to, že strava s vysokým skóre HEI bola v pozitívnej korelácii s plazmatickou koncentráciou karotenoidov a vitamínu C,

čo indikuje, že výber potravín založený na potravinovej pyramíde viedol k zdravšiemu stravovaniu. Napriek tomu ale zvýšená koncentrácia uvedených biomarkerov neindikovala nevyhnutne znížené riziko chorôb. Stále chýba dôkaz existencie pozitívneho vzťahu medzi príjmom potravín, plazmatickými biomarkermi a chorobami. Potvrdená bola len slabá korelácia medzi skóre HEI a rizikom chronických (kardiovaskulárnych a nádorových) chorôb (McCullough et al., 2000a, 2000b).

Vypracovanie nových nutričných odporúčaní pre americkú populáciu v roku 2005 bolo motiváciou pre revíziu HEI. Štandardy potravinových skupín sú založené na odporúčaní MojaPyramída (MyPyramid) (Britten et al., 2006). Štandardy boli vytvorené použitím princípu denzity, tzn. boli vyjadrené ako percentá kalórií alebo na 1000 kcal (4200 kJ). Komponenty HEI-2005 a skórovacie štandardy sú uvedené v tab. 3. HEI-2005 je štandardizovaný a môže byť použitý v nutričnom monitoringu, intervencii a výskume. Obsahuje 12 komponentov (Guenther et al., 2006). Guenther et al. (2008) na základe svojich výsledkov uvádzajú, že skóre v prípade 9 z 12 komponentov bolo nižšie u fajčiarov ako nefajčiarov.

Cieľom práce bolo vyhodnotiť vybrané komponenty indexu zdravého stravovania v stravovaní dospelých žien.

## MATERIÁL A METÓDY

V skupine náhodne vybraných žien dospelého veku (25-58 rokov) sme hodnotili stravovanie použitím 24-hodinových retrospektívnych nutričných anamnéz (n = 174). Veková charakteristika a zloženie súboru podľa veku žien sú uvedené v tab. 4 a 5. Celodenný záznam stravy sme počítačovo spracovali v nutričnom programe Alimenta verzia 4.3e (vypracovanom vo Výskumnom ústave potravinárskom v Bratislave), ktorý využíva Potravinovú banku dát zloženia potravín. Celodenný príjem stravy sme na základe spracovania v nutričnom software zhodnotili podľa vybraných komponentov HEI indexu zdravého stravovania (tab. 1).

- celkový tuk (položka 61374 vo výstupe z nutričného software Alimenta 4.3e)
- nasýtený tuk (položka 61375 vo výstupe z nutričného software Alimenta 4.3e)
- cholesterol (položka 52610 vo výstupe z nutričného software Alimenta 4.3e)
- sodík (položka 54111 vo výstupe z nutričného software Alimenta 4.3e).

**Tabuľka 4 Veková charakteristika súboru**

Parametre	Vek (roky)
<b>priemer ± SD</b>	44,42 ± 9,84
<b>minimum</b>	25,00
<b>maximum</b>	58,00
<b>medián</b>	46,00
<b>modus</b>	51,00

**Tabuľka 5 Vekové zloženie súboru**

Vek	%
25 – 30 rokov	10,53
31 – 35 rokov	15,79
36 – 40 rokov	5,26
41 – 45 rokov	15,79
46 – 50 rokov	21,05
51 – 55 rokov	15,79
56 – 60 rokov	15,79

Zároveň sme vyhodnotili aj spoločné plnenie viacerých nutričných odporúčaní (zložiek indexu zdravého stravovania) súčasne.

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

Pri hodnotení príjmu vybraných nutričných faktorov sme zistili, že príjem tukov zodpovedal odporúčaniam a HEI, t.j. max. 30 % denného energetického príjmu u približne tretiny súboru (31,03 %). Nepriaznivým výsledkom je, že extrémne vysoký podiel tukov v strave (viac ako 45 % denného energetického príjmu) malo 8,05 % probandov (tab. 6). Priemerný percentuálny podiel tuku bol 34,49 ± 29,38 %, t.j. bol vyšší ako výživové odporúčanie (tab. 10).

Odporúčané výživové dávky SR určujú vo všeobecných odporúčaníach podiel tukov na celkovom objeme energie maximálne 30 % s nasledujúcou štruktúrou mastných kyselín: nasýtené mastné kyseliny 10 %, monoénové mastné kyseliny 10-12 %, polyénové mastné kyseliny 8-10 % (Vestník MZ SR, 1997). Štandard, aby nie viac ako 30 % denného energetického príjmu pochádzalo z tukov, v súčasnosti prekračuje väčšina obyvateľov Európy. To znamená, že ak uvažujeme denný príjem energie 10 000 kJ (2400 kcal), čo sú denné energetické nároky dospelého jedinca s priemernou fyzickou aktivitou, tak množstvo prijatého tuku by malo byť maximálne 80 g. Toto číslo zahŕňa tuky a/alebo oleje použité pri príprave potravín a zároveň tzv. skryté tuky prítomné v potravínach a surovinách. Početné výskumy a experimenty dokazujú, že okrem množstva prijatého tuku má veľmi dôležitú úlohu aj jeho zloženie (Ministerstvo zdravotníctva SR, 2001).

**Tabuľka 6 Energetická hodnota z tukov**

Hodnota parametra	n	%
<b>max. 30 % energetického príjmu *</b>	54	<b>31,03</b>
<b>31-44 % energetického príjmu</b>	106	<b>60,92</b>
<b>45 % energetického príjmu a viac</b>	14	<b>8,05</b>

\* odporúčanie podľa Vestníka MZ SR (1997) a Kajabu et al. (1999); podľa HEI (Basiotis et al., 2002)

Odporúčaná energetická hodnota zo nasýtených mastných kyselín (max. 10 %) bola zistená u viac ako polovice súboru (58,62 %; tab. 7). Naopak toto odporúčanie vysoko prekračovalo 5,17 % probandov, ktorí mali v strave nepriaznivo vysoký podiel nasýtených mastných kyselín z celkového denného energetického príjmu (t.j. ich podiel predstavoval viac ako 15 % z príjmu energie). Priemerný podiel prijatého nasýteného tuku bol nižší ako stanovené kritérium (8,95 ± 4,12 %) (tab. 10).

Podľa odporúčaní by mali nasýtené mastné kyseliny poskytovať 10 %, mononenasýtené mastné kyseliny 12 %, polynenasýtené 6-8 % z celkového energetického príjmu.

Aj vzájomný pomer n-3, n-6 a n-9 mastných kyselín ovplyvňuje fyziologické procesy (**Ministerstvo zdravotníctva SR, 2001**).

Nasýtené mastné kyseliny sa vyskytujú v živočíšnych tukoch aj v rastlinných olejoch. K bohatým zdrojom nasýtených mastných kyselín patrí maslo, živočíšny tuk a tropické oleje (palmový, kokosový olej a olej z palmových jadier). V USA a v Európe tvoria nasýtené mastné kyseliny 12-15 % z celkového energetického príjmu. V priemere na každé 1 % energie prijatej vo forme nasýtených mastných kyselín, ktoré zvyšujú hladinu cholesterolu v krvi, sa hladina LDL-cholesterolu zvýši v porovnaní s kyselinou olejovou asi o 2 mg.dl<sup>-1</sup> (0,025 mmol.l<sup>-1</sup>). Jedna nasýtená mastná kyselina - kyselina stearová (C<sub>18:0</sub>) nezvyšuje koncentráciu LDL-cholesterolu. Hlavným zdrojom tejto kyseliny je hovädzí loj a kakaové maslo (**Grundy, 2003**).

