

4

2011



Vedecký časopis pre potravinárstvo

Scientific Journal for Food Industry

číslo

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

ročník 5  
číslo 4  
december 2011

potravinárstvo 4 (5)  
ISSN 1338-0230 (tlačaná verzia)  
ISSN 1337-0960 (elektronická verzia)

## Potravinárstvo

### Vedecký časopis pre potravinárstvo

**Šéfredaktor:**

Ing. Peter Zajác, PhD.  
SPU Nitra

**Zástupca šéf redaktora:**

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

**Redaktori:**

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

**Predseda redakčnej rady:**

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

**Redakčná rada:**

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

## Potravinárstvo

### Scientific Journal for Food Industry

**Editor:**

Peter Zajác  
SUA Nitra

**Deputy of Editor:**

Jozef Golian  
SUA Nitra

**Sub-Editor:**

Radoslav Židek,  
Jozef Čapla,  
Vladimír Vietoris  
SUA Nitra

**Chairman, Editorial Board:**

Jozef Golian,  
SUA Nitra

**Editorial Board:**

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

• **Potravinárstvo**® • **Ročník:** 5, č. 4/2011 • Vedecký časopis pre potravinárstvo • Scientific Journal for Food Industry • **Vydavateľ:** Ing. Peter Zajác, HACCP Consulting, Slivková 12, 951 01 Nitrianske Hrnčiarovce. Vydavateľ úzko spolupracuje s Katedrou hygieny a bezpečnosti potravín, FBP, SPU v Nitre • **Nakladateľ:** Združenie HACCP Consulting, Slivková 12, 951 01 Nitrianske Hrnčiarovce • **Periodicita:** vychádza 4x do roka • **Internetová stránka časopisu:** [www.potravinarstvo.com](http://www.potravinarstvo.com) • **Adresa redakcie:** Slivková 12, 951 01 Nitrianske Hrnčiarovce • **E-mail:** [info@potravinarstvo.com](mailto:info@potravinarstvo.com) • **Tel.:** +421908164361, +421904138562 • **Jazyková úprava:** Publikované články neprešli jazykovou úpravou • **Grafická úprava:** Flame-studio Nitra • **Tlač:** SPU Nitra • **Cena čísla:** nepredajné • **Distribuuje:** Združenie HACCP Consulting • **Náklad:** 150 ks • **Miesto vydania:** Nitra • **Právne informácie a autorské práva:** Za obsah jednotlivých článkov zodpovedajú autori. Za obsah inzerátov zodpovedajú inzerenti • Časopis je indexovaný v databázach: UIUC OAI registry, OAIster, AGRIS FAO, DOAJ, Google Scholar a CrossRef • **Názov a skratka pomocou ktorých je časopis indexovaný v medzinárodných databázach:** *Potravinarstvo, Potr.*

Všetky práva vyhradené, © 2011 Potravinárstvo®  
Evidenčné číslo Ministerstva kultúry SR: 3771/09



Katedra hygieny a bezpečnosti  
potravín



## MORPHOLOGICAL AND ORGANOLEPTIC NATURE OF *ZIZIPHUS JUJUBA* MILL.

*Ján Brindza, Margarita Karnatovská, Olga Grygorieva, Vladimír Vietoris, Lucia Kucelová, Gabriela Erdélyová*

### ABSTRACT

Aim of the experiment was to determine morphological and sensory differences between selected *Ziziphus jujube* Mill. genotypes. For experimental study were used 19 seed grown genotypes planted in experimental garden of the Slovak University of Agriculture in Nitra. In our laboratories were analysed quantitative and qualitative traits of matured fruits. In the collection of genotypes were identified by morphological analysis the average weight in range from 4.68 to 0.66 grams, length of 21.67 to 0.77 mm, and width of 16.97 to 0.67 mm. Mass weight ratio of fresh pulp to total fruit were determined in the range 57-79%. In the group of selected genotypes were identified significant differences in the pulp and pericarp pigmentation. With stones was determined the average weight in the range 0.90-0.24 g, length from 14.35-0.58 mm and width 8.32-0.34 mm. Significant differences has been found in stones shape and color of analyzed genotypes as well. For the evaluation of sensory analysis was applied the 9 point scale. By sensory analysis were evaluated the dried fruit pulp samples of five genotypes (A, B, C, D, E) and 8 genotypes (AV, BV, CV, DV, EV, PV, GV, HV) samples of dried flesh for 60 minutes boiled in water and then extracted. Among the samples were identified significant differences in taste too. Gained experience and results can be used for expansion of jujube specific genotypes in Slovakia with primary orientation on organic agriculture and/or for other applications in practice as well.

**Keywords:** Jujube, *Ziziphus jujuba* Mill., agrophysical traits, fruits, stones, sensory analysis, dried fruits

### ÚVOD

*Ziziphus jujuba* Mill. sa označuje ako čínska datľa. V Číne sa pestuje viac ako 4 000 rokov. Je známych viac ako 400 odrôd registrovaných v mnohých krajinách sveta. Je to subtropický opadavý ker alebo strom, dosahujúci 3 – 8 m (Heaton, 1997). Plodom je 20 – 50 mm dlhá, vajcovitá, hruškovitá až guľovitá kôstkovica (Mareček et al., 2001) s priemernou hmotnosťou pri vyšľachtených odrodách 4,52 – 34,3 g (Karnatovska et al., 2007; Ecevit et al., 2007; Sivakov et al., 1988; Kundi et al., 1989; Gao et al., 2003; Prasad, 2005; Jia et al. 2010). Dozreté ovocie má mahagónovú farbu. Plody sú jednosemenné a majú aromatickú sladkú chuť (Heaton, 1997). Konzumujú sa v čerstvom stave, sušené, údené, alebo ako maslová hmota. Sušené plody sa využívajú aj na prípravu čajov. Varia sa s ryžou alebo sa pečú s chlebom (Heaton, 1997). Krška a Mishra (2009) hodnotili senzorickejšie viacero produktov zizifusa jujubového v rôznom prostredí. Hodnotením potvrdili ako najvhodnejšie spracovanie plodov vo forme kompótov a dužiny plodov konzervované v mede.

### MATERIÁL A METÓDY

Cieľom práce je určenie hospodárskej hodnoty kolekcie genotypov druhu zizifusa jujubového pre agropotravinárske využitie. Pre experimentálne štúdium sme použili plody z 19 genotypov dopestovaných na experimentálnej báze Slovenskej poľnohospodárskej univerzity v Nitre zo semien. Pri genotypoch sme hodnotili morfológické parametre plodov a kôstkovičiek a to hmotnosť (g), výšku a hrúbku (mm) a podiel hmotnosti dužiny z celkovej hmotnosti plodov. Z každého genotypu sme hodnotili 20 odbraných plodov v technologickej zrelosti. Pre určenie rozdielov medzi genotypmi sme použili analýzu rozptylu a najmenšie preukazné rozdiely

Rastlina a jej produkty majú široké praktické využitie v tradičnej čínskej medicíne. Dokázali sa jej sedatívne, hypnotické (Jiang et al., 2006), antimikrobiálne účinky (Suksamrarn et al., 2006; Ali et al., 2001). Kôra tejto prastarej indianskej liečivej rastliny má antisteroidogénnu aktivitu (Gupta et al., 2004). Uvažuje sa o jej využití na podporu imunity (Lang et al. 1988). Toxické listy majú antidiabetickú aktivitu (Abdel-Zahe et al., 2005), podobne ako aj pri iných druhoch rodu (Cisse et al., 2000). Skúmajú sa jej účinky pri poškodení neurónov (Park et al., 2004). Extrakt z plodov niektorých druhov rodu má preukazný účinok na znižovanie mutagenity materského genómu (Aliiev et al., 2002). Dokázalo sa pozitívne pôsobenie pri ateroskleróze (Wu et al., 1989). V plodoch sú významné alkaloidy (Inayat-Ur-Rahman et al., 2007; Singh et al, 2006), aflatoxíny (Liau et al., 2007), mastné kyseliny (Zhao et al., 2006), saponíny (Wu et al., 2005), karotény (Guil-Guerrero et al., 2004), rutín, triesloviny (Mareček et al., 2001; Sinko 1976), triterpenoidy (Lee et al., 2004) a glykozidy (Maciuk et al., 2003).

(LSD). V experimentálnej štúdiu sme genotypy označovali ako ZJ 1 – ZJ 19.

Zmyslové hodnotenie plodov sme zabezpečili v podmienkach senzorickejšieho laboratória. Hodnotenia sa zúčastnilo osem školených hodnotiteľov. Na hodnotenie sa použila stupnicová metóda (bodový test). Senzorickou analýzou sme hodnotili vzorky suchej dužiny z 5 genotypov (A, B, C, D, E) a vzorky suchej dužiny prevarených vo vode a ich vyluhovaním v dĺžke 60 minút z 8 genotypov (AV, BV, CV, DV, EV, FV, GV a HV) stupnicovou metódou – bodovým testom. Uvedená forma produktu je typická pre prípravu čajov zo sušenej dužiny plodov. Zmyslové hodnotenie sme zabezpečili podľa

vlastne vyvinutých klasifikátorov. Na vzorkách suchej dužiny plodov sme hodnotili atraktivnosť farby, vôňu, textúru, žuvateľnosť, prehĺtanie, chuť, trpkosť, kyslosť, sladkosť, horkosť, pocity v hltane a reakcie po použití.

Formuláre sa následne spracovali do elektronickej podoby a po overení normality vyhodnotili pomocou neparametrického Kruskal-Wallisovho testu.

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

Determinácia hospodárskej hodnoty a kvality produktov každého druhu pre využívanie vo výžive si vyžaduje okrem spoznania výživnej, energetickej a hygienickej hodnoty aj agrofyzikálne parametre plodov a ich organoleptické znaky, čo sme zabezpečili aj v predloženej práci.

### 1 Variabilita znakov na plodoch

Pre spoznanie hospodárskej hodnoty genotypov sme hodnotili na plodoch základné parametre na plodoch a kôstkovičkách.

#### a) Hmotnosť plodov (g)

Hmotnosť plodov je najčastejšie používaný znak pri určovaní hospodárskej hodnoty plodov ovocných druhov. Priemerná hmotnosť plodov hodnotených genotypov zizifusa jujubového je uvedená v tabuľke 1. Z prezentovaných údajov vyplýva, že priemernú hmotnosť plodov sme určili v rozsahu od 0,66 g (ZJ 3) do 4,68 g (ZJ 5). Pri hodnotení individuálnych plodov sme určili hmotnosť v rozsahu od 0,37 g (ZJ 3) do 6,36 g (ZJ 5). Analýzou rozptylu určenej variability šírky plodov pri hodnotení 19 genotypov sme potvrdili štatisticky preukazné rozdiely medzi testovanými genotypmi (Tabuľka 4). Testovaním preukaznosti rozdielov medzi hodnotenými genotypmi vyplýva, že genotyp ZJ 5 poskytol plody o najväčšej hmotnosti. Plody o vyššej

hmotnosti ako 3 g poskytli genotypy ZJ 19, ZJ 13 a ZJ 1. Genotyp ZJ 3 poskytol plody s preukazne najnižšou hmotnosťou (Tabuľka 1).

Hodnoty variačných koeficientov dokumentujú stredný až veľmi vysoký stupeň variability znaku.

**Karnatovska et al. (2007)** určila pri hodnotení 23 odrôd zizifusa jujubového v extrémnych agroekologických podmienkach Novej Kachovky na Ukrajine priemernú hmotnosť plodov v rozsahu 1,0 – 9,5 g. **Ecevit et al. (2007)** určili pri štúdiu 52 genetických zdrojov priemernú hmotnosť plodov v rozsahu 4,52 – 6,12 g, **Sivakov et al. (1988)** určili v rozsahu 5,72 – 10,45 g. **Kundi et al. (1989)**, **Gao et al. (2003)**, **Prasad (2005)**, **Jiang et al. (2006)** určili priemernú hmotnosť plodov vyšľachtených odrôd v rozsahu 10,0 – 29,34 g. **Zhang et al. (2011)** dokumentuje pri opise odrody Cangjin NO1 priemernú hmotnosť plodov 8,3 g, pričom najväčšie plody dosahovali hmotnosť 12,7 g. **Jia et al. (2010)** uvádza pri odrode Shiguang priemernú hmotnosť plodov 34,3 g s maximálnou hmotnosťou 108 g.

Z porovnania našich a literárnych údajov vyplýva, že zizifus jujubový je schopný poskytovať plody o vyššej hmotnosti ako sme dosiahli v podmienkach Slovenska, čo je závislé od genotypu ale aj podmienok pestovateľského prostredia.

**Tabuľka 1** Variabilita v hmotnosti plodov v hodnotenej skupine genotypov zizifusa jujubového (*Ziziphus jujuba* Mill.)

Genotypy	Hmotnosť plodov v čerstvom stave (g)					Hmotnosť kôstkovičiek (g)				
	min	max	$\bar{x}$	$S_{\bar{x}}$	V%	min	max	$\bar{x}$	$S_{\bar{x}}$	V%
ZJ 1	1,71	8,83	3,55	0,48	53,25	0,41	1,36	0,71	0,07	39,42
ZJ 2	0,90	2,05	1,46	0,09	24,32	0,27	0,57	0,42	0,02	20,88
ZJ 3	0,37	0,90	0,66	0,03	19,25	0,20	0,37	0,30	0,01	16,34
ZJ 4	1,03	2,37	1,76	0,09	21,82	0,29	0,68	0,52	0,02	19,16
ZJ 5	3,33	6,36	4,68	0,27	23,02	0,39	0,73	0,57	0,02	17,19
ZJ 6	0,77	2,08	1,42	0,11	30,62	0,30	0,63	0,49	0,02	18,25
ZJ 7	0,66	1,35	0,84	0,10	30,62	0,20	0,44	0,29	0,03	28,82
ZJ 8	1,20	3,47	2,36	0,18	29,81	0,27	0,70	0,50	0,02	22,90
ZJ 9	1,32	3,01	1,95	0,36	37,82	0,20	0,29	0,24	0,02	16,66
ZJ 10	1,18	1,92	1,50	0,05	14,24	0,35	0,56	0,45	0,01	14,31
ZJ 11	0,95	2,73	1,48	0,11	30,91	0,32	0,64	0,49	0,02	21,47
ZJ 12	1,23	3,19	1,80	0,17	38,38	0,43	1,05	0,64	0,05	34,14
ZJ 13	1,60	7,20	3,71	0,32	34,18	0,20	1,00	0,58	0,06	39,64
ZJ 14	0,80	1,55	1,28	0,04	14,71	0,25	0,50	0,39	0,01	16,55
ZJ 15	0,84	6,43	2,04	0,34	64,90	0,34	1,39	0,57	0,06	44,72
ZJ 16	0,51	2,48	1,12	0,19	54,70	0,14	0,67	0,34	0,04	41,99
ZJ 17	0,93	3,31	2,14	0,18	33,91	0,33	0,70	0,50	0,03	23,43
ZJ 18	0,61	2,38	1,16	0,15	52,16	0,23	0,78	0,44	0,04	37,83
ZJ 19	2,11	6,07	4,13	0,33	31,58	0,45	1,33	0,90	0,07	30,19

#### b) Dĺžka plodov (mm)

Z výsledkov tabuľky 2 vyplýva, že priemernú dĺžku plodov sme určili v rozsahu od 0,77 mm (ZJ 19) do 21,67 mm (ZJ 19). Pri hodnotení individuálnych plodov sme určili dĺžku v rozsahu od 0,61 mm (ZJ 19) do

26,23 mm (ZJ 13). Analýzou rozptylu určenej variability šírky plodov pri hodnotení 19 genotypov sme potvrdili štatisticky preukazné rozdiely medzi testovanými genotypmi (Tabuľka 4). Testovaním preukaznosti



rozdielov medzi hodnotenými genotypmi vyplýva, že genotyp ZJ 13 poskytol plody o najväčšej dĺžke. Plody o vyššej dĺžke ako 16 mm poskytli genotypy ZJ 1, ZJ 14, ZJ 7 a ZJ 8. Genotyp ZJ 19 poskytol plody s preukazne najnižšou dĺžkou. Hodnoty variačných koeficientov dokumentujú stredný až veľmi vysoký stupeň variability znaku.

**Karnatovska et al. (2007)** určila pri hodnotení 23 odrôd zizifusa jujubového v extrémnych agroekologických podmienkach Novej Kachovky na Ukrajine priemernú

dĺžku plodov v rozsahu 13,0 – 32,2 mm. **Zhang et al. (2011)** dokumentuje pri opise odrody Cangjin NO1 priemernú dĺžku plodov 26,1 mm. **Klymenko a Grygorieva (2008)** určili pri hodnotení 12 genotypov zizifusa jujubového v Kyjeve na Ukrajine priemernú dĺžku plodov v rozsahu 14,98 – 29,74 mm. Z porovnaní našich a literárnych údajov vyplýva, že zizifus jujubový je schopný poskytovať dlhšie plody ako sme dosiahli v podmienkach Slovenska, čo je závislé v prvom rade od genotypu.

#### b) Priemer plodov (mm)

Priemer plodov je znak, ktorý sa používa na hodnotenie ovocných druhov. Z výsledkov vyplýva, že priemernú šírku plodov sme určili v rozsahu od 0,67 mm (ZJ 19) do 16,97 mm (ZJ 1). Pri hodnotení individuálnych plodov sme určili šírku v rozsahu od 0,51 mm (ZJ 19) do 24,58 mm (ZJ 1). Analýzou rozptylu určenej variability šírky plodov pri hodnotení 19 genotypov sme potvrdili štatisticky preukazné rozdiely medzi testovanými

genotypmi (Tabuľka 4). Testovaním preukaznosti rozdielov medzi hodnotenými genotypmi vyplýva, že genotyp ZJ 1 poskytol plody o najväčšej šírke. Plody širšie ako 14 mm poskytli genotypy ZJ 13 a ZJ 14. Genotyp ZJ 9 poskytol plody s preukazne najnižšou šírkou. Hodnoty variačných koeficientov dokumentujú stredný až veľmi vysoký stupeň variability znaku.

Tabuľka 2 Variabilita v dĺžke a priemere plodov hodnotených genotypov zizifusa jujubového (*Ziziphus jujuba* Mill.)

Genotypy	Dĺžka plodov (mm)					Šírka plodov (mm)				
	min	max	$\bar{X}$	$S_{\bar{X}}$	V%	min	max	$\bar{X}$	$S_{\bar{X}}$	V%
ZJ 1	15,87	25,42	19,17	0,59	11,97	13,04	24,58	16,97	0,78	17,99
ZJ 2	12,72	19,52	16,60	0,64	10,90	9,62	14,62	11,98	0,37	12,07
ZJ 3	10,64	12,5	11,49	0,13	4,64	7,68	10,71	8,77	0,20	9,14
ZJ 4	12,74	29,70	16,11	1,02	24,54	10,12	15,36	12,93	0,31	9,47
ZJ 5	11,99	14,98	13,42	0,24	7,08	6,41	13,36	10,04	0,54	21,17
ZJ 6	11,64	14,78	13,25	0,28	8,19	10,42	14,35	12,78	0,27	8,39
ZJ 7	15,29	20,43	17,52	0,74	10,45	7,81	9,32	8,45	0,22	6,56
ZJ 8	15,38	19,43	17,34	0,32	7,24	8,94	17,49	13,67	0,62	17,76
ZJ 9	12,28	15,98	13,71	1,22	17,78	11,72	17,33	13,80	1,22	16,81
ZJ 10	15,00	17,49	16,04	0,19	4,61	11,13	13,75	11,97	0,15	5,16
ZJ 11	11,79	16,29	13,54	0,27	7,97	10,69	16,44	12,70	0,39	11,95
ZJ 12	12,38	18,65	16,50	0,51	12,08	10,40	17,34	12,15	0,54	17,43
ZJ 13	17,14	26,23	21,67	0,71	12,72	10,75	21,91	15,87	0,71	17,38
ZJ 14	16,18	22,47	18,80	0,51	10,63	11,69	20,96	15,53	0,69	17,29
ZJ 15	10,69	19,21	13,76	0,69	19,56	10,81	20,73	14,16	0,73	19,98
ZJ 16	9,45	14,08	10,98	0,45	13,11	9,00	16,23	11,90	0,74	19,72
ZJ 17	10,71	20,73	14,97	0,86	22,47	10,95	18,50	14,93	0,53	13,75
ZJ 18	9,95	14,62	12,39	0,37	11,68	8,36	16,11	11,15	0,57	19,85
ZJ 19	0,61	0,85	0,77	0,01	9,42	0,51	0,80	0,67	0,02	14,76

**Karnatovska et al. (2007)** určila pri hodnotení 23 odrôd zizifusa jujubového v extrémnych podmienkach Novej Kachovky na Ukrajine priemernú šírku plodov v rozsahu 11,06 – 23,8 mm. **Zhang et al. (2011)** dokumentuje pri opise odrody Cangjin NO1 priemernú šírku plodov 25,8 mm. **Klymenko a Grygorieva (2008)** určili pri hodnotení 23 odrôd zizifusa jujubového v extrémnych

agroekologických podmienkach Novej Kachovky na Ukrajine priemernú šírku plodov v rozsahu 11,45 – 18,71 mm. Z porovnaní našich a literárnych údajov vyplýva, že zizifus jujubový je schopný poskytovať širšie plody ako sme dosiahli v podmienkach Slovenska, čo je závislé od genotypu.

#### d) Hmotnosť kôstkovičiek (g)

Z výsledkov tabuľky 1 vyplýva, že priemernú hmotnosť kôstkovičiek sme určili v rozsahu od 0,24 g (ZJ 9) do 0,90 g (ZJ 19). Pri hodnotení individuálnych plodov sme určili hmotnosť kôstkovičiek v rozsahu od 0,02 g (ZJ 9) do 0,32 g (ZJ 19). Analýzou rozptylu určenej variability hmotnosti kôstkovičiek plodov pri hodnotení 19 genotypov sme potvrdili štatisticky preukazné rozdiely medzi testovanými genotypmi (Tabuľka 4). Z testovania preukaznosti rozdielov medzi hodnotenými genotypmi

vyplýva, že genotyp ZJ 19 poskytol kôstkovičky o najväčšej hmotnosti. Kôstkovičky o vyššej hmotnosti ako 0,50 g poskytli genotypy ZJ 1 a ZJ 12. Genotyp ZJ 9 poskytol plody s preukazne najnižšou hmotnosťou kôstkovičiek (Tabuľka 1). Hodnoty variačných koeficientov dokumentujú stredný až veľmi vysoký stupeň variability znaku.

**Karnatovska et al. (2007)** určila pri hodnotení 23 odrôd zizifusa jujubového v extrémnych agroekologických

## potravinárstvo

podmienkach Novej Kachovky na Ukrajine priemernú hmotnosť kôstkovičiek v rozsahu 1,0 – 2,1 g. **Ecevit et al. (2007)** určili pri štúdiu 52 genetických zdrojov priemernú hmotnosť kôstkovičiek v rozsahu 0,34 – 0,41 g, **Sivakov**

**et al. (1988)** určili v rozsahu 0,28 – 0,65 g a **Ghosh a Mathew (2002)** pri štúdiu 9 genotypov v rozsahu 0,6 – 1,9 g.

**Tabuľka 3** Variabilita dĺžky a šírky kôstkovičiek (mm) plodov testovaných genotypov zizifusa jujubového (*Ziziphus jujuba* Mill.)

Genotypy	Dĺžka kôstkovičiek (mm)					Priemer kôstkovičiek (mm)				
	min	max	$\bar{x}$	$S_{\bar{x}}$	V%	min	max	$\bar{x}$	$S_{\bar{x}}$	V%
ZJ 1	10,43	14,11	12,13	0,32	10,50	5,91	11,12	8,16	0,45	21,39
ZJ 2	9,64	14,89	11,49	0,35	12,07	5,06	7,77	6,29	0,17	10,71
ZJ 3	8,26	9,77	8,99	0,12	5,47	6,50	8,27	7,28	0,13	7,10
ZJ 4	9,43	16,22	11,37	0,42	14,33	6,55	8,83	7,41	0,19	10,22
ZJ 5	9,19	12,78	10,43	0,26	9,83	5,94	8,48	7,37	0,16	8,83
ZJ 6	8,03	10,5	9,00	0,23	9,98	5,57	8,07	6,92	0,18	10,54
ZJ 7	12,67	14,71	13,72	0,30	5,44	4,57	7,77	6,33	0,50	19,56
ZJ 8	6,40	14,33	12,18	0,52	16,55	5,41	8,70	7,24	0,26	14,10
ZJ 9	8,28	11,39	9,12	0,75	16,54	5,39	7,65	6,28	0,48	15,47
ZJ 10	8,68	11,97	10,58	0,24	8,98	5,07	7,17	6,15	0,14	9,14
ZJ 11	9,36	11,33	10,15	0,17	6,68	5,76	9,52	7,47	0,26	13,95
ZJ 12	9,65	14,49	12,61	0,40	12,37	7,23	10,5	8,08	0,24	11,93
ZJ 13	11,51	17,41	14,35	0,41	11,26	3,76	6,99	5,24	0,21	16,02
ZJ 14	5,79	9,45	7,49	0,30	15,93	5,36	10,49	8,32	0,35	16,61
ZJ 15	7,43	15,42	9,86	0,59	23,29	6,10	9,95	7,41	0,24	12,93
ZJ 16	8,23	13,11	9,22	0,45	15,58	5,81	9,46	7,42	0,32	13,82
ZJ 17	7,36	16,5	10,61	0,75	27,66	6,64	9,05	7,89	0,17	8,50
ZJ 18	8,44	11,27	9,94	0,26	10,21	6,40	9,22	7,64	0,18	9,20
ZJ 19	0,45	0,65	0,58	0,01	8,83	0,23	0,43	0,34	0,01	15,08



**Obrázok 1** Porovnanie hodnotených genotypov zizifusa jujubového (*Ziziphus jujuba* Mill.) v tvare a farbe plodov

e) Dĺžka kôstkovičiek (mm)

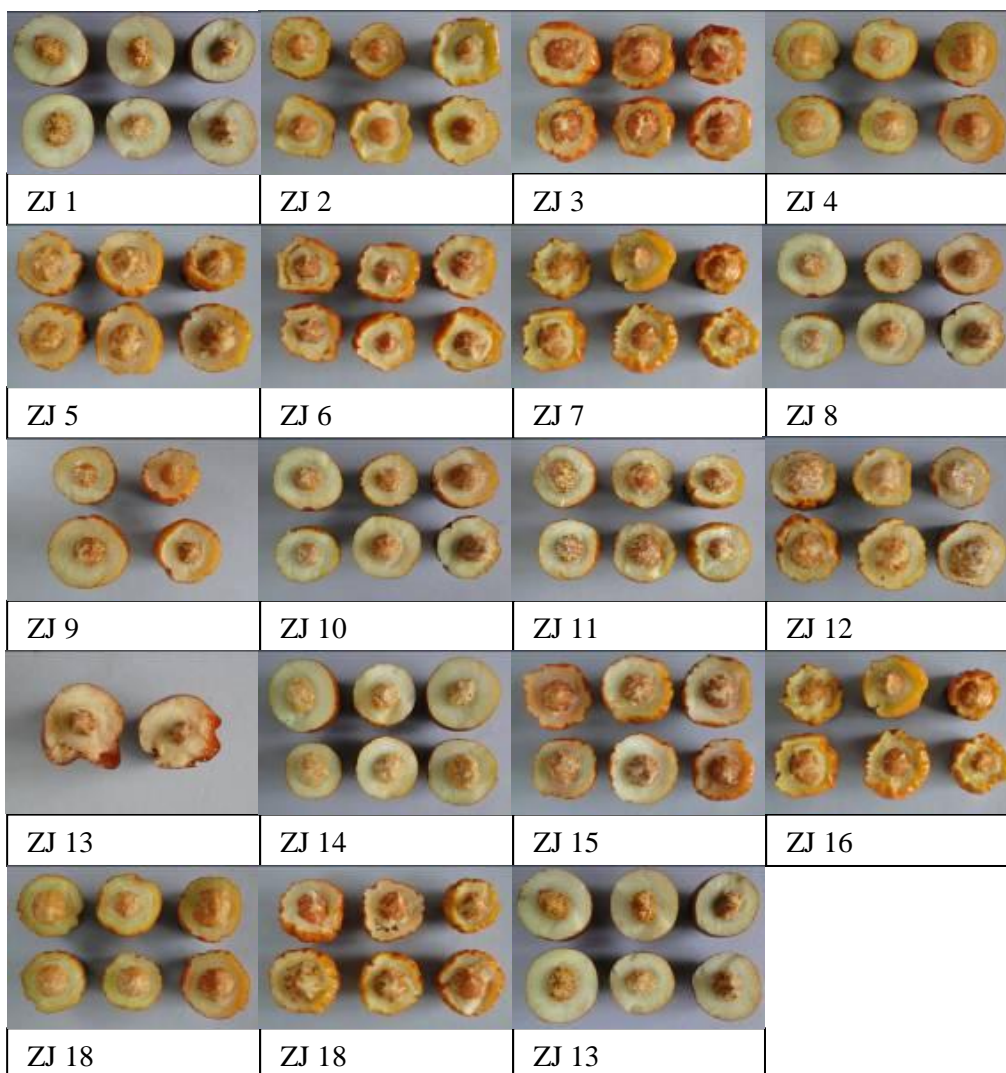
Z výsledkov vyplýva, že priemernú dĺžku kôstkovičiek sme určili v rozsahu od 0,58 mm (ZJ 19) do 14,35 mm (ZJ 13). Pri hodnotení individuálnych plodov sme určili dĺžku kôstkovičiek v rozsahu od 0,45 mm (ZJ 19) do 17,41 mm (ZJ 13). Analýzou rozptylu určenej variability dĺžky kôstkovičiek pri hodnotení 19 genotypov sme potvrdili štatisticky preukazné rozdiely medzi testovanými genotypmi (Tabuľka 4). Z testovania preukaznosti

rozdielov medzi hodnotenými genotypmi vyplýva, že genotyp ZJ 13 poskytol kôstkovičky o najväčšej dĺžke. Kôstkovičky o vyššej dĺžke ako 12 mm poskytol genotyp ZJ 7. Genotyp ZJ 19 poskytol kôstkovičky s preukazne najnižšou dĺžkou (Tabuľka 3). Hodnoty variačných koeficientov dokumentujú stredný až veľmi vysoký stupeň variability znaku.

f) Šírka kôstkovičiek (mm)

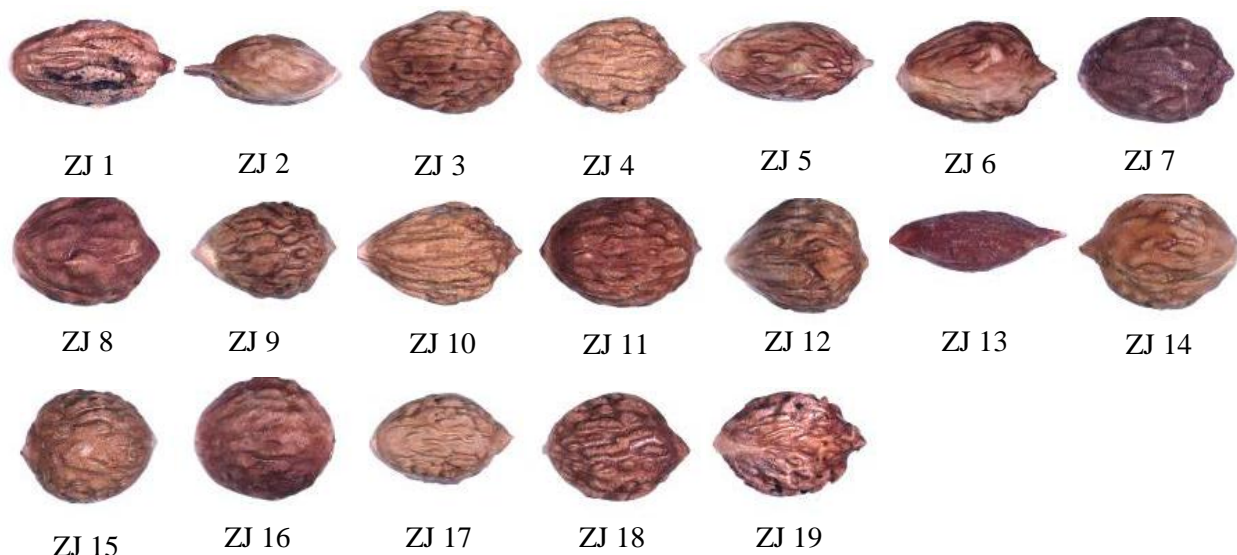
Z výsledkov tabuľky 3 vyplýva, že priemernú šírku kôstkovičiek sme určili v rozsahu od 0,34 mm (ZJ 19) do 8,32 mm (ZJ 14). Pri hodnotení individuálnych plodov sme určili šírku kôstkovičiek v rozsahu od 0,23 mm (ZJ 19) do 10,49 mm (ZJ 14). Analýzou rozptylu určenej variability šírky kôstkovičiek pri hodnotení 19 genotypov sme potvrdili štatisticky preukazné rozdiely medzi testovanými genotypmi (Tabuľka 4). Z testovania preukaznosti rozdielov medzi hodnotenými genotypmi vyplýva, že genotyp ZJ 14 poskytol kôstkovičky o najväčšej šírke. Kôstkovičky o vyššej šírke ako 7 mm poskytli genotypy ZJ 1 a ZJ 12. Genotyp ZJ 19 poskytol kôstkovičky s preukazne najnižšou šírkou (Tabuľka 3). Hodnoty variačných koeficientov dokumentujú stredný až veľmi vysoký stupeň variability znaku.

Semená zizifusa nachádzajúce sa v kôstkovičkách majú významnú hospodársku hodnotu ako surovina pre cenný olej, ktoré má široké praktické využitie. Dokazujú to poznatky mnohých literárnych zdrojov. **Al-Reza et al. (2009)** stanovili v oleji zo semien zizifusa 23 komponentov. Medzi významné komponenty patrí eukalyptol, chavicol, eugenol, isoeugenol, ledol, veridiflorol, tumeron a ďalšie. Súčasne určili významný účinok proti vrtkým 5 kmeňom listérie (*Listeria monocytogenes* ATCC 19111, 19116, 19118). **Jung In Yoon et al. (2010)** určili významný účinok oleja na rast vlasov, čo experimentálne potvrdili na pokusoch s krysami. **Al-Reza et al. (2009)** so svojím kolektívom určili aj významné protizápalové účinky aplikácie oleja na koži pokusných zvierat.