**Tabuľka 7 Energetická hodnota zo nasýtených mastných kyselín (SFA)**

Množstvo SFA	n	%
<b>max. 10 % energetického príjmu *</b>	102	<b>58,62</b>
<b>10-14 % energetického príjmu</b>	63	<b>36,21</b>
<b>15 % energetického príjmu a viac</b>	9	<b>5,17</b>

\* odporúčanie podľa Vestníka MZ SR (1997) a Kajabu et al. (1999); podľa HEI (Basiotis et al., 2002)

Rastlinné oleje sú bohaté na nenasýtené mastné kyseliny. Na rozdiel od ostatných mastných kyselín ľudský organizmus nedokáže produkovať niektoré polynenasýtené mastné kyseliny (esenciálne), takže musia byť prijaté potravou. Spomedzi týchto esenciálnych mastných kyselín sa kyselina linolová (n-6) vyskytuje vo veľkých množstvách v slnečnicovom oleji, zatiaľ čo linolénová (n-3) v repkovom a sójovom oleji v 8 % zastúpení. Pre ľudské zdravie je prospešné, ak množstvo n-6 mastných kyselín v dennej strave nie je viac ako 4 až 10-krát vyššie ako množstvo n-3 mastných kyselín. Olej produkovaný morskými rybami je vysoko cenený kvôli obsahu takých mastných kyselín, akými sú kyselina eikosapentaénová (EPA) a dokosahexaénová (DHA), ktoré znižujú pravdepodobnosť vzniku trombózy v krvných cievach. Ľudský organizmus je schopný syntetizovať vyššie spomenuté mastné kyseliny radu n-3 s dlhým uhlíkovým reťazcom obsahujúcim 5 alebo 6 dvojité väzby, ale aj napriek tomu sa ich odporúča spolu denne konzumovať v množstve 200-300 mg. Z nutričného hľadiska sú tuky a oleje zdraviu prospešné iba vtedy, ak zastúpenie mastných kyselín sa blíži k vyššie spomínaným pomerom. Z hľadiska príjmu tukov je vhodné prijímať najmenej 2,7 g kyseliny linolovej a 0,5 g kyseliny α-linolénovej na 10 000 kJ prijatej energie (**Ministerstvo zdravotníctva SR, 2001**).

Vo vyšetrovanom súbore bol príjem cholesterolu v rámci odporúčaných hodnôt (max. 300 mg) u 69,54 %. U 10,92 % probandov bol príjem cholesterolu veľmi vysoký, čo je nepriaznivé zistenie vzhľadom na kardiovaskulárne riziko (tab. 8). Priemerné množstvo cholesterolu prijateho stravou za deň bolo v súbore nižšie ako požadované nutričné kritérium (233,80 ± 175,03 mg) (tab. 10).

Ľudský organizmus si je schopný syntetizovať nevyhnutné množstvo cholesterolu, a preto jeho nadmerný príjem z potravy zvyšuje riziko kardiovaskulárnych ochorení. To je hlavný dôvod, pre ktorý nutricionisti odporúčajú nekonzumovať viac ako 300 mg cholesterolu. Cholesterol sa vyskytuje iba v potravinách živočíšneho pôvodu. Potraviny rastlinného pôvodu neobsahujú cholesterol, ale môžu obsahovať látky s podobnou štruktúrou – rastlinné steroly, ktoré sa slabo vstrebávajú, nekonvertujú na cholesterol, dokonca niektoré z nich znižujú hladinu cholesterolu v krvi (**Ministerstvo zdravotníctva SR, 2001**).

Hlavnými zdrojmi cholesterolu sú vaječný žĺtok, produkty s obsahom mliečneho tuku, živočíšne tuky a mäso. Každých 200 mg cholesterolu prijateho stravou denne zvýši koncentráciu sérového LDL-cholesterolu (LDL - low density lipoproteins, lipoproteíny s nízkou hustotou) priemerne asi o 6 mg.dl<sup>-1</sup> (0,155 mmol.l<sup>-1</sup>) (**Grundy, 2003**). Mäso obsahuje v priemere 60-75 mg, syry približne 100 mg cholesterolu na 100 g. Jedno slepačie vajce obsahuje takmer 300 mg cholesterolu, ktorý je sústredený v žĺtku, zatiaľ čo v bielku sa nevyskytuje žiaden cholesterol. Podľa štatistických údajov ľudia s vysokou hladinou cholesterolu v krvi sú častejšie postihnutí kardiovaskulárnym ochorením. Okrem cholesterolu prijateho v potravinách ovplyvňuje hladinu cholesterolu v krvi aj kvalita tukov konzumovaných s jedlom. Nasýtené mastné kyseliny zvyšujú, zatiaľ čo polynenasýtené mastné kyseliny znižujú hladinu cholesterolu v krvi (**Ministerstvo zdravotníctva SR, 2001**).

**Tabuľka 8 Príjem cholesterolu**

Množstvo cholesterolu	n	%
<b>max. 300 mg *</b>	121	<b>69,54</b>
<b>300 – 449 mg</b>	34	<b>19,54</b>
<b>450 mg a viac</b>	19	<b>10,92</b>

\* odporúčanie podľa Vestníka MZ SR (1997) a Kajabu et al. (1999); podľa HEI (Basiotis et al., 2002)

Odporúčaný príjem sodíka bol charakteristický len pre malú časť súboru (22,99 %). Odporúčanie presiahlo 77,01 % probandov (tab. 9). Priemerný podiel denne prijateho sodíka bol vyšší ako požadované kritérium (3760,42 ± 1976,89 mg) (tab. 10).

Sodík sa nachádza v potravinách rastlinného aj živočíšneho pôvodu. Za zvýšený príjem sodíka zodpovedá množstvo prijatej soli (utilizácia chloridu sodného). Podľa odporúčaných výživových dávok v SR sa požaduje znižovať obsah kuchynskej soli v potravinách. S nadmernou konzumáciou soli súvisí aj nadmerný výskyt kardiovaskulárnych ochorení. Prevenciou je vyhýbanie sa slaným jedlám, preto je nevyhnutné, aby sa značne znížil aj obsah soli v potravinárskych výrobkoch. Človek je schopný privyknuť si na málo solené jedlá. Okrem toho v mierne solených jedlách sa môže objaviť chuť, ktorá bola predtým potlačovaná nadmerným solením (**Ministerstvo zdravotníctva SR, 2001**).

**Tabuľka 9 Príjem sodíka**

Množstvo sodíka	n	%
max. 2400 mg *	40	<b>22,99</b>
2400 – 4799 mg	98	<b>56,32</b>
4800 mg a viac	36	<b>20,69</b>

\* odporúčanie podľa HEI (Basiotis et al., 2002)

**Tabuľka 10 Výživové odporúčania**

Parameter	n = 174
<b>celkový tuk (% energie)</b> priemer ± SD medián modus	34,49 ± 29,38 32,63 47,31
<b>nasýtený tuk (% energie)</b> priemer ± SD medián modus	8,95 ± 4,12 8,85 14,65
<b>cholesterol (mg)</b> priemer ± SD medián modus	233,80 ± 175,03 189,58 233,49
<b>sodík (mg)</b> priemer ± SD medián modus	3760,42 ± 1976,89 3514,94 4784,78

Hodnotením výživových odporúčaní (komponentov 6-9) z indexu HEI sme v súbore zistili najlepšie výsledky pri dodržiavaní nutričných kritérií v prípade posudzovania príjmu cholesterolu, ďalej nasýteného, potom celkového tuku a najmenej bolo splňané nutričné odporúčanie pre príjem sodíka (tab. 11). Najväčším problémom v súbore je tak dodržiavanie odporúčania v príjme sodíka.

**Tabuľka 11 Výživové odporúčania**

Vybrané výživové odporúčania	Nutričné protokoly (n = 174)	
	n	%
<b>celkový tuk</b> (max. 30 % energie)	54	<b>31,03</b>
<b>nasýtený tuk</b> (max. 10 % energie)	102	<b>58,62</b>
<b>cholesterol</b> (max. 300 mg)	121	<b>69,54</b>
<b>sodík</b> (max. 2400 mg)	40	<b>22,99</b>

Hodnotili sme tiež súčasné splnenie štyroch odporúčaní v dennom stravovaní probandov (pre celkový príjem tukov, pre príjem nasýtených mastných kyselín, cholesterolu a sodíka). Zistili sme, že ani jedno zo štyroch odporúčaní nemalo v stravovaní dodržaných 11,49 % probandov (tab. 12). Najväčší podiel súboru splnil súčasne jedno alebo dve odporúčania (spolu 62,07 %). Tri alebo štyri odporúčania súčasne pokrylo 26,44 % osôb, z čoho však všetky štyri výživové odporúčania naplnil len veľmi malý podiel probandov (8,62 %).

**Tabuľka 12 Počet splnených odporúčaní \* (% súboru)**

Počet splnených odporúčaní	n	%
0	20	<b>11,49</b>
1	52	<b>29,89</b>
2	56	<b>32,18</b>
3	31	<b>17,82</b>
4	15	<b>8,62</b>

\* z nasledujúcich štyroch kritérií: pre celkový príjem tukov, pre príjem nasýtených, mastných kyselín, cholesterolu a sodíka

Keďže neexistuje prakticky žiadna potravina, ktorá by mala ideálne nutričné zloženie, potraviny musia byť selektované takým spôsobom, aby denný príjem stravy zahŕňoval všetky nevyhnutné nutrienty v primeranom pomere (**Ministerstvo zdravotníctva SR, 2001**). Plnenie nutričných odporúčaní v dlhodobom meradle je predpokladom dobrého nutričného a zdravotného stavu jedincov.