Obrázok 2 Porovnanie hodnotených genotypov zizifusa jujubového (*Ziziphus jujuba* Mill.) vo farbe dužiny plodov



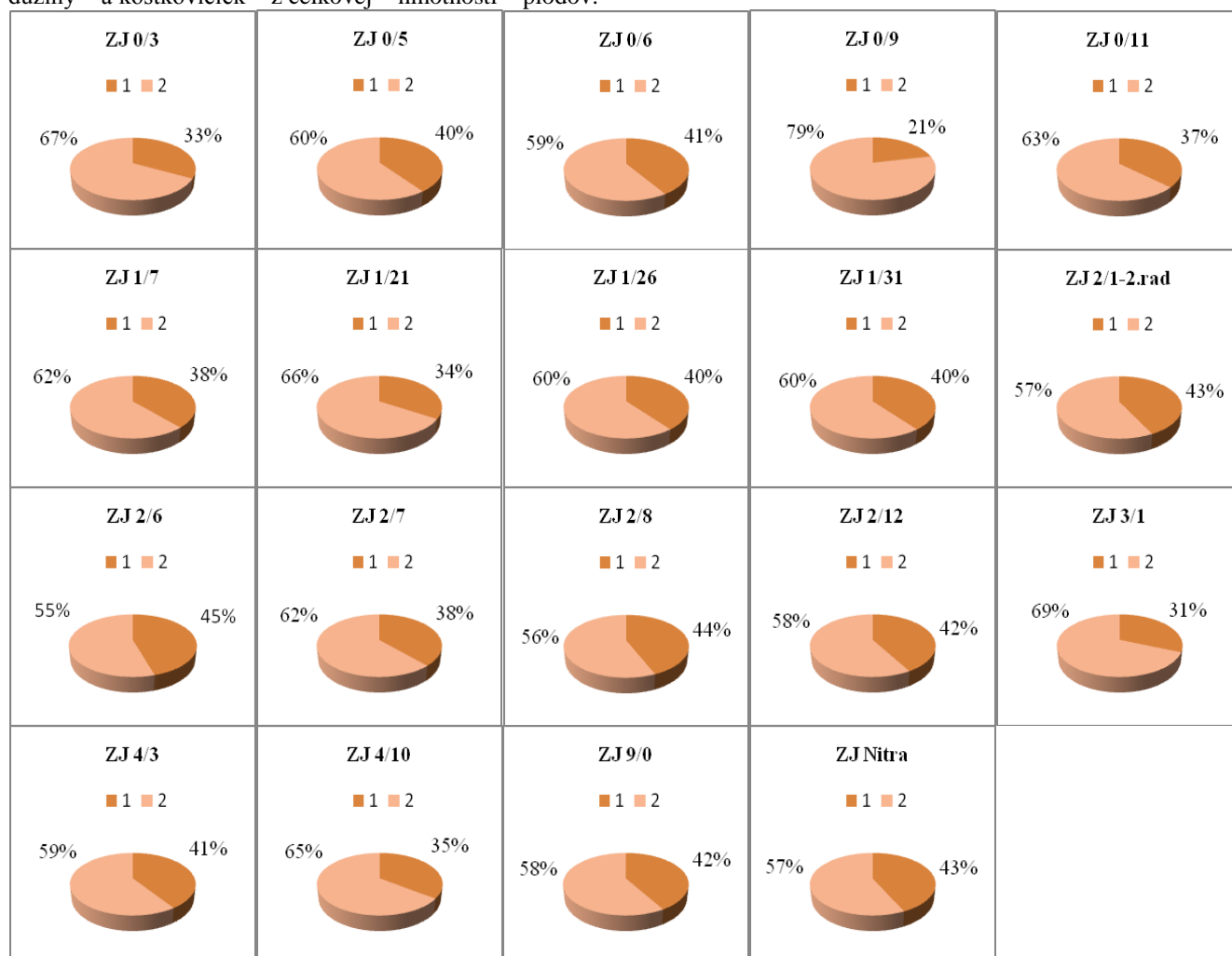


Obrázok 3 Porovnanie hodnotených genotypov zizifusa jujubového (*Ziziphus jujuba* Mill.) v tvare kôstkovičiek

**g) Podiel hmotnosti dužiny z celkovej hmotnosti plodov (%)**

Z hospodárskeho hľadiska je pri plodoch hodnotený aj podiel využiteľnej dužiny v porovnaní so semenami. Z uvedeného dôvodu sme v práci pri hodnotených genotypoch zizifusa jujubového určili aj podiel hmotnosti dužiny a kôstkovičiek z celkovej hmotnosti plodov.

V danom znaku sme určili významné rozdiely medzi genotypmi, čo dokazuje rozsah 57 % ZJ Nitra – 79 % ZJ 0/9. Tento poznatok názorne dokumentuje aj porovnanie genotypov v danom znaku na obrázku 4.



Obrázok 4 Porovnanie hodnotených genotypov zizifusa jujubového (*Ziziphus jujuba* Mill.) v podiele hmotnosti dužiny (1) a kôstkovičiek (2) z celkovej hmotnosti plodov (%)

## potravinárstvo

**Tabuľka 4** Analýza rozptylu pre hodnotené znaky plodov zizifusa jujubového (*Z. jujuba* Mill.)

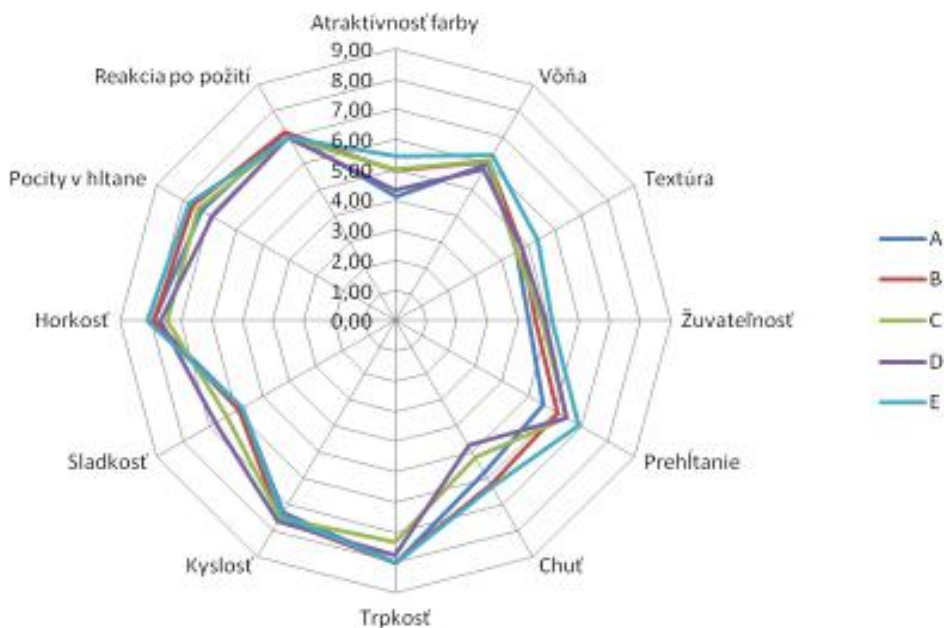
Faktory	f	S	MS	F	Preukaznosť	Preukazný rozdiel*	
<b>Hmotnosť plodov (g) - Účinok vplyvu 0,96</b>							
Medzi súborni	18	334,068	18,559	377,481	0,000	0,05	0,267
V rámci súborov	241	11,8490	0,0492			0,01	0,309
<b>Dĺžka plodov (mm) - Účinok vplyvu 0,98</b>							
Medzi súborni	18	4,969.7070	276,0948	916,7952	0,000	0,05	0,6631
V rámci súboru	241	72,5777	0,3012			0,01	0,7655
<b>Šírka plodov (g) - Účinok vplyvu 0,97</b>							
Medzi súborni	18	3,282.4340	182,3574	640,1110	0,000	0,05	0,6450
V rámci súborov	241	68,6571	0,2849			0,01	0,7445
<b>Hmotnosť dužiny v čerstvom stave plodov (g) - Účinok vplyvu 0,96</b>							
Medzi súborni	18	231,5774	12,8654	354,8336	0,000	0,05	0,2301
V rámci súborov	241	8,7381	0,0363			0,01	0,2656

### 2 Senzorická analýza dužiny plodov

#### a) Sušené plody

V atraktivite farby sušených plodov komisia neurčila štatisticky preukazné rozdiely (p-hodnota = 0,1565). Horkosť sa javila skupine tiež ako štatisticky nepreukazná a panel hodnotil vzorky ako rovnako horké (p-hodnota =

0,9583). Pri hodnotení chuti určila komisia štatisticky preukazný rozdiel medzi vzorkami D a E (p-hodnota = 0,0501), čo demonštruje obrázok 5.



**Obrázok 5** Profilogram sensorických vlastností sušenej dužiny plodov hodnotených genotypov zizifusa jujubového (*Ziziphus jujuba* Mill.)

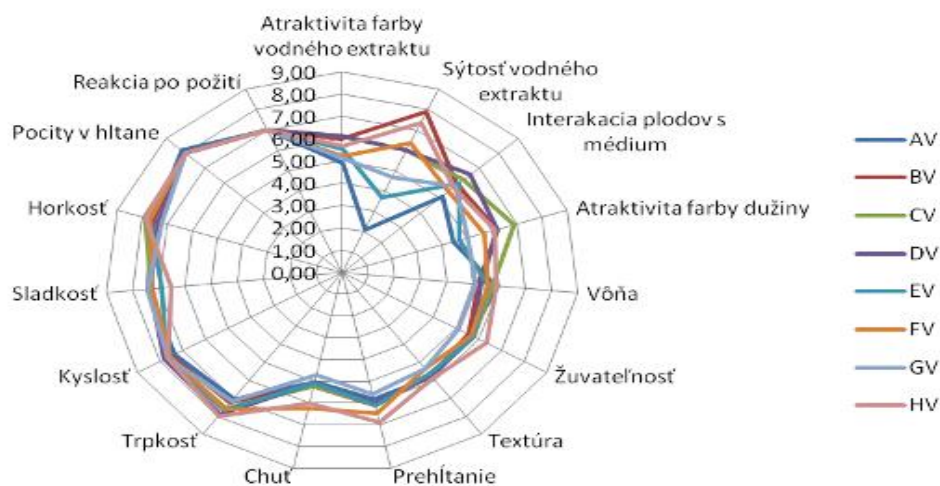
Komisia určila preukazné rozdiely aj pri hodnotení sladkosti (p-hodnota = 0,0337) a prehĺtania (0,0498). V ostatných znakoch sa neurčili preukazné rozdiely medzi

genotypmi. V hodnotení celkovej kvality bol vyhodnotený ako najlepší genotyp E. Rozdiely medzi jednotlivými genotypmi dokumentuje obrázok 5.

#### b) Vylúhované plody vo vodnom roztoku

Pri hodnotení suchej dužiny plodov vylúhovanej 60 minút vo vriacom vodnom roztoku (obrázok 10) určila komisia štatisticky preukazné rozdiely pri atraktivite farby dužiny (p-hodnota = 0,0328), sýtosť vodného roztoku (0,0186), chuť (0,0441) a žuvateľnosť (0,0499). Pri ostatných znakoch neurčila komisia preukazné rozdiely

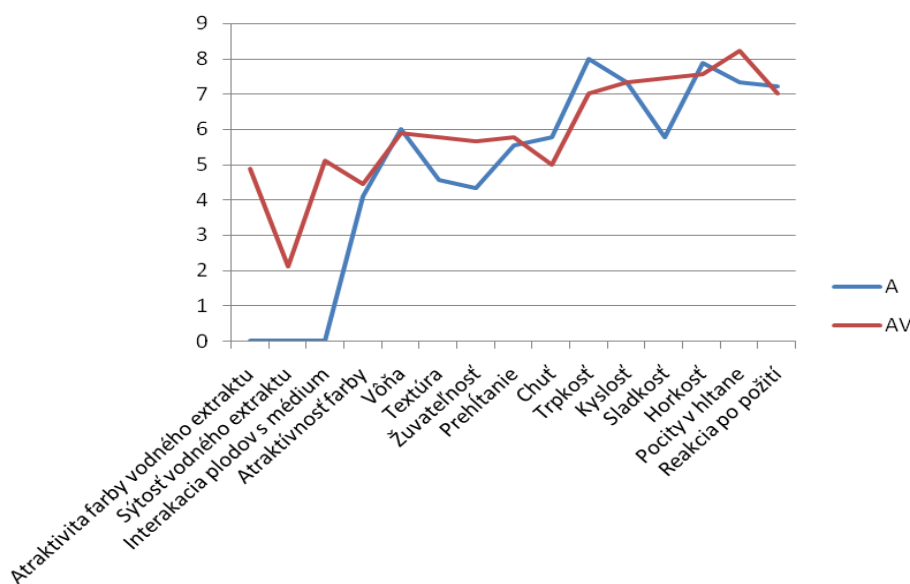
medzi hodnotenými vzorkami, čo dokumentuje aj obrázok 6. Pri hodnotení suchej dužiny plodov vylúhovanej vo vriacej vode dominovala v celkovej kvalite vzorka z genotypu H.



**Obrázok 6** Profilogram senzoričných vlastností hodnotených genotypov zizifusa jujubového (*Ziziphus jujuba* Mill.) vo vodnom výluhu

Väčšina deskriptorov pre hodnotenie dužiny suchých plodov a dužiny suchých plodov vylúhovaných vo vriacej vode bola identická, preto bolo možné porovnanie vzoriek

aj pri niektorých znakoch. Vo výluhoch boli navyše doplnené deskriptory atraktivita farby vodného roztoku, sýtosť vodného roztoku a deskriptor interakcia s médiom.



**Obrázok 7** Porovnanie vzorky sušenej dužiny plodov genotypu (A) so sušenou dužinou plodov vylúhovanej vo vodnom roztoku (AV) zizifusa jujubového (*Ziziphus jujuba* Mill.)

V prípade genotypu pod označením A sme určili určité rozdiely v hodnotení suchej dužiny a suchej dužiny vylúhovanej vo vodnom roztoku, čo dokumentuje aj obrázok 7. Texturálne atribúty sa vplyvom interakcie s vodou (lúhovaním) mierne zvýšili (textúra, žuvateľnosť a prehĺtavosť). Pri sušených plodoch je pozorovaná vyššia intenzita celkovej chuti. Naopak lúhovaním komisia zistila vyššiu intenzitu čiastkových chutí. Daný stav dokumentuje obrázok 7.

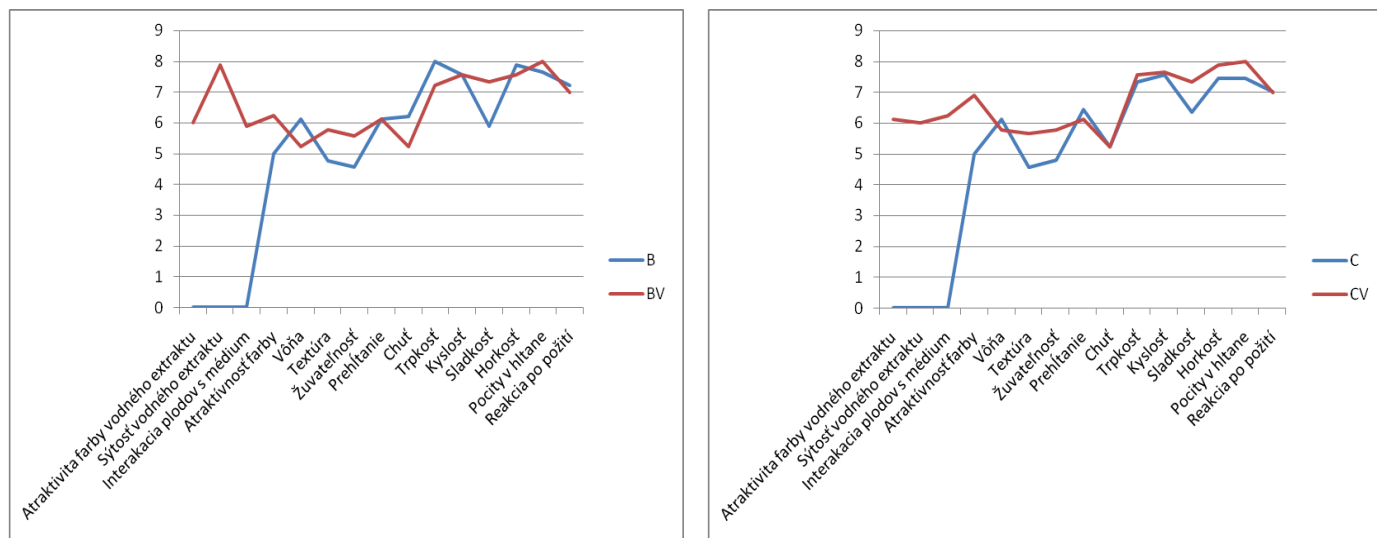
Podobnú situáciu sme určili aj pri hodnotení vzoriek genotypu B. Porovnanie sušených plodov a výluhov vzorky B potvrdilo predchádzajúce pozorovanie a platí, že texturálne atribúty sa mierne zlepšili. Chuť a trpkosť sú

dominantné pri sušenej dužine plodov a čiastkové chute sú naopak výraznejšie pri hodnotení suchej dužiny vo výluhoch. Dokumentujú to aj údaje na obrázku 8.

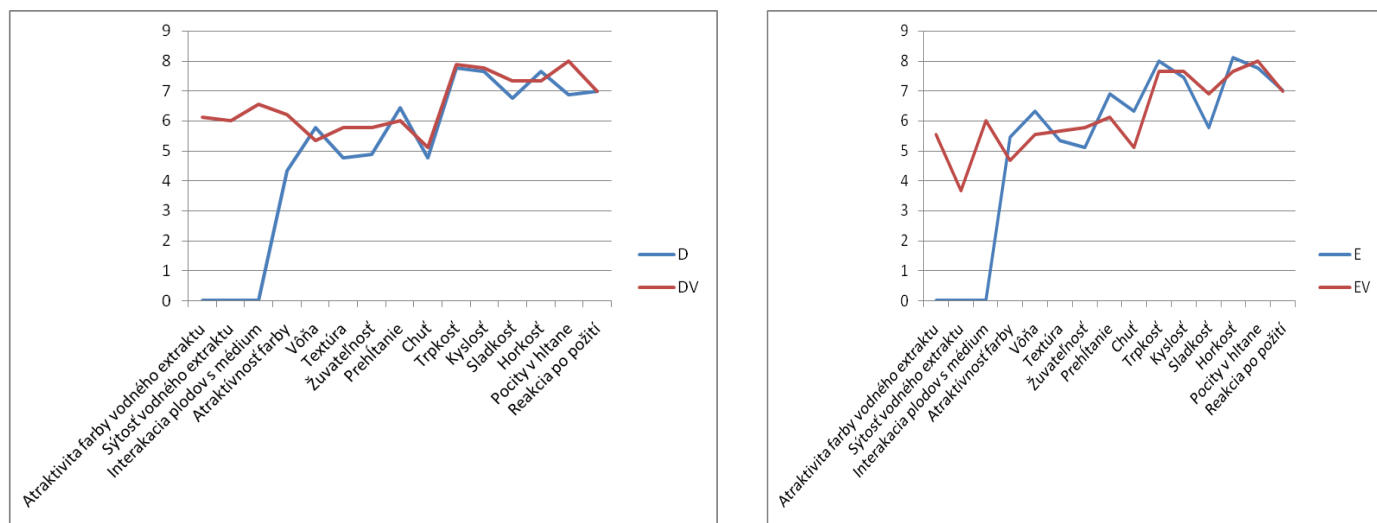
Pri hodnotení vzorky genotypu C sme určili vo všeobecnosti najmenšie rozdiely medzi sušenou dužinou a sušenou dužinou vylúhovanou vo vodnom roztoku (CV), čo dokumentuje aj obrázok 8. Vo väčšine znakov dominovala sušená dužina vylúhovaná vo vodnom roztoku (CV).

Pri hodnotení vzoriek z genotypov D a G sme určili obdobné výsledky, čo dokumentujú aj výsledky prezentované na obrázku 9.

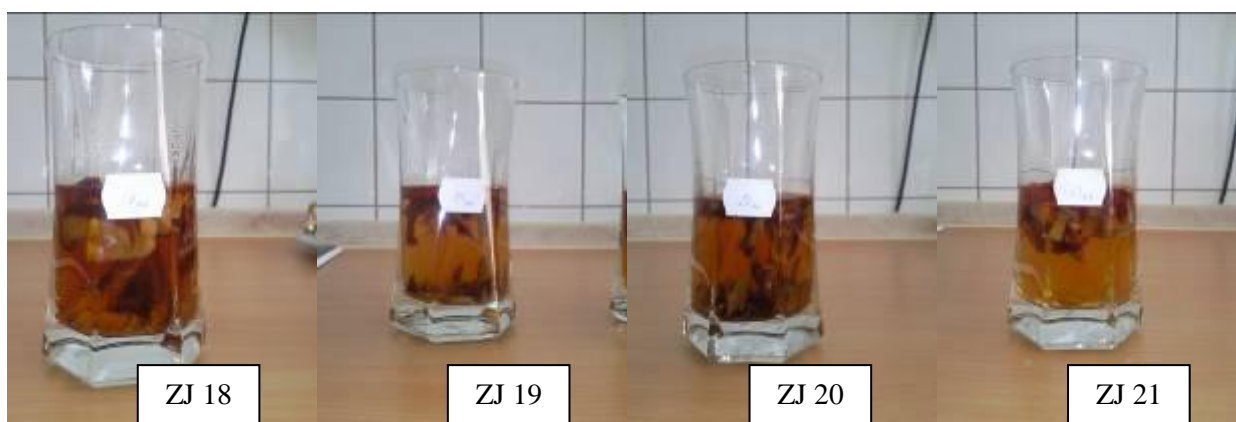




**Obrázok 8** Porovnanie vzoriek sušenej dužiny plodov (B) a (C) so sušenou dužinou plodov vylúhovaných o vodnom roztoku (BV) a (CV) pri genotypoch B a C zizifusa jujubového (*Ziziphus jujuba* Mill.)



**Obrázok 9** Porovnanie vzoriek sušenej dužiny plodov (D) a (E) so sušenou dužinou plodov vylúhovanou vo vodnom roztoku (DV) a (EV) pri genotypoch D a E zizifusa jujubového (*Ziziphus jujuba* Mill.)



**Obrázok 10** Porovnanie vzoriek sušenej dužiny zizifusa jujubového (*Ziziphus jujuba* Mill.) vo vodnom výluhu  
Foto: G. Erdélyiová

## ZÁVER

Dopestovaním prvej populácie genotypov zo semien zizifusa jujubového sme potvrdili možnosti praktického využívania daného druhu aj v podmienkach Slovenska. Medzi genotypmi sme určili významné rozdiely vo všetkých znakoch plodov ako aj kôstkovčiek, čo je možné využiť na selekčné účely. V populácii genotypov sme určili plody o priemernej hmotnosti 0,66 – 4,68 g. Senzorickou analýzou suchej dužiny plodov a suchej dužiny plodov vylúhované vriacou vodou sme potvrdili významné rozdiely medzi genotypmi v chuti, farbe dužiny, textúre, atraktivnosti tvaru a farby a ostatnými znakmi. Vo

všeobecnosti boli hodnotené ako vhodnejšie na konzum vzorky prevarených sušených plodov. Genotyp s označením ZJ 9 sme určili vo všeobecnosti najvyššiu hospodársku hodnotu pri všetkých znakoch. Získané výsledky rozširujú doteraz známe teoretické poznatky z pestovania zizifusa jujubového aj v podmienkach Slovenska. Umožňujú propagáciu a popularizáciu pestovania a využívania plodov z daného druhu aj v podmienkach Slovenska ako významného zdroja s vysokou nutričnou a fytotherapeutickou hodnotou.

## LITERATÚRA

- ABDEL-ZAHER, A. O., SALIM, S. Y., ASSAF, M. H., ABDEL-HADY, R. H. 2005. Antidiabetic activity and toxicity of *Zizyphus spina-christi* leaves. In *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 101, 2005, no. 1-3, p. 129-138.
- ALI, N. A. A., JULICH, W. D., KUSNICK, C., LINDEQUIST, U. 2001. Screening of Yemeni medicinal plants for antibacterial and cytotoxic activities. In *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 74, 2001, p. 173-179.
- ALIEV, A. A., DZHAFAROVA, S. D., RUSTAMOVA, A. M., MEDZHIDOV, M. M. 2002. Protection of mammalian genome from the mutagenicity of styrene and aniline using the extract from unabi (*Zizyphus Mill*) fruit and a composite preparation. In *Tsitol Genet.*, vol. 36, 2002, no.5, p. 26-29.
- AL-REZA, S. M., BAJPAI, V. K., KANG, S. C. 2009. Antioxidant and antilisterial effect of seed essential oil and organic extracts from *Zizyphus jujuba*. In *Food and Chemical Toxicology*, vol. 47, 2007, p. 2374-2380.
- CISSE, A., NDIAYE, A., LOPEZ-SALL, P., SECK, F., FAYE, B. 2000. Antidiabetic activity of *Zizyphus mauritiana* Lam (*Rhamnaceae*). In *Dakar Medical*, vol. 45, 2000, p. 105-107.
- CEVIT, F. M., ŞAN, B., DİLMAÇ ÜNAL, T., HALLAÇ TÜRK, F., YILDIRIM, A. N., POLAT, M., YILDIRIM, F. 2007. Selection of Superior Ber (*Zizyphus jujuba* L.) Genotypes in Çivril Region. In *Tarim Bilimleri Dergisi*, vol. 14, 2008, no. 1, p. 51-56.
- GAO, L., ZHOU, G. F., SHEN, G. N. 2003. New jujube varieties and their cultural techniques. In *China Fruits*, vol. 2, 2003, p. 38-40.
- GHOSH, S. N., MATHEW, B. 2002. Performance of nine ber (*Zizyphus mauritiana* Lamk) cultivars on topworking in the semi-arid region of West Bengal. In *Journal of Applied Horticulture*, vol. 4, 2002, no. 1, p. 49-51.
- GUIL-GUERRERO, J. L., DIAZ DELGADO, A., MATA LLANA GONZÁLEZ, M. C., TORIJA ISASA, M. E. 2004. Fatty Acids and Carotenes in Some Ber (*Zizyphus jujuba* Mill) Varieties. In *Plant Foods for Human Nutrition*, no. 59, 2004, p. 23-27.
- GUPTA, M., MAZUMDER, U. K., VAMSI, M. L., SIVAKUMAR, T., KANDAR, C. C. 2004. Anti-steroidogenic activity of the two Indian medicinal plants in mice. In *J Ethnopharmacol*, vol. 90, 2004, no. 1, p. 21-25.
- HEATON, D. D. 1997. *A produce reference guide to fruits and vegetables from around the world*. New York : Food Products Press, 1997, p. 79. ISBN 1-56022-865-2.
- INAYAT-UR-RAHMAN, ALI KHAN, M., AFRAN, M., AKHTAR, G., KHAN, L., AHMAD, V. U. 2007. A new 14-membered cyclopeptide alkaloid from *Zizyphus oxyphylla*. In *Natural Product Research*, vol. 21, 2007, no. 3, p. 243-253.
- JIA, Y. F., LU, R., DUAN, Y., MA, W. 2010. A New *Zizyphus jujuba* Cultivar 'Shiguang' (Shijiazhuang Pomology Institute, Hebei Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Shijiazhuang 050061, China).
- JIANG, X. W., CAO, J. Q., ZENG, J. X., HUANG, F. P. 2006. Jujube cultivars trials and study on their adaptability. In *South China Fruits*, vol. 1, 2006, p. 51-52.
- JUNG IN YOON, AL-REZA, S. M., KANG, S. C. 2010. Hair growth promoting effect of *Zizyphus jujuba* essential oil. In *Food and Chemical Toxicology*, vol. 48, 2010, p. 1350-1354.
- KARNATOVSKA, M., BRINDZA, J., GRYGORIEVA, O., DEREVJANKO V., KOCHANOVA, Z., BIROVA, D. 2007. Jujube Fruit (*Zizyphus jujuba* Mill.) Variability Determination. 1st International Scientific Conference on Medicinal, Aromatic and Spice Plants. In *Book of Scientific Papers and Abstracts*, December 5-6, 2007, Nitra. p. 219. ISBN 987-80-8069-973-4.
- KLIMENKO, S. V., GRYGORIEVA, O. V. 2008. Zizifus (*Zizyphus jujuba* Mill.) v lesostepnej zóne na Ukrajine. Aktuálne problémy z botaniky v Arménsku. In *Zborník medzinárodnej konferencie*, 70. Výročie Botanického ústavu, Botanickéj záhrady NAN RA a 90. výročie akademika V. O. Kazariana G, 6-9 október 2008, Erevan : Ústav botaniky NAN RA, 2008, p. 378-381.
- KRŠKA, B., MISHRA, S. 2009. Sensory evaluation of different products of *Zizyphus jujuba* Mill. 2009. I International Jujube Symposium. ISH Acta Horticulturae 840. ISBN 978-90-66055 92-6. ISSN 0567-7572. Boading, China.
- KUNDI, A. H. K., WAZIR, F. K., ABDUL, G., WAZIR, Z. D. K. 1989. Physico-chemical characteristics and organoleptic evaluation of different ber (*Zizyphus jujuba* Mill.) cultivars. In *Sarhad Journal of Agriculture*, vol. 5, 1989, no. 2, p. 149-155.
- LANG, X. C., LI, M. X., JIA, B. Y., WU, S. X., LI, L. F., ZHAO, S. Y. 1988. Effects of the seeds of *Zizyphus spinosa* hu on the immune function of mice. In *Zhong Yao Tong Bao*, vol. 13, 1988, no. 11, p. 43-45.
- LEE, S. M., PARK, J. G., LEE, Y. H., LEE, C. G., MIN, B. S., KIM, J. H., LEE, H. K. 2004. Anti-complementary activity of triterpenoides from fruits of *Zizyphus jujuba*. In *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, vol. 27, 2004, no. 11, p. 1883-1886.
- LIAU, B. C., JONG, T. T., LEE, M. R., CHANG, C. M. 2007. Supercritical fluid extraction and quantification of aflatoxins in *Zizyphi Fructus* by liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometry. In *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, vol. 21, 2007, no. 5, p. 667-673.

- MACIUK, A., GHEDIRA, K., THEPENIER, P., LAVAUD, C., ZECHES-HANROT, M. 2003. A new flavonol glycoside from leaves of *Zizyphus lotus*. In *Pharmazie*, vol. 58, 2003, no. 2, p. 158-159.
- MAREČEK, F. et al. 2001. *Zahradnický slovník naučný 5 R-Ž*. Praha: Ústav zemědělských a potravinářských informací. 2001. p. 174-175. ISBN 80-7271-075-3.
- PARK, J. H., LEE, H. J., KOH, S. B., BAN, J. Y., SEONG, Y. H. 2004. Protection of NMDA-induced neuronal cell damage by methanol extract of *Zizyphi spinosi* semen in cultured rat cerebellar granule cells. In *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 95, 2004, no. 1, p. 39-45.
- PRASAD, R. N. 2005. Effect of N and P on growth, yield and quality of ber grown under rainfed conditions of Indian arid zone. In *Indian Journal of Horticulture*, vol. 62, 2005, no. 4, p. 404-406.
- SINGH, S., PANDEY, M. B., SINGH, J. P., PANDEY, V. B. 2006. Peptide alkaloids from *Zizyphus sativa* bark. In *Journal of Asian Natural Products*, vol. 8, 2006, no. 8, p. 733-737.
- SINKO, L. T. 1976. *Rastit Resur.* 12, 303 (1976).
- SIVAKOV, L., GEORGIEV, D., RISTEVSKI, B., MITRESKI, Z. 1988. Pomological and technological characteristics of Chinese jujube (*Zizyphus jujuba*) in Macedonia, 1998. In *Jugoslovensko Vocarstvo*, vol. 22, 1998, no. 4, p. 387-392.
- Acknowledgments:**  
This publication was supported by project "Promotion of innovation technologies of special organic products for a healthy diet of people" ITMS 26220220115 to support the Operational Programme of Research and development financed by the European Regional Development Fund.
- Contact address:**  
doc. Ing. Ján Brindza, PhD. Institute of Biological Conservation and biosafety, Faculty of Agrobiology and Food Resources, Slovak University of Agriculture in Nitra, Trieda Andreja Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovak Republic. Tel.: +421 376 414 787, E-mail: Jan.Brindza@uniag.sk  
Mgr. Margarita Karnatovská, PhD., Nikita Botanical Garden Research Centre, Nova Kachovka, Sadova 1, 74900 Plodove, Kherson, Ukraine. Tel.: +380950844654, E-mail: karnatovskaya@gmail.com
- SUKSMARARN, S., PANSEETA, P., KUNCHANAWATTA, S., DISTAPORN, T., RUKTASING, S., SUKSMARARN, A. 2006. Ceanothane- and lupane-type triterpenes with antiplasmodial and antimycobacterial activities from *Zizyphus cambodiana*. In *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, vol. 54, 2006, no. 4, p. 535-537.
- ZHANG, L., LIU, J., LI, Z., ZHAI, Y., SUN, X., MIAO, F., XIAO, J. 2011. Selection of Jujube variety Cangjin NO.1 in cracking resistance of high quality. In *Hebei Journal of Forestry and Orchard Research*, 2011.
- ZHAO, J., LI, S. P., YANG, F. Q., LI, P., WANG, Y. T. 2006. Simultaneous determination of saponins and fatty acids in *Zizyphus jujuba* (Suanzaoren) by high performance liquid chromatography-evaporative light scattering detection and pressurized liquid extraction. In *Journal of Chromatography*, vol. 1108, 2006, no. 2, p. 188-194.
- WU, S. X., LANG, X. C., JIA, B. Y., ZHAO, S. X., LI, M. X., LAN, M. Y. 1989. Effects of *Zizyphus spinosa* Hu on serum lipoprotein and experimental atherosclerosis. In *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*, vol. 14, 1989, no. 7, p. 434-451, 448.
- WU, Y., DING, A., BAO, B. 2005. Studies on the extraction and purification of total saponins from Parched Semen *Zizyphi Spinosa*. In *Zhong Yao Cai*, vol. 28, 2005, no. 3, p. 219-223.
- Mgr. Oľga Grygorieva, PhD., M. M. Grishko National Botanical Gardens of Ukraine National Academy of Sciences, Timiryazevska 1, 01014 Kiev, Ukraine. E-mail: ogrygorieva@mail.ru  
Ing. Vladimír Vietoris, PhD. Department of Storing and Processing of Plant Products, Faculty of Biotechnology and Food Science, Slovak University of Agriculture in Nitra. Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovak Republic E-mail: vietoris@afnet.uniag.sk  
Ing. Lucia Kucelová. Institute of Biological Conservation and biosafety, Faculty of Agrobiology and Food Resources, Slovak University of Agriculture in Nitra, Trieda Andreja Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovak republic. Tel.: +421376414787, E-mail: lucia.kucelova@uniag.sk

## FLAVONOID NATURAL SOURCES AND THEIR IMPORTANCE IN THE HUMAN DIET

Martina Danihelová, Ernest Šturdík

### ABSTRACT

Flavonoids as natural bioactive compounds are present in almost every sort of fruits, vegetables and from them derived products. Flavonols may be found mainly in fruits and vegetables, while flavones are abundant in herbs and spices. Rich natural sources of flavanols are tea, cocoa, grape seeds or apple skin. Flavanones are primarily found in a variety of citrus fruits and anthocyanidins in many coloured berries. Soy is rich in isoflavonoids. Average daily intake of flavonoids is approximately in the range of 150 to 300 mg. It strongly depends on individual, country and culture usages. In west countries main dietary sources of flavonoids consist of tea, wine and fruits, while in east countries there is consumed mainly soy with high isoflavonoid content. Many studies have shown, that intake of fruits and vegetables with high flavonoid content is associated with lowered risk of incidence of some diseases such as cardiovascular or cancer. These findings are attributed to experimentally confirmed biological effects of flavonoids – antioxidant, anti-inflammatory, anti-allergic, anticancer or cardioprotective. The final effect is however depending on their bioavailability, which is in the case of flavonoids not high, because in the nature dominating flavonoid glycosides can poorly penetrate through lipophilic cell membranes. Final effective molecules are flavonoid metabolites, that more or less retain their biological activities.

**Keywords:** bioavailability, biological effect, daily intake, flavonoid, natural source

### ÚVOD

Vyvážená strava by mala obsahovať ovocie a zeleninu, ktorých konzumácia sa odporúča počas celého roka, pokiaľ možno v čerstvom stave. Výsledky epidemiologických štúdií poukazujú na prospešný účinok takto zloženej stravy v boji proti civilizačným ochoreniam (Gonzalez, Riboli, 2010; Zhao et al., 2011). Ochranný účinok sa pripisuje ich bioaktívnym zložkám, ktorých značnú časť predstavujú polyfenoly a spomedzi nich najväčšia podskupina – flavonoidy (Silalahi, 2002).

Výskum flavonoidov začal v roku 1936 ich objavom maďarskými výskumníkmi (Rusznák, Szent-Györgyi, 1936). Veľký rozmach dosiahol najmä v poslednom desaťročí. Každoročne sa zvyšujúci počet publikácií svedčí o atraktivnosti tejto skupiny prírodných látok. Práce sa zaoberajú štúdiom biologických účinkov flavonoidov, objasňovaním mechanizmov ich pôsobenia, skúmaním biodostupnosti a potenciálnych toxických účinkov ako aj izoláciou nových štruktúr z rôznych prírodných zdrojov.

Flavonoidy patria do skupiny sekundárnych metabolitov. V rastlinnej ríši sú zodpovedné za pôsobivé farby kvetov, ovocia i zeleniny. V potravinách väčšinou prispievajú ku ich prirodzenej horkej chuti a vďaka svojim vlastnostiam i ku nutričnej kvalite ovocia a zeleniny (Manach et al., 2004).

Výskumy preukázali u mnohých spomedzi flavonoidov viaceré zdravie prospešné účinky ako napr. antioxidantné, protizápalové, kardioprotektívne, antivirálné či protirakovinové (Birt, Hendrich, Wang, 2001; Yao et al., 2004; González-Gallego, Sánchez-Campos, Tuñón, 2007; Shukla et al., 2010; Yao et al., 2011). Vychádzajúc z týchto poznatkov našli už viaceré zlúčeniny flavonoidov svoje uplatnenie v oblasti potravinárstva, farmácie i kozmetiky (Ardhaoui et al., 2004; Vorsa et al., 2007; Birbara, 2011).

Každé ovocie i zelenina obsahujú niekoľko druhov flavonoidov. Zdravotné benefity potravy bohatej na ovocie

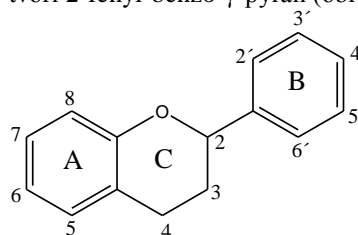
a zeleninu sa pripisujú vzájomnému synergistickému pôsobeniu týchto látok ako aj spoluúčinnosti s ostatnými fytochemikáliami prítomnými v celých potravinách (Liu, 2004). Preto je výhodnejšie konzumovať celé potraviny než prijímať jednotlivé flavonoidy osve vo forme výživových doplnkov. Výsledný účinok flavonoidov vo veľkej miere závisí od ich biodostupnosti pre živé organizmy. Tento fakt treba brať do úvahy pri stanovovaní ich odporúčaného denného príjmu, ktorý ešte nebol presne determinovaný (Yao et al., 2004).

Pre vývoj nových potravinových aditív či nutraceutík na báze flavonoidov je dôležité poznať ich najvýznamnejšie prírodné zdroje. Týmto smerom je orientovaný i predkladaný článok, pričom potravinové zdroje sú prehľadne rozdelené podľa jednotlivých tried flavonoidov podľa najnovšie dostupných informácií. Práca pojednáva i o dennom príjme flavonoidov ako aj o význame ich príjmu stravou pre ľudské zdravie. Ohľad sa pritom berie na údaje o ich biodostupnosti ako aj metabolizme.

### ŠTRUKTÚRNA VARIABILITA

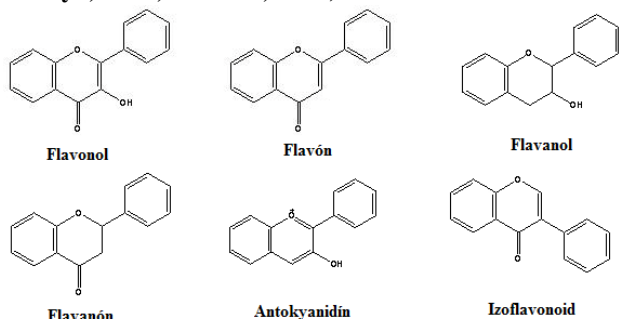
Flavonoidy predstavujú skupinu rastlinných pigmentov. Sú zodpovedné za mnohé organoleptické vlastnosti jedál a nápojov na báze rastlín a to najmä chuť a farbu. Svojimi prospešnými vlastnosťami taktiež prispievajú k nutričnej kvalite ovocia a zeleniny ako aj ku ich stabilite.

Sú to polyfenoloné látky, ktoré zaraďujeme medzi sekundárne metabolity rastlín. Základnú štruktúru väčšiny flavonoidov tvorí 2-fenyl-benzo- $\gamma$ -pyrón (obrázok č. 1).



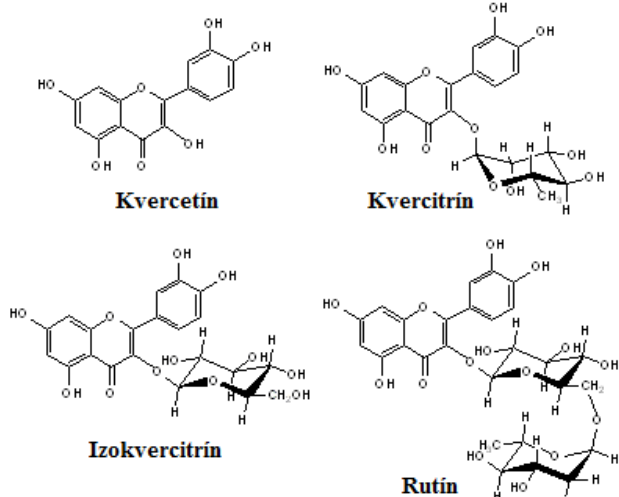
Obrázok 1 Základná štruktúra flavonoidov

Doteraz bolo identifikovaných viac než 8000 druhov týchto látok (Tapas, Sakarkar, Kakde, 2008). Na základe stupňa nenasýtenosti a stupňa oxidácie stredného kruhu C rozlišujeme 6 základných tried flavonoidov: flavóny, flavonoly, flavanoly (katechíny), flavanóny, izoflavonoidy a antokyanidíny (obrázok č. 2) (Heim, Tagliaferro, Bobilya, 2002; Beecher, 2003).



Obrázok 2 Štruktúry hlavných tried flavonoidov

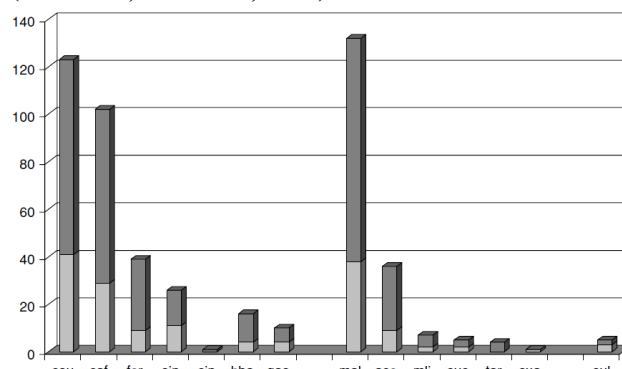
Väčšina flavonoidov sa v prírode vyskytuje vo forme glykozidov. Príslušný sacharid sa zväčša pripája na uhlík v polohe 3, 5 alebo 7. Sacharidovú časť tvorí najčastejšie glukóza. Okrem nej možno nájsť aj konjugáty flavonoidov s galaktózou, ramnózou, xylózou a arabinózou a menej často s manózou, fruktózou, kyselinou glukurónovou a galakturónovou. Spomedzi disacharidov vytvára glykozidovú časť najmä rutinóza (6-O- $\alpha$ -L-ramnozyl-D-glukóza) alebo neohesperidóza (2-O- $\alpha$ -L-ramnozyl-D-glukóza) (obrázok č. 3) (Robards, Antolovich, 1997).



Obrázok 3 Štruktúry kvercetínu a jeho najznámejších glykozidov (kvercitrín = kvercetín-3-ramnozid, izokvercitrín = kvercetín-3-glukozid, rutin = kvercetín-3-ramnoglukozid)

Rozmanitosť flavonoidových štruktúr existuje i vďaka modifikácii základného skeletu špecifickými reakciami vrátane glykozylácie, metylácie, prenylácie a acylácie (Schiljen et al., 2004). Spomedzi flavonoidov sú najčastejšie acylované antokyaníny (glykozylované formy antokyanidínov), nakoľko sú v prírode nestabilné a týmto spôsobom si stabilitu svojej molekuly zvyšujú. Viac ako 65 % antokyanínov vyskytujúcich sa v prírode je acylovaných alifatickými alebo aromatickými kyselinami.

Aromatické acylové skupiny antokyanínov zahŕňajú rôzne hydroxyškoricové (p-kumarová, kávová, ferulová, sinapová kyselina) a hydroxybenzoové kyseliny (p-hydroxybenzoová, galová kyselina). Spomedzi alifatických skupín a celkovo najčastejším acylačným činidlom u antokyanínov je kyselina malonová, pričom deriváty s kyselinou octovou, jablčnou, šťaveľovou, jantárovou a vinnou sú menej časté (obrázok č. 4) (Andersen, Jordheim, 2006).



Obrázok 4 Počty antokyanínov obsahujúcich rôzne acylové zvyšky. Horná tmavšia časť každého stĺpca predstavuje antokyaníny objavené po roku 1992 (cou, kyselina p-kumarová; caf, k. kávová; fer, k. ferulová; sin, k. sinapová; cin, k. 3,5-dihydroxyškoricová; hba, k. p-hydroxybenzoová; gao, k. galová; mal, k. malonová; ace, k. octová; mli, k. jablčná; suc, k. jantárová; tar, k. vinná; oxa, k. šťaveľová; sul, k. sírová) (Andersen, Jordheim, 2006)

Metyláciu zabezpečujú metyltransferázy. Uskutočňuje sa na hydroxylových skupinách aglykónovej i glykozidovej časti flavonoidov. Ako substrát slúži S-adenozyl-L-metionín. Metylácia flavonoidov zvyšuje ich lipofilitu a tým im uľahčuje prechod bunkovými membránami. O-alkylácia sa v prírode vyskytuje častejšie než C-alkylácia. Štruktúry zaujímavé svojimi účinkami vznikajú i pôsobením prenyltransferáz (Davies, Schwinn, 2006).

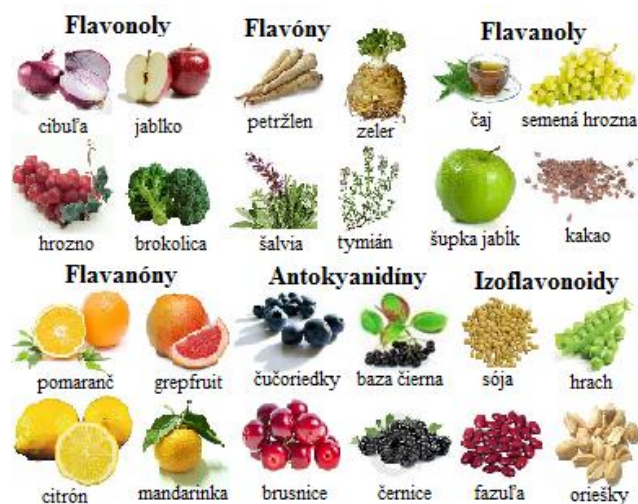
### PRÍRODNÉ ZDROJE

V rastlinách sú flavonoidy prítomné vo všetkých ich častiach: v listoch, kvetoch, plodoch i semenách (Cook, Samman, 1996). Častokrát možno pozorovať ich akumuláciu vo vonkajších obalových vrstvách akými sú šupky (jablko, hrozno, cibuľa), pretože ich biosyntézu stimuluje snečné žiarenie (Wiczowski et al., 2003; Anastasiadi et al., 2010; Carbone et al., 2011). Na množstvo prítomných flavonoidov má vplyv nielen rodová a druhová diverzita, ale tiež sezónne a klimatické podmienky ako aj spôsob technologickej úpravy pri príprave konkrétnych jedál z čerstvých surovín (Wiczowski, Piskula, 2004). Hlavnými zdrojmi flavonoidov v ľudskej strave sú najmä ovocie, zelenina a nápoje ako čaj a víno (obrázok č. 5) (De Groot, Rauen, 1998).

Obsahové dáta jednotlivých flavonoidov v rôznych jedlách vykazujú podľa dostupnej literatúry značnú variabilitu. Tieto hodnoty sú ovplyvnené nielen už spomínanými podmienkami (rodová diverzita, klimatické podmienky, spôsob technologickej úpravy), ale tiež



voľbou vhodných metód pre detekciu daných zlúčenín. Preto sme pre čo najobjektívnejšie zhodnotenie obsahu flavonoidov v jednotlivých prírodných zdrojoch zvolili údaje z americkej databázy obsahu flavonoidov v jedlách (3. aktualizovaná verzia z roku 2011) (Bhagwat, Haytowitz, Holden, 2011) resp. údaje z databázy obsahu izoflavonoidov v potravinách (2. aktualizovaná verzia z roku 2008) (Bhagwat, Haytowitz, Holden, 2008), ktoré tieto faktory zohľadnili. Pre celkové zjednodušenie je v databázach uvedený obsah najčastejšie sa vyskytujúcich flavonoidov vo forme ich aglykónov (príslušné glykozidy boli prepočítané na pomerné množstvá aglykónov). Ak niektoré flavonoidy nie sú pri niektorých zdrojoch uvedené, to nevyhnutne neznamená, že sa tam nenachádzajú. Možno iba v danom zdroji neboli doposiaľ stanovované.



Obrázok 5 Prírodné zdroje jednotlivých tried flavonoidov

### FLAVONOLY

Flavonoly sú prírodné pigmenty bledožltej farby prítomné v kvetoch a listoch u takmer 80% vyšších rastlín a tiež v ovocí, v menšej miere ich obsahuje zelenina či cereálie (Herrmann, 1976).

Hlavné potravinové flavonoly predstavujú kvercetin, kempferol, myricetin a izoramnetin, o ktorých obsahu v potravinách pojednávajú i vyššie spomínané databázy.

Najvyšší obsah kvercetínu majú niektoré koreniny ako napr. kapary (233,84 mg/100 g), kôpor (55,15 mg/100 g), koriander (52,90 mg/100 g) či fenikel (48,80 mg/100 g).

Z hľadiska bežne konzumovanej stravy u slovenského obyvateľstva sú významné hodnoty kvercetínu v jablkách (3,69 až 3,89 mg/100 g), kapuste (22,58 mg/100 g) a cibuli, pričom vyšší obsah majú červené odrody (31,77 mg/100 g) než žlté (21,40 mg/100 g). U niektorých plodín sa kvercetin (ale aj iné flavonoidy) hromadí vo vrchných častiach akými sú napr. šupky, ktoré bývajú častokrát nedocenené z hľadiska ich nutričnej hodnoty. U jablka napr. šupka obsahuje 5-krát viac kvercetínu v porovnaní s celým jablkom. U cibule sa kvercetin sústreďuje vo vrchnej suchej šupke vo forme aglykónu, vo vnútorných vrstvách tvorí najmä glykozidy (Beesk et al., 2010).

Z bobuľového ovocia majú významnejšie hodnoty tohto flavonoidu jarabina (18,53 mg/100 g), brusnica (14,84 mg/100 g) a baza čierna (26,77 mg/100 g). Čierne ríbezle majú niekoľkonásobne vyšší obsah kvercetínu

(4,48 mg/100 g) než červené (0,77 mg/100 g). Značné množstvo kvercetínu vo forme diglykozidu rutínu obsahuje pseudocereálie pohánka (15,38 mg/100 g).

Zo zeleniny sú známe vyšším obsahom kvercetínu žerucha (29,99 mg/100 g), špargľa (13,98 mg/100 g), brokolica (3,26 mg/100 g), pažitka (4,77 mg/100 g), hlávkový šalát (zelený = 4,16 mg/100 g, červený = 11,90 mg/100 g) a špenát (3,97 mg/100 g). Približne 2 mg kvercetínu/100 g obsahujú nápoje ako červené víno, zelený a čierny čaj (tabuľka 1) (Bhagwat, Haytowitz, Holden, 2011).

Tabuľka 1 Obsah kvercetínu vo vybraných potravinových zdrojoch (Bhagwat, Haytowitz, Holden, 2011)

Potravina	Obsah (mg/100 g)
kapary	233,84
kôpor	55,15
koriander, listy	52,90
fenikel, listy	48,80
červená cibuľa	31,77
žerucha	29,99
baza čierna	26,77
kapusta	22,58
žltá cibuľa	21,40
šupka jablka	19,36
jarabina	18,53
pohánka	15,38
brusnica	14,84
špargľa	13,98
hlávkový šalát, červený	11,90
oregano	7,30
figy	5,47
pažitka	4,77
čierne ríbezle	4,48
hruška	4,24
hlávkový šalát, zelený	4,16
špenát	3,97
jablko	3,69 až 3,89
černice	3,58
brokolica	3,26
zelený čaj	2,49
čierny čaj	1,99
červené víno	1,76

Ak sa pozrieme na prírodné zdroje kempferolu, do popredia vystupujú opäť niektoré koreniny: kapary (259,19 mg/100 g), šafrán (205,48 mg/100 g) a zázvor (33,60 mg/100 g).

Zo zeleniny sa vyskytuje najmä v kapuste (46,80 mg/100 g), žeruche (23,03 mg/100 g), špargli (7,84 mg/100 g) či špenáte (6,38 mg/100 g). Ovocné zdroje nie sú zastúpením kempferolu zaujímavé. Zelený a čierny čaj obsahujú 1,31 mg kempferolu/100 g (tabuľka 2) (Bhagwat, Haytowitz, Holden, 2011).

Pri myricetíne sú významnými zdrojmi taktiež koreniny – fenikel (19,80 mg/100 g), oregano (2,10 mg/100 g) i kurkuma (2,04 mg/100 g). Zo zeleniny je obsahom myricetínu zaujímavý petržlen (14,84 mg/100 g). Významný obsah má i bobuľové ovocie, najmä brusnice (6,63 mg/100 g) a čierne ríbezle (6,18 mg/100 g) (tabuľka 3) (Bhagwat, Haytowitz, Holden, 2011).



**Tabuľka 2** Obsah kempferolu vo vybraných potravinových zdrojoch (Bhagwat, Haytowicz, Holden, 2011)

Potravina	Obsah (mg/100 g)
kapary	259,19
šafrán	205,48
kapusta	46,80
zázvor	33,60
žerucha	23,03
kôpor	13,33
čakanka	10,10
pažitka	10,0
brokolica	7,84
fenikel, listy	6,50
špenát	6,38
fazuľa biela	3,40
pór	2,67
kaleráb	2,43
petržlen	1,49
čierny čaj	1,31
zelený čaj	1,31

**Tabuľka 3** Obsah myricetínu vo vybraných potravinových zdrojoch (Bhagwat, Haytowicz, Holden, 2011)

Potravina	Obsah (mg/100 g)
fenikel, listy	19,80
petržlen	14,84
brusnice	6,63
čierne ríbezle	6,18
červená cibuľa	2,70
oregano	2,10
kurkuma	2,04

Izoramnetín je metylovaným analógom kvercetínu. Jeho významné množstvá obsahuje sušený petržlen (331,24 mg/100 g) a kôpor (43,50 mg/100 g). Zo zeleninových zdrojov je naň bohatá kapusta (23,60 mg/100 g), pažitka (6,75 mg/100 g), špargľa (5,70 mg/100 g) a cibuľa (žltá = 5,01 mg/100 g, červená = 3,01 mg/100 g). Izoramnetín obsahujú i mandle (2,64 mg/100 g) (tabuľka 4) (Bhagwat, Haytowicz, Holden, 2011).

**Tabuľka 4** Obsah izoramnetínu vo vybraných potravinových zdrojoch (Bhagwat, Haytowicz, Holden, 2011)

Potravina	Obsah (mg/100 g)
petržlen, sušený	331,24
kôpor	43,50
kapusta	23,60
fenikel, listy	9,30
pažitka	6,75
špargľa	5,70
baza čierna	5,42
žltá cibuľa	5,01
červená cibuľa	3,01
mandle	2,64

## FLAVÓNY

Flavóny majú rovinnú štruktúru. Sú prítomné najmä v bylinách a cereáliách a spôsobujú ich žlté sfarbenie (De Groot, Rauen, 1998). Najzastúpenejšími prírodnými flavónmi sú apigenín a luteolín.

Bohatým zdrojom apigenínu je najmä sušený petržlen (4503,50 mg/100 g), pričom čerstvý petržlen obsahuje 20-krát menej tohto flavonoidu. Medzi hlavné prírodné zdroje patria tiež rôzne koreniny a byliny – mäta pieporná (8,71 mg/100 g), majorán (3,50 mg/100 g), oregano (2,57 mg/100 g), tymián (2,50 mg/100 g). Zo zeleniny sú to okrem petržlenu artičoky (7,42 mg/100 g) a zeler (2,85 mg/100 g), pričom zelerové semeno obsahuje 30-krát vyššie množstvo apigenínu. Istú hladinu apigenínu má i pseudocereália cirok (2,54 mg/100 g) (tabuľka 5) (Bhagwat, Haytowicz, Holden, 2011).

**Tabuľka 5** Obsah apigenínu vo vybraných potravinových zdrojoch (Bhagwat, Haytowicz, Holden, 2011)

Potravina	Obsah (mg/100 g)
petržlen, sušený	4503,50
petržlen	215,46
zelerové semeno	83,70
mäta pieporná	8,71
artičoky	7,42
majorán, sušený	3,50
zeler	2,85
olivové listy	2,84
oregano	2,57
cirok	2,54
tymián	2,50
červené víno	1,33

Najviac luteolínu sa nachádza v zelerovom semene (811,41 mg/100 g). Ako apigenín tak i luteolín možno nájsť najmä v rôznych bylinách a koreninách – tymián (45,25 mg/100 g), sušený petržlen (19,75 mg/100 g), šalvia (16,70 mg/100 g), mäta pieporná (11,33 mg/100 g). Spomedzi zeleniny obsahuje najviac luteolínu červený hlávkový šalát (2,50 mg/100 g) a artičoky (2,27 mg/100 g). Ovocné zdroje nie sú pre tento druh flavonoidu významné. Za zmienku stojí jeho obsah v olivových listoch (27,70 mg/100 g) alebo v ciroku (3,93 mg/100 g) (tabuľka 6) (Bhagwat, Haytowicz, Holden, 2011).

**Tabuľka 6** Obsah luteolínu vo vybraných potravinových zdrojoch (Bhagwat, Haytowicz, Holden, 2011)

Potravina	Obsah (mg/100 g)
zelerové semeno	811,41
tymián	45,25
olivové listy	27,70
petržlen, sušený	19,75
šalvia	16,70
mäta pieporná	11,33
cirok	3,93
čierne korenie	3,87
hlávkový šalát, červený	2,50
artičoky	2,27
rozmarín	2,0

**FLAVANOLY**

Flavanoly sa nazývajú aj katechíny a vyskytujú sa najmä v zelenom a čiernom čaji, kde sú zodpovedné za ich prirodzenú horkú chuť (De Groot, Rauen, 1998). V prírode sú najrozšírenejšie katechín, epikatechín a ich estery s kyselinou galovou. Väčšinou sú najvyššie koncentrácie jednotlivých flavanolov v zelenom čaji, čo vyplýva z procesov použitých pri jeho výrobe (nie je napr. fermentovaný ako čierny čaj).

Spomedzi flavanolov sa v čaji katechín vyskytuje v najnižších koncentráciách, pričom čierny čaj je jeho bohatším zdrojom (137,82 mg/100 g) než zelený (57,12 mg/100 g). Okrem toho vysoké koncentrácie obsahujú i kakaové bôby (88,45 mg/100 g) či semená hrozna (74,63 mg/100 g).

Spomedzi ovocia ho možno nájsť najmä v čierniciach (37,06 mg/100 g), tmavom hrozne (10,14 mg/100 g), banáne (6,1 mg/100 g) či čučoriedkach (5,29 mg/100 g). Šupky jablka obsahujú niekoľkonásobne vyššie hladiny katechínu (7,4 mg/100 g) než celé jablká (0,59 až 2 mg/100 g).

U zeleniny predstavuje významnejší zdroj iba bôb (14,29 mg/100 g). U nápojov okrem čaju možno katechín nájsť i v červenom víne (7,12 mg/100 g) (tabuľka 7) (U.S. Department of Agriculture, 2007; Bhagwat, Haytowitz, Holden, 2011).

**Tabuľka 7** Obsah katechínu vo vybraných potravinových zdrojoch (U.S. Department of Agriculture, 2007\*; Bhagwat, Haytowitz, Holden, 2011)

Potravina	Obsah (mg/100 g)
čierny čaj, sušený	137,82*
kakaové bôby	88,45
semená hrozna	74,63
zelený čaj, sušený	57,12*
černice	37,06
bôb	14,29
tmavé hrozno	10,14
šupka jablka	7,40
pekanové oriešky	7,24
červené víno	7,12
banán	6,10
čučoriedky	5,29
broskyňa	4,92
čerešne	4,36
hrozno biele	3,73
marhuľa	3,67
pistácie	3,57
jahody	3,11

Najviac epikatechínu sa nachádza v zelenom (811,72 mg/100 g) a čiernom čaji (255,19 mg/100 g). Vysoké hladiny majú i kakaové bôby (99,18 mg/100 g) a semená hrozna (93,31 mg/100 g).

Zo zeleniny je epikatechín hojne zastúpený v bôbe (28,96 mg/100 g). Šupky jablka obsahujú 5-násobné množstvá epikatechínu (28,73 mg/100 g) než celé jablká (5,51 až 9,83 mg/100 g).

Spomedzi ovocia je prítomný v tmavom hrozne (8,68 mg/100 g), čerešniach (5 mg/100 g), marhuliach (4,74 mg/100 g), čierniciach (4,66 mg/100 g) i brusniciach

(4,37 mg/100 g). Červené víno neobsahuje veľa epikatechínu (3,76 mg/100 g) (tabuľka 8) (U.S. Department of Agriculture, 2007; Bhagwat, Haytowitz, Holden, 2011).

**Tabuľka 8** Obsah epikatechínu vo vybraných potravinových zdrojoch (U.S. Department of Agriculture, 2007\*; Bhagwat, Haytowitz, Holden, 2011)

Potravina	Obsah (mg/100 g)
zelený čaj, sušený	811,72*
čierny čaj, sušený	255,19*
kakaové bôby	99,18
semená hrozna	93,31
bôb	28,96
šupka jablka	28,73
jablko <i>Red Delicious</i>	9,83
tmavé hrozno	8,68
jablko <i>Gala</i>	6,04
jablko <i>Golden Delicious</i>	5,51
čerešne	5,00
marhuľa	4,74
černice	4,66
brusnice	4,37
červené víno	3,76
hruška	3,76
malina	3,52

Spomedzi esterov katechínov s kyselinou galovou je v čaji najviac zastúpený epigalokatechín-3-galát, pričom najviac ho je v zelenom čaji (7115,98 mg/100 g), nasleduje biely (4245 mg/100 g) a čierny čaj (1121,92 mg/100 g). Z ostatných zdrojov je prítomný ešte v pekanových (2,3 mg/100 g) a lieskových orieškoch (1,06 mg/100 g). Ovocné a zeleninové zdroje nie sú významné (tabuľka 9) (U.S. Department of Agriculture, 2007; Bhagwat, Haytowitz, Holden, 2011).

**Tabuľka 9** Obsah epigalokatechín-3-galátu vo vybraných potravinových zdrojoch (U.S. Department of Agriculture, 2007\*; Bhagwat, Haytowitz, Holden, 2011)

Potravina	Obsah (mg/100 g)
zelený čaj, sušený	7115,98*
biely čaj, sušený	4245,00
čierny čaj, sušený	1121,92*
pekanové oriešky	2,30
lieskový orech	1,06
brusnice	0,97
černice	0,68
maliny	0,54

V čaji sa nachádza i epikatechín-3-galát. V najvyššom množstve je prítomný v zelenom čaji (1491,29 mg/100 g), ďalej v bielom (835 mg/100 g) a čiernom čaji (688,27 mg/100 g). Obsahuje ho i tmavé hrozno (2,81 mg/100 g), slivky (0,76 mg/100 g) či rebarbora (0,6 mg/100 g) (tabuľka 10) (U.S. Department of Agriculture, 2007; Bhagwat, Haytowitz, Holden, 2011).

## potravinárstvo

**Tabuľka 10** Obsah epikatechín-3-galátu vo vybraných potravinových zdrojoch (U.S. Department of Agriculture, 2007\*; Bhagwat, Haytowitz, Holden, 2011)

Potravina	Obsah (mg/100 g)
zelený čaj, sušený	1491,29*
biely čaj, sušený	835,00
čierny čaj, sušený	688,27*
tmavé hrozno	2,81
slivky	0,76
rebarbora	0,60

### FLAVANÓNY

Flavanóny sa v prírode vyskytujú najmä vo forme konjugátov s disacharidmi v polohe 7 na základnom flavonoidovom skelete. Sú prítomné hlavne v citrusovom ovocí (De Groot, Rauen, 1998). V prírode možno nájsť spomedzi ich zástupcov najmä hesperetín a naringenín, resp. ich glykozidy.

Narigenín obsahujú koreniny ako oregano (372 mg/100 g) a rozmarín (24,86 mg/100 g). Vysoké koncentrácie má i citrusové ovocie, najmä grepfruit (53 mg/100 g), pomelo (24,72 mg/100 g), pomaranč (15,32 mg/100 g) či mandarinka (10,02 mg/100 g). Tu sa naringin vyskytuje najmä vo forme glykozidov.

Zo zeleniny najviac naringenínu obsahujú artičoky (12,51 mg/100 g). Naringenín je prítomný i v ciroku (1,67 mg/100 g) (tabuľka 11) (Bhagwat, Haytowitz, Holden, 2011).

**Tabuľka 11** Obsah naringenínu vo vybraných potravinových zdrojoch (Bhagwat, Haytowitz, Holden, 2011)

Potravina	Obsah (mg/100 g)
oregano, sušené	372,00
grepfruit	53,00
rozmarín	24,86
pomelo	24,72
pomaranč	15,32
artičoky	12,51
mandarinka	10,02
limetka	3,40
ružičková kapusta	3,29
cirok	1,67
rajčiak	0,68
citrón	0,55

Najvyšší obsah hesperetínu je v citrusovom ovocí (opäť vo forme glykozidov), najmä v limetkách (43 mg/100 g), citróne (27,9 mg/100 g) a pomaranči (27,25 mg/100 g). Z iných zdrojov je významnejšie množstvo v mäte piepornej (9,52 mg/100 g) (tabuľka 12) (Bhagwat, Haytowitz, Holden, 2011).

**Tabuľka 12** Obsah hesperetínu vo vybraných potravinových zdrojoch (Bhagwat, Haytowitz, Holden, 2011)

Potravina	Obsah (mg/100 g)
limetka	43,00
citrón	27,90
pomaranč	27,25
mäta pieporná	9,52
pomelo	8,40
mandarinka	7,94
grepfruit	1,50

### ANTOKYANIDÍNY

Antokyanidíny sú v prírode rozšírené pigmenty s modrou, fialovou alebo červenou farbou. Sú zodpovedné za charakteristickú farbu kvetov, ovocia príp. listov danej rastliny (De Groot, Rauen, 1998). V prírode nájdeme napr. kyanidín, delfinidín, malvidín či pelargonidín.

Najzastúpenejším spomedzi antokyanidínov je kyanidín. Najviac ho obsahuje baza čierna (485,26 mg/100 g). Bohatými prírodnými zdrojmi sú i jarabina (344,07 mg/100 g), čierna malina (323,47 mg/100 g) a čakanka (126,99 mg/100 g). Vysoké koncentrácie spomedzi ovocia obsahujú černice (90,49 mg/100 g), ostružiny (88,30 mg/100 g), červené (65,54 mg/100 g) a čierne ríbezle (61,3 mg/100 g), bobule acai (53,64 mg/100 g), červené maliny (36,74 mg/100 g), brusnice (37,74 mg/100 g), čerešne (27,45 mg/100 g) či čučoriedky (17,92 mg/100 g).

Zo zeleninových zdrojov je významná červená kapusta (63,5 mg/100 g). Kyanidín obsahujú i farebné pšenice (11,07 mg/100 g) či niektoré oriešky – pekanové (10,74 mg/100 g), lieskové (6,71 mg/100 g), pistácie (6,06 mg/100 g) (tabuľka 13) (Bhagwat, Haytowitz, Holden, 2011).

**Tabuľka 13** Obsah kyanidínu vo vybraných potravinových zdrojoch (Bhagwat, Haytowitz, Holden, 2011)

Potravina	Obsah (mg/100 g)
baza čierna	485,26
jarabina	344,07
čierna malina	323,47
čakanka	126,99
černice	90,49
ostružiny	88,30
červené ríbezle	65,54
červená kapusta	63,50
čierne ríbezle	61,30
bobule acai	53,64
brusnice	37,74
červené maliny	36,74
čerešne	27,45
čučoriedky	17,92
tmavé hrozno	13,16
hruška	12,18
fialová pšenica	11,07
pekanové oriešky	10,74

## potravinárstvo

Delfinidín možno nájsť najmä v čiernej maline (97,59 mg/100 g) a čiernych ríbezliach (87,86 mg/100 g). Zo zeleniny ho obsahuje najmä baklažán (41,24 mg/100 g). Častejšie sú však ovocné zdroje, tmavé hrozno (39,58 mg/100 g), čučoriedky (34 mg/100 g), červené ríbezle (9,32 mg/100 g), brusnice (7,66 mg/100 g) či banán (7,39 mg/100 g). Delfinidín je prítomný i v pekanových orieškoch (7,28 mg/100 g). Červené víno obsahuje nízke hodnoty tohto flavonoidu (2,75 mg/100 g) (tabuľka 14) (Bhagwat, Haytowitz, Holden, 2011).

**Tabuľka 14** Obsah delfinidínu vo vybraných potravinových zdrojoch (Bhagwat, Haytowitz, Holden, 2011)

Potravina	Obsah (mg/100 g)
čierna malina	97,59
čierne ríbezle	87,86
baklažán	41,24
tmavé hrozno	39,58
čučoriedky	34,00
červené ríbezle	9,32
čakanka	7,68
brusnice	7,66
banán	7,39
pekanové oriešky	7,28
fialová pšenica	3,20
červené víno	2,75

Pre malvidín ako i pre ostatné antokyanidíny sú významné ovocné zdroje, najmä čučoriedky (54 mg/100 g) a červené hrozno (36,2 mg/100 g). Malvidín možno nájsť i v červenom víne (15,29 mg/100 g) či fialovej pšenici (4,02 mg/100 g) (tabuľka 15) (Bhagwat, Haytowitz, Holden, 2011).

**Tabuľka 15** Obsah malvidínu vo vybraných potravinových zdrojoch (Bhagwat, Haytowitz, Holden, 2011)

Potravina	Obsah (mg/100 g)
čučoriedky	54,00
červené hrozno	36,20
červené víno	15,29
fialová pšenica	4,02
tmavé hrozno	3,47
jarabina	1,22
červená malina	0,71

Pelargonidín je prítomný v ovocí ako jahody (25,69 mg/100 g), čučoriedky (2,65 mg/100 g), červené maliny (1,64 mg/100 g). Zo zeleniny je významným zdrojom reďkovka (25,66 mg/100 g). Nachádza sa i vo farebných pšenicách (3,41 mg/100 g) (tabuľka 16) (Bhagwat, Haytowitz, Holden, 2011).

**Tabuľka 16** Obsah pelargonidínu vo vybraných potravinových zdrojoch (Bhagwat, Haytowitz, Holden, 2011)

Potravina	Obsah (mg/100 g)
jahody	25,69
reďkovka	25,66
fialová pšenica	3,41
čučoriedky	2,65
červená malina	1,64
čierne ríbezle	1,17
jarabina	0,98

### IZOFLAVONOIDY

Izoflavonoidy na rozdiel od ostatných flavonoidov majú v základnej štruktúre fenylovú skupinu v polohe 3 na benzo- $\gamma$ -pyráne. V prírode sú prítomné najmä v strukovinách. Najrozšírenejšie sú genisteín a daidzeín.

Genisteín je prítomný v sóji (22,57 mg/100 g) a z nej odvodených produktoch ako sú jedlá miso (23,24 mg/100 g), tempeh (36,15 mg/100 g) či sójové syry. Obsahuje ho i červená ďatelina (10 mg/100 g) alebo pistácie (1,75 mg/100 g) (tabuľka 17) (Bhagwat, Haytowitz, Holden, 2008).

**Tabuľka 17** Obsah genisteínu vo vybraných potravinových zdrojoch (Bhagwat, Haytowitz, Holden, 2008)

Potravina	Obsah (mg/100 g)
sójová múka	98,77
sójové semená	60,07
tempeh	36,15
miso	23,24
sója	22,57
červená ďatelina	10,00
mozzarella, sójový syr	2,60
cheddar, sójový syr	2,11
pistácie	1,75
parmezán, sójový syr	0,80

S obsahom daidzeínu je to podobne ako pre genisteín, pričom jeho koncentrácie sú v daných potravinách o niečo nižšie. Obsahuje ho sója (20,34 mg/100 g) a z nej odvodené produkty. Je prítomný i v červenej ďateline (11 mg/100 g) a pistáciách (1,88 mg/100 g) (tabuľka 18) (Bhagwat, Haytowitz, Holden, 2008).