### ZÁVER

V súbore sme hodnotením vybraných nutričných parametrov ako komponentov indexu zdravého stravovania – HEI z roku 1995 zistili vážne nedostatky v dennom stravovaní, pričom najväčším problémom v súbore bolo dodržiavanie príjmu sodíka (max. 2400 mg len u 22,99 % probandov), nasledoval príjem celkového tuku (max. 30 % energie u 31,03 % osôb), nasýteného tuku (max. 10 % energie u 58,62 %) a napokon cholesterolu (max. 300 mg denne u 69,54 %).

Stravovanie sa na základe ukazovateľov indexu zdravého stravovania vyznačovalo absolútnym nedodržiavaním výživových odporúčaní (zodpovedajúcich nulovému hodnoteniu v systéme HEI) v prípade príjmu celkového tuku u 8,05 % probandov (s podielom tuku v strave 45 % energie a viac), príjmu nasýteného tuku u 5,17 % osôb (s jeho podielom 15 % energie a viac), príjmu cholesterolu u 10,92 % (v dennom množstve 450 mg a viac) a sodíka u 20,69 % (v dennom množstve 4800 mg a viac).

Komplexné zhodnotenie stravovania podľa všetkých štyroch hodnotených nutričných kritérií preukázalo, že všetky odporúčania boli dodržané súčasne len u 8,2 % súboru. Minimálne dve zo štyroch odporúčaní splnila viac ako polovica súboru (58,62 % osôb). Zvyšný podiel probandov (41,38 %) mal v strave výrazné nedostatky, z nich v prípade 11,49 % dokonca nebolo dodržané ani jedno nutričné kritérium.

Z výsledkov vyplýva, že je potrebné zvyšovať nutričné uvedomenie populácie, zdôrazňovať vplyv stravy na vznik a rozvoj závažných civilizačných ochorení efektívne, aby zmeny viedli k dodržiavaniu nutričných odporúčaní v dennom príjme stravy, k zlepšovaniu aktuálneho spôsobu výživy populácie, a tým aj jej zdravotného a nutričného stavu. Nápomocné by mohlo byť aj prehľadné nutričné označovanie potravinárskych výrobkov s uvádzaním významných nutričných kritérií, hodnotených aj v rámci indexu zdravého stravovania, pre lepšiu orientáciu spotrebiteľov pri výbere potravín a surovín.

**Acknowledgments:**

This work has been supported by the Excellence Center for Agrobiodiversity Conservation and Benefit project implemented under the Operational Programme Research and Development financed by European Fund for Regional Development (ITMS 26220120015). This article was also part of the project KEGA 301-035SPU-4/2010.

**LITERATÚRA**

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, 2002. CNPP-12.

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.

BRITTEN, P., MARCOE, K., YAMINI, S., DAVIS, C. 2006. Development of Food Intake Patterns for the MyPyramid Food Guidance System. In *Journal of Nutrition Education and Behavior*, vol. 38, 2006, no. 6S, p. S78-S92.

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, 2001.

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.

DUBOIS, L., GIRARD, M., BERGERON, N. 2000. The choice of a diet quality indicator to evaluate the nutritional health of populations. In *Public Health Nutrition*, vol. 3, 2000, no. 3, p. 357-365.

GIBSON, R. S. 2005. *Principles of Nutritional Assessment*. 2<sup>nd</sup> ed. Oxford : Oxford University Press, 2005. 908 p. ISBN 978-0-19-517169-3

GRUNDY, S. M. 2003. Factors Determining Blood Cholesterol Levels. In *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*. Volume 2. Second Edition. Oxford : Elsevier Science, 2003. p. 1237-1243. ISBN 0-12-227055-X

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.

Health Canada, 1990. *Nutrition recommendations: Report of the Scientific Review Committee*. Ottawa : Minister of Supplies and Services Canada, 1990.

KAJABA, I., ŠIMONČIČ, R., GINTER, E., ONDREJKA, J., KALÁČ, J., BZDÚCH, V. 1999. Odporúčané výživové dávky pre obyvateľstvo Slovenska (8. revízia OVD). In *Výživa a zdravie*, roč. 44, 1999, č. 2, s. 25-29.

KENNEDY, E. T., OHLS, J., CARLSON, S., FLEMING, K. 1995. The Healthy Eating Index: design and applications. In *Journal of the American Dietetic Association*, vol. 95, 1995, no. 10, p. 1103-1108.

MCCULLOUGH, M. L., FESKANICH, D., STAMPFER, M. J., ROSNER, B. A., HU, F. B., HUNTER, D. J., VARIYAM, J. N., COLDITZ, G. A., WILLET, W. C. 2000a. Adherence to the Dietary Guidelines for Americans and risk of major chronic disease in women. In *American Journal of Clinical Nutrition*, vol. 72, 2000, no. 5, p.1214-1222.

MCCULLOUGH, M. L., FESKANICH, D., RIMM, E. B., GIOVANNUCCI, E. L., ASCHERIO, A., VARIYAM, J. N., SPIEGELMAN, D., STAMPFER, M. J., WILLET, W. C. 2000b. Adherence to the Dietary Guidelines for Americans and risk of major chronic disease in men. In *American Journal of Clinical Nutrition*, vol. 72, 2000, no. 5, p.1223-1231.

Ministerstvo zdravotníctva SR, 2001. *Skupiny potravinových komodít a kritériá pre hodnotenie ich zdravotnej neškodnosti. Projekt Zdravá výživa pre zdravé srdce*. Ministerstvo zdravotníctva SR, máj 2001. 16 s.

National Research Council, Committee on Diet and Health, Food and Nutrition Board, 1989a. *Diet and Health: Implications for Reducing Chronic Disease Risk*. Washington, DC: National Academy Press, 1989a.

National Research Council, Subcommittee on the Tenth Edition of the RDAs, Food and Nutrition Board, 1989b. *Recommended Dietary Allowances* (10<sup>th</sup> ed.). Washington, DC: National Academy Press, 1989b.

U.S. Department of Agriculture, 1995. The Healthy Eating Index. U.S. Department of Agriculture, Center for Nutrition Policy and Promotion. CNPP-1.

U.S. Department of Agriculture, 1996. The Food Guide Pyramid. U.S. Department of Agriculture, Center for Nutrition Policy and Promotion. Home and Garden Bulletin Number 252.

U.S. Department of Agriculture, 1997. Pyramid Servings Data. Results from USDAs 1994-1996 Continuing Survey of Food Intakes by Individuals. 1997. U.S. Department of Agriculture, Agriculture Research Service, Food Survey Research Group, Bethesda, MD.

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.

**Contact address:**

Katarína Fatrcová-Šramková, Department of Human Nutrition, Faculty of Agrobiology and Food Resources, Slovak University of Agriculture, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra Slovakia, E-mail: katarina.sramkova@gmail.com

## EVALUATION OF ELISA METHOD TO DETECTION OF COW $\beta$ -LACTOGLOBULIN IN SHEEP MILK AND SHEEP MILK PRODUCTS

Lucia Zeleňáková, Radoslav Židek, Margita Čanigová, Juraj Paulov, Tatiana Gallisová

### ABSTRACT

The aim of work was to optimize the ELISA method to detect the adulteration of sheep milk and sheep milk products by cow milk in the laboratory. We have focused on laboratory testing of ELISA kit ( $\beta$ -Lactoglobulin ELISA Set, SEDIUM R&D) for detection of cow  $\beta$ -Lg in sheep milk order to obtain high-quality, reliable and economically advantageous method suitable for routine use in practice. The results shown that for the quality of adulteration determination it is necessary to verify the sensitivity of applied kit by the samples dilution in accordance with the producer declared quantification range contained in the manual ELISA kit. The starting point for obtaining of relevant data was to create separate regression curves with high determination coefficient, which allowed to quickly and easily detect the cow milk additions in sheep milk, cloddish sheep and Slovak sheep cheese.

**Keywords:** cow milk, sheep milk, sheep cheese, adulteration, ELISA

### ÚVOD

Podľa komisie EÚ pre autentifikáciu potravín, musia mať autentické potraviny definovaný pôvod, obsah a kvalitu a musia pochádzať zo špecifikovaných zdrojov (Hurley et al., 2004a).

Ochrana záujmov spotrebiteľa je ošetrená v Nariadení (ES) č. 178/2002 EP a Rady, pričom článok 8 (potravínové právo) sa zameriava na predchádzanie podvodným alebo nekalým postupom falšovania potravín a akýmkoľvek iným postupom, ktoré môžu spotrebiteľa viesť do omylu.

S problematikou falšovania mlieka je spätý Výnos MP SR a MZ SR č. 1187/2004-100, ktorým sa vydáva hlava Potravinového kódexu Slovenskej republiky upravujúca označovanie potravín v znení neskorších predpisov (harmonizovaná legislatíva). Problematikou falšovania mlieka sa zaoberá aj Výnos MP SR a MZ SR č. 2143/2006 – 100, ktorým sa vydáva hlava Potravinového kódexu Slovenskej republiky upravujúca mlieko a výrobky z mlieka a ktorý je neharmonizovanou legislatívou. V harmonizovanej i neharmonizovanej legislatíve Slovenskej republiky je zadefinované, aké mlieko, prípadne, aký výrobok z tohto mlieka sa môže označiť ako ovčie, kozie.

Keďže ovčie a kozie mlieko sú podstatne drahšie ako kravské mlieko a ich produkcia je sezónna, rozšírilo sa falšovanie ovčích a kozích syrov nedeklarovanou prísadou kravského mliečnej zložky (Piknová et al., 2002). V mnohých krajinách má detekcia falšovania syrov mimoriadny význam najmä z hľadiska zachovania tradícií ich výroby. Z uvedeného dôvodu získali mnohé syry tzv. ochrannú značku originality (PDO – protected designation of origin), čo znamená, že sú vyrobené z jedného druhu mlieka a v označení je táto skutočnosť deklarovaná (De La Fuente, Juárez, 2005). V kontexte s uvedeným dňa 17. júla 2008 bolo v Úradnom vestníku Európskej únie zverejnené Nariadenie Komisie (ES) č. 676/2008 zo 16. júla 2008, ktorým sa do Registra chránených označení pôvodu a chránených zemepisných označení zapisujú určité názvy a medzi nimi i náš výrobok Slovenská bryndza.

Mlieko jednotlivých cicavcov je možné rozdeliť podľa zastúpenia hlavných druhov bielkovín na mlieka kazeínové

a albumínové. Kazeínové mlieka produkujú prežúvavce a relatívny obsah kazeínového komplexu tu presahuje 75 % celkového obsahu dusíka. Albumínové mlieka produkujú mäsožravce, všežravce a bylinožravce s jednoduchým žalúdkom (Gajdúšek, 2003; Buňka et al., 2009). Najväčší podiel čistých bielkovín (priemerne 80 %) pripadá na bielkoviny kazeínového komplexu. Jedným zo základných znakov kazeínového komplexu je jeho precipitácia pri pH 4,6 (Madureira et al., 2007). Kazeín kravského mlieka predstavuje komplex štyroch fosfoproteínových frakcií označovaných ako  $\alpha_{S1}$ -,  $\alpha_{S2}$ -,  $\beta$ - a  $\kappa$ -kazeíny. Proteíny kazeínového komplexu sú polymorfné, z čoho vyplýva, že u jednotlivých genetických variantov sa primárna štruktúra konkrétnej frakcie môže mierne odlišovať. Hlavne v staršej literatúre sa ďalej objavujú zmienky o  $\gamma$ -kazeínoch a  $\lambda$ -kazeínoch, ktoré sú však v skutočnosti iba fragmentmi základných frakcií  $\beta$ -kazeínu, resp.  $\alpha_{S1}$ -kazeínu (Farrell et al., 2004).

Približne 20 % čistých bielkovín tvoria tzv. srvátkové proteíny, ktoré sa nevráťajú pri pH 4,6. Medzi srvátkové proteíny zahrňujeme hlavne  $\alpha$ -laktalbumín ( $\alpha$ -La),  $\beta$ -laktoglobulín ( $\beta$ -Lg), sérový albumín (SA), imunoglobulíny, proteázo-peptónovú frakciu, enzýmy a iné minoritné bielkoviny (Madureira et al., 2007). Obsah jednotlivých frakcií srvátkových bielkovín sa líši podľa druhu mlieka (tabuľka 1).

Hlavnou frakciou srvátkových proteínov v mlieku prežúvavcov je  $\beta$ -Lg (Mc Kenzie, 1991). Kým u kravského mlieka je známych 7 genetických variantov  $\beta$ -Lg, tak v ovčom mlieku sa potvrdili 2 genetické varianty  $\beta$ -Lg označené ako A a B (Pintado, Malcata, 1999).

Technologické vlastnosti mlieka z hľadiska výroby syrov sú podmienené radou faktorov a majú vplyv na kvalitu syrov a ekonomiku výroby. Rozhodujúci vplyv má obsah a zastúpenie bielkovín v mlieku. Vplyv genetického polymorfizmu bielkovín na zloženie mlieka je popísaný u fenotypov jednotlivých kazeínových frakcií,  $\beta$ -Lg, u stupňa glykolyzácie  $\kappa$ -kazeínu, u obsahu minerálnych látok, hlavne vápnika a u veľkosti kazeínovej micely (Böhmová, Černý, 1994).



**Tabuľka 1** Zloženie a obsah srvátkových proteínov v surovom mlieku kráv, kôz a oviec (Hurley et al., 2004b)

Srvátkové proteíny	Kravské mlieko	Kozie mlieko	Ovčie mlieko
	Celkom [%]		
Imunoglobulíny	15,0	11,5	20,0
Sérumalbumín/laktoferín	9,5	12,8	8,1
β-laktoglobulín	59,3	54,2	61,1
α-laktoalbumín	16,2	21,4	10,8
Koncentrácia [g.l <sup>-1</sup> ]			
Imunoglobulíny	0,97	0,71	2,15
Sérumalbumín/laktoferín	0,61	0,79	0,87
β-laktoglobulín	3,83	3,33	6,58
α-laktoalbumín	1,05	1,31	1,16
Srvátkové proteíny celkom	6,46	6,14	10,76

Z výživového hľadiska je optimálne, aby sa v prostredí mlieka a mliečnych výrobkov uhradili asi dve tretiny odporúčanej dávky vápnika a tie by mali byť rozdelené v pomere 1: 1 : 1 medzi syry, mlieko a zakysané mliečne výrobky (Fatrková-Šramková, 2009). Zvlášť syry majú široké využitie v gastronómii. Do teplých i studených pokrmov sa pridávajú postrúhané, našľahané, obalené, či vyprášané a zapekané syry (Habánová, 2004). V poslednom desaťročí sa zvýšil počet experimentov a štúdií dokumentujúcich priaznivý terapeutický účinok syrov pri niektorých chorobných stavoch. Z hľadiska ich využitia v praxi je mimoriadne významný ich lokálny, celkový a biomedicínsky účinok, inhibičný efekt voči patogénom, optimalizačný vplyv na tráviace procesy a anticholesterolová aktivita (Lengelyová et al., 2010).

Fyziologické odchýlky v zložení mlieka majú veľký vplyv na kvantitatívny dôkaz použitej analytickej metódy (Schilk, 1995; Can, 1996). V potravinovej analýze je ELISA najpoužívanejšia forma imunoanalýzy, pretože redukuje cenu vybavenia a je ľahko použiteľná, rýchla, pohotová a automatizovaná (Giovannacci et al., 2004; Hurley et al., 2004b). Vysoká špecifickosť tejto metódy sa odráža aj v koncentračných jednotkách, v ktorých sa celosvetovo vyjadrujú výsledky ELISA, a to buď ppm (mg.kg<sup>-1</sup>) alebo ppb (μg.kg<sup>-1</sup>). Za hlavné výhody sa považuje spracovanie veľkého množstva vzoriek, vytvorenie kalibračnej krivky a premeranie slepých vzoriek súčasne na jednej mikrotitračnej doštičke, čo eliminuje vplyv meniacich sa podmienok počas stanovenia (Stejskal et al., 2008). ELISA má aj nevýhody napr. v tom, že deteguje neporušené bielkoviny, ale bielkovinové hydrolyzáty nemusia imunologicky reagovať. Iným negatívom je, že spracovateľské operácie môžu znížiť rozpustnosť bielkovín, vyvolať chemické modifikácie, čo môže mať vplyv na viazanie protilátok na epitopy v systéme ELISA (Taylor et al., 2009).