**Tabuľka 18** Obsah daidzeínu vo vybraných potravinových zdrojoch (Bhagwat, Haytowitz, Holden, 2008)

Potravina	Obsah (mg/100 g)
sójová múka	72,92
sójové semená	61,70
tempeh	22,66
miso	16,43
sója	20,34
červená ďatelina	11,00
pistácie	1,88
cheddar, sójový syr	1,83
parmezán, sójový syr	1,80
mozzarella, sójový syr	1,14

## DENNÝ PRÍJEM

Stanoviť priemerný denný príjem flavonoidov prijatých prostredníctvom stravy je zložité, nakoľko konzumácia ich prírodných zdrojov u ľudí je veľmi individuálna, stanovená hladina flavonoidov v jednotlivých potravinách vykazuje značnú variabilitu, ťažko sa určuje vplyv technologických procesov prípravy a úpravy jedál, ktorý do vysokej miery ovplyvňuje konečný príjem flavonoidov, doteraz nie je dostatok informácií o obsahu flavonoidov v konkrétnych jedlách. Počet literárnych odkazov na danú problematiku preto nie je vysoký. Z dostupných informácií možno povedať, že priemerný denný príjem flavonoidov sa pohybuje približne v rozmedzí 150 až 300 mg/deň.

Štúdia prevedená v Anglicku a Írsku sa zaoberala príjmom 23 spomedzi všetkých tried flavonoidov u miestneho obyvateľstva. Celkový denný príjem flavonoidov bol stanovený na 182 mg resp. 177 mg (u anglických resp. írskych obyvateľov). V oboch prípadoch predstavovali antokyanidíny a flavanoly 65% z celkového príjmu (Beking, Vieira, 2011).

U japonských školákov bol zistený oveľa nižší denný príjem flavonoidov, iba 36,4 mg, pričom takmer tretinu z tohto množstva tvorili sójové izoflavonoidy, čo vzhľadom na miestne potravinové zvyklosti nie je nezvyčajné (Teruyo et al., 2002).

Hertog et al. (1993a) zisťovali príjem flavonolov a flavónov u obyvateľov Holandska. Tento bol stanovený na 23 mg/deň. Takmer polovicu z príjmu týchto flavonoidov predstavoval čaj. Avšak ostatné triedy flavonoidov do meraní neboli zaradené. Podobne i Justesen et al. (2000) stanovovali v Dánsku príjem iba u dvoch tried flavonoidov, konkrétne flavonolov a flavanónov, pričom obe triedy dokopy predstavovali denný príjem u žien 26 mg a u mužov 20 mg.

Ďalší autori (Chun, Chung, Song, 2007) stanovili denný príjem flavonoidov u dospelého obyvateľstva USA na 189,7 mg/deň. Z tohto množstva najvyššie percento predstavovali flavanoly (83,5 %), nasledovali flavanóny (7,6 %), flavonoly (6,8 %), antokyanidíny (1,6 %), flavóny (0,8 %) a izoflavonoidy (0,6 %).

U flámskych žien bol determinovaný denný príjem flavonoidov 3 rôznymi metódami na 166 mg/deň, 203 mg/deň a 158,3 mg/deň. Tri štvrtiny z toho predstavovali flavanoly (Mullie et al., 2007).

V rozsiahlej štúdii sa Zamora-Ros a kol. (2010) sústredili na stanovenie denného príjmu flavonoidov u španielskeho obyvateľstva. Výsledky preukázali, že priemerný denný príjem je 313,26 mg.

Počas 3 desaťročí sledovali Maras et al. (2011) príjem flavonoidov u obyvateľov Baltimoru v USA. Ich denný príjem bol v 80.-tych rokoch 20. storočia 250 mg, pričom o 30 rokov neskôr bol zaznamenaný jeho nárast na 280 mg/deň. Spomedzi potravín ku tomu najviac prispeli čaj, jablká, hrušky a citrusové ovocie.

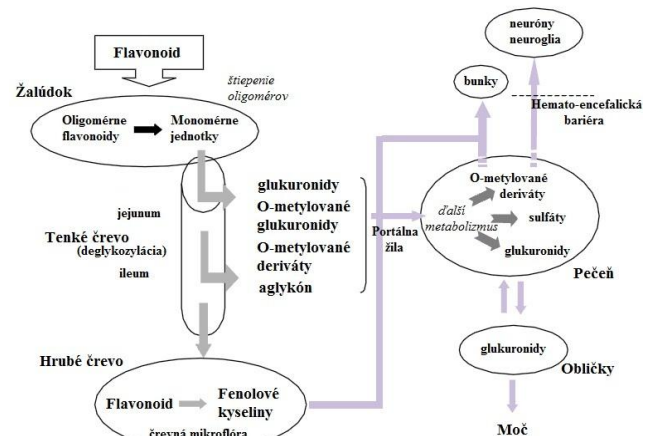
## BIODOSTUPNOSŤ A METABOLIZMUS

Aby sme mohli posudzovať zdraviu prospešné účinky flavonoidov *in vivo*, je potrebné poznať ich množstvá, ktoré sa reálne dostanú do krvného obehu ako aj ich možný následný metabolizmus.

Podľa štúdií biodostupnosti u ľudí dosahujú flavonoidy po prestupe do ľudskej krvi koncentrácie 0,1 až 10  $\mu\text{mol.l}^{-1}$  (Manach et al., 2005). Je zrejme, že biodostupnosť bude

vo veľkej miere závislá nielen od vlastností konkrétnej štruktúry, ale tiež od potravinovej matrice, veľkosti dávky či genetických dispozícií jednotlivca.

Flavonoidy sa v prírode vyskytujú najmä vo forme glykozidov. Povaha sacharidovej časti ovplyvňuje mieru ich absorpcie (Chang et al., 2005), nakoľko pred samotnou absorpciou nastáva ich deglykozylácia (obrázok č. 6). Odstránenie sacharidu sa uskutočňuje pomocou glykozidáz prítomných v tenkom čreve (Walle, 2004). Nasleduje pasívna difúzia aglykónu cez stenu čreva, nakoľko deglykozyláciou sa zvýšila hydrofobicita pôvodnej molekuly, čím sa uľahčil aj jej prestup cez lipidovú dvojvrstvu bunkovej membrány enterocytov tenkého čreva (Day et al., 1998).



Obrázok 6 Sumárny metabolizmus flavonoidov v gastrointestinálnom trakte a pečeni (Spencer, Abd-el-Mohsen, Rice-Evans, 2004)

Aglykóny nepotrebujú deglykozyláciu, preto aj prestup cez membrány býva zväčša v ich prípade jednoduchší i rýchlejší (Steensma, Noteborn, Kuiper, 2004; Tian et al., 2009). Avšak existujú aj práce, ktoré popisujú rýchlejšiu absorpciu glykozidov než aglykónov (Hollman et al., 1995; Kwon et al., 2007). Uvedené môže byť spôsobené priamym prestupom neštiepených glykozidov pomocou rôznych transportérov (Gee a kol., 2000). Najlepšiu absorpciu vykazujú izoflavóny, priemernú absorpciu flavanoly, flavanóny a glykozidy flavonolov, najťažšie prestupujú membránou antokyaníny (Viskupičová, Ondrejovič, Šturdík, 2008).

Predtým, než sa aglykóny dostanú do krvného obehu, podstupujú sériu metabolických reakcií, z nich najvýznamnejšia je glukuronidácia, sulfatácia a O-metylácia. V krvnom riečisku sa viažu na albumín, ktorý zabezpečí rýchly transport metabolitov i zvyšných nemetabolizovaných aglykónov do pečene, kde podstupujú ďalšie konjugáčnne reakcie (Walle, 2004). Experimentálne dáta preukázali, že hoci sú flavonoidy absorbované v tenkom čreve, ich relatívne vysoké množstvá prechádzajú z tenkého do hrubého čreva (Jaganath et al., 2006; Marks et al., 2009), kde črevná mikroflóra odštiepuje konjugované časti a výsledné aglykóny sú degradované na fenolové kyseliny. Tieto môžu byť taktiež absorbované a po metabolizácii v pečeni vylúčené močom (obrázok č. 6) v značných množstvách, ktoré častokrát prevyšujú množstvá metabolitov transportovaných do krvného obehu z tenkého čreva (Jaganath et al., 2006; Stalmach et al.,



2010), čo poukazuje na celkovú nízku biodostupnosť flavonoidov.

Ako vyplýva z obrázku 6, konkrétne účinné formy, ktoré sa dostávajú do buniek, predstavujú metabolity flavonoidov a nie pôvodné molekuly. Preto je potrebné venovať sa štúdiu biologickej aktivity taktiež týchto metabolitov. Doterajšie práce naznačujú, že glukuronidy, sulfáty i O-metylované deriváty flavonoidov si viac či menej zachovávajú svoje pôvodné biologické vlastnosti, pričom v niektorých prípadoch je popísané zachovanie či zvýšenie účinku metabolitu (Shirai et al., 2002; Suri et al., 2008) a v iných zasa pokles jeho aktivity po modifikácii (Loke et al., 2008; Pavlica, Gebhardt, 2010). Na potvrdenie tejto skutočnosti sú potrebné ďalšie testovania.

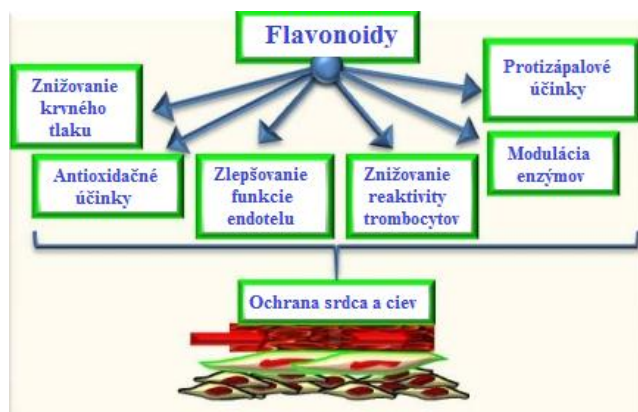
### VÝZNAM V ĽUDSKEJ STRAVE

Už štúdie zo začiatku 90. rokov ukázali, že flavonoidy vykazujú prospešné účinky na ľudské zdravie (Hertog et al., 1993b; Miksicek, 1993; Thompson, 1993; Knekt et al., 1996). Odvtedy sa počet podobných publikácií zvýšil na niekoľko tisíc.

Tieto prírodné fytochemikálie disponujú spektrom biologických účinkov, z nich významné je protizápalové, kardioprotektívne, protirakovinové, antimikrobiálne, antialergické či hepatoprotektívne pôsobenie (Havsteen, 2002; Tripoli et al., 2007; Tapas, Sakarkar, Kakde, 2008; Prasain, Carlson, Wyss, 2010).

### FLAVONOIDY A SRDCOVO-CIEVNE OCHORENIA

Na kardioprotektívnych účinkoch sa flavonoidy podieľajú viacerými svojimi vlastnosťami (obrázok č. 7). Zlepšujú funkciu endotelu, majú antioxidantné a protizápalové účinky, vazorelaxačné schopnosti znižujú krvný tlak (Grassi, Desideri, Ferri, 2010).



Obrázok 7 Potenciálne účinky flavonoidov pri ochrane srdcovo-cievneho systému (Grassi, Desideri, Ferri, 2010)

Z viacerých štúdií vyplýva, že príjem flavonoidov resp. potravín s ich vysokým obsahom je spojený so zníženým rizikom srdcovo-cievnych ochorení. Existujú však i štúdie, ktoré tieto skutočnosti nepotvrdzujú.

Podľa štúdie konanej v Holandsku u starších mužov bol príjem katechínov z čaju a ostatných zdrojov v inverznom vzťahu k úmrtnosti na ischemickú chorobu srdca, avšak podobný vzťah nebol zistený pre úmrtnosť na mŕtvicu (Arts et al., 2001a). I Hertog et al. (1993b) zistili znížené riziko úmrtnosti na srdcový infarkt pri prijímaní flavonoidov

z prírodných zdrojov (čaj, cibuľa, jablká). U žien z Iowy (USA) príjem jabĺk a vína znamenal znížené riziko úmrtnosti na kardiovaskulárne ochorenia (Arts et al., 2001b).

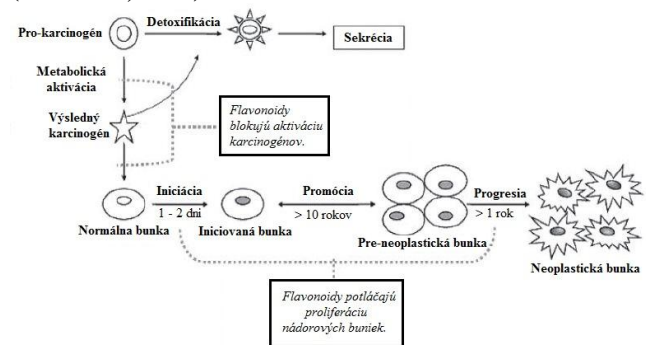
Štúdia u amerických žien preukázala, že príjem flavonolov, flavónov, flavanónov, flaván-3-olov, antokyanidínov a polymérnych flavonoidov mierne znižoval koncentrácie markerov zápalu a dysfunkcie endotelu (Landberg et al., 2011). V dvojito zaslepenej štúdií príjem cibulovej polievky inhiboval zhlukovanie krvných doštičiek, čo môže viesť k zníženému riziku trombózy a možných kardiovaskulárnych ochorení (Hubbard et al., 2006). Štúdia Knekt et al. (1996) odhalila, že u ľudí s nízkym príjmom flavonoidov je vyššie riziko ochorení srdca.

Výsledky 14-ročnej štúdie autorov Cassidy et al. (2011) naznačujú, že antokyanidíny, apigenín a katechín môžu prispievať ku menšiemu výskytu vysokého krvného tlaku u dospelých ľudí. Ochranný účinok antokyanidínov voči akútnejmu infarktu myokardu potvrdila štúdia z Talianska, zatiaľ čo pre ostatné triedy flavonoidov toto nebolo pozorované (Tavani et al., 2006). U ľudí s vysokým rizikom srdcovo-cievnych príhod znamenal zvýšený príjem izoflavónov zlepšenie funkcie cievneho endotelu (Chan et al., 2007).

Lin et al. (2007) zistili, že príjem flavónov a flavonolov neznamenal zníženie rizika infarktu myokardu. Ani v štúdií u amerických žien sa nepotvrdilo spojenie príjmu flavonoidov so znížením rizikom kardiovaskulárnych ochorení (Sesso et al., 2003). U západoeurópskych žien zvýšený príjem fytoestrogénov nepreukázal ochranný účinok voči riziku kardiovaskulárnych ochorení (van der Schouw et al., 2005).

### FLAVONOIDY A RAKOVINA

Získané dáta z laboratórnych meraní napovedajú, že flavonoidy zohrávajú významnú úlohu v prevencii rakoviny. Boli identifikované viaceré mechanizmy ich protinádorového pôsobenia: inaktivácia prokarcinogénov, inhibícia proliferácie rakovinových buniek, inhibícia angiogenézy, indukcia apoptózy, antioxidantné pôsobenie či potlačanie multilekovej rezistencie (obrázok č. 8) (Ren et al., 2003).



Obrázok 8 Flavonoidy blokujú a potláčajú proces karcinogenézy (modifikované podľa Kale, Gawande, Kotwal, 2008)

Pri rakovine konečníka konzumácia zeleného čaju mala ochranný účinok, ktorý bol pripísaný prítomnosti



katechínov v zelenom čaji (Yang et al., 2007). V ďalšej štúdií zvýšený príjem kvercetínu znižoval riziko rakoviny hrubého čreva, avšak nie konečníka (Kyle et al., 2010).

Vysoký príjem kvercetínu v potrave bol taktiež v inverznom vzťahu ku riziku výskytu žalúdočného adenokarcinómu (Ekström et al., 2011). I zelený čaj môže znižovať riziko rakoviny žalúdka (Inoue et al., 2009). Preventívnu úlohu flavónov pri rakovine pečene potvrdzujú výsledky štúdie z Grécka (Lagiou et al., 2008). Podľa zistení Bobe et al. (2008) strava bohatá na flavonoidy môže znižovať riziko rakoviny pankreasu.

Štúdia v USA odhalila, že úmrtnosť na rakovinu prsníka môže byť znížená v spojení s vysokými hladinami flavónov a izoflavónov v strave (Fink et al., 2007). I Dong a Qin (2011) potvrdzujú ochranný účinok sójových izoflavonoidov pri rakovine prsníka u obyvateľov Ázie, avšak nie u západných krajín.

Príjem flavanónov a proantokyanidínov významne znižoval incidenciu rakoviny pľúc u fajčiarov, toto však nebolo pozorované u nefajčiarov (Cutler et al., 2008). Príjem izoflavónov u ľudí v Japonsku znamenal znížené riziko výskytu rakoviny pľúc (Shimazu et al., 2010).

Výsledky štúdie Wang et al. (2009) nepodporujú preventívny účinok flavónov, flavanolov ani vybraných potravín bohatých na flavonoidy (čaj, jablko, brokolica, cibuľa, tofu) pri rakovine. Ani v štúdií vykonanej v Grécku sa neprejavil preventívny účinok žiadnej z tried flavonoidov voči rakovine prsníka (Peterson et al., 2003). Bosetti et al. (2006) zistili, že príjem potravín s vysokým obsahom flavonoidov nevykazuje preventívne účinky voči rakovine prostaty.

Hoci epidemiologické dáta sledujúce využitie flavonoidov pre liečbu rakoviny u ľudí sú stále nepostačujúce a výsledky nie sú vždy jednoznačné, boli determinované isté spojenia medzi príjmom potravín bohatých na flavonoidy a ich následným ochranným účinkom voči onkologickým ochoreniam. Takými príkladmi môžu byť sója a rakovina prsníka, zelený čaj a rakovina žalúdka či cibuľa a rakovina pľúc (Le Marchand, 2002).

## ZÁVER

Flavonoidy sú v poslednej dobe čoraz viac podrobované neustálym výskumom, nakoľko pre ľudské zdravie zohrávajú významnú úlohu nielen ako antioxidanty. Na fyziologickej úrovni možno podčiarknuť kardioprotektívne, protizápalové, antimikrobiálne, protirakovinové či hepatoprotektívne pôsobenie.

Stále nejednotné sú informácie o obsahu jednotlivých flavonoidov v ich bežných prírodných zdrojoch akými sú ovocie, zelenina, koreniny a nápoje ako čaj a víno. Najvhodnejšie je využívať dostupné databázy, u ktorých je však potrebná neustála aktualizácia. Od týchto informácií sa odvíja i priemerný denný príjem flavonoidov, ktorý sa pohybuje v rozmedzí 150 až 300 mg.

Treba mať na mysli, že výsledné účinné látky v organizme nie sú vo väčšine prípadov samotné flavonoidy, ale ich metabolity, najmä sulfáty, glukuronidy a O-metylované deriváty. Preto by sa prieskum prospešných vlastností mal orientovať práve na tieto látky. Epidemiologické štúdie naznačujú ochranný vplyv flavonoidov pri určitých ochoreniach akými sú napr. kardiovaskulárne komplikácie či rakovina. Výsledky štúdií

nie sú však vždy jednoznačné. Preto je potrebné, aby sa výskum naďalej venoval objasneniu i tejto problematiky.

Flavonoidy sa považujú za relatívne netoxické v množstvách denne prijatých prostredníctvom bežnej stravy. Zvýšený príjem vo forme nutraceutík treba dobre zvážiť, odporúčané sú denné dávky rádovo v desiatkach miligramov, avšak nie gramov.

## LITERATÚRA

- ANASTASIADI, M., PRATSINIS, H., KLETSAS, D., SKALTSOUNIS, A. L., HAROUTOUNIAN, S. A. 2010. Bioactive non-coloured polyphenols content of grapes, vines and vinification by-products: evaluation of the antioxidant activities of their extracts. In *Food Research International*, vol. 43, 2010, no. 3, p. 805-813.
- ANDERSEN, Ø. M., JORDHEIM, M. 2006. The anthocyanins. In: ANDERSEN, Ø. M., MARKHAM, K. M., Flavonoids: chemistry, biochemistry and applications, New York : CRC Press, 2006, p. 471-552, ISBN 0-8493-2021-6.
- ARDHAOU, M., FALCIMAIGNE, A., ENGASSER, J. M., MOUSSOU, P., PAULY, G., GHOUL, M. 2004. Acylation of natural flavonoids using lipase of *Candida antarctica* as biocatalyst. In *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, vol. 29, 2004, no. 1-6, p. 63-67.
- ARTS, I. C. W., HOLLMAN, P. C. H., FESKENS, E. J. M., DE MESQUITA, H. B. B., KROMHOUT, D. 2001a. Catechin intake might explain the inverse relation between tea consumption and ischemic heart disease: the Zutphen Elderly Study. In *The American Journal of Clinical Nutrition*, vol. 74, 2001a, no. 2, p. 227-232.
- ARTS, I. C. W., JACOBS, D. R. Jr., HARNACK, L. J., GROSS, M., FOLSOM, A. R. 2001b. Dietary catechins in relation to coronary heart disease death among postmenopausal women. In *Epidemiology*, vol. 12, 2001b, no. 6, p. 668-675.
- BEECHER, G. R. 2003. Overview of dietary flavonoids: nomenclature, occurrence and dietary intake. In *The Journal of Nutrition*, vol. 133, 2003, no. 10, p. 3248S-3254S.
- BEEKS, N., PERNER, H., SCHWARZ, D. GEORGE, E., KROH, L. W., ROHN, S. 2010. Distribution of quercetin-3,4'-O-glycoside, quercetin-4'-O-monoglucoside and quercetin in different parts of the onion bulb (*Allium cepa* L.) influenced by genotype. In *Food Chemistry*, vol. 122, 2010, no. 3, p. 566-571.
- BEKING, K., VIEIRA, A. 2011. An assessment of dietary flavonoid intake in the UK and Ireland. In *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, vol. 62, 2011, no. 1, p. 17-19.
- BHAGWAT, S., HAYTOWITZ, D. B., HOLDEN, J. M. 2008. USDA database for the isoflavone content of selected foods, release 2.0. September 2008, 67 p., dostupné na internete: <[http://www.ars.usda.gov/SP2UserFiles/Place/12354500/Data/isoflav/Isoflav\\_R2.pdf](http://www.ars.usda.gov/SP2UserFiles/Place/12354500/Data/isoflav/Isoflav_R2.pdf)>.
- BHAGWAT, S., HAYTOWITZ, D. B., HOLDEN, J. M. 2011. USDA database for the flavonoid content of selected foods, release 3.0. September 2011, 156 p. [online] s.a. [cit. 2011] dostupné na internete: <[http://www.ars.usda.gov/SP2UserFiles/Place/12354500/Data/Flav/Flav\\_R03.pdf](http://www.ars.usda.gov/SP2UserFiles/Place/12354500/Data/Flav/Flav_R03.pdf)>.
- BIRBARA, P. J. 2011. Methods of making and using compositions comprising flavonoids. Patent WO 2011049629.
- BIRT, D. F., HENDRICH, S., WANG, W. 2001. Dietary agents in cancer prevention: flavonoids and isoflavonoids. In *Pharmacology & Therapeutics*, vol. 90, 2001, no. 2-3, p. 157-177.
- BOBE, G., WEINSTEIN, S. J., ALBANES, D., HIRVONEN, T., ASHBY, J., TAYLOR, P. R., VIRTAMO,

- J., STOLZENBERG-SOLOMON, R. Z. 2008. Flavonoid intake and risk of pancreatic cancer in male smokers (Finland). In *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, vol. 17, 2008, no. 3, p. 553-562.
- BOSETTI, C., BRAVI, F., TALAMINI, R., PARPINEL, M., GNAGNARELLA, P., NEGRI, E., MONTELLA, M., LAGIOU, P., FRANCESCHI, S., LA VECCHIA, C. 2006. Flavonoids and prostate cancer risk: a study in Italy. In *Nutrition and Cancer*, vol. 56, 2006, no. 2, p. 123-127.
- CARBONE, K., GIANNINI, B., PICCHI, V., LO SCALZO, R., CECCHINI, F. 2011. Phenolic composition and free radical scavenging activity of different Apple varieties in relation to the cultivar, tissue type and storage. In *Food Chemistry*, vol. 127, 2011, no. 2, p. 493-500.
- CASSIDY, A., O'REILLY, É. J., KAY, C., SAMPSON, L., FRANZ, M., FORMAN, J. P., CURHAN, G., RIMM, E. B. 2011. Habitual intake of flavonoid subclasses and incident hypertension in adults. In *The American Journal of Clinical Nutrition*, vol. 93, 2011, no. 2, p. 338-347.
- CHAN, Y. H., LAU, K. K., YIU, K. H., LI, S. W., CHAN, H.-T., TAM, S., SHU, X.-O., LAU, C.-P., TSE, H.-F. 2007. Isoflavone intake in persons at high risk of cardiovascular events: implications for vascular endothelial function and the carotid atherosclerotic burden. In *The American Journal of Clinical Nutrition*, vol. 86, 2007, no. 4, p. 938-945.
- CHANG, Q., ZUO, Z., CHOW, M. S., HO, W. K. 2005. Difference in absorption of the two structurally similar flavonoid glycosides, hyperoside and isoquercitrin, in rats. In *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, vol. 59, 2005, no. 3, p. 549-555.
- CHUN, O. K., CHUNG, S. J., SONG, W. O. 2007. Estimated dietary flavonoid intake and major food sources of U.S. adults. In *The Journal of Nutrition*, vol. 137, 2007, no. 5, p. 1244-1252.
- COOK, N. C., SAMMAN, S. 1996. Flavonoids – chemistry, metabolism, cardioprotective effects and dietary sources. In *Nutritional Biochemistry*, vol. 7, 1996, no. 2, p. 66-76.
- CUTLER, G. J., NETTLETON, J. A., ROSS, J. A., HARNACK, L. J., JACOBS Jr., D. R., SCRAFFORD, C. G., BARRAJ, L. M., MINK, P. J., ROBIEN, K. 2008. Dietary flavonoid intake and risk of cancer in postmenopausal women: The Iowa women's health study. In *International Journal of Cancer*, vol. 123, 2008, no. 3, p. 664-671.
- DAVIES, K. M., SCHWINN, K. E. 2006. Molecular biology and biotechnology of flavonoid biosynthesis. In: ANDERSEN, Ø. M., MARKHAM, K. M. Flavonoids: chemistry, biochemistry and applications, New York : CRC Press, 2006, p. 471-552, ISBN 0-8493-2021-6.
- DAY, A. J., DUPONT, M. S., RIDLEY, S., RHODES, M., RHODES, M. J., MORGAN, M. R. WILLIAMSON, G., 1998. Deglycosylation of flavonoid and isoflavonoid glycosides by human small intestine and liver  $\beta$ -glucosidase activity. In *FEBS Letters*, 436, 1998, no. 98, p. 71-75.
- DE GROOT, H., RAUEN, U. 1998. Tissue injury by reactive oxygen species and the protective effects of flavonoids. In *Fundamental and Clinical Pharmacology*, vol. 12, 1998, no. 3, p. 249-255.
- DONG, J. Y., QIN, L. Q. 2011. Soy isoflavones consumption and risk of breast cancer incidence or recurrence: a meta-analysis of prospective studies. In *Breast Cancer Research and Treatment*, vol. 125, 2011, no. 2, p. 315-323.
- EKSTRÖM, A. M., SERAFINI, M., NYRÉN, O., WOLK, A., BOSETTI, C., BELLOCCO, R. 2011. Dietary quercetin intake and risk of gastric cancer: results from a population-based study in Sweden. In *Annals of Oncology*, vol. 22, 2011, no. 2, p. 438-443.
- FINK, B. N., STECK, S. E., WOLFF, M. S., BRITTON, J. A., KABAT, G. C., GAUDET, M. M., ABRAHAMSON, P. E., BELL, P., SCHROEDER, J. C., TEITELBAUM, S. L., NEUGUT, A. I., GAMMON, M. D. 2007. Dietary flavonoid intake and breast cancer survival among women on Long Island. In *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, vol. 16, 2007, no. 11, p. 2285-2292.
- GEE, J. M., DUPONT, S. M., DAY, A. J., PLUMB, G. W., WILLIAMSON, G., JOHNSON, I. T. 2000. Intestinal transport of quercetin glycosides in rats involves both deglycosylation and interaction with the hexose transport pathway. In *Journal of Nutrition*, vol. 130, 2000, p. 2765-2771.
- GONZALEZ, C. A., RIBOLI, E. 2010. Diet and cancer prevention: Contributions from the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) study. In *European Journal of Cancer*, vol. 46, 2010, no. 14, p. 2555-2562.
- GONZÁLEZ-GALLEGO, J., SÁNCHEZ-CAMPOS, S., TUÑÓN, M. J. 2007. Anti-inflammatory properties of dietary flavonoids. In *Nutrición Hospitalaria*, vol. 22, 2007, no. 3, p. 287-293.
- GRASSI, D., DESIDERI, G., FERRI, C. 2010. Flavonoids: Antioxidants against atherosclerosis. In *Nutrients*, vol. 2, 2010, no. 8, p. 889-902.
- HAVSTEEN, B. H. 2002. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. In *Pharmacology & Therapeutics*, vol. 96, 2002, no. 2-3, p. 67-202.
- HEIM, K. E., TAGLIAFERRO, A. R., BOBILYA, D. J. 2002. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationship. In *Journal of Nutritional Biochemistry*, vol. 13, 2002, no. 10, p. 572-584.
- HERRMANN, K. 1976. Flavonols and flavones in food plants: a review. In *International Journal of Food Science and Technology*, vol. 11, 1976, no. 5, p. 433-448.
- HERTOG, M. G., HOLLMAN, P. C. H., KATAN, M. B., KROMHOUT, D. 1993a. Intake of potentially anticarcinogenic flavonoids and their determinants in adults in the Netherlands. In *Nutrition and Cancer*, vol. 20, 1993a, no. 1, p. 21-29.
- HERTOG, M. G., FESKENS, E. J., HOLLMAN, P. C., KATAN, M. B., KROMHOUT, D. 1993b. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen elderly study. In *The Lancet*, vol. 342, 1993b, no. 8878, p. 1007-1011.
- HOLLMAN, P. C., DE VRIES, J. H., VAN LEEUWEN, S. D., MENGELERS, M. J., KATAN, M. B. 1995. Absorption of dietary quercetin glycosides and quercetin in healthy ileostomy volunteers. In *The American Journal of Clinical Nutrition*, vol. 62, 1995, no. 6, p. 1276-1282.
- HUBBARD, G. P., WOLFFRAM, S., DE VOS, R., BOYY, A., GIBBINS, J. M., LOVEGROVE, J. A. 2006. Ingestion of onion soup high in quercetin inhibits platelet aggregation and essential components of the collagen-stimulated platelet activation pathway in man: a pilot study. In *British Journal of Nutrition*, vol. 96, 2006, no. 3, p. 482-488.
- INOUE, M., SASAZUKI, S., WAKAI, K., SUZUKI, T., MATSUO, K., SHIMAZU, T., TSUIJ, I., TANAKA, K., MIZOUE, T., NAGATA, C., TAMAKOSHI, A., SAWADA, N., TSUGANE, S. 2009. Green tea consumption and gastric cancer in Japanese: a pooled analysis of six cohort studies. In *Gut*, vol. 10, 2009, p. 1323-1332.
- JAGANATH, I. B., MULLEN, W., EDWARDS, C. A., CROZIER, A. 2006. The relative contribution of the small

and large intestine to the absorption and metabolism of rutin in man. In *Free Radical Research*, vol. 40, 2006, no. 10, p. 1035-1046.

JUSTESEN, B. U., KNUTHSEN, P., ANDERSEN, N. L., LETH, T. 2000. Estimation of daily intake distribution of flavonols and flavanones in Denmark. In *Scandinavian Journal of Nutrition*, vol. 44, 2000, p.158-160.

KALE, A., GAWANDE, S., KOTWAL, S. 2008. Cancer phytotherapeutics: Role for flavonoids at the cellular level. In *Phytotherapy Research*, vol. 22, 2008, no. 5, p. 567-577.

KNEKT, P., JARVINEN, R., REUNANEN, A., MAATELA, J. 1996. Flavonoid intake and coronary mortality in Finland: A cohort study. In *British Medical Journal*, vol. 312, 1996, no. 7029, p. 478-481.

KWON, S. H., KANG, M. J., HUH, J. S., HA, K. W., LEE, J. R., LEE, S. K., LEE, B. S., HAN, I. H., LEE, M. S., LEE, M. W., LEE, J., CHOI, Y. W. 2007. Comparison of oral bioavailability of genistein and genistin in rats. In *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 337, 2007, no. 1-2, p. 148-154.

KYLE, J. A., SHARP, L., LITTLE, J., DUTHIE, G. G., MCNEILL, G. 2010. Dietary flavonoid intake and colorectal cancer: a case-control study. In *The British Journal of Nutrition*, vol. 103, 2010, no. 3, p. 429-436.

LAGIOU, P., ROSSI, M., LAGIOU, A., TZONOU, A., LA VECCHIA, C., TRICHOPOULOS, D. 2008. Flavonoid intake and liver cancer: a case-control study in Greece. In *Cancer Causes Control*, vol. 19, 2008, no. 8, p. 813-818.

LANDBERG, R., SUN, Q., RIMM, E. B., CASSIDY, A., SCALBERT, A., MANTZOROS, C. S., HU, F. B., VAN DAM, R. M. 2011. Selected dietary flavonoids are associated with markers of inflammation and endothelial dysfunction in U.S. women. In *The Journal of Nutrition*, vol. 141, 2011, no. 4, p. 618-625.

LE MARCHAND, L. 2002. Cancer preventive effects of flavonoids – A review. In *Biomedicine & Pharmacotherapy*, vol. 56, 2002, no. 6, p. 296-301.

LIN, J., REXRODE, K. M., HU, F., ALBERT, C. M., CHAE, C. U., RIMM, E. B., STAMPFER, M. J., MANSON, J. E. 2007. Dietary intakes of flavonols and flavones and coronary heart disease in US women. In *American Journal of Epidemiology*, vol. 165, 2007, no. 11, p. 1305-1313.

LIU, R. H. 2004. Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: mechanism of action. In *The Journal of Nutrition*, vol. 134, 2004, no. 12, p. 3479S-3485S.

LOKE, W. M., PROUDFOOT, J. M., STEWART, S., MCKINLEY, A. J., NEEDS, P. W., KROON, P. A., HODGSON, J. M., CROFT, K. D. 2008. Metabolic transformation has a profound effect on anti-inflammatory activity of flavonoids such as quercetin: Lack of association between antioxidant and lipoxigenase inhibitory activity. In *Biochemical Pharmacology*, vol. 75, 2008, no. 5, p. 1045-1053.

MANACH, C., SCALBERT, A., MORAND, C., RÉMÉSY, C., JIMÉNEZ, L. 2004. Polyphenols: food sources and bioavailability. In *The American Journal of Clinical Nutrition*, vol. 79, 2004, no. 5, p. 727-747.

MANACH, C., WILLIAMSON, G., MORAND, C., SCALBERT, A., RÉMÉSY, C. 2005. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. In *American Journal of Clinical Nutrition*, vol. 81, 2005, no. 1, p. 230S-242S.

MARAS, J. E., TALEGAWKAR, S. A., QIAO, N., LYLE, B., FERRUCCI, L., TUCKER, K. L. 2011. Flavonoid intakes in the Baltimore Longitudinal Study of Aging. In *Journal of Food Composition and Analysis*, 2011, in press.

MARKS, S. C., MULLEN, W., BORGES, G., CROZIER, A. 2009. Absorption, metabolism and excretion of cider dihydrochalcones in healthy humans and subjects with an ileostomy. In *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 57, 2009, no. 5, p. 2009-2015.

MIKSICEK, R. J. 1993. Commonly occurring plant flavonoids have estrogenic activity. In *Molecular Pharmacology*, vol. 44, 1993, no. 1, p. 37-43.

U.S. DEPARTMENT OF AGRICULTURE, 2007. USDA database for the flavonoid content of selected foods, release 2.1. Január 2007, 128 p., [online] s.a. [cit. 2011] dostupné na internete: <<http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/Data/Flav/Flav02-1.pdf>>.

MULLIE, P., CLARYS, P., DERIEMAERKER, P., HEBBELINCK, M. 2007. Estimation of daily human intake of food flavonoids. In *Plant Foods for Human Nutrition*, vol. 62, 2007, no. 3, p. 93-98.

PAVLICA, S., GEBHARDT, R. 2010. Protective effects of flavonoids and two metabolites against oxidative stress in neuronal PC12 cells. In *Life Sciences*, vol. 86, 2010, no. 3-4, p. 79-86.

PETERSON, J., LAGIOU, P., SAMOLI, E., LAGIOU, A., KATSOUYANNI, K., LA VECCHIA, C., DWYER, J., TRICHOPOULOS, D. 2003. Flavonoid intake and breast cancer risk: a case-control study in Greece. In *The British Journal of Cancer*, vol. 89, 2003, no. 7, p. 1255-1259.

PRASAIN, J. K., CARLSON, S. H., WYSS, J. M. 2010. Flavonoids and age-related disease: Risk, benefits and critical windows. In *Maturitas*, vol. 66, 2010, no. 2, p. 163-171.

REN, W., QIAO, Z., WANG, H., ZHU, L., ZHANG, L. 2003. Flavonoids: promising anticancer agents. In *Medicinal Research Reviews*, vol. 23, 2003, no. 4, p. 519-534.

RUSZYŃAK, S., SZENT-GYÖRGYI, A., 1936. Vitamin nature of flavones. In *Nature*, vol. 138, 1936, p. 798.

SCHILJEN, E. G. W. M., RIC DE VOS, CH., VAN TUNEN, A. J., BOVY, A. G. 2004. Modification of flavonoid biosynthesis in crop plants. In *Phytochemistry*, vol. 65, 2004, no. 19, p. 2631-2648.

SESSO, H. D., GAZIANO, J. M., LIU, S., BURING, J. E. 2003. Flavonoid intake and the risk of cardiovascular disease in women. In *American Journal of Clinical Nutrition*, vol. 77, 2003, no. 6, p. 1400-1408.

SHIMAZU, T., INOUE, M., SASAZUKI, S., IWASAKI, M., SAWADA, N., YAMAJI, T., TSUGANE, S. 2010. Isoflavone intake and risk of lung cancer: a prospective cohort study in Japan. In *The American Journal of Clinical Nutrition*, vol. 91, 2010, no. 3, p. 722-728.

SHIRAI, M., YAMANISHI, R., MOON, J. H., MUROTA, K., TERAO, J. 2002. Effect of quercetin and its conjugated metabolite on the hydrogen peroxide-induced intracellular production of reactive oxygen species in mouse fibroblasts. In *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, vol. 66, 2002, no. 5, p. 1015-1021.

SHUKLA, S. K., GUPTA, S., OJHA, S. K., SHARMA, S. B. 2010. Cardiovascular friendly natural products: a promising approach in the management of CVD. In *Natural Product Research*, vol. 24, 2010, no. 9, p. 873-898.

SILALAHI, J. 2002. Anticancer and health protective properties of citrus fruit components. In *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, vol. 11, 2002, no. 1, p. 79-84.

SPENCER, J. P., ABD-EL-MOHSEN, M. M., RICE-EVANS, C. 2004. Cellular uptake and metabolism of flavonoids and their metabolites: implications for their bioactivity. In *Archives of Biochemistry and Biophysics*, vol. 423, 2004, no. 1, p. 148-161.

- STALMACH, A., MULLEN, W., STEILING, H., WILLIAMSON, G., LEAN, M. E., CROZIER, A. 2010. Absorption, metabolism and excretion of green tea flavan-3-ols in humans with an ileostomy. In *Molecular Nutrition & Food Research*, vol. 54, 2010, no. 3, p. 323-334.
- STEENSMA, U., NOTEBORN, H. P. J. M., KUIPER, H. A. 2004. Comparison of Caco-2, IEC-18 and HCEC cell lines as a model for intestinal absorption of genistein, daidzein and their glycosides. In *Environmental Toxicology and Pharmacology*, vol. 17, 2004, no. 2, p. 103-110.
- SURI, S., TAYLOR, M. A., VERITY, A., TRIBOLO, S., NEEDS, P. W., KROON, P. A., HUGHES, D. A., WILSON, V. G. 2008. A comparative study of the effects of quercetin and its glucuronide and sulfate metabolites on human neutrophil function *in vitro*. In *Biochemical Pharmacology*, vol. 76, 2008, no. 5, p. 645-653.
- TAPAS, A. R., SAKARKAR, D. M., KAKDE, R. B. 2008. Flavonoids as nutraceuticals: a review. In *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, vol. 7, 2008, no. 3, p. 1089-1099.
- TAVANI, A., SPERTINI, L., BOSETTI, C., PARPINEL, M., GNAGNARELLA, P., BRAVI, F., PETERSON, J., DWYER, J., LAGIOLU, P., NEGRI, E., LA VECCHIA, C. 2006. Intake of specific flavonoids and risk of acute myocardial infarction in Italy. In *Public Health Nutrition*, vol. 9, 2006, no. 3, p. 369-374.
- TERUYO, M., AIKO, U., NORIKO, K., MASATAKA, I. 2002. Daily intake of flavonoids by school children. In *Journal of Japanese Society of Nutrition and Food Science*, vol. 55, 2002, no. 5, p. 269-273.
- TIAN, X. J., YANG, X. W., YANG, X., WANG, K. 2009. Studies of intestinal permeability of 36 flavonoids using Caco-2 cell monolayer model. In *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 367, 2009, no. 1-2, p. 58-64.
- THOMPSON, L. U. 1993. Potential health benefits and problems associated with antinutrients in foods. In *Food Research International*, vol. 26, 1993, no. 2, p. 131-149.
- TRIPOLI, E., LA GUARDIA, M., GIAMMANCO, S., DI MAJO, D., GIAMMANCO, M. 2007. Citrus flavonoids: Molecular structure, biological activity and nutritional properties: A review. In *Food Chemistry*, vol. 104, 2007, no. 2, p. 466-479.
- VAN DER SCHOUW, Y. T., KREJKAMP-KASPERS, S., PEETERS, P. H. M., KEINAN-BOKER, L., RIMM, E. B., GROBBEE, D. E. 2005. Prospective study on usual dietary phytoestrogen intake and cardiovascular disease risk in western women. In *Circulation*, vol. 111, 2005, no. 4, p. 465-471.
- VISKUPIČOVÁ, J., ONDREJOVIČ, M., ŠTURDÍK, E. 2008. Bioavailability and metabolism of flavonoids. In *Journal of Food and Nutrition Research*, vol. 47, 2008, no. 4, p. 151-162.
- VORSA, N., VVEDENSKAYA, I. O., HUANG, M. T., ROSEN, L. R. S. L. 2007. Anti-inflammatory cranberry flavonol extract preparations. United States Patent 7270837.
- WALLE, T. 2004. Absorption and metabolism of flavonoids. In *Free Radical Biology & Medicine*, vol. 36, 2004, no. 7, p. 829-837.
- WANG, L., LEE, I. M., ZHANG, S. M., BLUMBERG, J. B., BURING, J. E., SESSO, H. D. 2009. Dietary intake of selected flavonols, flavones, and flavonoid-rich foods and risk of cancer in middle-aged and older women. In *The American Journal of Clinical Nutrition*, vol. 89, 2009, no. 3, p. 905-912.
- WICZKOWSKI, W., NEMETH, K., BUCIŃSKI, A., PISKUŁA, M. K. 2003. Bioavailability of quercetin from flesh scales and dry skin of onion in rats. In *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, vol. 12/53, 2003, no. SI 1, p. 95-99.
- WICZKOWSKI, W., PISKUŁA, M. K. 2004. Food Flavonoids. In *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, vol. 13/54, 2004, no. SI 1, p. 101-114.
- YANG, G., SHU, X. O., LI, H., CHOW, W. H., JI, B. T., ZHANG, X., GAO, Y. T., ZHENG, W. 2007. Prospective cohort study of green tea consumption and colorectal cancer risk in woman. In *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, vol. 16, 2007, no. 6, p. 1219-1223.
- YAO, L. H., JIANG, Y. M., SHI, J., TOMÁS-BARBERÁN, F. A., DATTA, N., SINGANUSONG, R., CHEN, S. S. 2004. Flavonoids in foods and their health benefits. In *Plant Foods for Human Nutrition*, vol. 59, 2004, no. 3, p. 113-122.
- YAO, H., XU, W., SHI, X., ZHANG, Z. 2011. Dietary flavonoids as cancer prevention agents. In *Journal of Environmental Science and Health. Part C, Environmental Carcinogenesis & Ecotoxicology Reviews*, vol. 29, 2011, no. 1, p. 1-31.
- ZAMORA-ROS, R., ANDRES-LACUEVA, C., LAMUELA-RAVENTÓS, R. M., BERENGUER, T., JAKSZYN, P., BARRICARTE, A., ARDANAZ, E., AMIANO, P., DORRONSORO, M., LARRAÑAGA, N., MARTÍNEZ, C., SÁNCHEZ, M. J., NAVARRO, C., CHIRLAQUE, M. D., TORMO, M. J., QUIRÓS, R., GONZÁLEZ, C. A. 2010. Estimation of dietary sources and flavonoid intake in a Spanish adult population (EPIC-Spain). In *Journal of The American Dietetic Association*, vol. 110, 2010, no. 3, p. 390-398.
- ZHAO, D., QI, Y., ZHENG, Z., WANG, Y., ZHANG, X. Y., LI, H. J., LIU, H. H., ZHANG, X. T., DU, J., LIU, J., 2011. Dietary factors associated with hypertension. In *Nature Reviews. Cardiology*, vol. 8, 2011, no. 8, p. 456-465.

**Acknowledgments:**

This article was part of the project funded by the Agency of the Ministry of Education, Science, Research and Sport of The Slovak Republic for EU Structural Funds entitled "Evaluation of natural substances and their choice for the prevention and treatment of lifestyle diseases" (ITMS 26240220040).

**Contact address:**

Mgr. Martina Danihelová, Institute of Biochemistry, Nutrition and Health Protection, Department of nutrition and food assessment, Faculty of Chemical and Food Technology, Slovak University of Technology in Bratislava, Radlinského 9, 812 37 Bratislava, Slovakia, 02/59325400, E-mail: martina.danihelova@stuba.sk.

doc. Ing. Ernest Šturdík, CSc., Institute of Biochemistry, Nutrition and Health Protection, Department of nutrition and food assessment, Faculty of Chemical and Food Technology, Slovak University of Technology in Bratislava, Radlinského 9, 812 37 Bratislava, Slovakia, 02/59325524, E-mail: ernest.sturdik@stuba.sk.

doi: 10.5219/161

**CHARACTERIZATION OF GLIADIN AND HMW GLUTENIN PROTEIN COMPOSITION IN COLOURED WHEAT (*TRITICUM AESTIVUM* L.) VARIETIES***Edita Gregová, Svetlana Šliková, Valéria Šudyová, Zuzana Šramková, Pavol Hauptvogel***ABSTRACT**

Wheat is one of the most important grains in our daily diet. Coloured wheat contains natural anthocyanin compounds. Bioactive compounds in wheat have attracted increasingly more interest from breeders because of their benefits. It is important to fully understand protein properties of red, blue, purple, and yellow-coloured wheat in order to predict their potential uses for culturing new varieties. All 21 accessions originating from different geographical areas of world were evaluated for high molecular weight glutenin subunit (HMW-GS) and T1BL.1RS wheat-rye translocation using SDS-PAGE and A-PAGE. The data indicated the prevalence of the allele 1 (36%), allele 0 (30%) and allele 2\* (34%) at the Glu-1A and five alleles, namely 7+8 (36%), 7+9 (29%), 20 (21%), 7 (12%) and 17+18 (2%) represented the Glu-1B. Existence of 2 alleles at the locus Glu-1D was revealed, in fact 21% of them showed the subunit pairs Glu-1D 5+10 correlated with good bread making properties. Protein subunit Glu-1A1 and Glu-1A2\* were correlated positively with improved dough strength as compared to subunit null. On the chromosome Glu-1B subunit 17+18 and 7+8 were associated with slightly stronger gluten type than 7+9, whereas subunit 20 and 7 were associated with weak gluten properties. On the basis of electrophoretic separation of gliadin fraction it was found that only one genotype contained T1BL.1RS wheat-rye translocation. The Glu-1 quality score ranged from 4 to 10. Suitable accessions can be used for the crossing programs to improve colour and good technological quality of bread wheat.

**Keywords:** coloured wheat grain, glutenin, gliadin

---

**INTRODUCTION**

Wheat kernels, also called wheat grains, have three main parts: the endosperm, the germ, and the brain. While whole wheat flour contains all three parts of the kernel, usually white flour is milled from the endosperm. Coloured grain wheat is also recognized as a significant source of antioxidants which promote health and reduce the risk of disease. Wheat naturally contains numerous classes of antioxidant compounds such as flavonoids, carotenoids, alkaloids, and others (Qin et al. 2010; Gilchrist & Sorrells 1982). Basic wheat pigments include xanthophylls, carotenoids, anthocyanins, and anthocyanins and are known for exhibiting good antioxidant activity (Humphries et al. 2004; Knieval et al. 2009). Wheat grain colour was controlled by genes, but also by the environment conditions such as light, temperature and fertilization, etc. For blue wheat grain the colour is due to the blue aleurone layer (Knott 1958). The colouration of a purple wheat grain is located in the pericarp and testa. In New Zealand the purple wheat Konini as released in 1981 used as specialty bred making wheat for the whole meal wheat loaf market. Purple grain colour controlled by two complementary dominant genes on chromosomes 3A and 7B (Piech & Evans, 1979). These unique phenomena may be due to the influences of environmental factors as well as genetic factors. Wheat gluten proteins are classified into two groups on the basis of their aggregation and functional properties. These are the gliadins which are present as monomers which interact by mono-covalent forces and the glutenins which form polymers stabilized by interchain disulphide bonds.

**MATERIAL AND METHODOLOGY**

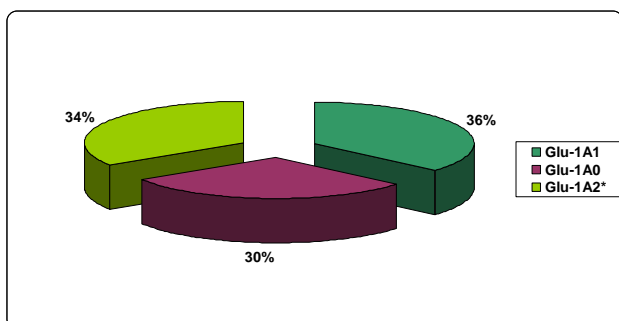
In this study we analyzed seed storage proteins extracted from hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.) grain. All samples were obtained from the collection of genetic wheat sources of Gene Bank of the Slovak Republic in Piešťany and from Agrotest Kroměříž of the Czech Republic. Seed storage proteins were isolated from the endosperm of intact, dry and mature single seeds. Seed homogenization was carried out by grinding. Glutenins were extracted by standard referee method ISTA (Wrigley 1992). Gliadins were obtained using standard referee method ISTA in the presence of acid solution (Draper 1987). The glutenin separation was performed by discontinuous PAGE based on ISTA methodology (Wrigley 1992) and using the electroseparatic unit Protean II (Biorad). The electrophoretic separation of gliadins was followed by referee method ISTA (Draper 1987) using mixture of glycine and acetic acid as electrolyte at pH 3.2. They were separated in continuous polyacrylamide gels at acid environment (Qi et al. 2006). Protein fractions were stained by Coomassie Brilliant Blue R-250. The separate gluten subunits were identified by the nomenclature of Payne and Lawrence (1983). According to the specific protein profile of the HMW alleles in each cultivar its quality score (Glu-score) was calculated by Payne et al. (1987).

**RESULTS AND DISCUSSION**

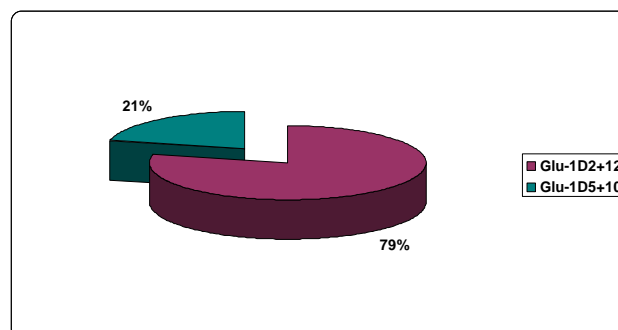
Twenty-one hexaploid wheat accessions originating from different geographical areas of the world were evaluated for high molecular weight glutenin subunit (HMW-GS) and gliadins composition using SDS-PAGE and A-PAGE.

**Table 1** HMW-GS composition and quality score of coloured wheat cultivars

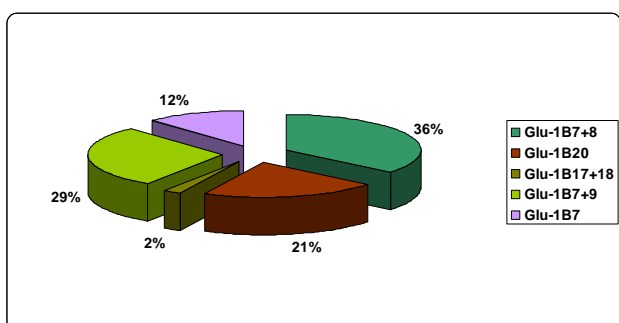
Genotype	Color of grain	Origin	Glu-1A	Glu-1B	Glu-1D	Glu score	Rye score
48M	blue	USA	0	7	2+12	4	4
Tschermarks Blaukorniger	blue	AUT	1	7+8	2+12	8	8
UC66094 A	blue	CHL	1	7+8	5+10	10	10
UC66094 B	blue	CHL	1	7+8	2+12	8	8
Abyssinskaja arraseita A	purple	RUS	0	7	2+12	4	4
Abyssinskaja arraseita B	purple	RUS	0	7+8	2+12	6	6
ANK 28	purple	RUS	1	7+8	2+12	8	8
Konini A	purple	NZL	1	7	2+12	6	6
Konini B	purple	NZL	0	7	2+12	4	4
Laval 19	purple	CAN	1	7+9	5+10	9	9
AC Andrew	yellow	CAN	2*	20	2+12	6	6
BonaDea	yellow	SVK	0	7+9	5+10	7	7
Broom	yellow	DEU	0	7+9	5+10	7	7
Cranbrock	yellow	AUS	0	7+8	2+12	6	6
Dundee A	yellow	AUS	2*	20	2+12	6	6
Dundee B	yellow	AUS	1	17+18	2+12	8	8
Fiorina	yellow	CHE	2*	20	2+12	6	6
Glugas	yellow	AUS	1	20	2+12	6	6
Kiata	yellow	AUS	2*	7+8	2+12	8	8
Kolibri	yellow	DEU	1	7+9	5+10	9	9
Passo Fundo	yellow	BRA	2*	7+8	2+12	8	8
Pomerelle	yellow	USA	2*	7+9	2+12	7	7
Saffrasi A	yellow	SWE	2*	7+9	2+12	7	5
Saffrasi B	yellow	SWE	2*	7+9	2+12	7	7
Whitebird	yellow	USA	0	7+8	2+12	6	6
Zenith	yellow	AUS	1	20	2+12	6	6



**Fig. 1** Allelic frequency at *Glu-1A* locus



**Fig. 3** Allelic frequency at *Glu-1D* locus



**Fig. 2** Allelic frequency at *Glu-1B* locus

Sixteen that is 76% of examined accessions showed homogeneous patterns, whereas remaining 5, that is 24% were heterogeneous, containing two different glutenin phenotypes. Considering the composition of HMW-GS

there were found 12 different electrophoretic protein profiles among 21 tested cultivars (Table 1). The data indicated the prevalence of the allele 1 (36%), allele 0 (30%) and allele 2\* (34%) at the *Glu-1A* (Figure 1) and five alleles, namely 7+8 (36%), 7+9 (29%), 20 (21%), 7 (12%) and 17+18 (2%) represented at the *Glu-1B* (Figure 2). Ram (2003) showed that protein subunit 2\* and subunit 1 were found correlated positively with improved dough strength as compared to subunit null. Combination 17+18 was relatively rare being found in genotype Dundee B only. The existence of 2 alleles at the locus *Glu-1D* was revealed, in fact 21% of them showed the subunit pairs Glu-1D 5+10 correlated with good bread making properties (Figure 3). Genotypes containing wheat-rye translocation (Graybosch et al. 1999, Wieser et al. 2000) were corrected in this score: 3 points less to scores 8-10, 2 points to scores 5-7 and one point to scores 3-4.



## CONCLUSION

Good baking quality is strongly correlated with the presence of 1 and 5+10 or 2\* and 5+10 HMW-GS and poor baking quality (Bradová et al. 2005, Gálová et al. 1998) usually associated with 2+12 HMW-GS, some of coloured wheat can be classified as a bread wheat (Chňápek et al. 2010). The cultivar with blue grain colour UC66094 A reached the maximum *Glu-score* and *Rye-score* 10. The cultivar with yellow grain colour Kolibri possessed alleles and allelic pairs 1, 7+9, 5+10 evaluated *Rye-score* and *Glu-score* 9. The cultivar with purple grain colour Laval 19 reached *Glu-score* 9 with the same alleles and allelic pairs as the cultivar Kolibri. Each of grain colours (blue, purple, or yellow) is under simple genetic control (Dobrovolskaja et al. 2006, Trojan et al. 2010) and coloured wheat can be used for the crossing programs to improve colour and good technological quality of bread wheat.

## REFERENCES

BRADOVÁ, J., ŠAŠEK, A. 2005. Diversity of gliadins and HMW glutenin subunits in Czech registered wheat varieties. *Czech Journal of Genetic and Plant Breeding.*, vol.41 (Special Issue), 2005, p. 160-163.

DOBROVOLSKAYA, O., ARBUZOVA, V. S., LOHWASSER, U., Roder, M. S., BORNER, A. 2006. Microsatellite mapping of complementary genes for purple grain color in bread wheat (*Triticum aestivum* L.) In *Euphytica*, vol. 150, 2006, p. 355-364.

DRAPER, S. R. 1987. ISTA variety committee. Report of the working group for biochemical tests for cultivar identification 1983-1986. In *Seed Science and Technology*, vol. 15, 1987, p. 431-434.

GÁLOVÁ, Z., SMOLKOVÁ, H., MICHALÍK, I., GREGOVÁ, E. 1998. Predikcia pekárskej kvality zrna pšenice podľa elektroforetického spektra HMW glutenínových podjednotiek. In *Rostlinná výroba*, vol. 44, 1998, p. 111-116.

GILCHRIST, J. A., SORRELLS, M. E. 1982. Inheritance of kernel color in charcoal wheat. In *Journal of Heredity*, vol. 73, 1982, p. 457-460.

GRAYBOSCH, R. A., LEE, J. H., PETERSON, C. J., PORTER, D. R., CHUNG, O. K. 1999. Genetic, agronomic and quality comparisons of two 1AL. 1RS wheat-rye chromosomal translocations. In *Plant Breeding*, vol. 118, 1999, p. 125-130.

CHŇÁPEK, M., GÁLOVÁ, Z., TOMKA, M., RÜCKSCHLOSS, L. 2010. Nutritive and technological quality of colored bread wheat genotypes (*Triticum aestivum* L.). In *Potravinárstvo*, vol. 4, 2010, no. 1, p. 20-25.

HUMPHRIES, J. M., GRAHAM, R. D., MARES, D. J. 2004. Application of reflectance colour measurement to the estimation of carotene and lutein content in wheat and triticale. In *Journal of Cereal Science*, vol. 40, 2004, p. 151-159.

KNIEVEL, D. C., ABDEL-AAL, E. S. M., RABALSKI, I., NAKAMURA, T., HUCL, P. 2009. Grain color development and the inheritance of high anthocyanin blue aleurone and purple pericarp in spring wheat (*Triticum aestivum* L.). In *Journal of Cereal Science*, vol.50, 2009, p. 113-120.

KNOTT, D. R. 1958. The inheritance in wheat of a blue endosperm color derived from *Agropyron elongatum*. In *Canadian Journal of Botany*, vol. 36, 1958, p. 571-574.

PAYNE, P. I., LAWRENCE G. J. 1983. Catalogue of alleles for the complex loci, Glu-A1, Glu-B1 and Glu-D1 which code for high-molecular-weight subunits of glutenin in hexaploid wheat. In *Cereal Research Communications*, vol. 11, 1983, 29-35.

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

TROJAN, V., BARTL, P., MUSILOVÁ, M., VYHNÁNEK, T., MARTINEK, P., TREMLOVÁ, B. 2010. Barené pšenice - genetika, šlechtění a potravinářské využití. In *Hygiene Alimenterium XXXI.*, 1. vyd. Košice, Slovensko: Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, 5. - 7. 5. 2010, 335-337.

QI, P. F., WEI, Y. M., YUE, Y. W., YAN, Z. H., ZHENG, Y. L. 2006. Biochemical and molecular characterization of gliadins. In *Molecular Biology*, vol. 40, 2006, no. 5, p. 796-807.

QIN, L., ZANG, Q., TRUST B. 2010. Comparison of Antioxidant Activities of Different Colored Wheat Grains and Analysis of Phenolic Compounds. In *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, vol. 58, 2010, no. 16, 9235-9241.

RAM, S. 2003. High molecular weight glutenin subunit composition of Indian wheats and their relationships with dough strength. In *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, vol. 12, 2003, p. 151-155.

WIESER, H., KIEFFER, R., LELLEY, T. 2000. The influence of 1B/1R chromosome translocation on gluten protein composition and technological properties of bread wheat. In *Journal of the Science of Food and Agriculture*, vol. 80, 2000, p.1640-1647.

WRIGLEY, C. W. 1992. Identification of cereal varieties by gel electrophoresis of the grain proteins. In *Seed Analysis*. Berlin: Heilderberg, Springerverlag. ISBN 3 540 52737 0, p.17-41.

## Acknowledgments:

This work originated thanks to the support within Operational Programme Research and Development for the project: "Transfer, use and dissemination of research results of plant genetic resources for food and agriculture" (ITMS: 26220220058), cofinanced from the resources of the European Union Fund for Regional Development.

## Contact address:

Edita Gregová, Plant Production Research Center Piešťany, Bratislavská cesta 122, 921 68 Piešťany, Slovak Republic, E-mail: gregova@vurv.sk

Zuzana Šramková, Department of Nutrition and Food Assessment, Slovak University of Technology, Radlinského 9, 812 37 Bratislava, Slovakia, E-mail: zuzannasramkova@gmail.com

Valéria Šudyová, Plant Production Research Center Piešťany, Bratislavská cesta 122, 921 68 Piešťany, Slovak Republic, E-mail: sudyova@vurv.sk

Pavol Hauptvogel, Plant Production Research Center Piešťany, Bratislavská cesta 122, 921 68 Piešťany, Slovak Republic, E-mail: hauptvogel@vurv.sk

Svetlana Šliková, Plant Production Research Center Piešťany, Bratislavská cesta 122, 921 68 Piešťany, Slovak Republic, E-mail: slikova@vurv.sk

## THE EVALUATION OF ANTIOXIDANT ACTIVITY OF MILLING FRACTIONS OF SELECTED CEREALS GROWN IN THE YEAR 2010

*Eva Ivanišová, Miroslav Ondrejovič, Štefan Dráb, Marián Tokár*

### ABSTRACT

Cereals are good source of biologically active compounds that contribute to reducing the risk of coronary heart disease and also inhibit oxidation in human plasma. The aim of this study was to evaluate of antioxidant potential of four milling fractions of selected cereals grown in the year 2010. Methanol was used to extract the antioxidant compounds from cereals. Free radical scavenging activity of samples was measured using DPPH assay and reducing power was determined using FRAP assay. Secondary was evaluated of total phenolic and flavonoid content of cereal extracts. We found that flour fractions (break flour and reduction flour) showed the lower proportion of the total antioxidant potential than bran fractions (fine bran and coarse bran). Extract from barley had the highest values of antioxidant activity and phenolic content.

**Keywords:** cereals, milling fractions, phenolic, antioxidant activity

### INTRODUCTION

Cereals are main foods in many countries, as human foods or as animal feeds (Castro-Rubio et al. 2006). Epidemiological studies indicate that the consumption of whole-grain and whole-grain products is related to reduction in total mortality, coronary heart disease mortality, diabetes and cancer incidence (Serpen et al. 2008). These beneficial effects are attributed to the bioactive factors in cereal grain such as non digestible carbohydrates and phytochemicals. The important part of phytochemicals with low molecular weight present in cereal grain is group of antioxidants such as tocopherols, lignans, flavonoids and phenolic acids. Antioxidants are defined as molecules that, at low concentration and specific assay conditions, can delay or prevent oxidation of an oxidizable substrate (Vaher et al. 2010). Higher concentrations of these compounds are found in the outer layers of the kernel which constitute the bran (Kim et al. 2006).

Cereal grains are rich in phenolic acids and saponins, while phytoestrogens and flavonoid are presented in small quantities (Dordević et al. 2010). Studies have shown that dietary phenolics have high antioxidant activity, which may contribute to their health benefits. In cereals, the predominant phenolic acid is ferulic acid, representing up to 90 % of total polyphenols. Other phenolic acids including vanilic, syringic, chlorogenic, *p*-coumaric, *m*-coumaric and *OH*-cinnamic acid have also been reported in cereals (Hosseinian & Mazza 2009). Total amount of polyphenols in cereals is highly variable both in whole grain and in bran and also depends on the cereal variety and milling procedure (Adom et al. 2005).

The main objective of the present work was to evaluate of antioxidant potential of selected cereals by Free Radical Scavenging Activity (DPPH) and The Ferric Ion Reducing Antioxidant Power (FRAP), and its distribution into the dry milling fractions. In addition, the content of flavonoids and total phenolics was also determined, in order to refer of unutilized potential of naturally occurring antioxidants in cereals, which leaving in the form of bran during the production of flour.

### MATERIAL AND METHODOLOGY

Chemicals were purchased from Sigma-Aldrich, St. Louis, MO and Mikrochem, SK. Cereals were grown in the year 2010 on a field nursery at Department of Environmental Protection and Organic Farming (DEPOF) Spišská Belá (SK) and on a field at Plant Production Research Institute (PPRI) Piešťany (SK). The used types and genotypes of cereals were: wheat (Torysa, PPRI), oat (Cacko, DEPOF), spelt wheat (Roquir, PPRI), triticale (Kandar, PPRI), rye (Dankovské nové, PPRI), barley (Ezer, DEPOF). Before the measurement samples were milled by laboratory mill (Brabender Quadrumat Senior) gaining four milling products: break flour (MF I.), reduction flour (MF II.), fine bran (MF III.), and coarse bran (MF IV.). 0.5 g of milling fractions was extracted with methanol for 24 hours. After centrifugation at 3000 g (Himac CT 6E, Hitachi Ltd., Japan,) for 20 min, the supernatant was evaporated at 40 °C and residue was solubilised in 1 mL of methanol.

#### Free Radical Scavenging Activity

Free radical scavenging activity of samples was measured using the 2,2-diferyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) according to the procedures described by Yen & Chen (1995). The extracts (25 µL) were reacted with 100 µL of DPPH solution (0.012 g DPPH in 100 mL methanol). Absorbance of the cereal extracts was determined using BioTek Microplate Reader (ELx800) at 550 nm. Free radical scavenging activity of the samples was expressed as mg Trolox equivalent antioxidant capacity per g of dry matter (mg TEAC g DM).

#### Reducing Power

Reducing power of samples was determined according to the procedure by Oyanizu (1986). The mixture of cereal extract (20 µL), phosphate buffered saline (50 µL, pH 6.6) and 1% potassium ferricyanide (50 µL) was incubated at 50 °C for 20 min, then rapidly cooled, mixed with 50 µL of 10% trichloacetic acid, and centrifugated at 11 000 g (Eppendorf MiniSpin) for 10 min. 50 µL of the supernatant was mixed with 50 µL of distilled water and 10 µL of 0.1%

ferric chloride. The absorbance at 700 nm using BioTek Microplate Reader (ELx800) was detected. Reducing power was expressed as mg Trolox equivalent antioxidant capacity per g of dry matter (mg TEAC g DM).

### Total Phenolic Content

Total phenolic content of cereal extracts was measured spectrophotometrically, using the modified Folin-Ciocalteu method as described by Singleton et al. (1965). 0.1 mL of each cereal extract was mixed with 0.1 mL of the Folin-Ciocalteu reagent and 1 mL of 20% sodium carbonate, and centrifugated at 11 000 g (Eppendorf MiniSpin) for 10 min. 240  $\mu$ L of the supernatant was used for measured the absorbance at 700 nm using BioTek Microplate Reader (ELx800). The total phenolics content was expressed as mg gallic acid equivalent (GAE) per g dry matter (DM).

### Total Flavonoid Content

Total flavonoid content was determined using the modified method by Quettier-Deleu et al. (2000). 0.1 mL of cereal extract was mixed with 20  $\mu$ L of 5% methanolic solution of aluminium chloride and centrifugated at 11 000 g (Eppendorf MiniSpin) for 10 min. 120  $\mu$ L of supernatant was used for measured the absorbance at 405 nm on a BioTek Microplate Reader (ELx800). The total flavonoid content was expressed as mg quercetin equivalent (QE) per g dry matter (DM).

## RESULTS AND DISCUSSION

DPPH $\cdot$  is a stable free radical and accepts an electron or hydrogen radical to become a stable diamagnetic molecule. The reductions capability of DPPH $\cdot$  is determined by the decrease in its absorbance induced by antioxidant (Liu & Yao, 2007). The scavenging effect of cereal extracts in flour milling fractions on DPPH radical decreased in this order: barley (29%) > spelt (22%) > oat (15%) > rye (13%) > triticale (12%) > wheat (9%). The scavenging effect of cereal extracts in bran milling fractions on DPPH radical decreased in this order: barley (20%) > triticale (18%) > wheat (17%) > oat (15%) > rye (15%) > spelt (14%). (Fig.1). These results indicated that all the extracts had a noticeable effect on scavenging free radical. The higher activities of all extracts were measured in bran (MF III. and MF IV.). Bran is a composite material made of several layers, such as pericarp, testa and aleurone (Hemery et al., 2011). The main components of the fine bran (MF III.) are aleurone layer and the germ. In coarse bran (MF IV.) is dominant pericarp (Schnürer, 1991). It is known that cereals bran are a rich source of fatty acids and several substances, such as tocopherol, vitamins, and phenolic compounds, possessing antioxidant properties (Prisenžňáková et al., 2010).

The extract from barley had the strongest scavenging activity in flour milling fractions. From the literature it is known, that the barley is an excellent source of natural antioxidant either for food preservation (to inhibit lipid oxidation), or for disease prevention (Fardet et al., 2008). Liu & Yao (2007) determined scavenging activity of barley seed extracts and found strong activity, which was dominant in 70 % acetone and shown similar activity to BHT at the amount of 200  $\mu$ g. In bran fractions extract from rye and wheat showed the strongest activity.

High activity was also determined in flour extracts of spelt and in bran extract of triticale. In a recent study Hosseinian & Mazza (2009) described triticale bran than potential new sources of antioxidant compounds.