Hlavným cieľom našej práce bola optimalizácia ELISA metódy na detekciu falšovania ovčieho mlieka a výrobkov z neho kravským mliekom v laboratórnych podmienkach. V zmysle uvedeného sme sa zamerali na laboratórne skúšanie ELISA testu (β-Lactoglobulin ELISA kit, SEDIUM R&D) založeného na detekcii boviného β-Lg

s cieľom získať kvalitnú, spoľahlivú a ekonomicky výhodnú metodiku vhodnú na rutinné použitie v praxi.

## MATERIÁL A METÓDY

Pri zostavovaní metodiky práce sme vychádzali z poznatkov získaných štúdiom vedeckej literatúry, ako aj z výsledkov výskumných projektov, ktoré boli zamerané na detekciu falšovania mlieka a syrov v niektorých európskych krajinách. Laboratórne analýzy sme uskutočnili na Katedre hodnotenia a spracovania živočíšnych produktov (príprava vzoriek) a na Katedre hygieny a bezpečnosti potravín FBP (detekcia falšovania ELISA testami). Surové ovčie mlieko získané zo salaša v Nitrianskom kraji a surové kravské mlieko odobrané z prvovýroby bolo ihneď po odbere uchovávané pri teplote 6 °C a následne spracované v zmysle stanovených cieľov. Surové ovčie mlieko, surové kravské mlieko, ako aj tepelne ošetrené kravské mlieko sme zmiešavali v stanovených pomeroch (0; 0,5; 5; 47 % kravského podielu v skúmanej vzorke ovčieho mlieka). Kravské mlieko sme pasterizovali pri 72 °C po dobu 15 sekúnd a 85 °C po dobu 3 sekundy. Zo vzniknutých mliečnych zmesí sme následne vyrábali hrudkový syr a bryndzu. Všetky vyrobené produkty sme analyzovali vybraným ELISA testom.

*Príprava vzoriek syrov:* Surové mlieko sme pred analýzou kvalitatívne vyšetrili s cieľom zistiť jeho technologické vlastnosti súvisiace s výrobou syrov. V zmysle uvedeného sme uskutočnili skúšku syriteľnosti a pre jej zlepšenie sme do jednotlivých vzoriek v závislosti od stupňa tepelného ošetrovania pridali od 1 – 2,5 ml CaCl<sub>2</sub> na 1 l. Po vzájomnom zmiešavaní obidvoch druhov mliek nasledovalo vlastné syrenie mlieka, spracovanie syreniny, obrátenie povrchu syreniny, jej krájanie, harfovanie a miešanie a nakoniec formovanie hrudkového syra. Vzniknuté hrudky sme následne ošetrovali 2 % roztokom NaCl a nechali zrieť pri teplotách zodpovedajúcich technologickým požiadavkám (23 °C, 19 °C a nakoniec 8 °C). Počas 12 dní sme okrem monitorovania teploty merali aj pH v jednotlivých hrudkách. S cieľom vyrobiť bryndzu sme jednotlivé hrudky syrov rozdrobili, pridali do nich 2 % soli, natlačili do kadičiek a nechali zrieť ďalšie 4 dni. Po ukončení prípravnej fázy sme jednotlivé vzorky analyzovali v zmysle požiadaviek výrobcu ELISA testu. Dosiahnuté výsledky boli interpretované použitím STAT FAX 321/plus microwell reader (Awareness Technology, Palm City, FL) pri vlnovej dĺžke 450 nm.

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

**Cieľom práce bolo optimalizovať ELISA** založenú na detekcii kravského β-Lg v ovčom mlieku a výrobkoch z neho v laboratórnych podmienkach. V zmysle uvedeného sme sa zamerali na:

výber najvhodnejšieho metodického postupu s dôrazom na zhodnotenie citlivosti ELISA metódy pri rôznych modelových situáciách

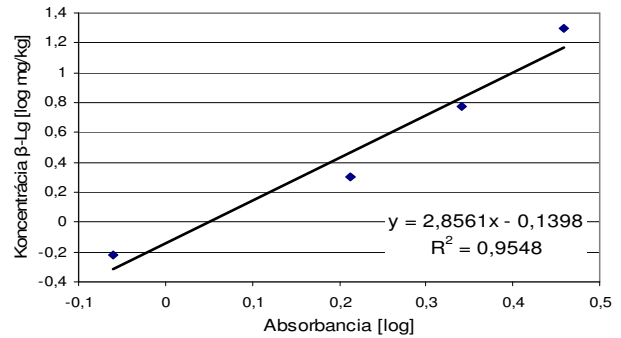
voľbu optimálneho riedenia supernatantu, ktoré v laboratórnej praxi (ak je prímes deklarovaná v označení) umožní rýchlejšie detegovať nežiaduce medzidruhové falšovanie mlieka a jeho výrobkov

V súlade s inštrukciami testu sme vykonali laboratórnu analýzu 27 vzoriek ovčieho mlieka, z neho vyrobenej hrudky a bryndze, ktoré sme na začiatku úmyselne kontaminovali rôznymi prídavkami kravského mlieka (0; 0,5; 5; 47 % kravského podielu v skúmanej vzorke ovčieho mlieka). Detekcii falšovania ovčieho mlieka a výrobkov z neho predchádzala fáza prípravy vzoriek, ktorá je popísaná v časti Materiál a metodika a ktorá v princípe spočívala vo východiskovej úprave vzoriek pred analýzou ELISA testami a v špecifickej príprave vzoriek na analýzu ELISA testami, na ktorú nadväzovalo vlastné vykonanie laboratórneho skúšania a jeho vyhodnotenie.

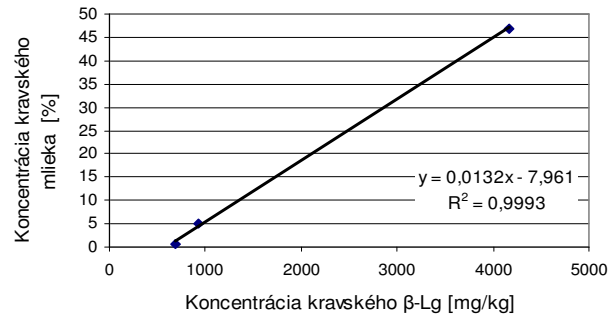
Pri hodnotení výsledkov sme aplikovali požiadavky výrobcu vybraného ELISA testu, no z hľadiska objektívneho hodnotenia kvality testu sme použili aj vlastné hodnotiace postupy. Keďže detekčné rozpätie použitého ELISA testu sa pohybovalo v rozmedzí 0,2 – 20 ppm a výrobca v návode presne neurčuje stupeň riedenia supernatantu získaného z jednotlivých druhov vzoriek pred aplikáciou do mikrotitračných doštičiek, bolo nutné v prvej fáze pokusu vybrané vzorky pred vlastnou analýzou nariediť v zmysle desiatkového riedenia ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  a  $10^{-5}$ ). Pri riedení ostatných vzoriek sme postupovali podľa výsledkov dosiahnutých v prvej fáze, pričom ďalšie informácie sme získali jednak z dostupných vedeckých literárnych zdrojov, ako aj od výrobcu analyzovaného testu.

Východiskom pre získanie relevantných údajov bolo vytvorenie kalibračnej krivky (obr. 1) zo štandardov nachádzajúcich sa v testovacej sade. Jednotlivé koncentrácie  $\beta$ -Lg kravského mlieka vo vzorkách (vyjadrené v ppm, resp.  $\text{mg.kg}^{-1}$ ) sme určili interpoláciou ich absorbancie na kalibračnej krivke. S cieľom kvalitatívne determinovať podiel kravského  $\beta$ -Lg v % sme pre každý spôsob tepelného ošetrovania vytvorili sériu osobitných regresných kriviek (obr. 2, 3, 4), pričom sme pomocou regresných rovníc matematicky definovali priebeh jednotlivých lineárnych funkcií. Tie stúpali úmerne so zvyšujúcou sa koncentráciou falšovaného podielu (0,5; 5 a 47 %), čo umožňovalo presnejšie určiť závislosti medzi koncentráciou prímеси kravského mlieka vo vzorke (%) a koncentráciou  $\beta$ -Lg vo vzorke ( $\text{mg.kg}^{-1}$ ). Ako vyplýva z obr. 2, závislosť medzi koncentráciou kravského mlieka (os y) a  $\beta$ -Lg (os x) je lineárna a dá sa vyjadriť regresnou rovnicou s koeficientom determinácie 0,999, čo dáva predpoklad spoľahlivého stanovenia prímеси kravského mlieka v surovom ovčom mlieku. Rovnako aj vo vzorkách syra a bryndze je možné na základe koncentrácie  $\beta$ -Lg interpolovať koncentráciu prímеси kravského mlieka, pričom koeficient determinácie získanej regresnej rovnice mal hodnoty 0,964 (obr. 3) a 0,965 (obr. 4). U ostatných vzoriek zaradených do pokusu nebolo možné zostrojiť krivku závislosti medzi koncentráciou kravského mlieka a  $\beta$ -Lg z dôvodu prekročenia kvantifikačného limitu ELISA testu.

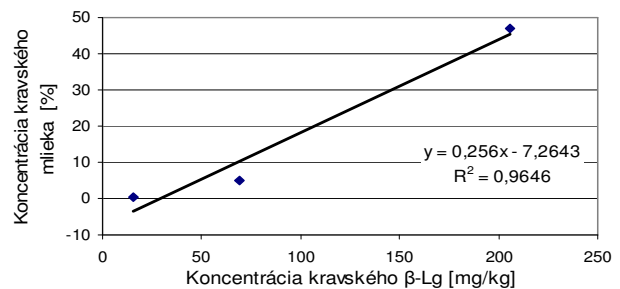
Ako sme už uviedli, v súlade s producentom deklarovaným kvantifikačným rozsahom obsiahnutým v manuáli k ELISA súprave, možno korektné kvantifikovať kontamináciu medzi 0,2 – 20 ppm ( $\text{mg.kg}^{-1}$ ) prítomného kravského  $\beta$ -Lg v skúmaných vzorkách. Hodnoty absorbancií vyššie, resp. nižšie ako uvedený detekčný limit nemožno spoľahlivo kvantifikovať a teda ani vyhodnotiť.



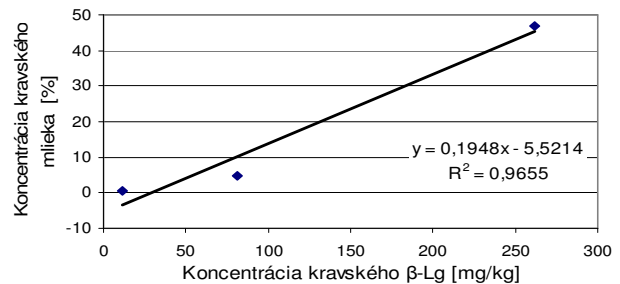
Obr. 1 Kalibračná krivka na detekciu kravského  $\beta$ -Lg



Obr. 2 Lineárna funkcia s rovnicou regresie pre prepočet koncentrácií  $\beta$ -Lg surového kravského mlieka vo vzorkách ovčieho mlieka



Obr. 3 Lineárna funkcia s rovnicou regresie pre prepočet koncentrácií  $\beta$ -Lg surového kravského mlieka vo vzorkách syrov



Obr. 4 Lineárna funkcia s rovnicou regresie pre prepočet koncentrácií  $\beta$ -Lg surového kravského mlieka vo vzorkách bryndze

Výsledky, ktoré sme dosiahli pri našich analýzach, sú prezentované v tab. 2. Väčšina vzoriek bola úspešne kvantifikovaná (hodnoty ppm, ktoré sa nachádzali v producentom garantovanom kvantifikačnom rozsahu použitého kitu), no iba vďaka ich niekoľnásobnému

riedeniu pred vlastnou analýzou. U niektorých vzoriek z hľadiska kvalitnejšej determinácie navrhujeme zvýšiť riedenie o jeden desiatkový poriadok, nakoľko aj v nami použitom riedení sme prídavok kravského mlieka nedetegovali. Je dôležité počítať aj s chybami, ktoré vznikajú v priebehu celého procesu kvantifikácie (vzájomné zmiešavanie mlieka, pipetovanie, riedenie, meranie absorbancí na spektrofotometri, či chyby samotných ELISA testov uvádzaných výrobcov). Napriek uvedeným skutočnostiam možno konštatovať, že hoci je

nami skúmaný ELISA test zameraný hlavne na detekciu nízkych koncentrácií kravského  $\beta$ -Lg, možno ho pri dodržaní určitých laboratórnych postupov aplikovať aj pri detekcii falšovania nebovinného mlieka a výrobkov z neho. Predpokladom kvalitnej determinácie falšovania je laboratórne overenie citlivosti každého použitého kitu nariadením vzoriek v súlade s producentom deklarovaným kvantifikačným rozsahom obsiahnutým v manuáli k ELISA súprave.

**Tab. 2 Výsledky detekcie  $\beta$ -Lg kravského mlieka v zmesi mlieka, syrov a bryndze**

		Koncentrácia kravského mlieka [%] v ovčom mlieku					
		0,5		5		47	
Spôsob tepelného ošetrenia kravského mlieka	Druh vzorky	absorb.	mg.kg <sup>-1</sup>	absorb.	mg.kg <sup>-1</sup>	absorb.	mg.kg <sup>-1</sup>
Surové mlieko	mlieko	2,201	689,9 (c)	2,441	927,1 (c)	1,85	4159,5 (d)
	syр	<b>2,901</b>	— (a!)	2,206	69,4 (b)	1,22	207 (c)
	bryndza	2,614	11,3 (a!)	2,333	81,5 (b)	1,405	262,2 (c)
Pasterizácia (72 °C, 15 s)	mlieko	<b>3</b>	— (b!)	2,63	1147,2 (c)	0,904	1252 (d)
	syр	<b>2,901</b>	— (a!)	2,316	79,8 (b)	1,149	187,2(c)
	bryndza	2,74	12,9 (a!)	2,569	107,3 (b)	1,886	429,6 (c)
Pasterizácia (85 °C, 3 s)	mlieko	<b>3</b>	— (b!)	1,845	416,8 (c)	1,072	883,9 (d)
	syр	2,695	12,3 (a!)	2,155	64,9 (b)	1,957	493,2 (c)
	bryndza	2,722	12,7 (a!)	2,359	84,1 (b)	2,173	665,1 (c)

Druh použitého riedenia: 10<sup>0</sup> (a); 10<sup>-1</sup> (b); 10<sup>-2</sup> (c); 10<sup>-3</sup> (d); zvýšiť riedenie (!); — nedetegovateľné

## ZÁVER

Hlavným cieľom práce bola **optimalizácia sendvičovej ELISA metódy** na detekciu falšovania ovčieho mlieka a výrobkov z neho v laboratórnych podmienkach. Zamerali sme sa na otestovanie zvoleného metodického postupu s dôrazom na kvalitu a opakovateľnosť dosahovaných výsledkov v rôznych modelových situáciách.

Je nutné podotknúť, že skúmaná ELISA súprava patrí do skupiny metód zameraných na detekciu alergénov nachádzajúcich sa v potravinách vo veľmi nízkych koncentráciách (mg.kg<sup>-1</sup>). S cieľom detegovať rôzne prídavky kravského mlieka v ovčom mlieku a výrobkoch z neho sme postupovali podľa pokynov výrobcu testu, ako aj podľa vlastného metodického postupu. Ako sme už uviedli, výrobca ELISA testu jednoznačne nedefinuje spôsob ďalšieho riedenia získaného supernatantu pred jeho aplikáciou do mikrotitračných doštičiek. Z našich pokusov vyplýva, že pre kvalitnejšiu determináciu najmä nízkych koncentrácií je potrebné nájsť vhodné riedenie pre rôzne koncentrácie kravského mlieka v kontexte so spôsobom ich tepelného ošetrenia, ako aj ďalšieho technologického spracovania, čo je aj bežnou laboratórnou praxou. Východiskom pre získanie relevantných údajov bolo v našom výskume vytvorenie osobitných regresných kriviek s vysokým koeficientom determinácie, ktoré umožnili rýchlo a ľahko detegovať prídavky kravského mlieka v ovčom mlieku, hrudkovom syre a bryndzi. Domnievame sa, že získané výsledky môžu prispieť k aplikácii otestovaných riedení v rámci jednotlivých falšovaných pomerov v prípade, ak sú podiely kravského mlieka deklarované v označení na

obaloch výrobkov (najmä syrov, či bryndze). Záverom možno konštatovať, že optimalizácia ELISA testov, ktoré sa použijú na detekciu kravského mlieka v ovčom mlieku a výrobkoch z neho si bude vyžadovať ďalšie laboratórne skúmanie s cieľom získať kvalitnú, spoľahlivú a ekonomicky výhodnú metodiku vhodnú na rutinné použitie.