### Reducing power

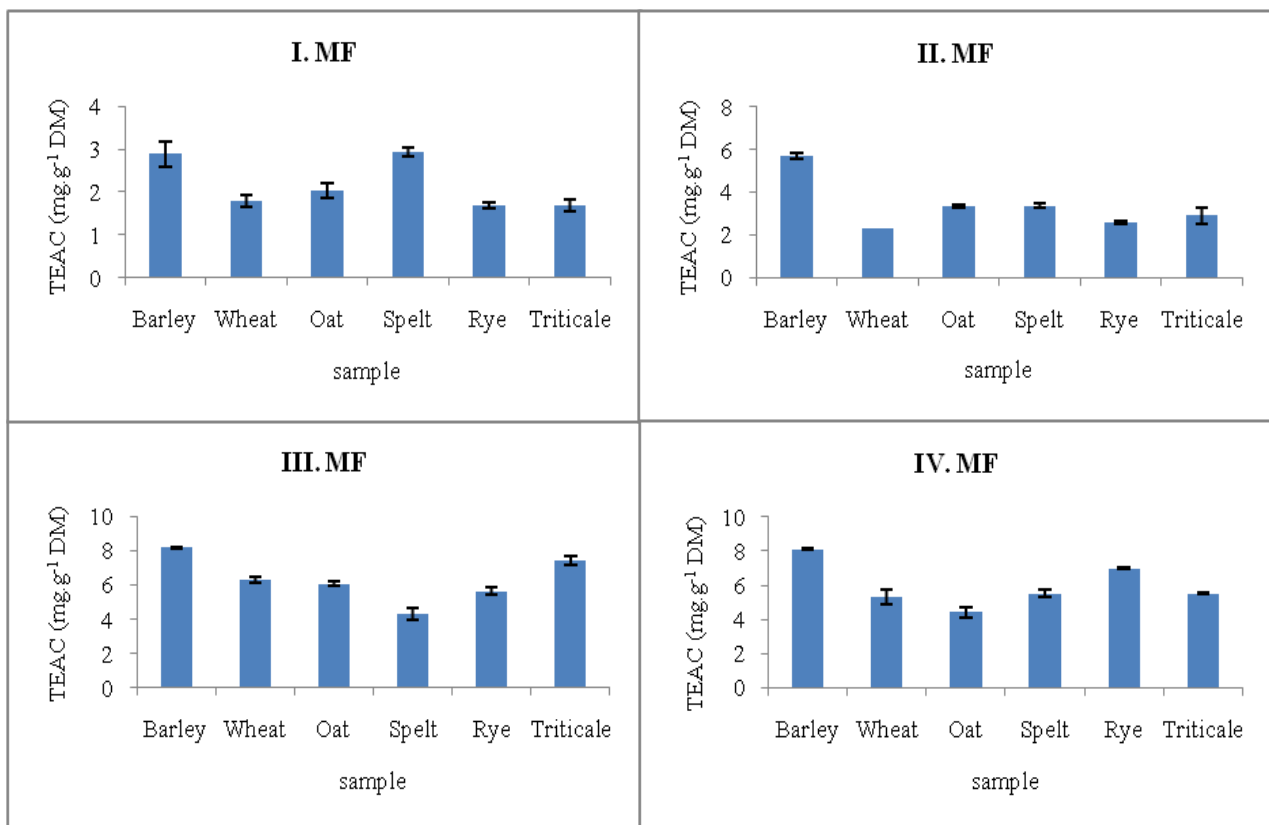
For measurement of the reductive ability, the Fe<sup>3+</sup> - Fe<sup>2+</sup> transformation in the presence of cereal extracts was investigated. Reductive capabilities of cereal extracts shown Fig. 2. Increase in absorbance of the reaction mixture indicated the reducing power of the samples. Reducing power of flour milling fractions of cereal extracts exhibited the following order: barley (50%) > spelt (16%) > oat (13%) > rye (10%) > wheat (7%) > triticale (3%). Reducing power of bran milling fractions of cereal extracts exhibited the following order: barley (32%) > triticale (16%) > wheat (16%) > oat (14%) > rye (13%) > spelt (9%). Similar like DPPH assay, the higher activities of all extracts were measured in bran (MF III. and MF IV.).

The reducing capacity of a compound may serve a significant indicator of its potential antioxidant activity (Liu & Yao, 2007). The reducing properties are generally associated with the presence of reductones (Pin-Der, 1998). It is reported that the antioxidant action of reductones is based on the breaking of the free radical chain by donating a hydrogen atom, or reacting with certain precursors of peroxide to prevent peroxide formation. It is presented that the phenolic compounds in cereals may act in a similar fashion as reductones by donating electrons and reacting with free radicals to convert them to more stable products and terminating the free radical chain reaction (Liu & Yao, 2007). The data presented here indicate that the marked reducing power of cereal extracts seem to be the result of their antioxidant activity.

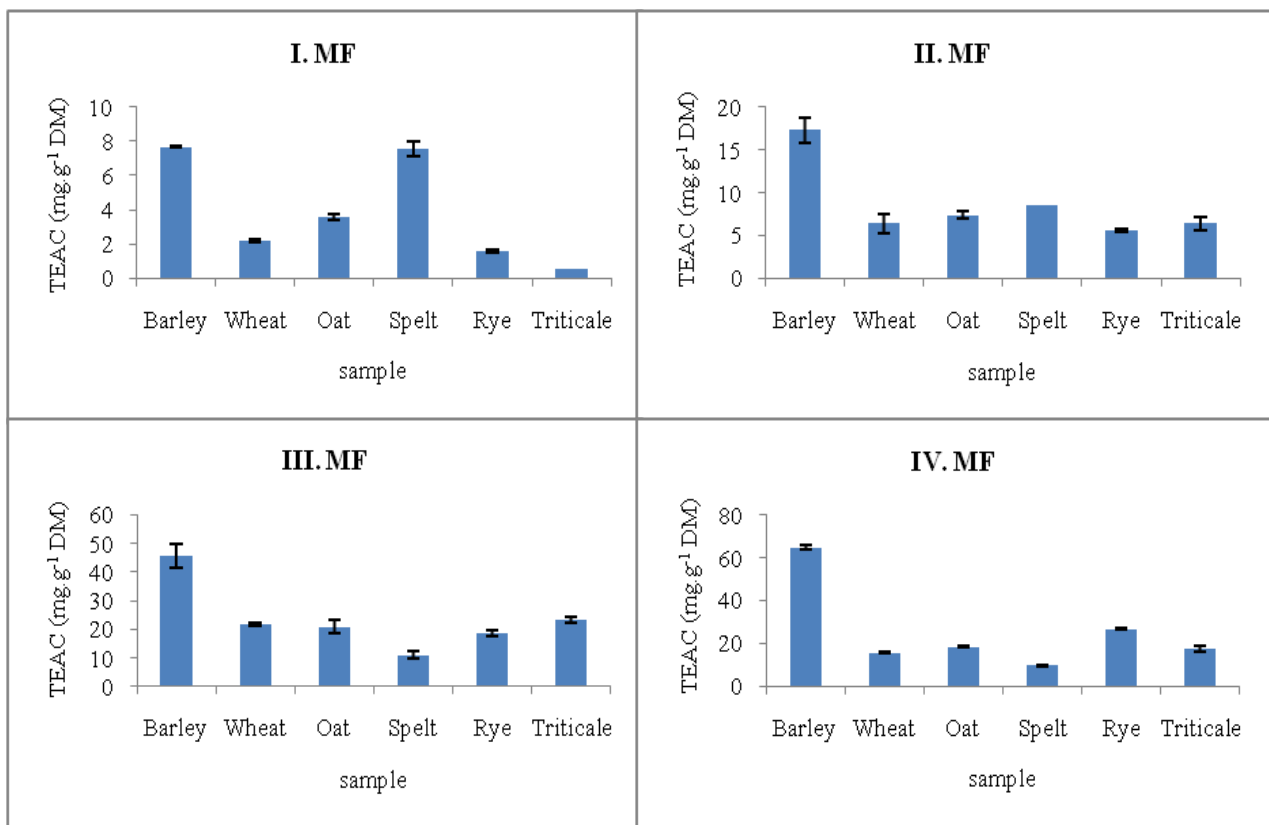
Similar like DPPH assay, the extract from barley had the strongest reducing power in both years in all fractions. Liu & Yao (2007) determined reducing power of different solvent extracts of barley and found that 70 % methanol extract exhibit the highest activity. Zhao et al. (2008) measured reducing power of malting barley extract and confirmed strong activity of barley. The high activities were also determined in flour fractions of spelt, and in bran fractions of triticale and rye. Zieliński et al. (2007) reported that rye is an excellent raw material for healthy and tasty foods. The ray grain contains a large variety of substances, especially those that are biologically active and demonstrate antioxidant properties, which include free radical-scavengers, reducing agents, potential complexes of prooxidant metals and quenchers of the formation of singlet oxygen.

### Cereal polyphenols

Phenolics are compounds with one or more aromatic ring and one or more hydroxyl groups (Liu, 2003). Structurally, phenolics in cereals can be subdivided into acids derived from either benzoic acid or cinnamic acid. Vanillic and salicylic acids are derivatives of benzoic acid while ferulic acid, the dominant phenolic acid in cereals, and caffeic acid are derivatives of cinnamic acid (Abdel-Aal et al., 2001). Phenolic acids are predominantly found in the outer bran layer.



**Fig. 1** Free radical scavenging activity of cereal extracts (in the year 2010) expressed as mg Trolox equivalent antioxidant capacity per g of dry matter (mg TEAC g DM), (I. MF – break flour, II. MF – reduction flour, III. MF – fine bran, IV. MF –coarse bran).



**Fig. 2.** Reducing power of cereal extracts (in the year 2010) expressed mg Trolox equivalent antioxidant capacity per g of dry matter ( mg TEAC g DM), (I. MF – break flour, II. MF – reduction flour, III. MF – fine bran, IV. MF – coarse bran).

Flavonoids are one group of phenolics, which consists of two aromatic rings linked by 3 carbons that usually in an oxygenated heterocycle ring (Liu, 2004). In cereals flavonoids are located mainly in the pericarp (Dykes & Rooney, 2007) in small quantities only (Peterson, 2001). Kim et al. (2006) reported that wheat is a good source of phenolic acid and flavonoids. King (1962) isolated two related flavones glycosides from wheat germ. Three major flavones, apigenin, luteolin and tricetin were identified in oat flour (Peterson, 2001). In barley grains are dominant catechin and epicatechin (Shahidi & Naczek, 2004).

The majority of phenolics in cereals are insoluble and bound by ester and ether linkages with polysaccharides, such as arabinoxylan and lignin, in the cell wall (Liyana-Pathirana & Shahidi, 2006), while a smaller portion is soluble (Stalikas, 2007). The bran layer is highly stratified not only in phenolic composition, but also in the degree of ester and ether bonds and the compounds to which the phenolics are cross-linked (Verma et al., 2009). Several studies have shown that methanol is an effective solvent in extracting phenolics and other polar substances from cereals (Ragaee et al., 2006). In this study, methanol extracts from cereals were used for the determination of phenolic (mg GAE/g) and flavonoid content (mg QE/g).

#### Total Phenolic Content

The total phenolic content was determined by the Folin-Ciocalteu assay. The results are presented in Tab. 1.

**Table 1** The phenolic contents (mg GAE/g) of milling fractions from cereals grown in the year 2010.

Sample	Milling Fraction			
	I.	II.	III.	IV.
Barley	31,4 ± 1,2	62,1 ± 0,7	161,0 ± 4,1	291,7 ± 3,5
Wheat	17,6 ± 0,1	19,7 ± 0,5	159,1 ± 2,6	128,2 ± 0,3
Oat	31,3 ± 0,2	39,1 ± 0,7	99,2 ± 2,2	61,3 ± 2,7
Spelt	40,4 ± 0,7	36,4 ± 0,3	66,4 ± 1,0	151,0 ± 3,7
Rye	17,6 ± 0,3	30,3 ± 0,6	95,9 ± 1,6	159,5 ± 12,6
Triticale	11,8 ± 0,5	16,3 ± 1,0	178,0 ± 1,7	133,7 ± 3,4

I. – bread flour, II. – reduction flour, III. – fine bran, IV. – coarse bran

From Tab. 1. it is evident that bran have higher content of total phenolic than flour. This is not surprising because it is well known that phenolic compounds are concentrated in the bran fractions of cereals that are removed during the milling of cereals into white flour (Vaher et al., 2010; Kim et al., 2006). Abdel-Aal et al., (2001) investigated the distribution of phenolic acids in wheat milling fractions. About 73 % of grain phenolic acids were found in the bran, but only 5 % in first and second milling fraction.

Total phenolic content of cereal extracts in flour milling fraction decreased in this order: barley > (26%) > spelt (26%) > oat (19%) > rye (15%) > wheat (8%) > triticale (6%). Total phenolic content of cereal extracts in bran milling fraction decreased in this order: barley > (21%) > wheat (20%) > triticale (17%) > rye (16%) > spelt (15%) > oat (11%). The results showed that phenolics were found in all cereal extracts, but bran fractions content higher values of phenolics. The sample of barley and spelt in flour fractions showed higher amounts of phenolics than

extract from oat and wheat. In bran fractions were the highest amounts of phenolics determined in sample of barley, wheat and triticale.

A comparison of results from different studies can be difficult, because in our study cereals were milling into four milling fraction, while in other works, sample of cereals were milling into flour and bran.

#### Total Flavonoid Content

The total flavonoid content of cereal extracts is shown in Tab. 2.

**Table 2** The flavonoid contents (mg QE/g) of milling fractions from cereals grown in the year 2010.

Sample	Milling Fraction			
	I.	II.	III.	IV.
Barley	0,75 ± 0,04	1,02 ± 0,03	1,08 ± 0,07	2,14 ± 0,07
Wheat	0,12 ± 0,01	0,16 ± 0,01	0,93 ± 0,15	3,07 ± 0,06
Oat	0,64 ± 0,04	0,84 ± 0,05	2,60 ± 0,02	1,23 ± 0,05
Spelt	0,33 ± 0,03	0,42 ± 0,04	0,81 ± 0,02	1,55 ± 0,04
Rye	0,24 ± 0,04	0,51 ± 0,02	2,39 ± 0,02	1,91 ± 0,03
Triticale	0,11 ± 0,02	0,18 ± 0,02	1,01 ± 0,02	1,24 ± 0,04

I. – bread flour, II. – reduction flour, III. – fine bran, IV. – coarse bran

Higher concentration was found in bran (MF III. and MF IV.), but in smaller amounts than the total phenolic content. Bran flavonoids may be important for the miller because bran are introduced into flour during the milling process. Increasing amounts of bran will decrease the grade of the flour (Feng et al., 1988).

In flour milling fractions of cereal extracts content of flavonoid decreased in this order: oat (31%) > barley (25%) > spelt (16%) > rye (15%) > triticale (6%) > wheat (6%). In bran milling fractions of cereal extracts content of flavonoid decreased in this order: wheat (20%) > rye (20%) > oat (19%) > barley (17%) > spelt (12%) > triticale (12%).

From literature is known that flavonoids are concentrated mainly in pericarp. Our results shown that flavonoids are presented also in flour fractions; this is very important information, because products from endosperm are basic in human nutrition. In flour milling fractions, high amount of total flavonoid showed extract of barley and oat. Oat is a source of many compounds that exhibit antioxidant activity, but is consumed in considerably lower quantities worldwide than wheat (Peterson, 2001). In bran milling fractions high amount of total flavonoid was determined in extract of rye and wheat.

These results indicate that the flavonoids of cereals were mostly concentrated in the outer layer of grains. Adom and Liu (2002) found similar results for cereal grains including wheat and oat.

#### CONCLUSION

In this article, we prepared and evaluated milling fractions from selected cereals. Antioxidant activity was determined by DPPH and FRAP assay, and total phenolic and flavonoid content was also determined. We found that flour fractions (break flour and reduction flour) showed the lower proportion of the total antioxidant potential, which



was balanced in observed years. Bran fractions (fine bran and coarse bran) showed higher antioxidant activity, but 30 – 80 % of these fractions are unused in food industry, they are used mainly as animal feed. Extract from barley showed the highest values in all methods in observed years. It is evident, that bran fractions can be evaluated in the future and used for fortification of flours

## REFERENCES

- ABDEL-AAL, E. S. M., HUCL, P., SOSULSKI, F. W., GRAF, R., GILLOTT, R., PIETRZAK, L. 2001. Screening spring wheat for midge resistance in relation to ferulic acid content. In *J. Agric. Food Chem.*, vol. 49, 2001, p. 3559-3566.
- ADOM, K. K., LIU, R. H. 2002. Antioxidant activity of grains. In *J. Agric. Food Chem.*, vol. 50, 2002, p. 6182-6187.
- ADOM, K. K., SORRELLS, M. E., RUI, H. L. 2005. Phytochemicals and antioxidant activity of milled fractions different wheat varieties. In *J. Agric. Food Chem.*, vol. 53, 2005, p. 2297-2306.
- ALVARE-JUBETE, L., WIJNGAARD, H., ARENDT, E. K., GALLAGHER, E. 2010. Polyphenol composition and in vitro antioxidant activity of amaranth, quinoa, buckwheat and wheat as affected by sprouting and baking. In *Food Chem.*, vol. 119, 2010, p. 770-778.
- CAMPBELL, G. M., FANGI, C., MUHAMAD, I. I. 2007. On predicting roller milling performance VI: Effect of kernel hardness and shape on the particle size distribution from first break milling of wheat. In *Chem. E.*, vol. 85, 2007, p. 7-23.
- CASTRO-RUBIO, A., GARCIA, M. C., MARINA, M. L. 2006. Rapid separation of soybean and cereal (wheat, corn, and rice) proteins in complex mixtures: Application to the selective determination of the soybean protein content in commercial cereal-based products. In *Anal. Chim. Acta*, vol. 558, 2006, p. 28-34.
- DORDEVIĆ, T. M., ŠILER-MARINKOVIĆ, S. S., DIMITRIJEVIĆ-BRANKOVIĆ, S. I. 2010. Effect of fermentation on antioxidant properties of some cereals and pseudo cereals. In *Food Chem.*, vol. 119, 2010, p. 957-963.
- DYKES, L., ROONEY, L. W. 2007. Phenolic compounds in cereal grains and their health benefits. In *Cereal Food World*, vol. 52, 2007, p. 105-111.
- FARDET, A., ROCK, E., RÉMÉSY, CH. 2008. Is the in vitro antioxidant potential of whole-grain cereals and cereal products well reflected in vivo? In *J. Cereal Sci.*, vol. 48, 2008, p. 258-276.
- HEMERY, Y., HOLOPAINEN, U., LAMPI, A. M., LEHTINEN, P., NURMI, T., PIIRONEN, V., EDELMANN, M., ROVAN, X. 2011. Potential of dry fractionation of wheat bran for the development of food ingredients part II: Electrostatic separation of particles. In *J. Cereal Sci.*, vol. 53, 2011, p. 9-18.
- HOSSEINIAN, F. S., MAZZA, G. 2009. Triticale bran and straw: Potential new sources of phenolic acids, proanthocyanidins, and lignans. In *J. Funct. Foods*, vol. 1, 2009, p. 57-64.
- KIM, K. H., TSAO, R., YANG, R., CUI, S. W. 2006. Phenolic acid profiles and antioxidant activities of wheat bran extracts and the effect of hydrolysis conditions. In *Food Chem.*, vol. 95, 2006, 466-473.
- KING, H. G. C. 1962. Phenolic compounds of commercial wheat germ. In *J. Food Sci.*, vol. 27, 1962, p. 446-454.
- LI, D., XIAO, G., DING, X. 2001. Study on antioxidant effect of tartary buckwheat flavonoids. In *J. Wuxi Un. Light Ind.*, vol. 20, 2001, p. 44-47.
- LIU, Q., YAO, H. 2007. Antioxidant activities of barley seeds extracts. In *Food Chem.*, vol. 102, 2007, p. 732-737.
- LIU, R. H. 2003. Health benefits of fruit and vegetables are from additive and synergistic combinations of phytochemicals. In *Am. J. Clin. Nutr.*, vol.78, 2003, p. 517-520.
- LIU, R. H. 2004. Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: Mechanism of action. In *J. Nutri.*, vol. 134, 2004, p. 3479-3485.
- LIYANA-PATHIRANA, C. M., SHAHIDI, F. 2006. Importance of insoluble-bound phenolics to antioxidant properties of wheat. In *J. Agric. Food Chem.*, vol. 54, 2006, p. 1256-1264.
- MUCHOVÁ, Z., FRANČÁKOVÁ, H., BOJŇANSKÁ, T., MAREČEK, J. 2011. Cereals. In The evaluation of raw materials and plant products p. 50-84, SAU, Nitra, SK.
- OYAZU, M. 1986. Studies on products of browning reaction prepared from glucoseamine. In *Jpn. J. Nutr.*, vol. 44, 1986, p. 307-314.
- PETERSON, D. M. 2001. Oat antioxidants. In *J. Cereal Sci.*, vol. 33, 2001, 115-129.
- PIN-DER, D. 1998. Antioxidant activity of Budrock (*Arctium lappa, L.*): its scavenging effect on free radical and active oxygen. In *J. Am. Oil. Chem.*, vol. 75, 1998, p. 455-461.
- PRISEŇŇÁKOVÁ, Ľ., NOSÁLOVÁ, G., HRMÁDKOVÁ, Z., EBRINGEROVÁ, A. 2010. The pharmacological activity of wheat bran polysaccharides. In *Fitoterapia*, vol. 81, 2010, p. 1037-1044.
- QUETTIER-DELEU, CH., GRESSIER, B., VESSEUR, J., DINE, E., BRUNET, C., LUYCKX, M., CAZIN, M., CAZIN, J. C., BAILLEUL, F. 2000. Phenolic compounds and antioxidant activities of buckwheat (*Fagopyrum esculentum Moench*) hulls and flour. In *J. Ethnopharm.*, vol. 1-2, 2000, p. 35-42.
- RAGAE, S., ABDEL-AAL, E. S. M. and NOAMAN, M. 2006. Antioxidant activity and nutrient composition of selected cereals for food use. In *Food Chem.*, vol. 98, 2006, p. 32-38.
- SCHNÜRER, J. 1991. Distribution of fungal biomass among fine bran, coarse bran, and flour from wheat stored at four different moisture levels. In *Cereal Chem.*, vol. 68, 1991, p. 434-437.
- SERPEN, A., GOKMEN, V., PELLEGRINI, N., FOGLIANO, V. 2008. Direct measurement of total antioxidant capacity of cereal products. In *J. Cereal Sci.*, vol. 48, 2008, p. 816-820.
- SHAHIDI, F. and NACZK, M. 2004. *Phenolics in food and nutraceuticals*. CRC Press: Washington, 566 pp. ISBN 0-203-50873-4.
- SINGLETON, V. L., ROSSI, J. A. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. In *Am. J. Enol. Agri.*, vol. 6, 1965, p. 144-158.
- STALIKAS, C. D. 2007. Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. In *J. Sep. Sci.*, vol. 30, 2007, p. 326-329.
- VAHER, M., MATSO, K., LEVANDI, T., HELMJA, K., KALJURAND, M. 2010. Phenolic compounds and the antioxidant activity of the bran, flour and whole grain of different wheat varieties. In *Procedia Chem.*, vol. 2, 2010, p. 76-82.
- VERMA, B., HUCL, P., CHIBBAR, R. N. 2009. Phenolic acid composition and antioxidant capacity of acid and alkali hydrolysed. In *Food Chem.*, vol. 116, 2009, p. 947-954.

YEN, G. C. and CHEN, H. Y. 1995. Antioxidant activity of various tea extracts in relation to their antimutagenicity. In *J. Agric. Food Chem.*, vol. 43, 1995, p. 27-32.

ZHAO, H., FAN, W., DONG, J., LU, J., CHEN, J., SHAN, L., LIN, Y., KONG, W. 2008. Evaluation of antioxidant activities and total phenolic contents of typical malting barley varieties. In *Food Chem.*, vol. 107, 2008, 296-304.

ZIELIŃSKI, H., CEGLIŃSKA, A., MICHALSKA, A. 2008. Antioxidant contents and properties as quality indices of rye cultivars. In *Food Chem.*, vol. 104, 2008, p. 980-988.

**Acknowledgement:** This work was supported by the grant No. APVV-LPP-0251-07.

**Contact address:**

Eva Ivanišová, Department of Storing and Processing Plant Products, Faculty of Biotechnology and Food

Sciences, Slovak University of Agriculture, Tr. A. Hlinku 2, Nitra, SK-949 76, Slovak Republic E-mail:eva.ivanisova@post.sk

Miroslav Ondrejovič, Department of Biotechnology, Faculty of Natural Sciences, University of SS. Cyril and Methodius, Nam. J. Herdu 2, Trnava, SK-917 01, Slovak Republic E-mail: miroslav.ondrejovic@ucm.sk

Štefan Dráb, Department of Storing and Processing Plant Products, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Slovak University of Agriculture, Tr. A. Hlinku 2, Nitra, SK-949 76, Slovak Republic E-mail: stefan.drab@uniag.sk

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

doi: 10.5219/147

**VIABILITY OF THE PROBIOTIC BACTERIA *L. ACIDOPHILUS* IN DAIRY PRODUCTS***Janka Koreňová***ABSTRACT**

A number of health benefits have been claimed for probiotic bacteria such as *Lactobacillus acidophilus*. Because of the potential health benefits, these organisms are increasingly incorporated into dairy foods. Viability of probiotic bacteria is important in order to provide health benefits. However, many studies have shown low viability of probiotics in market preparations. This study cover selective enumeration and survival of probiotic bacteria *L. acidophilus* in some dairy drinks. *L. acidophilus* was found in the range from  $10^6$  to  $10^7$  CFU.g<sup>-1</sup> in five types of fermented milk products containing probiotic cultures. Two investigated products were up to standard according to Regulation of Ministry of Agriculture and Ministry of Health of Slovak Republic.

**Keywords:** *L. acidophilus*, probiotics, viability, dairy food

---

**ÚVOD**

Probiotiká (z gréckeho „pre život“) sú všeobecne známe živé mikroorganizmy, ktoré pri dodaní v dostatočnom množstve vyvolajú zlepšenie zdravotného stavu hostiteľa. Optimalizujú osídlenie a zloženie črevnej mikroflóry zvierat a ľudí so stimulačným efektom na tráviace procesy a imunitu organizmu a majú tiež potenciálny pozitívny vplyv v prevencii nádorových ochorení (Quillien, 2001; Kuchta et al., 2006; Urgeová & Marecová, 2003; Holm, 2001; Teitelbaum & Walker, 2002; Leahy et al., 2005; Sanders & Klaenhammer, 2001).

Medzi najbežnejšie probiotiká patria bakteriálne kmene *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus rhamnosus* a *Bifidobacterium sp.* Baktérie rodu *Lactobacillus* sa prirodzene vyskytujú v mlieku, obilninách a iných rastlinách. Spôsobujú skvasovanie laktózy na kyselinu mliečnu, ktorá spomaľuje rozmnožovanie hnilobných baktérií a stafylokokov. Ich prirodzená prítomnosť a metabolická činnosť v niektorých potravinách a krmivách sa tradične využívajú na konzerváciu potravín a krmív a sú považované zo zdravotného hľadiska za bezpečné (Quillien, 2001; Michalík et al., 1999). Jedným z najzaujímavejších mikroorganizmov z hľadiska využitia ako pomocnej látky vo výžive je *Lactobacillus acidophilus* (Hughes & Hoover, 1991; Dave & Shah, 1996).

Probiotické mikroorganizmy sa môžu aplikovať samotné alebo s inými mikroorganizmami, v potravine, ako prídavná látka, výživový doplnok, liek. Asi najčastejšie sa spotrebiteľ s probiotikami stretáva v kyslomliečnych výrobkoch, z ktorých najbežnejšie druhy vyskytujúce sa v obchodnej sieti sú jogurt, jogurtové mlieko, acidofilné mlieko, zakysané mlieko, kefir a kefirové mlieko. Tradičné kyslomliečne výrobky (zakysané, fermentované) sú vyrábané z mlieka alebo z mliečnych výrobkov procesom kysnutia, pôsobením tzv. štartovacích kultúr (smotanová, jogurtová, acidofilná kultúra), ktoré tvorí zmes dvoch alebo viacerých druhov mliečnych baktérií, ktoré môžu byť v symbióze. Proces kysnutia vyvoláva charakteristické biochemické zmeny sprevádzané znížením pH, vyzrážaním bielkovín mlieka a tvorbou aromatických látok.

Štartovacie kultúry sú potvrdené ako zdraviu prospešné, avšak nie sú prirodzenou mikroflórou ľudského tráviaceho systému, neprežívajú cestu tráviacim systémom, ani ho nie sú schopné v dostatočnej miere kolonizovať (Shah, 2000). Pre kyslomliečny výrobok, ktorý má byť považovaný za probiotický produkt sú k nemu pred alebo po fermentácii pridávané kmene probiotických baktérií, ako dietetický prídavok. Terapeutické minimum probiotického výrobku je  $1.10^5$  KTJ.g<sup>-1</sup>. Aby sa u človeka dosiahlo akýchkoľvek kladných zdravotných účinkov, je nevyhnutná denná konzumácia výrobkov s obsahom živých buniek v množstve  $1.10^6$  -  $1.10^9$  (Lee & Salminen, 1995; Robinson, 1987). Výnos MP SR a MZ SR č. 2143/2006 vymedzuje definície, názvy a označovanie kyslomliečnych výrobkov a ustanovuje množstvo živých mikroorganizmov špecifických pre konkrétny druh výrobku na  $10^7$  KTJ.g<sup>-1</sup>, a pridaných mikroorganizmov uvedených v názve či v zložení výrobku na  $10^6$  KTJ.g<sup>-1</sup>.

Prvým krokom k splneniu významného kritéria, ktorým je schopnosť mikroorganizmov prežiť počas technologických procesov a skladovania výrobku, do ktorého boli pridané, je používanie štartovacích a probiotických kultúr od renomovaných výrobcov, ktorý má atesty o zdravotných účinkoch probiotických kultúr a pri dodržaní podmienok inokulácie, teploty a pod., zaručuje jej životaschopnosť vo výrobku.

Osobitnou skupinou sú výrobky, ktoré majú na obaloch tzv. zdravotné tvrdenia: „Zdravotné tvrdenie je každé tvrdenie, ktoré uvádza, naznačuje, alebo z ktorého vyplýva, že spotreba určitej kategórie potravy alebo niektorej z jej zložiek významne znižuje riziko vzniku určitého ľudského ochorenia.“ Ich uvádzanie nie je povinné, ale ak ich výrobca uvedie, musí dodržať ďalšie podmienky, ktoré sú definované v Nariadení Európskeho parlamentu a Rady (ES) č. 1924/2006 z decembra 2006 a v príslušných novelizáciách. Zdravotné účinky konkrétnych probiotických kmeňov môžu byť uznané len na podklade spracovania výsledkov in vitro a in vivo testovania v mnohých vedeckých štúdiách a súčasne môže byť povolená deklarácia zdravotných tvrdení pri označovaní výrobkov na obaloch a v reklame (Sanders &

Klaenhammer, 2001; Reid, 1999; Anonym 2009; Anonym 1999; Anonym 2006). Na výrobku musí byť spolu so zdravotným tvrdením uvedená aj denná dávka potraviny, a spôsob jej konzumácie, potrebná na dosiahnutie uvedeného priaznivého účinku. Zoznam oprávnených zdravotných tvrdení pre konkrétne probiotické mikroorganizmy vypracovaný Európskou konfederáciou potravinárskeho a nápojového priemyslu (CIAA) bol podaný na schválenie Komisii zriadenej Európskym úradom pre bezpečnosť potravín (EFSA), ktorá spravuje register podaných žiadostí prístupný verejnosti (CIAA, 2007a; EFSA, 2009). V tomto zozname je určená denná dávka pre dosiahnutie deklarovaných zdravotných účinkov mikroorganizmov *Lactobacillus acidophilus* 10<sup>9</sup> KTJ/deň (CIAA, 2007b). Z pohľadu spotrebiteľa má tento údaj praktické využitie, pretože u výrobkov s dostatočnou koncentráciou probiotickej kultúry postačuje konzumácia jedného balenia (porcie) výrobku denne na dosiahnutie kladného zdravotného účinku.

V predkladanom príspevku uvádzame niektoré výsledky selektívneho stanovenia koncentrácie probiotickej kultúry *Lactobacillus acidophilus* vo vybraných kyslomliečnych nápojoch.

### MATERIÁL A METÓDY

Predmetom rozboru boli kyslomliečne nápoje s obsahom probiotickej kultúry *L. acidophilus*. 5 výrobkov s týmto spoločným znakom sa náhodne vybralo zo slovenskej obchodnej siete v období február – marec 2009. Každý výrobok sa analyzoval z troch balení v čase bezprostredne (2 – 0 dní) pred uvedeným dátumom spotreby.

Analyzované výrobky:

1. Acidko plnotučné biele, zakysané mlieko s probiotickou kultúrou, zloženie: smotanová kultúra, probiotická kultúra *L. acidophilus*, balenie: 250 g, výrobca: A
2. Acidko plnotučné jahoda, zakysané mlieko s probiotickou kultúrou, zloženie: smotanová kultúra, probiotická kultúra *L. acidophilus*, balenie: 250 g, výrobca: A
3. Acidofilné mlieko, acidofilné mlieko s probiotickou kultúrou *L. acidophilus*, zloženie: mlieko, acidofilná kultúra *L. acidophilus*, balenie: 200 g, výrobca: B
4. Acidofilné mlieko, acidofilné mlieko plnotučné s probiotickou kultúrou *L. acidophilus*, zloženie: smotanová kultúra, probiotická kultúra *L. acidophilus*, balenie: 230 ml, výrobca: C
5. Acidofilné mlieko, acidofilné mlieko s probiotickou kultúrou *L. acidophilus* LA-5 Nutrish<sup>®</sup>, zloženie: smotanová kultúra, probiotická kultúra *L. acidophilus*, balenie: 950 g, výrobca: D

### Použitý mikroorganizmy:

Ako štandardné vzorky selektívne stanovovaných mikroorganizmov boli použité originály probiotických kultúr *L. acidophilus* poskytnutých dodávateľmi od

výrobcov kultúr: *L. acidophilus* LA-5, Chr. Hansen, Dánsko, Howaru *Dophilus*, Danisco, Dánsko.

### Použitá metódy:

Na selektívne stanovenie *L. acidophilus* sa použila metóda inokulácie na agarové platne s MRS agarom s klindamycínom a ciprofloxacínom (ISO 20128:2006 IDF 192; Anonym 2007;). Agarové platne boli pripravené rozpustením MRS agaru (Merck, Nemecko) v destilovanej vode podľa návodu, médium bolo následne sterilizované autoklávaním pri 121 °C počas 15 minút. Po sterilizácii bolo do vychladeného média s teplotou 50 °C pridané 5 ml zásobného roztoku ciprofloxacínu na 1 l média a 0,5 ml zásobného roztoku klindamycínu na 1 l média. Zásobný roztok ciprofloxacínu bol pripravený rozpustením 2 mg ciprofloxacín hydrochloridu (Sigma, USA) v 10 ml destilovanej vody a následne sterilizovaný filtráciou (0,22 µm). Zásobný roztok klindamycínu bol pripravený rozpustením 2 mg hydrochloridu klindamycínu (Sigma, USA) v 10 ml destilovanej vody a následne sterilizovaný filtráciou (0,22 µm). Pripravené médium sa za sterilných podmienok nalialo na Petriho misky a bolo použité na inokuláciu vzoriek rozterom.

Úprava analyzovaných vzoriek kyslomliečnych výrobkov a ich 10 - násobné riedenia boli robené podľa STN EN ISO 8261:2001. Vzorky boli riedené desiatkovým riedením 6 až 8 krát v peptónovom riediacom roztoku. Na predsušené agarové platne bolo 2x paralelne inokulovaných 200 µl vzorky z každého z troch za sebou nasledujúcich desiatkových riedení a rozotrené po celej ploche, následne boli platne inkubované za anaeróbných podmienok pri 37°C počas 72 hodín.

Vyrastené kolónie boli morfoloicky posúdené farbením podľa Grama (Horáková et al., 1993) a biochemicky potvrdené identifikačným systémom API 50CHL (BioMérieux, Francúzsko).

### VÝSLEDKY A DISKUSIA

Vyšetrované výrobky vykazovali počty sledovaných baktérií v priemerných hodnotách 10<sup>6</sup> – 10<sup>7</sup> KTJ.g<sup>-1</sup>. Legislatívou stanovené požiadavky na minimálny obsah živých charakteristických mikroorganizmov v mliečnych výrobkoch splnili len zakysané mlieka č. 1 a 2, u ktorých sa zistil dokonca viac ako o jeden desiatkový poriadok vyšší počet sledovaných mikroorganizmov. V acidofilnom mlieku č. 5 sa stanovil počet živých buniek *L. acidophilus* tesne pod požadovanou hranicou 10<sup>7</sup> KTJ.g<sup>-1</sup>. V acidofilných mliekach č. 3 a 4 sa zistil počet živých buniek o jeden desiatkový poriadok nižší, ako predpisuje Výnos MP SR a MZ SR 2143/2006.

Zdravotné tvrdenia majú na obaloch uvedené výrobky 1 a 2 s odporúčaním jednej porcie výrobku denne pre dosiahnutie deklarovaného zdravotného účinku. Priemerný počet buniek *Lactobacillus acidophilus* vo výrobkoch 1 a 2 bol 2,0 – 8,2. 10<sup>7</sup> KTJ.g<sup>-1</sup>, jedno balenie 250 g výrobku predstavuje približne 5,0. 10<sup>9</sup> - 2,1. 10<sup>10</sup> KTJ, čím tieto výrobky plne pokrývajú dennú dávku probiotického mikroorganizmu pre prejavenie sa zdravotných tvrdení.

**Tabuľka 1:** Prehľad výsledkov mikrobiologickej analýzy počtu živých buniek *Lactobacillus acidophilus* v jednotlivých vyšetrovaných výrobkoch

Výrobok	Výsledok* KTJ. g <sup>-1</sup>	Výsledok* log KTJ. g <sup>-1</sup> ±SD	Minimum ** KTJ.g <sup>-1</sup>	Výsledok* KTJ/ unifikovaná dávka (200 g)	Počet zostávajúcich dní do dátumu spotreby v čase analýzy
1. Acidko biele, zakysané mlieko A, 250 g	2,0.10 <sup>7</sup>	7,27±0,23	10 <sup>6</sup>	4,0.10 <sup>9</sup>	2
2. Acidko jahoda, zakysané mlieko A, 250 g	8,2.10 <sup>7</sup>	7,89±0,16	10 <sup>6</sup>	1,6.10 <sup>10</sup>	0
3. Acidofilné mlieko, acidofilné mlieko B, 200 g	1,1.10 <sup>6</sup>	6,02±0,06	10 <sup>7</sup>	2,2.10 <sup>8</sup>	1
4. Acidofilné mlieko, acidofilné mlieko C, 230 ml	1,8.10 <sup>6</sup>	6,24±0,07	10 <sup>7</sup>	3,6.10 <sup>8</sup>	2
5. Acidofilné mlieko, acidofilné mlieko D, 950 g	7,2.10 <sup>6</sup>	6,85±0,05	10 <sup>7</sup>	1,4.10 <sup>9</sup>	1

\* priemer z výsledkov analýz 3 balení z každého výrobku v 3 riedeniach po 2 paralelkách SD – smerodajná odchýlka.

\*\* minimálny obsah živých probiotických mikroorganizmov podľa Výnosu MP SR a MZ SR č. 2143/2006  
KTJ – kolóniu tvoriaca jednotka

Výsledky zahraničných štúdií uvádzajú obsah životaschopných buniek baktérií v probiotických výrobkoch podobný, alebo nižší. **Dave & Shah (1996)** uvádza množstvo *L. acidophilus* v dvoch jogurtových výrobkoch od 7,33 – 7,21 log KTJ.g<sup>-1</sup> a množstvo bifidobaktérií 6,23 – 7,21 log KTJ.g<sup>-1</sup>, v troch probiotických tyčinkách ten istý autor zistil *L. acidophilus* len v množstve 4,72 – 5,20 log KTJ.g<sup>-1</sup> a *Bifidobacterium sp.* v množstve 2,08 – 3,04 log KTJ.g<sup>-1</sup>. Podobne v českých a slovenských kyslomliečnych výrobkoch stanovil autor počty bifidobaktérií priemerne v hodnotách 2,37; 5,44; 6,03; 6,22; 6,31; a 7,17 log KTJ.g<sup>-1</sup> (**Rada, 2006**). *L. casei* vo fermentovaných mliečnych nápojoch bol stanovený v hodnotách 6,98 – 8,22 log KTJ.g<sup>-1</sup> a zo 6 analyzovaných jogurtov v troch bol stanovený obsah *L. casei* < 3,0 log KTJ.g<sup>-1</sup>, v dvoch 3,41 – 3,72 log KTJ.g<sup>-1</sup> a len v jednom výrobku 7,49 log KTJ.g<sup>-1</sup> (**Ravula, 1998**). Používanie štartovacích a probiotických kultúr od renomovaných výrobcov, ktorí pri dodržaní podmienok inokulácie, teploty a pod., zaručujú ich životaschopnosť vo výrobku, predpokladá zodpovednú manipuláciu od samotného výrobcu kyslomliečného výrobku.

Výrobca môže kladne ovplyvniť životaschopnosť probiotických kultúr dodržaním podmienok inokulácie, inkubačnej teploty, doby fermentácie a tiež teploty skladovania, čo sa týka aj teploty pri preprave a pri uskladnení priamo v predajnej sieti a v domácnosti u spotrebiteľa. Ďalej je dôležitá finálna acidita produktu v momente ukončenia fermentácie, koncentrácia sacharidov, koncentrácia rozpusteného kyslíka vo výrobku a prienik kyslíka cez obalový materiál (**Dave & Shah, 1996; Shah, 2000; Shah et al., 1995**).

## ZÁVER

V súčasnej dobe sa venuje veľká pozornosť tzv. probiotickým mliečnym výrobkom pre ich potenciálny priaznivý vplyv na ľudské zdravie. Ide hlavne o ovplyvňovanie imunitného systému, trávenia, metabolických procesov a pod. Probiotiká môžu mať tento priaznivý účinok na zdravie konzumenta len pri ich príjme v dostatočnom množstve. Zdravotné a výživové tvrdenia sú viazané na konkrétne a špecifické podmienky použitia, ktoré pri probiotických kultúrach predstavuje najmä ich minimálny obsah v unifikovanej dávke, resp. v 1 g (ml). Z uvedeného dôvodu je kľúčové ich prežitie vo výrobku počas jeho technologického spracovania a skladovania. V piatich kyslomliečnych výrobkoch z obchodnej siete obsahujúcich probiotickú kultúru *L. acidophilus* boli zistené priemerné hodnoty živých zárodkov tohto mikroorganizmu v rozmedzí 10<sup>6</sup> – 10<sup>7</sup> KTJ.g<sup>-1</sup>. Požadované kritériá podľa Výnosu MP SR a MZ SR splnili dva výrobky z piatich vyšetovaných.

Prípady stanovení nižšieho počtu životaschopných buniek probiotických baktérií v kyslomliečnych výrobkoch boli zaznamenané aj v zahraničných prácach a poukazujú na potrebu zodpovednej manipulácie od samotného výrobcu kyslomliečného výrobku, ktorá spočíva v dodržaní podmienok inokulácie probiotickej kultúry, inkubačnej teploty, doby fermentácie, kvality obalov a tiež teploty skladovania, teploty pri preprave, pri uskladnení v predajnej sieti aj v domácnosti u spotrebiteľa.

## LITERATÚRA

ANONYMOUS, 1999. Physiological effects of *Bifidobacterium longum* BB 536 - in vitro tests and



- administration to humans and animals. Morinaga milk Industry, Tokyo, 1999.
- ANONYMOUS, 2006. Effect of *Bifidobacterium longum* BB 536 on prevention of influenza virus infection of elderly. Morinaga probiotics news release. Annual meeting of Japan Society for bioscience, biotechnology, and agrochemistry, 2006.
- ANONYMOUS, 2007. Enumeration of *L.acidophilus*, in fermented milk products – Guidelines, Technical bulletin P-10, Chr. Hansen, nov. 2007.
- ANONYMOUS, 2009: *Lactobacillus acidophilus* NCFM® - a probiotic with proven efficacy. Technical memorandum TM 54-I e, Danisco, 2009.
- CIAA, 2007a. Industry contribution to Article 13 under Health and Nutrition Claims Regulation 1924/2006/EC [online].
- CIAA e-newsletter - Issue 7 - [online] 15/10/2007 [cit. 2009]. Dostupné na internete: <[http://www.ciaa.be/e-newsletter/print\\_full\\_nsl.asp?nsl\\_id=16](http://www.ciaa.be/e-newsletter/print_full_nsl.asp?nsl_id=16)>.
- CIAA, 2007b. *List of health and nutritional claims* [online]. Explanatory cover note to the food industry's contribution to the list of claims according to Article 13 (3) of EU regulation 1924/2006/EC on nutrition and health claims made on foods. [online] s.a. [cit. 2009]. Dostupné na internete: <<http://www.anilact.pt/documentos/healthclaims01.pdf>>.
- DAVE, R. I., SHAH, N. P., 1996. Evaluation of Media for Selective Enumeration of *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus*, and Bifidobacteria. In *J. Dairy Sci.* vol. 79, 1996, no. 9, p. 1529–1536.
- EFSA, 2009. *Register of Questions* [online] s.a. [cit.20.02.2009] Dostupné na internete: <<http://registerofquestions.efsa.europa.eu/roqFrontend/questionListLoader?panel=ALL>>.
- HOLM, F., 2001. *Zdravé črevá*. Syntetická správa Flair-Flow Europe o priaznivom účinku pro a prebiotik na zdravie. VÚP Bratislava, 28 p. ISBN: 80-89088-02-3.
- HORÁKOVÁ, K., BARÁTHOVÁ, H., VOLLEK, W. 1993. Mikrobiológia. Návod na cvičenia. STU Bratislava, 201 p., ISBN 80-227-0057-6.
- HUGHES, D. B., HOOVER, D. G., 1991: Bifidobacteria - Their Potential for Use in American Dairy Products. In *Food Technology*, vol. 45, 1991, no. 4, p. 75.
- ISO 20128:2006, IDF 192: Milk products – Enumeration of presumptive *Lactobacillus acidophilus* on selective medium – Colony count technique at 37°C.
- KUCHTA, M., PRUŽINEC, P., BOMBA, A., BUNGANIČ, I., BUTÁŠOVÁ, G., EBRINGER, L., ČERVENKOVÁ, D., FIRMENT, J., GÖBÖOVÁ, M., GOMBOŠOVÁ, K., HALUŠKOVÁ, V., HRUBIŠKO, M., HUDÁK, V., JARČUŠKA, P., KALETOVÁ, V., KERTYS, P., KLIMENT, M., KRISTIAN, P., KUŽELA, L., MAGULOVÁ, L., MEGO, M., MIKUŠ, M., NEMCOVÁ, R., NOVÁKOVÁ, B., OLTMAN, M., PETRÁŠOVÁ, D., ŠUTKA, J., 2006: Probiotiká, ich miesto a využitie v medicíne. Bratislava: Bonus CCS, 163 p., ISBN 80-968491-7-4.
- LEAHY, S. C., HIGGINS, D. G., FITZGERALD, G. F., VAN SINDEREN, D., 2005: Getting better with bifidobacteria. In *J. Appl. Microbiol.*, vol. 98, 2005, p.1303-1315.
- LEE, Y. K., SALMINEN, S., 1995: The coming of age probiotics. In *Trends in Food Sci. & Technol.*, vol. 6, 1995, no.7, p. 241–245.
- MICHALÍK, I., URMINSKÁ, D., BAUEROVÁ, M., ŠILHÁR, S., SOKOL, J., OUWEHAND, A., KIRJAVAINEN, P., SHORTT, C., SALMINEN, S., 1999: Probiotics: mechanism and established effects. In *Int. Dairy J.*, vol. 9, 1999, p. 43-52.
- NARIADENIE Európskeho parlamentu a Rady (ES) č. 1924/2006 z 20. decembra 2006 o výživových a zdravotných tvrdeniach o potravinách. Official Journal of the European Union OJ L12, 2007, p. 3-18.
- QUILLIEN, G., 2001. Probiotiká. Syntetická správa Flair-Flow Europe. VÚP Bratislava, ISBN: 80-89088-01-5, 16 p.
- RADA, V., 2006. Bifidobakterie v mléčných kysaných výrobkoch a funkčných potravinách. In *Potravinárska revue* 2, p. 10-14.
- RAVULA, R. R., SHAH, N. P., 1998. Selective enumeration of *Lactobacillus casei* from yogurt and fermented milk drinks. *Biotechnol. Tech.* 12, 1998, p. 819-822.
- REID, G., 1999. Minireview. The scientific basis for probiotics strains of *Lactobacillus*. In *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 65, 1999, no. 9, p. 3763-3765.
- ROBINSON, R. K., 1987. Survival of *Lactobacillus acidophilus* in fermented products. In *Suid Afrikaanse Tydskrif Vir Suiwelkunde*, vol. 19, 1987, p. 25-27.
- SANDERS, M. E., KLAENHAMMER, T. R., 2001. Invited Review: The Scientific Basis of *Lactobacillus acidophilus* NCFM Functionality as a Probiotic. In *J. Dairy Sci.*, vol. 84, 2001, no. 2, p. 319-331.
- SHAH, N. P., 2000. Probiotic Bacteria: Selective Enumeration and Survival in Dairy Foods. In *J. Dairy Sci.*, vol. 83, 2000, no. 4, p. 894-907.
- SHAH, N. P., LANKAPUTHRA, W. E. V., BRITZ, M., KYLE, W. S. A., 1995. Survival of *L. acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* in commercial yoghurt during refrigerated storage. In *Int. Dairy J.*, vol. 5, 1995, p. 515-521.
- STN EN ISO 8261:2001: Mlieko a mliečne výrobky. Všeobecné pravidlá úpravy analytických vzoriek, prípravy základných suspenzií a desaťnásobných riedení na mikrobiologické skúšanie (ISO 8261: 2001). Bratislava: SUTN, 2002.
- TEITELBAUM, J. E., WALKER, W. A., 2002. Nutritional impact of pre- and probiotics as protective gastrointestinal organisms. In *Annual Review of Nutrition* 22, p. 107-138.
- ŮRGEOVÁ, E., MARECOVÁ, M., 2003. Probiotické kmene mikroorganizmov a ich účinok na hostiteľský organizmus. *Nova Biotechnologica* III-2, p. 145-157.
- VÝNOS Ministerstva pôdohospodárstva Slovenskej republiky a Ministerstva zdravotníctva Slovenskej republiky zo 14. augusta 2006 . 2143/2006-100, ktorým sa vydáva hlava Potravinového kódexu Slovenskej republiky upravujúca mlieko a výrobky z mlieka. *Vestník MP SR*, 38 (18), 2006, p. 1-16.

**Contact address:**

Ing. Janka Koreňová, Department of Microbiology, Molecular biology and Biotechnology, Food Research Institute, Priemyselná 4, 824 75 Bratislava, korenova@vup.sk

doi: 10.5219/164

## MULTIVARIATE GEOGRAPHICAL CHARACTERISATION OF SLOVAK FRUIT DISTILLATES THROUGH MINERAL ELEMENTS PROFILE

*Mária Koreňovská, Milan Suhaj*

### ABSTRACT

Mg, Ca, Zn, Cu, K and Na were determined in some species of Slovakian fruit distillates by atomic absorption spectrometry with the aim to differentiate the spirit drinks according to geographical origin. Potassium, sodium and copper were found as markers with the highest concentrations and variability in the distillates, namely in the apricot and grape brandy. Using the multivariate statistics of principal component and canonical discriminant analysis enabled relative effective differentiation of samples according to their regional origin. Prediction ability of the model resulted in more than 80% of correctly classified samples of the fruit distillates into the relevant Slovakian regions.

**Keywords:** fruit distillate, mineral element, principal component analysis, discrimination

### ÚVOD

V súčasnosti sa spotrebitelia stávajú oveľa citlivejší k niektorým aspektom kvality potravín, ktoré súvisia s pestovateľskými metódami, spôsobom technológie výroby a tiež s deklarováním geografického pôvodu. Vysledovateľnosť potravinárskych výrobkov až do miesta pôvodu základných surovín i komponentov je základným faktorom a predpokladom bezpečnosti potravín. Nariadenie Európskeho parlamentu a Rady (ES) č. 110/2008 zo dňa 15. januára 2008 o definovaní, popise, prezentácii, označovaní a ochrane zemepisných označení sa vzťahuje na liehoviny. V tomto nariadení sú stanovené pravidlá na ochranu zemepisných označení liehovín (mali by sa registrovať zemepisné označenia, ktoré označujú liehoviny ako liehoviny pochádzajúce z územia krajiny, regiónu alebo lokality na tomto území, ak možno danú kvalitu, povest' alebo inú vlastnosť liehoviny zásadne pripísať zemepisnému pôvodu). Na zavedenie systémov vysledovania potravín v zmysle zákona o potravinách (Nariadenie EC 178/2002) sú požadované kontrolné mechanizmy a metódy, ktoré by okrem iného umožňovali overiť aj také špecifikácie výrobkov, ktoré by dokazovali ich pôvod z vymedzenej zemepisnej oblasti. Jednou z takýchto metód je aj metóda elementárnej analýzy, ktorá bola za posledných desať rokov najčastejšie využívaná na geografickú autentifikáciu liehovín a niektorých potravín.

Minerálny profil vybraných prvkov (Al, Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, Pb, S, Se, Si, Sn, Sr a Zn) bol použitý napríklad na charakterizáciu regionálnych rozdielov typickej brazílskej liehoviny z cukrovej trstiny „Caninha“ a porovnaný s inými cudzozemskými liehovinami (rum, whisky, koňak, vodka, brandy, tekila) (Mascimento et al., 1999; Fernandes et al., 2005). Porovnaním hladiny koncentrácie medi, zinku, vápnika a horčíka boli charakterizované whisky, gin, rum, brandy, víno a pivo vyrábané v Španielsku (Navarro et al., 2007). Chemometrická štúdia značkových španielskych anizových liehovín využila chemické deskriptory Zn, B, Fe, Mg, Ca, Na a Si (Jurado et al., 2005). Kokkinofta et al., (2003) stanovili 16 prvkov v alkoholických nápojoch (40 až 55 % alkoholu) z rôznych krajín a zistili, že Mg, Zn, a Cu sú najvhodnejšie markery autenticity tradičnej liehoviny vyrábanej na Cypre. Soufleros et al., (2004) publikovali poznatky o obsahu minerálnych prvkov

Fe, Ca, Cu a toxického Pb v tradičnom gréckom ovocnom destiláte „Mouro“. Pomocou štatistických metód a prvkových deskriptorov Na, K, Ca, S, Mg, Fe, Sr, Cu a Zn sa podarilo autorom Cebalos -Magana et al., (2009) rozlíšiť rôzne typy tekily (zlatá, strieborná, extra tekila a „mezcal“). Mexická tekila bola predmetom autentifikácie z hľadiska obsahu prvkov (Ag, As, Ba, Cd, Co, Cr, Cu, Hg, Mn, Mo, Ni, Pb, Sb, Se, Tl, V, Zn, Th, a U) a vybraných organických látok s cieľom rozlíšiť originálny výrobok od nepravých druhov (Flores et al., 2009). Na dôkaz pravosti škótskej whisky bola použitá koncentrácia 8 prvkov (Zn, Fe, Ni, Mg, Ca, Na, Cu Pb) a štatistická metóda zhlukovej analýzy (Adam et al., 2002). Pomocou koncentrácie medi, železa a zinku sa pokúsili Hernandez-Caraballo et al., (2008) o geografickú diferenciaciu typickej venezuelskej liehoviny „brandy z Cocuy“ vyrobenej v troch regiónoch krajiny. Širší prehľad poznatkov o minerálnych a stopových prvkoch v liehovinách (zdroje, koncentrácie, analytické metódy) bol publikovaný autormi Ibanez et al., (2008).

V našej práci sme sa zamerali na stanovenie koncentrácie prvkov Mg, Ca, Zn, Cu, K a Na v ovocných destilátoch vyrobených v páleniciach západoslovenského, stredoslovenského a východoslovenského kraja s cieľom ich diferencovania ako potenciálnych markerov geografického pôvodu. Na stanovenie obsahu vybraných prvkov bola použitá metóda atómovej absorpčnej spektrometrie. Na geografickú charakterizáciu sledovaných destilátov bola použitá multivariačná štatistika.

### MATERIÁL A METÓDY

Ovocné liehoviny od deklarovaných slovenských výrobcov (jablkovica 14 vz, hruškovica 7, marhuľovica 14, vínovica 7, slivovica 31, višňovica 3) boli poskytnuté Združením výrobcov liehu a destilátov na geografickú autentifikáciu. V týchto liehovinách sme stanovili koncentrácie prvkov Mg, Ca, Zn, Cu, K a Na v (mg.l<sup>-1</sup>) metódou AAS na plameni. Na meranie bol použitý atómový absorpčný spektrometer „PERKIN ELMER 4100“ (Norwalk, CT, USA) s horákom. Prístrojové podmienky merania sú uvedené v tabuľke 1.

**Tabuľka 1** Podmienky stanovenia prvkov v liehovinách na AAS –plameň

Prvok	Vlnova dĺžka [nm]	Prúd na výbojke [mA]	plyny	Meraný signál
Ca	422,7	15	C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> . air	AA
Cu	324,8	15	C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> . air	AA-BG
Mg	285,2	15	C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> . air	AA-BG
K	769,9	15	C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> . air	AA
Na	589,0	15	C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> . air	AA
Zn	213,9	25	C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> . air	AA-BG

Kalibračné pracovné roztoky sa pripravili z jednorvkových štandardných roztokov (vápnik, horčík, sodík, draslík, zinok a meď) s certifikovanou koncentráciou 1 g.l<sup>-1</sup> (fy Merck, Darmstadt, Germany). Na AAS stanovenie sa použili ionizačné tlmivé roztoky CsCl 99% Serva (New York, USA) a 50,0 g.l<sup>-1</sup>LaCl<sub>3</sub> v 2% HCl z SMÚ (Bratislava, Slovakia).

Príprava vzorky liehoviny na meranie: 1ml (alebo 2 ml) sa odpipetoval do 10 ml odmernej banky, pridal sa 1ml 1 mol.l<sup>-1</sup> kyseliny dusičnej a ionizačný tlmivý roztok (ak to bolo potrebné) a doplnil sa objem deionizovanou vodou po značku. Pri stanovovaní vápnika a horčíka sa pridal tlmivý ionizačný roztok 5 % LaCl<sub>3</sub> do odmerných baniek tak, aby výsledná koncentrácia bola 0,1 % LaCl<sub>3</sub>. Pri stanovovaní sodíka a draslíka sa do odmerných baniek pridal 2 % CsCl v takom množstve, aby výsledná koncentrácia v banke bola 0,5 % CsCl. Pri stanoveniach Cu a Zn sa tlmivé roztoky nepridávali.

Správnosť metódy sme potvrdili metódou výtlačnosti meraného prvku na dvoch koncentračných hladinách (0,1 mg.l<sup>-1</sup> a 0,5 mg.l<sup>-1</sup>). Analytické parametre (LD, LOQ, neistoty merania) a merané výtlačnosti metódy sú v tabuľke 2.

**Tabuľka 2** Analytické parametre (LD, LOQ, neistoty merania) a merané výtlačnosti metódy (R)

prvok	DL [mg.kg <sup>-1</sup> ]	LOQ [mg.kg <sup>-1</sup> ]	U <sub>A</sub> [%]	U <sub>B</sub> [%]	U <sub>C</sub> [%]	R [%]
Ca	0,030	0,100	3,34	5,95	6,82	96-105
Cu	0,004	0,010	0,8	6,9	6,95	99-106
Mg	0,030	0,090	1,22	3,26	3,48	95-104
K	0,020	0,060	0,54	10,3	10,3	98-99
Na	0,003	0,009	2,93	5,64	6,36	85-107
Zn	0,400	0,740	2,00	7,20	7,47	88-100

Analytické parametre: DL - detekčný limit, LOQ - medza stanovenia, U<sub>A</sub>- neistota merania typu A, U<sub>B</sub> -neistota merania typu B. U<sub>C</sub> - kombinovaná neistota merania.

Z multivariačných techník bola na štatistickú diferenciáciu vzoriek podľa obsahu minerálnych prvkov použitá technika hlavných komponentov a kanonickej diskriminačnej a klasifikačnej analýzy. Pre tieto účely bol využitý štatistický program Unistat v. 6.0 (Unistat, Londýn, Veľká Británia).

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

Výsledky stanovenia vybraných minerálnych prvkov v 6 druhoch ovocných destilátov pochádzajúcich z troch slovenských krajov sú uvedené v tabuľke 3. Tieto prvky ako markery pôvodu boli vybrané na základe vyššie

uvedených literárnych poznatkov. Hlavným zdrojom minerálnych látok v destilátoch je samotná ovocná fermentovaná matrica, riediaci voda a použité technologické zariadenie. Z uvedených výsledkov stanovenia vyplýva, že nájdené hladiny koncentrácie prvkov sú porovnateľné s údajmi v odbornej literatúre (Cebalos -Magana et al., 2009), pričom najvyšší obsah a jeho variabilita bola zistená v prípade minerálnych prvkov draslíka, sodíka a meďi.

Hlbšie informácie o geografických rozdieloch medzi jednotlivými druhmi ovocných destilátov nám poskytli metódy multivariačnej štatistiky. V príspevku graficky prezentujeme výsledky týkajúce sa vzoriek slivovice, ktoré predstavovali najpočetnejší súbor destilátov. Analýza obsahu minerálnych prvkov metódou hlavných komponentov vizualizuje vzorky slivovice na obrázku 1.

Pomocou dvoch hlavných komponentov, ktoré spolu vysvetľujú 56 % celkovej variability minerálnych prvkov sa pomerne dobre odlišili vzorky slivovice západoslovenského kraja (horná polovica grafu hlavných komponentov) od ostatných destilátov. Najväčší vplyv na túto diferenciáciu vzoriek mali prvky K a Na v prvej komponente a v druhej komponente Mg a Zn. Signifikantný bol aj vplyv Cu a Ca v tretej a štvrtej komponente.

Významnejšie krajové rozdiely, boli zistené kanonickej diskriminačnou analýzou, ktorá s 81 % úspešnosťou klasifikovala vzorky slivovice do predmetných slovenských oblastí pomocou dvoch diskriminačných funkcií, obrázok 2. Táto diferenciácia bola ovplyvnená najmä diskriminačným účinkom Mg a K v prvej diskriminačnej funkcii ako aj Ca a Cu v druhej funkcii. Pri testovaní predikčnej schopnosti kanonickej diskriminácie sme mali za cieľ rozlíšiť vzorky slivovice podľa krajov spôsobom, že časť vzoriek v danom modeli sme označili ako neznáme. V tomto prípade sa zistila 80 % správnosť klasifikácie vzoriek podobne ako pri testovaní rekognoskačnej schopnosti modelu.

V prípade ostatných ovocných destilátov kanonickej diskriminačnej analýzy klasifikovala vzorky podľa jednotlivých oblastí Slovenska s úspešnosťou 92,3 % v prípade marhuľovice a 85,7 % pri vzorkách jablkovice. Meď sa v oboch prípadoch prejavila ako veľmi účinný diskriminujúci marker. Vzhľadom na malý počet vzoriek v ostatných druhoch ovocných destilátov diskriminačnú analýzu nebolo možné uskutočniť.

## ZÁVER

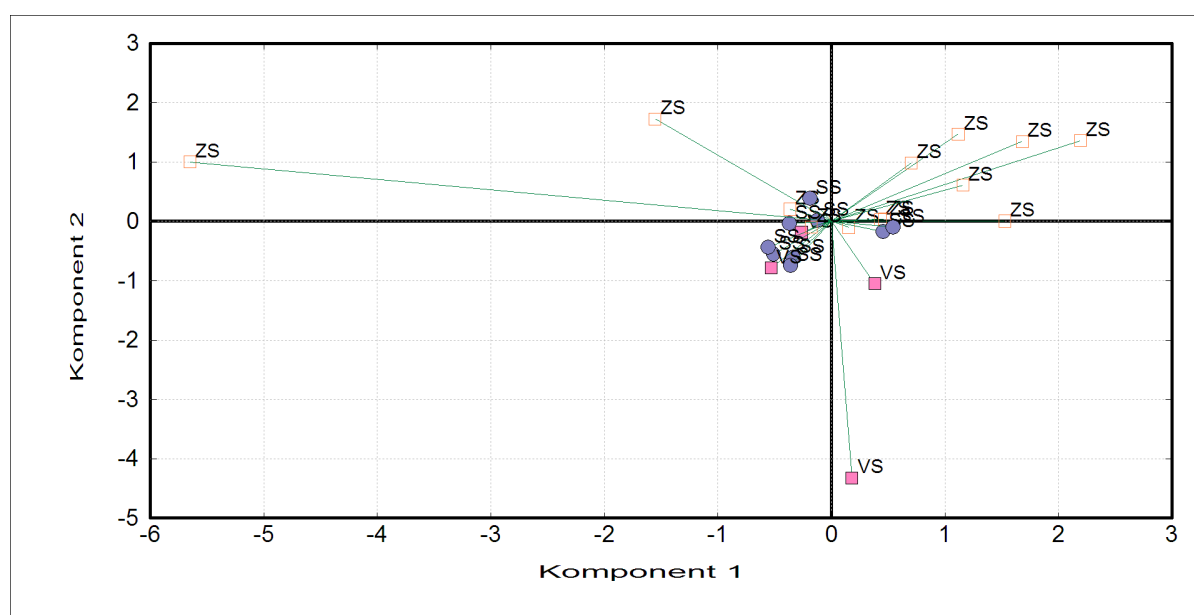
Na základe multivariačnej analýzy obsahu minerálnych prvkov v ovocných destilátoch sa potvrdilo, že Ca, Cu, K, Na, Mg a Zn sú pomerne účinné diskriminujúce markery diferencujúce vzorky podľa geografického pôvodu ako sa to uvádza v odborných publikáciách. V prípade slovenských destilátov sa dosiahla efektívna klasifikácia destilátov, ktorá v rámci validácie modelu v predikčnej procedúre dosiahla 80%. V ďalšej fáze riešenia tejto problematiky bude potrebné rozšíriť referenčné dáta destilátov aj o ďalšie druhy s jasne definovaným pôvodom.

## potravinárstvo

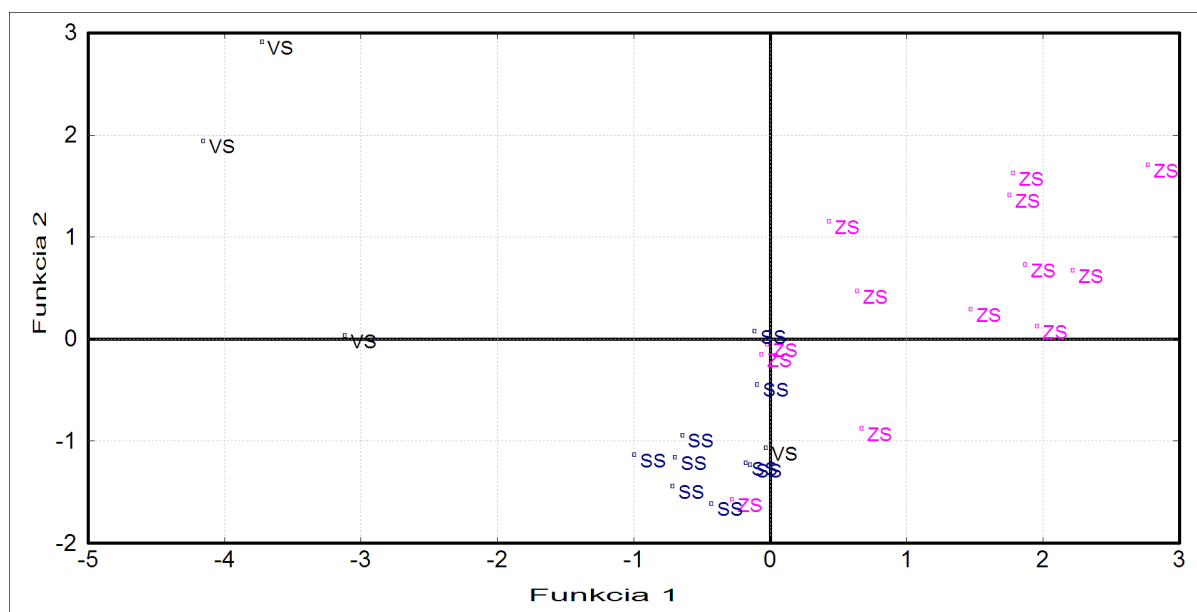
**Tabuľka 3** Porovnanie koncentrácie prvkov v ovocných liehovinách z páleníc západoslovenského (ZS), stredoslovenského (SS) a východoslovenského kraja (VS)

Druh liehoviny	Kraj	n*	Ca [mg.l <sup>-1</sup> ] X±s <sub>x</sub> min-max.	Cu [mg.l <sup>-1</sup> ] X±s <sub>x</sub> min-max	K [mg.l <sup>-1</sup> ] X±s <sub>x</sub> min-max	Mg [mg.l <sup>-1</sup> ] X±s <sub>x</sub> min-max	Na [mg.l <sup>-1</sup> ] X±s <sub>x</sub> min-max	Zn [mg.l <sup>-1</sup> ] X±s <sub>x</sub> min-max
Jablkovica	ZS	7	11,5±3,21 7,59-17,1	11,1±7,98 1,48-21,1	5,36±9,0 0,94-26,1	7,09±0,97 5,71-8,28	3,65±2,01 1,49-7,03	3,82±1,07 2,97-5,74
	SS	1	15,3	0,18	3,04	10,8	1,73	1,94
	VS	6	10,5±2,29 7,17-13,0	7,88±3,27 3,26-12,7	1,51±0,57 0,84-2,26	3,64±3,03 0,1-7,14	6,36±7,89 0,1-19,1	4,99±3,95 1,27-11,8
Hruškovica	ZS	5	12,5±4,97 7,92-18,8	12,4±7,65 6,2-25,7	5,71±9,17 1,31-22,1	9,16±5,38 5,06-17,5	6,41±7,18 2,1-19,1	3,14±0,43 2,72-3,78
	SS	1	8,28	0,87	1,62	5,58	2,34	2,58
	VS	1	8,12	7,34	2,67	6	3,21	1,81
Marhuľovica	ZS	9	14,6±6,05 7,14-25,6	10,9±11,7 0,20-25,5	15,9±39,0 2,16-120	9,38±4,06 5,19-15,7	9,57±11,7 2,61-38	3,13±1,25 1,28-4,76
	SS	1	17,9	3,86	3,27	6,4	6,31	4,89
	VS	4	11,8±1,56 10,1-13,2	24,2±20,9 0,1-37,2	0,87±0,16 0,77-1,05	0,10 0,10-0,10	0,31±0,37 0,10-0,74	7,36±5,03 1,9-11,8
Vínovica	ZS	2	11,2±0,90 10,3-12,1	9,33±1,68 7,65-11,0	4,21±1,85 2,36-6,05	9,77±0,63 9,14-10,4	7,55±1,21 6,34-8,76	3,75±0,35 3,4-4,1
	SS	2	8,18±1,18 7,0-9,35	0,48±0,1 0,39-0,56	3,12±0,05 3,07-3,17	4,67±0,46 4,21-5,11	3,41±0,28 3,13-3,68	3,54±0,20 3,34-3,73
	VS	3	7,76±3,40 3,93-10,4	12,9±10,8 5,41-25,3	63,4±56,8 3,13-116	7,71±6,98 0,10-13,8	5,78±2,31 3,66-8,25	3,40±1,64 2,15-5,26
Slivovica	ZS	15	12,6±5,06 5,34-21,8	10,2±17,1 0,10-69,6	4,44±8,88 0,37-36,4	6,73±4,15 0,10-13,0	7,96±11,5 0,10-37,5	3,11±1,01 1,61-5,06
	SS	10	8,32±2,22 5,78-12,9	7,16±4,71 0,36-14,1	1,56±0,35 1,03-2,06	5,39±1,24 4,08-8,03	3,94±2,63 0,87-9,47	3,37±0,96 1,84-4,58
	VS	6	13,3±4,68 9,10-18,3	9,03±8,44 0,31-18,6	1,55±1,28 0,62-3,44	1,47±2,74 0,10-5,57	0,7±1,2 0,10-2,50	5,36±4,39 2,45-11,9
Višňovica	ZS	2	16,4±9,8 6,69-26,2	0,24±0,12 0,12-0,35	2,96±0,34 2,62-3,29	8,79±4,02 4,77-12,8	21,9±14,9 7,06-36,9	1,80±0,39 1,40-2,19
	VS	1	11,2	32,4	1,43	0,10	0,10	0,10

\*n – počet vzoriek



**Obrázok 1** Geografické porovnanie slovenských slivovíc podľa koncentrácie makroelementov metódou hlavných komponentov (Kraje: ZS- západoslovenský, SS- stredoslovenský a VS- východoslovenský)



**Obrázok 2** Geografické porovnanie slovenských slivovic podľa koncentrácie makroelementov metódou kanonickej diskriminačnej analýzy (Kraje: ZS- západoslovenský, SS- stredoslovenský a VS- východoslovenský)

## LITERATÚRA

ADAM, T., DUTHIE, E., FELDMANN, J. 2002. Investigations into the use of copper and other metals as indicators for the authenticity of Scotch Whiskies. In *Journal of the Institute of Brewing*, vol.108, 2002, no.4, pp. 459-464.