## Acknowledgments:

This work was supported by grant project VEGA 1/0619/10 and KEGA 3/7255/09

## LITERATÚRA

- BÖHMOVÁ, J., ČERNÝ, V. 1994. Stanovení technologických vlastností mléka z hlediska výroby sýrů. Ministerstvo zemědělství, Národní agentúra pro zemědělský výzkum, č. R – 329 -142/2, 1992-1994.
- BUŇKA, F., BUŇKOVÁ, L., KRÁČMAR, S. 2009. *Základní principy výroby tavených sýrů*. Monografia. Brno : Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně. 68 p. ISBN 978-80-7375-336-8.
- CAN, E. 1996. Entwicklung und Anwendung von enzymimmunologischen Verfahren zum Nachweis von Kuhmilch in Büffelmilch und käse: Inaugural-Dissertation zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde. München : die Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität, 1996, 92 p.
- DE LA FUENTE, M. A. M., JUÁREZ, M. 2005. Authenticity assessment of dairy products. In *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 45, 2005, p. 563-585.
- FARRELL, H. M., JIMENEZ-FLORES, R., BLECK, G. T., BROWN, E. M., BUTLER, J. E. 2004. Nomenclature of the

- proteins of cow's milk – sixth revision. In *J. Dairy Sci.*, 87, 2004, p. 1641-1674.
- GAJDŮŠEK, S. 2003. Laktologie. 1. vyd. Brno : MZLU. ISBN 80-7157-657-3.
- GIOVANNACCI, I., GUIZARD, C., CARLIER, M., DUVAL, V., MARTIN, J. L. 2004. Species identification of meat products by ELISA. In *Int. J. Food Sci. Tech.*, 39, 2004, p. 863-867.
- FATRCOVÁ-ŠRAMKOVÁ, K. 2009. Potravinová pyramída v detskom veku. In KERESTEŠ, J. a kolektív. 2009. *Biotechnológia, výživa a zdravie*. Považská Bystrica : Eminent, 2009. s. 479-485. ISBN 978-80-970205-9-0.
- HABÁNOVÁ, M. 2004. Využitie mlieka v gastronómii. In *Mliekarstvo*, 35, 2004, 3, p. 25.
- HURLEY, I. P., COLEMAN, R. C., IRELAND, H. E. 2004a. Measurement of Bovine IgG by Indirect Competitive ELISA as a Means of Detecting Milk Adulteration. In *J. Dairy Sci.*, 87, p. 543-549.
- HURLEY, I. P., COLEMAN, R. C., IRELAND, H. E. 2004b. Application of immunological methods for the detection of species adulteration in dairy products. In *Int. J. Food Sci. Tech.*, 39, 2004, p. 873-878.
- LENGYELOVÁ, L., PINTÉROVÁ, S., TRSTENIČOVÁ, E., KOZELOVÁ, D. 2010. Mliečne baktérie v jogurtoch na slovenskom trhu. In *Bezpečnosť a kontrola potravín* (zborník z medzinárodnej konferencie). Nitra : SPU. 2010, s. 39-43. ISBN 978-80-552-0350-8.
- 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. In *Food Res. Int.*, 40, 2007, p. 1197-1211.
- Mc KENZIE, H. A. 1991.  $\beta$ -lactoglobulins. Milk proteins. In *Chem. molec. biology*, 12, 1991, p. 257-330.
- Nariadenie Komisie (ES) č. 676/2008 zo 16. júla 2008, ktorým sa do Registra chránených označení pôvodu a chránených zemepisných označení zapisujú určité názvy. Uverejnené v Úradnom vestníku 4. 10. 2007 (2007/C323/10).
- Nariadenie (ES) č. 178/2002 Európskeho parlamentu a Rady z 28. 1. 2002, ktorým sa ustanovujú zásady a požiadavky potravinového práva, zriaďuje Európsky úrad pre bezpečnosť potravín a stanovujú postupy v záležitostiach bezpečnosti potravín. Uverejnené v Úradnom vestníku Európskych spoločenstiev 1. 2. 2002 (L31/1).
- PIKNOVÁ, E., KRAHULCOVÁ, J., KUČHTA, T. 2002. Dôkaz kravskej mliečnej zložky v ovčích a kozích syroch polymerázovou reťazovou reakciou. In *Bulletin potravinárskeho výskumu*, 41, 2002, 3, s. 163-167.
- PINTADO, M. E., MALCATA, F. X. 1999. Studies on genetic variants of  $\alpha$ -lactalbumin and  $\beta$ -lactoglobulin from milk of native Portuguese ovine and caprine breeds. In *Int. J. Food Sci. Tech.*, 34, 1999, p. 245-252.
- SCHILK, J. 1995. Enzymimmuntests für bovines Plasmin und caprines IgG – Nachweis von Kuh- und Ziegenmilch in Schafmilch: Inaugural Dissertation zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde. München : die Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München, 1995, 120 p.
- STEJSKAL, V., HAJŠLOVÁ, J., KOCOUREK, V. 2008. *Bioanalytické metody pro hodnocení bezpečnosti zemědělských surovin a produktů*. 2008. [online] [cit. 2010-06-04]. Dostupné na: <<http://www.phytopsanitary.org/?link/projekty/2008>>.
- TAYLOR, L. S. – NORDLEE, A. J. – NIEMANN, M. 2009. Allergen immunoassays – considerations for use of naturally incurred standards. In *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 395, 2009, 1, p. 83-92.
- Výnos Ministerstva pôdohospodárstva Slovenskej republiky a Ministerstva zdravotníctva Slovenskej republiky zo 14. augusta 2006 č. 2143/2006 – 100, ktorým sa vydáva hlava Potravinového kódexu Slovenskej republiky upravujúca mlieko a výrobky z mlieka.
- Výnos Ministerstva pôdohospodárstva Slovenskej republiky a Ministerstva zdravotníctva Slovenskej republiky z 28. apríla 2004 č. 1187/2004-100, ktorým sa vydáva hlava Potravinového kódexu Slovenskej republiky upravujúca označovanie potravín v znení neskorších predpisov.

**Contact address:**

Ing. Lucia Zeleňáková, PhD., Department of Food Hygiene and Safety, Faculty of Biotechnology and Food Science, Slovak Agricultural University in Nitra, Tr. A. Hlinku 949 76 Nitra. e-mail: Lucia.Zelenakova@uniag.sk

Ing. Radoslav Židek, PhD., Department of Food Hygiene and Safety, Faculty of Biotechnology and Food Science, Slovak Agricultural University in Nitra, Tr. A. Hlinku 949 76 Nitra. e-mail: Radoslav.Zidek@uniag.sk

doc. Ing. Margita Čanigová, CSc., Department for Evaluation and Processing of Animal Products, Faculty of Biotechnology and Food Science, Slovak Agricultural University in Nitra, Tr. A. Hlinku 949 76 Nitra. e-mail: Margita.Canigova@uniag.sk

Juraj Paulov, e-mail: paulovjuraj@gmail.com

Tatiana Gallisová, e-mail: tatiana.gallisova@seznam.cz

## POKYNY PRE PRISPIEVATEĽOV

### Príjem príspevkov:

- Príspevky zasielajte pomocou elektronického systému časopisu Potravinárstvo®. Najskôr sa zaregistrujte, následne sa prihláste do Vami vytvoreného účtu a nahrajte článok do elektronického systému. Po nahratí sledujte proces spracovania príspevku, všetka komunikácia s autorom sa vedie len cez elektronický systém časopisu Potravinárstvo®. Pre registráciu a prihlásenie použite webovú stránku časopisu: [www.potravinarstvo.com](http://www.potravinarstvo.com).

### Upozornenie:

- Každý autor musí byť zaregistrovaný v databáze časopisu Potravinárstvo®.
- Príspevok môže byť napísaný v angličtine, slovenčine alebo češtine. Odporúčaný rozsah príspevku je 10 až 20 strán.
- Text príspevku musí byť v súlade so štylistickými a bibliografickými požiadavkami, ktoré sú opísané vo vzorovom dokumente, ktorý je k dispozícii na webovej stránke časopisu.
- Každý príspevok je oponovaný transparentným a anonymným spôsobom.
- Autor dostane pokyny pre opravu príspevku od editora.
- Príspevky môžu prejsť jazykovou korektúrou v redakcii časopisu.
- Redakcia časopisu Potravinárstvo® si vyhradzuje právo zamietnutia alebo odloženia uverejnenia príspevku na základe rozhodnutia redakčnej rady.
- Redakcia časopisu Potravinárstvo® nezodpovedá za obsah jednotlivých príspevkov a inzerátov a ani za prípadné škody vzniknuté tretím stranám v súvislosti s ich publikovaním v časopise Potravinárstvo®, za tieto škody zodpovedajú autori príspevkov a inzerenti. Za obsah jednotlivých príspevkov zodpovedajú autori. Za obsah jednotlivých inzerátov zodpovedajú inzerenti.
- Zverejnením príspevku nevzniká autorovi nárok na honorár.
- Autor garantuje, že príspevok nebol pred publikovaním v časopise Potravinárstvo® zverejnený v inom printovom alebo elektronickom médiu za odplatu (ak bol príspevok už zverejnený, musí to uviesť editorovi v poznámke počas elektronického podania príspevku).
- Autor zaručuje, že príspevok nebude zverejnený inde v akomkoľvek jazyku bez súhlasu majiteľa autorských práv, že nebudú porušené práva tretích strán, a že vydavateľ nie je právne zodpovedný pri uplatňovaní si nárokov tretích strán na náhradu škody spojenú s publikovaním príspevku v časopise Potravinárstvo®.
- Autori a inzerenti majú zákonnú zodpovednosť za informácie uverejnené v článkoch alebo reklame publikovaných v časopise Potravinárstvo®.
- Časopis Potravinárstvo®, redaktori a redakčná rada nie sú zodpovední za škody alebo nároky na náhradu škody tretím stranám vzniknutým v dôsledku alebo v súvislosti s publikovaním príspevkov alebo reklamy v časopise Potravinárstvo®.

### Autorské práva:

- Autori uverejňujú príspevky v časopise Potravinárstvo® za týchto podmienok:
  1. Autori si ponechávajú autorské právo, avšak časopis Potravinárstvo® má právo prvého vydania príspevku. Autor súčasne súhlasí s licenčnou dohodou Creative Commons Attribution License, ktorá umožňuje ďalšie zdieľanie príspevku a jeho spracovanie. Licencia je k dispozícii v elektronickom systéme časopisu Potravinárstvo®.
  2. Autori môžu vstupovať do samostatných, ďalších zmluvných vzťahov pre neexkluzívnu distribúciu príspevku (napr. publikovanie príspevku v knihe alebo na internetovej stránke) avšak pri takejto publikácii musia uviesť, že pôvodné prvé uverejnenie príspevku bolo v časopise Potravinárstvo®.
  3. Autori môžu ďalej publikovať ich príspevok online (napr. na internetových stránkach inštitúcií alebo ich vlastných internetových stránkach) pred, počas a po procese podávania príspevku do časopisu Potravinárstvo®, pretože takéto úsilie môže viesť k väčšej citovanosti príspevku publikovaného v časopise Potravinárstvo®.

### Ochrana osobných údajov:

- Mená, osobné údaje a e-mailové adresy uvedené užívateľmi tejto internetovej stránky budú použité výlučne len pre účely tohto časopisu a nebudú k dispozícii pre akýkoľvek iný účel alebo tretím stranám.

# H A C C P

---

# C O N S U L T I N G

---

- **HACCP**
- **IFS**
- **BRC**
- **ISO 22000**
- **ISO 9001**
- **Akreditované školenia**
- **Recenzia etikiet**
- **Prevádzkové poriadky**
- **Audity**

**HACCP Consulting**  
**0908164361, 0904138562**  
**[www.haccp.szm.sk](http://www.haccp.szm.sk)**

<b>INFLUENCE OF NATURAL ADDITIVES ON PROTEIN COMPLEX OF BREAD</b> <i>Tatiana Bojňanská, Dana Urminská</i> .....	1-5
<b>CEREALS AS BASIS OF PREVENTING NUTRITION AGAINST OBESITY</b> <i>Lenka Duchoňová, Ernest Šturdík</i> .....	6-15
<b>GENETIC MARKERS AS ONE OF TOOLS FOR PRODUCTION OF TENDERNESS MEAT IN CATTLE</b> <i>Michal Gábor, Anna Trakovická, Martina Miluchová, Nina Moravčíková</i> .....	16-21
<b>EFFECT OF MODERATE RED WINE CONSUMPTION ON THE DEVELOPMENT AND PROGRESSION OF METABOLIC SYNDROME AS A COMPLEX RISK FACTOR FOR CARDIOVASCULAR DISEASE AND DIABETES MELLITUS II.</b> <i>Martina Gažarová, Marta Habánová, Peter Chlebo, Jana Kopčeková</i> .....	22-27
<b>CONTAMINATION OF RAISIN BY FILAMENTOUS FUNGI – POTENTIAL PRODUCERS OF OCHRATOXIN A</b> <i>Lusine Hakobyan, Karine Grigoryan, Ara Kirakosyan</i> .....	28-33
<b>ANTIOXIDANT EFFECTS OF HERBAL EXTRACTS AND THEIR FOOD APPLICATION</b> <i>Eva Ivanišová, Martina Fikselová, Vladimír Vietoris, Martin Mellen</i> .....	34-37
<b>COMPARISON OF OCCURENCE LACTIC ACID BACTERIA IN CHOSEN YOGURTS</b> <i>Libuša Lengyelova, Dagmar Kozelová, Ľudmila Trstenovičová, Silvia Pinterová</i> .....	38-43
<b>QUALITY OF BROILER’S PRODUCTION ON THE FARM IN THE APPLICATION OF WELFARE</b> <i>Ján Medveď, Mária Angelovičová</i> .....	44-47
<b>PROTEINS OF POTATOES IN RELATION TO THE CONTENT OF CADMIUM IN THEIR TUBERS</b> <i>Janette Musilová, Judita Bystrická</i> .....	48-55
<b>SENSITIVITY TO ANTIBIOTICS IN STRAINS OF S. AUREUS ISOLATED FROM COW’S MILK</b> <i>Jana Pukáčková, Lucia Poľáková, Eva Dudriková</i> .....	56-64
<b>POLYPHENOLS IN CHOSEN SPECIES OF LEGUME - A REVIEW</b> <i>Mária Timoracká, Alena Vollmannová, Judita Bystrická</i> .....	65-72
<b>COMPONENTS OF THE HEALTHY EATING INDEX IN NUTRITION OF ADULT FEMALES</b> <i>Katarína Fatrcová Šramková</i> .....	73-79
<b>EVALUATION OF ELISA METHOD TO DETECTION OF COW B-LACTOGLOBULIN IN SHEEP MILK AND SHEEP MILK PRODUCTS</b> <i>Lucia Zeleňáková, Radoslav Židek, Margita Čanigová, Juraj Paulov, Tatiana Gallisová</i> .....	80-84





# **Katedra hygieny a bezpečnosti potravín**

## **Fakulta biotechnológie a potravinárstva**

### **SPU Nitra**

**2003 – 2010**

#### **Pedagogická činnosť:**

Hygiena potravín,  
Legislatíva a kontrola potravín,  
Bezpečnosť potravín,  
Hygiena výživy a stravovania,  
Ochorenia z potravín,  
Sanitácia v potravinárstve,  
Falšovanie a autentifikácia potravín,  
Všeobecná hygiena potravín,  
Ochrana zvierat a produkcia potravín,  
Správna hygienická prax v potravinárstve,  
Hygiena distribúcie a predaja potravín,  
Verejné zdravie a produkcia potravín,  
Epidemiológia a alergie z potravín,  
Riziká pri produkcii potravín,  
Akreditácia a certifikácia v potravinárstve,  
Imunoanalýzy v biológii a potravinárstve,  
Seminár k praxi,  
Teória metodológie záverečnej práce,  
Informačné zdroje v biológii a potravinárstve.

#### **Výučba predmetov pre:**

- **bakalárske študijné programy** FBP Agropotravinárstvo, Bezpečnosť a kontrola potravín, Aplikovaná biológia, Agrobiotechnológie a FAPZ Výživa ľudí,
- **inžinierske študijné programy** FBP Technológia potravín, Biotechnológie a FAPZ Výživa ľudí,
- **inžiniersky študijný program** FEŠRR Manažment prírodných zdrojov,
- **doktorandské študijné programy** FBP Technológia potravín a Biotechnológie.

#### **Personálne obsadenie katedry:**

doc. Ing. Jozef Golian, Dr.,  
prof. Ing. Mária Angelovičová, CSc.,  
prof. MVDr. Jozef Sokol, DrSc.,  
Ing. Alica Bobková, PhD.,  
Ing. Lucia Zeleňáková, PhD.,  
Ing. Peter Zajác, PhD.,  
Ing. Radoslav Židek, PhD.,  
Ing. Dagmar Kozelová, PhD.,  
Ing. Jozef Čapla,  
MVDr. Ľubomír Lopašovský, PhD.,  
Ing. Simona Pavličová, PhD.,  
Ing. Jela Denkerová,  
Bc. Eva Piecková.