CEBALOS-MAGANA, S. G., JURADO, J. M., MARTIN, M. J., PABLOS, F. 2009. Quantitation of Twelve Metals in Tequila and Mezcal Spirits as Authenticity Parameters. In *Journal Agriculture and Food Chemistry*, vol. 57, 2009, no.4, pp. 1372-1376.

FERNANDES, A. P., SANTOS, M. C., LEMOS, S. G., FERREIRA, M. C., NOGUEIRA, A. R. A., NÓBREGA, J. A. 2005. Pattern recognition applied to mineral characterization of Brazilian coffees and sugar-cane spirits. In *Spectrochimica Acta Part B*, vol. 60, 2005, pp. 717-724.

FLORES, C. R., FIQUEROA, J. A. L., WROBEL, K., WROBEL, K. 2009. ICP-MS multi-element profiles and HPLC determination of furanic compounds in commercial tequila. In *European Food Research and Technology*, vol. 228, 2009, no.6, pp. 951-958.

HERNANDEZ-CARABALLO, E. A., MÁVILA DE HERNÁNDEZ, R., RIVAS-ECHEVERRIA, F., CAPOTELUNA, T. 2008. Discrimination of Venezuelan spirituous beverages by a trace element-radial basis neural network approach. In *Talanta*, vol.74, 2008, no.4, pp. 871-878.

IBANEZ, J. G., CARREON-ALVAREZ, A., BARCENASOTO, M., CASILLAS, N. 2008. Metals in alcoholic beverages: A review of sources, effects, concentrations, removal, speciation and analysis. In *Journal of Food Composition and Analysis*, vol.21, 2008, pp. 672-683.

JURADO, J. M., ALCÁZAR, A., PABLOS, F., MARTIN, M. J., AND. GONZÁLEZ, A. G. 2005. In Classification of aniseed drinks by means of cluster, linear discriminant analysis and soft independent modelling of class analogy based on their Zn, B, Fe, Mg, Ca, Na and Si content. In *Talanta*, vol. 66, 2005, no. 5, pp. 1350-1354.

JURADO, J. M., MARTIN, M. J., PABLOS, F., MOREDA-PIÑEIRO, A., BERMEJO-BARRERA, P. 2007. Direct determination of copper, lead and cadmium in aniseed spirits by electrothermal atomic absorption spectrometry. In *Food Chemistry*, vol.101, 2007, pp. 1296-1304.

KOKKINOFTA, R., PETRAKIS, P. V., MAVROMOUSTAKOS, T., THEOCHARIS, CH. R. 2003. Authenticity of the traditional Cypriot spirit zivania on the basis of metal content using a combination of coupled plasma spectroscopy and statistical analysis. In *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 51, 2003, no. 21 pp. 6233-6239.

NASCIMENTO, R. F., BEZERRA, C. W. B., FURUAYA, S. M. B., SCHULTZ, LISANIAS M. S., POLASTRO, R., LIMA NETO, B. S., FRANCO, D.W. 1999. Mineral profile of Brazilian Cachacas and other International spirits. In *Journal of Food Composition and Analysis*, vol. 12, 1999, p. 17-25.

NAVARRO-ALERCON, M., VELASCO, C., JODRAL, A., TERRÉS, C., OLALLA, M., LOPEZ, H., LOPEZ, M. C. 2007. Copper, zinc, calcium and magnesium content of alcoholic content of alcoholic beverages and by products from Spain: Nutrition supply. In *Food Additives and Contaminants*, vol. 24, 2007, no. 7, pp.685-694.

SOUFLEROS, E. H., MYGDALIA, A. S., NATSKOULIS, P. 2004. Characterization and safety evaluation of the traditional Greek fruit distillate „Mauro“ by flavor compounds and mineral analysis. In *Food Chemistry*, vol.86, 2004, pp. 625-636.

### Acknowledgments:

This work is a part of national research project No. 2/PVV supported by the Ministry of Agriculture and Rural Development of the Slovak Republic. Association of the Slovak Producers of Spirits and Distillates is gratefully acknowledged for some free samples provision.

### Contact address:

Mária Koreňovská, Department of Chemistry and Food Analysis, Food Research Institute, Priemyselná 4, 824 75 Bratislava, Slovakia, E-mail: maria.korenovska@vup.sk

Milan Suhaj, Department of Chemistry and Food Analysis, Food Research Institute, Priemyselná 4, 824 75 Bratislava, Slovakia, E-mail: suhaj@vup.sk



**ENTEROCOCCI AND THEIR ABILITY LIVE OUT ACTIVITY OF SANITATION DETERGENTS***Monika Lavová, Viera Ducková, Margita Čanigová, Miroslav Kročko***ABSTRACT**

We evaluated the effect of temperature decrease of sanitation solutions (35 °C) in condition of organic load (1% reconstituted powdered milk) and varying hardness of the water used for solution preparation (0 °, 15 °, 30 ° and 45 °) on the ability to randomly selected strains of enterococci survive exposure to acidic and alkaline sanitation solution (0.5% concentration, contact time 15 minutes) in model experiments. Increasing water hardness also increases the number surviving enterococci. Presence of organic loads and lower temperatures decreased the sanitation effect of the test solutions. The tested strains showed different tolerances to applied sanitation solutions. We found a weaker powerful of acid sanitation solution on base phosphoric acid after its application.

**Keywords:** *Enterococcus, contamination, resistance, sanitation detergent, primary production of milk*

---

**ÚVOD**

Zlé hygienické podmienky praxe pri výrobe mlieka môžu mať za následok nebezpečné výrobky. Prítomnosť mikroorganizmov, ako sú pôvodcovia zoonóz v mlieku, by mohla predstavovať riziko pre verejné zdravie (Vilar et al., 2011). Mnohokrát bolo zistené, že mlieko je zdrojom chorôb, ktoré sú prenášané potravinami, hoci bolo pasterizované (Gran et al., 2002).

Vzhľadom na svoje zloženie a vlastnosti je mlieko ideálnym substrátom pre široké spektrum mikroorganizmov. Sekundárna kontaminácia mlieka, ktorá nastáva po jeho vydojení z vemena, môže mať rôzne zdroje - fekálie, podstielku, krmivo, prach, ale aj nedostatočne sanitované stroje a zariadenia, s ktorými mlieko prichádza do kontaktu (Laktičová et al., 2006), voda, ruky a odev dojičov (Fabianová et al., 2010). Použitie účinných čistiacich a dezinfekčných prostriedkov voči mikroorganizmom minimalizuje kontamináciu produktu, zvyšuje trvanlivosť a znižuje riziko alimentárnych ochorení (Wirtanen a Salo, 2003). Efektívna sanitácia sa skladá zo sérií oplachovaní, umývaní, aplikácie sanitačných prostriedkov s účinnou koncentráciou pri vhodných teplotách a záverečnej fázy sušenia (Wirtanen et al., 2002).

Účinnosť sanitácie v mliekarenskom podniku môže byť negatívne ovplyvnená okrem iného aj prítomnosťou enterokokov, keďže jednou z ich charakteristických schopností je ich schopnosť tvoriť biofilm (Tendolkar et al., 2004). Enterokoky sú časť dominantnej mikroflóry niektorých mliečnych produktov (Mannu et al., 2003). Svojou proteolytickou, peptidolytickou, lipolytickou, esterázovou, oksylujúcou aktivitou a citrátovým a pyruvátovým metabolizmom sa podieľajú na tvorbe charakteristických chuťových zložiek týchto potravín (Foulquié Moreno et al., 2006). Sú to mikroorganizmy, ktoré prirodzene kontaminujú mlieko po jeho schladení a dokážu prežiť aj záchrev (Giraffa, 2003). Používajú sa ako indikátory fekálnej kontaminácie (Jurkovič et al., 2007) a ako indikátory hygieny výrobných liniek mliečnych výrobkov, pretože dokážu prežiť nepriaznivé podmienky prostredia (O'Briena et al., 2004). Do surového mlieka sa môžu dostať z viacerých zdrojov

primárnej alebo sekundárnej kontaminácie. Pravidelne sa nachádzajú v dojacích strojoch alebo na inom náradí a zariadení (Fabianová et al., 2010). Enterokoky sú považované za závažné nozokomiálne patogény spôsobujúce bakterémiu, endokarditídy, infekcie močových ciest (Hadji-Sfaxi et al., 2011), krvného obehu, brucha, žlčových ciest a popálenín (Domig et al., 2003) a majú schopnosť produkovať biogénne amíny (Foulquié Moreno et al., 2006). To kladie vysoké nároky na proces sanitácie technologických zariadení ako v prvovýrobe, tak aj pri jeho mliekarenskom ošetrovaní a spracovaní (Krebs-Artimová et al., 2010).

Cieľom práce bolo v modelových pokusoch otestovať účinnosť alkalického a kyslého sanitačného prostriedku bežne používaných v prvovýrobe za rôznych podmienok na prežívanie náhodne vybraných kmeňov enterokokov. Tieto boli izolované z oplachových vôd po sanitácii dojacích zariadení vo vybraných poľnohospodárskych podnikoch. Sledoval sa vplyv rôznej tvrdosti vody pri zníženej teplote sanitačných roztokov a v prítomnosti organickej záťaž na uvedenú skupinu mikroorganizmov

**MATERIÁL A METÓDY***Príprava bakteriálnej suspenzie*

Pre modelové pokusy sa použilo 8 náhodne vybraných identifikovaných kmeňov enterokokov, ktoré sa izolovali z posledného oplachu dojacieho okruhu po sanitácii v dvoch vybraných poľnohospodárskych podnikoch. Z 24 hodinových bakteriálnych kultúr vyrastených na glukózo-tryptónovom agare (HiMedia Laboratories, India) pri

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

Príprava sanitačných roztokov

Sanitačné roztoky sa pripravovali rozpustením prostriedkov v destilovanej vode (tvrdosť vody 0°) a v destilovanej vode, do ktorej sa pridalo 15 mg, 30 mg a 45 mg CaCO<sub>3</sub> na 100 ml vody (tvrdosť vody 15°, 30° a 45°). Testovali sa sanitačné roztoky s koncentráciou 0,75 % pri teplote 35 °C a dobou pôsobenia 15 minút.

Testovanie účinnosti roztokov

K čerstvo pripraveným a vytemperovaným sanitačným roztokom pripraveným z vody s rôznou tvrdosťou a s organickou záťažou (1 % obnoveného sušeného mlieka) sa pridala pripravená pracovná suspenzia enterokokov. Po premiešaní sa nechali skúmavky vo vodnom kúpeli pri príslušnej teplote stanovenú dobu 15 minút, následne sa vyočkovali na Petriho misky a zaliali žlč-eskulín azidovým agarom (*Biokar Diagnostic*, Francúzsko). Kultivácia prebiehala pri 37 ± 1 °C po dobu 24 hodín.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Súčasťou alkalického sanitačného prostriedku bol chlórnan sodný. Mechanizmus antimikrobiálneho účinku organických i anorganických zlúčenín s aktívnym chlórrom je založený na chemickej reakcii s biomolekulami, a to na chlorácii peptidickej väzby bielkovín alebo na oxidácii enzýmov. Účinok na bunkové a nebunkové mikroorganizmy je nezvratný, na tieto prípravky nevzniká rezistencia a k usmrteniu mikroorganizmov dochádza v priebehu niekoľkých minút. Tým možno vysvetliť vyššiu účinnosť alkalického sanitačného prostriedku v porovnaní s kyslým prostriedkom, ktorý bol na báze kyseliny fosforečnej, ktorá spôsobuje deštrukciu biomolekúl v dôsledku vysokej koncentrácie H<sup>+</sup> iónov (Volná, 1999).

Percentá enterokokov prežívajúcich pôsobenie alkalického sanitačného roztoku sú uvedené v tabuľke 1 a kyslého sanitačného roztoku v tabuľke 2. Z tabuliek vyplýva, že jednotlivé kmene enterokokov prejavili rôznu toleranciu k sanitačným roztokom. Prežívanie enterokokov podporila rastúca tvrdosť vody. Nedodržanie niektorého z faktorov sanitácie podporuje vo všeobecnosti prežívanie mikroorganizmov. K týmto faktorom možno zaradiť nedodržanie odporúčanej teploty sanitačného roztoku. **Salo et al. (2006)** uvádzajú, že zhoršenie úrovne čistenia v mliekarniach súvisí zväčša s poklesom teploty čistiacej vody pod 50 °C a podobne aj **Feldmann et al. (2006)** zaznamenali, že pokles teploty oplachovej vody pod 42 °C viedol k zvýšeniu kontaminácie dojacieho zariadenia koliformnými baktériami a rodom *Pseudomonas* spp. Okrem spomínaného nedodržania teploty sanitačného roztoku, ďalšími rizikovými faktormi, ako to vidieť i z našich výsledkov, je prítomnosť organickej záťaže v sanitovanom prostredí a používanie tvrdej vody na prípravu sanitačných roztokov. **Fabianová et al. (2011)** testovali účinnosť vybraných kmeňov enterokokov voči sanitačným roztokom. Zistili, že roztoky boli účinné aj pri 40 °C a 30 °C a v prostredí organickej a anorganickej záťaže. Výnimku však predstavoval kmeň *Enterococcus faecalis* 53, ktorý prežil podmienky sanitácie. **Čanigová et al. (2004)** vo svojom výskume zistili, že znižovanie teploty sanitačných roztokov na 40 °C vedie k znižovaniu mikrobiálneho účinku kyslých prostriedkov. Účinok kyslých a zásaditých roztokov sa pri tejto teplote znižuje so zvyšujúcou sa koncentráciou organickej záťaže.

Tab. 1 Počet enterokokov, ktoré preživali pôsobenie alkalického sanitačného roztoku (koncentrácia 0,75 %, doba pôsobenia 15 minút, teplota 35 °C), v prítomnosti organickej záťaže (1 % mlieka) a rôznej tvrdosti vody, vyjadrený v %

Kmene enterokokov	Tvrdosť vody / Prežívanie mikroorganizmov [%]			
	0°	15°	30°	45°
<i>Enterococcus faecalis</i> A	62,22	80,89	100	100
<i>Enterococcus faecalis</i> B	1,78	14,54	22,00	100
<i>Enterococcus mundii</i>	1,00	7,023	18,53	35,00
<i>Enterococcus faecium</i> A	3,52	28,31	28,70	37,01
<i>Enterococcus faecium</i> B	7,71	20,86	37,43	40,29
<i>Enterococcus faecalis</i> C	0	0	0	0
<i>Enterococcus faecalis</i> D	66,35	100	100	100
<i>Enterococcus faecalis</i> E	22,85	23,49	44,61	52,37

Tab. 2 Počet enterokokov, ktoré preživali pôsobenie kyslého sanitačného roztoku (koncentrácia 0,75 %, doba pôsobenia 15 minút, teplota 35 °C), v prítomnosti organickej záťaže (1 % mlieka) a rôznej tvrdosti vody, vyjadrený v %

Kmene enterokokov	Tvrdosť vody / Prežívanie mikroorganizmov [%]			
	0°	15°	30°	45°
<i>Enterococcus faecalis</i> A	97,78	100	100	100
<i>Enterococcus faecalis</i> B	1,35	46,60	68,00	88,00
<i>Enterococcus mundii</i>	26,18	30,88	31,47	46,77
<i>Enterococcus faecium</i> A	28,31	98,74	80,52	80,52
<i>Enterococcus faecium</i> B	42,29	44,29	52,29	75,14
<i>Enterococcus faecalis</i> C	3,22	52,36	53,64	100
<i>Enterococcus faecalis</i> D	100	100	100	100
<i>Enterococcus faecalis</i> E	35,78	64,64	64,66	75,43

Vplyv týchto faktorov na účinnosť 6 rôznych dezinfekčných prostriedkov potvrdili v rámci laboratórných pokusov aj **Wirtanen et al. (1997)**. Vyššia

koncentrácia organickej záťaže redukovala účinok väčšiny testovaných dezinfekčných prostriedkov, ale v rôznom stupni. Medzi testovanými mikroorganizmami bol i *Enterococcus faecium*, ktorý bol z daných mikroorganizmov najcitlivejší. Naopak relatívne nízky vplyv organického materiálu na aktivitu dezinfekčného prostriedku Umonium 38 na testované baktérie (vrátane *Enterococcus hirae*) uvádzajú Raffo et al. (2007).

## ZÁVER

Na základe výsledkov modelových pokusov môžeme konštatovať, že účinnosť kyslého sanitačného roztoku na báze kyseliny fosforečnej bola v porovnaní s alkalickým sanitačným roztokom na báze chlóru nižšia. Tiež možno konštatovať, že nedodržanie odporúčanej teploty roztokov pri sanitácii, prítomnosť organickej záťaže a rovnako aj tvrdosť používanej vody sú faktory, ktoré znižujú účinnosť sanitačných roztokov a umožňujú v rôznej intenzite prežívanie enterokokov.

## LITERATÚRA

ČANIGOVÁ, M., HEGEDŮSOVÁ, A., DUCKOVÁ, V. 2004. Testing the effect of sanitary detergents on psychrophilic bacteria isolated from milk. In *Hungarian Veterinary Journal*, vol. 126, 2004, no. 12, p. 761-764.

DOMIG, K. J., MAYER, H. K., KNEIFEL, W. 2003. Methods used for the isolation, enumeration, characterisation and identification of *Enterococcus* spp.: 1. Media for isolation and enumeration. In *International Journal of Food Microbiology*, vol. 88, 2003, no. 2-3, p. 147-164.

FABIANOVÁ, J., DUCKOVÁ, V., ČANIGOVÁ, M., KROČKO, M. 2010. Presence of *Enterococci* in cow milk and their antibiotic resistance. In *Potravinárstvo*, vol. 4, 2010, no. 2, p. 17-21.

FABIANOVÁ, J., DUCKOVÁ, V., ČANIGOVÁ, M., KROČKO, M., GÁBOR, M. 2011. In vitro testing of sanitary solutions effect for the enterococci survival. In *Potravinárstvo*, vol. 5, special issue, 2010, p. 123-128.

FOULQUIÉ MORENO, M. R., SARANTINOPOULOS, P., TSAKALIDOU, E., DE VUYST, L. 2006. The role and application of enterococci in food and health. In *International Journal of Food Microbiology*, vol. 106, 2006, no. 1, p. 1-24.

FELDMANN, M., ZIMMERMANN, A., HOEDEMAEKER, M. 2006. Influence of milking technique, milking hygiene and environment on microbial contamination of milking machine. In *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift*, vol. 113, 2006, no. 7, p. 274-281.

GIRAFFA, G. 2003. Functionality of enterococci in dairy products. In *International Journal of Food Microbiology*, vol. 88, 2003, p. 215-222.

GRAN, H. N., MUTUKUMIRA, A. N., WETLESEN, A., NARVHUS, J. N. 2002. Smallholder dairy processing in Zimbabwe: hygienic practices during milking and the microbiological quality of the milk at the farm and on delivery. In *Food Control*, vol. 13, 2002, no. 1, p. 41-47.

HADJI-SFAXI, I., EL-GHAISH, S., AHMADOVA, A., BATDORJ, B., LE BLAY-LALIBERTÉ, G., BARBIER, G., HAERTLÉ, T., CHOBERT, J.M. 2011. Antimicrobial activity and safety of use of *Enterococcus faecium* PC4.1 isolated from Mongol yogurt. In *Food Control*, vol. 22, 2011, no. 12, p. 2020-2027.

JURKOVIČ, D., KRIŽKOVÁ, L., SOJKA, M., TAKÁČOVÁ, M., DUŠINSKÝ, R., KRAJČOVIČ, J., VANDAMME, P., VANCANNEYT, M. 2007. Genetic diversity of *Enterococcus faecium* isolated from Bryndza cheese. In *International Journal of Food Microbiology*, vol. 116, 2007, no. 1, p. 82-87.

KREBS-ARTIMOVÁ, A., KROČKO, M., DUCKOVÁ, V., ČANIGOVÁ, M. 2010. Testovanie účinnosti sanitačných prostriedkov na enterokoky. In *Potravinárstvo*, vol. 4, 2010, no. 1, p. 35-38.

LAKTIČOVÁ, K., ONDRAŠOVIČ, M., ONDRAŠOVIČOVÁ, O., SASÁKOVÁ, N., VARGOVÁ, M., ŠMIRJÁKOVÁ, S., JURÍŠ, P. 2006. Čistenie a dezinfekcia v potravinárskom priemysle. In *Slovenský veterinársky časopis*, 2006, no. 3, p. 150-152.

MANNU, L., PABA, A., DAGA, E., COMUNIAN, R., ZANETTI, S., DUPRÉ, L., SECHI, L.A. 2003. Comparison of the incidence of virulence determinants and antibiotic resistance between *Enterococcus faecium* strains of dairy, animal and clinical origin. In *International Journal of Food Microbiology*, vol. 88, 2003, no. 2-3, p. 291-304.

O'BRIENA, S. S., LINDSAY, D., VON HOLY, A. 2004. The presence of *Enterococcus*, coliforms and *E. coli* in a commercial yeast manufacturing process. In *International Journal of Food Microbiology*, vol. 94, 2004, no. 1, p. 23-31.

RAFFO, P., SALLIEZ, A. C., COLLIGNON, C. 2007. Antimicrobial activity of formulation for the low temperature disinfection of critical and semi-critical medical equipment and surface. In *New Microbiologica*, vol. 30, 2007, no. 4, p. 274-281.

SALO, S., EHAVALD, H., RAASKA, L., VOKK, R., WIRTANEN, G. 2006. Microbial surveys in Estonian dairies. In *LWT - Food Science and Technology*, vol. 39, 2006, p. 460-471.

TENDOLKAR, P. M., BAGHDAYEAN, A. S., GILMORE, M. S., SHANKAR, N. 2004. Enterococcal surface protein, Esp, enhances biofilm formation by *Enterococcus faecalis*. In *Infection Immunology*, vol. 72, 2004, no. 10, p. 6032-6039.

VOLNÁ, F. 1999. *Dezinfekcia a sterilizácia - teória a prax*. 1. vyd. Žilina: Vrana, s.r.o., 1999, 188 p.

VILAR, M. J., RODRÍGUEZ-OTERO, J. L., SANJUÁN, J. L., DIÉGUEZ, F. J., VARELA, M., YUS, E. 2011. Implementation of HACCP to control the influence of milking equipment and cooling tank on the milk quality. In *Trends in Food Science & Technology*, 2011, In press.

WIRTANEN, G., SALO, S., MANKONEN, J. 1997. *Nordfood. Sanitation in dairies. Espoo Technical Research Center of Finland*, VTT Publications 302, 1997, 47 p.

WIRTANEN, G., SALO, S. 2003. Disinfection in food processing – efficacy testing of disinfectants. In *Reviews in Environmental Science and Bio-Technology*, 2003 p. 293-306.

WIRTANEN, G., LANGSRUD, S., SALO, S., OLOFSON, U., ALNÅS, H., NEUMAN, M., HOMLEID, J. P., MATTILA-SANDHOLM, T. 2002. *Evaluation of sanitation procedures for use in dairies*. VTT Publications 481, 2002, 96 p.

## Acknowledgments:

This work was supported by grant VEGA no. 1/0410/09

## Contact address:

Ing. Monika Lavová, Department for Evaluation and Processing of Animal Products, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Slovak Agricultural University in Nitra, Tr. A. Hlinku 949 76 Nitra, Slovakia, E-mail: monika.lavova@gmail.com

Ing. Viera Ducková, PhD., Department for Evaluation and Processing of Animal Products, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Slovak Agricultural University in Nitra, Tr. A. Hlinku 949 76 Nitra, Slovakia, E-mail: viera.duckova@uniag.sk

doc. Margita Čanigová, CSc., Department for Evaluation and Processing of Animal Products, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Slovak Agricultural University in Nitra, Tr. A. Hlinku 949 76 Nitra, Slovakia, E-mail: margita.canigova@uniag.sk

Ing. Miroslav Kročko, PhD., Department for Evaluation and Processing of Animal Products, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Slovak Agricultural University in Nitra, Tr. A. Hlinku 949 76 Nitra, Slovakia, E-mail: mirokrocko@yahoo.com

## MONITORING OF GENETIC DIVERSITY IN FARMED DEER POPULATIONS USING MICROSATELLITE MARKERS

Lenka Maršáľková, Ľubomír Belej, Pavol Bajzík, Jaroslav Pokorádi

### ABSTRACT

Deer (Cervidae) belong to the most important species used as farmed animals. We focused on assessing the genetic diversity among five deer populations. Analysis has been performed on a total of 183 animals originating from Czech Republic, Hungary, New Zealand, Poland and Slovak Republic. Genetic variability were investigated using 8 microsatellite markers used in deer. Statistical data of all populations we obtained on the basis of Nei statistics, using by POWERMARKER 3.23 programme. Graphical view of relationships among populations and individuals in the populations was obtained using the Dendroscope software. Molecular genetic data combined with evaluation in statistical programmes could lead to a complex view of populations and differences among them.

**Keywords:** genetic variability, microsatellite markers, Red deer

### ÚVOD

Jelenia zver (*Cervidae*) je v súčasnej dobe jedným zo zaujímavých živočíšnych druhov chovaných na farmách, ale využívaná aj ako divo- žijúca lovná zver. Strata genetickej diverzity bola pozorovaná u všetkých druhov, ktoré sa využívajú ako farmové zvieratá. Od 80-tych rokov sa využívajú genetické markery založené na variabilite DNA, čo umožňuje identifikáciu populácií ale taktiež jedincov medzi sebou (Poetsch et al., 2001). Použitie mikrosatelitných markerov na vyhodnocovanie genetickej diverzity a príbuznosti medzi jednotlivými populáciami je zdokumentované v mnohých štúdiách (Xu Yan-chun et al. 2001). Práca vychádzajúca z mikrosatelitných markerov hodnotiaca premiešanie populácie jeleňov a nerovnováhu v sledovanej skupine bola popísaná v práci Slate et al. (2007). Biodiverzitu Francúzskej populácie popísali Frantz et al. (2008). Nízka genetická diverzita môže vzniknúť ako následok rapidnej redukcie zvierat, ako aj introdukcie skupiny zvierat do novej lokality. Znížená diverzita sa prejavuje hlavne redukciami počtu alel a zníženou hodnotou heterozygotity (Webley et al., 2007). Súčasný vývoj molekulárnej biológie a štatistiky umožňuje identifikáciu a využitie genomickej variácie. Rôzne štatistické programy využívajúce genetické údaje boli vyvinuté na hodnotenie príbuznosti medzi populáciami. Cieľom tejto práce bolo vyhodnotiť genetickú variabilitu medzi piatimi, rôzne veľkými, populáciami farmových jeleňov.

### MATERIÁL A METÓDY

DNA bola izolovaná z chlpových cibuliek z celkového počtu 183 farmových jeleňov pochádzajúcich z Českej republiky (50), Maďarska (30), Nového Zélandu (45), Poľska (45) a Slovenskej republiky (13). Ako zdroj DNA sme používali bunkový lyzát. V modifikovanom PCR multiplexe podľa Ernsta (2008) bolo použitých 8 mikrosatelitných markerov. Mastermix obsahoval 1 µl lyzátu; 1,2x Go Taq® Hot Pufor (Promega, Medison USA); 0,34 mM dNTP (Applied Biosystems); 1,8 mM MgCl<sub>2</sub> (Promega, Medison USA); 0,5 U GoTaq® Hot Start Polymeráza (Promega, Medison USA); 3% DMSO, rôzne koncentrácie primerov (80 - 400 nM) a

redestilovanú vodu doplnenú do objemu 10 µl. PCR reakcia prebiehala na prístroji PTC-150 Minicycler™ v krokoch: predinkubácia pri 95°C, 5 min.; 30 cyklov pozostávajúcich z denaturácie (95°C, 30 s.), aneling (59°C, 90 s.) a extenzie (72°C, 90 s.), záverečná extenzia pri 72°C, 1 min. a chladenie na 15°C (1s.). Fragmentyčná analýza PCR produktov prebiehala pomocou prístroja ABI Prism® 310 Genetic Analyzer (AppliedBiosystems) a genotypy jedincov boli vyhodnotené softvérom Genemapper. Genetická diverzita populácií bola vyhodnotená pomocou Nei (1983) štatistiky v programe POWERMARKER 3.23 (Liu and Muse, 2005) - počet alel (NA), počet genotypov, pozorovaná (Ho) a očakávaná heterozygotita (He) a Hardy-Weibergová rovnováha (HWE). Dendrogramy boli zostrojené pomocou softvéru Dendroscope (Huson et al., 2007).

**Tabuľka 1** Zoznam primerov, farbička používaná pri fragmentačnej analýze, sekvencia primerov

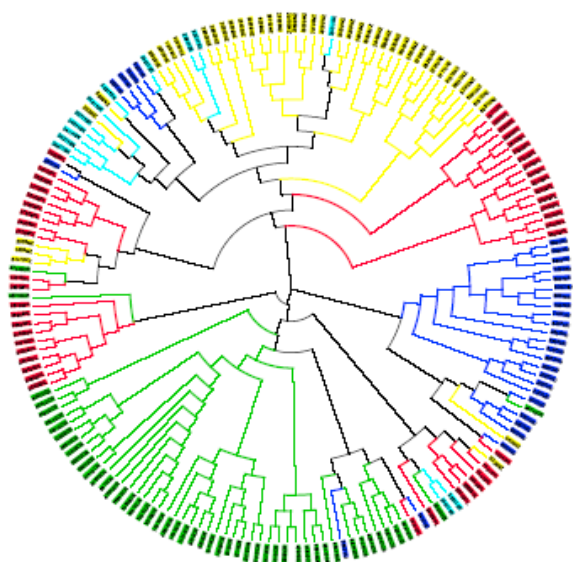
<b>BM888</b>	VIC – ACTAGGAGGCCATATAGGAGGC// AGCTCAAACGAGGGACAGGG (Talbot et al., 1996)
<b>OarFCB5</b>	6FAM - AAGTTAATTTTCTGGCTGGAAA ACCCAG//ACCTGACCCTTACTCTCTTC ACTC (Buchanan et al., 1994)
<b>RM188</b>	VIC – GCACTATTGGGCTGGTGATT// GGTTCACAAAGAGCTGGAC (Barendse et al., 1994)
<b>RT1</b>	VIC-CATATGGCTAACTACCTAGCTTG CC//GAGTCCCAAAGATTTTCAGCCCTAC (Wilson et al., 1997)
<b>RT13</b>	NED – GCCCAGTGTTAGGAAAGAAGA// CATCCAGAACAGGAGTGAG (Wilson, et al., 1997)
<b>T26</b>	6FAM – TGCCATAGTTTTTCTACCTTC// GAAGTTCCAATAGACACGCTC (Jones et al., 2002)
<b>T156</b>	6FAM – ATGAATACCCAGTCTTGTCTG// TCTTCCTGACCTGIGTCTTG (Jones et al., 2002)
<b>T501</b>	PET – CTCCTCATTATTACCCTGTGA ACATGCTTTGACCAAGACCC (Jones et al., 2002)

VÝSLEDKY A DISKUSIA

V našej práci sme hodnotili genetickú variabilitu medzi populáciami farmových jeleňov pochádzajúcich z piatich krajín. Celkovo sme pozorovali 140 alel v 8 mikrosatelitných lokusoch. Počet alel na lokus sa nachádzal v rozmedzí od 12 (RM188, T501) do 27 (RT13) s priemerným počtom 17,5. Môžeme konštatovať že zvolené mikrosatelitné markery sú polymorfnejšie ako markery publikované v práci **Židek et al. (2011)** s priemerným počtom alel 11,5. He na lokus u všetkých populácií sa nachádzal v rozmedzí 0,714 (RT1) a 0,912 (RT13), v priemere 0,846 (Tab. 2.). Hodnota Ho na lokus sa nachádzala v rozmedzí 0,628 (RT13) a 0,857 (OarFCB5). Tieto hodnoty sú porovnateľné s najnižšou a najvyššou hodnotou Ho uvedenými v práci **Židek et al. (2007)**. Priemerná hodnota Ho je 0,743 a je porovnateľné s priemernou hodnotou Ho na lokus v práci **Perez-Espona et al. (2008)**. Keďže je hodnota Ho v lokuse RT13 malá v pomere k počtu genotypov, môžeme uvažovať, že tu dochádza k určitej fixácii alel.

Tabuľka 2 P<0,001 vo všetkých lokusoch

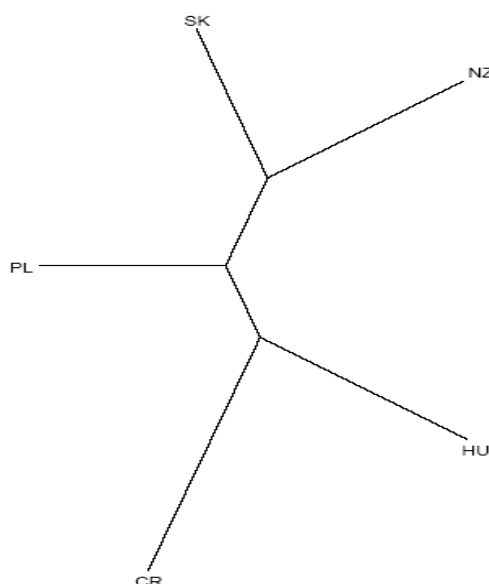
Marker	počet genotypov	počet alel	He	Ho
OarFCB5	51	13	0.881	0.857
T156	59	20	0.879	0.771
BM888	68	24	0.881	0.836
RT1	37	17	0.714	0.644
RT13	75	27	0.912	0.628
T501	42	12	0.822	0.732
T26	46	15	0.865	0.711
RM188	38	12	0.815	0.771
Mean	52	17.5	0.846	0.743



**Obrázok 1** Matica genetických vzdialeností je vyráтанá na základe pozorovanej alelovej frekvencie jedincov. SK (tyrkysová), HU (modrá), CR (zelená), NZ (žltá), PL (červená).

Obrázok 1 je detailnejším zobrazením populácií a predstavuje vzájomné premiešanie populácií. Každá vetva na grafe predstavuje jedinca. Dendrogram je rozdelený do štyroch hlavných vetiev. Česká populácia (zelená) sa nachádza na samostatnej vetve a je najmenej premiešaná. maďarská populácia (modrá) sa nachádza taktiež na samostatnej vetve blízko českej populácie.

Jedinci poľskej populácie sú rozdelený do viacerých vetiev a nachádzajú sa prevažne na jednej hlavnej vetve spolu so slovenskou (tyrkysová) a novozélandskou (žltá) populáciou. Štvrtú vetvu tvorí malá skupina poľských jedincov. Všetky populácie vytvárajú samostatné zhluky jedincov až na poľskú populáciu.



**Obrázok 2** Genetické vzdialenosti medzi populáciami boli vypočítané z priemernej frekvencie alel u všetkých jedincov v populácii.

Obrázok 2 je grafickým zobrazením genetických vzdialeností medzi všetkými piatimi populáciami. Slovenská a Novozélandská populácia majú navzájom menšiu genetickú vzdialenosť a vytvárajú prvú skupinu. K nim najvzdialenejšia je populácia Z Čiech, ku ktorej je priradená Maďarská populácia. Medzi týmito dvomi skupinami sa nachádza Poľská populácia, ktorá má približne rovnakú genetickú vzdialenosť od oboch skupín.

ZÁVER

Genetická variabilita bola vyhodnotená u piatich populácií farmových jeleňov pochádzajúcich zo Slovenska, Maďarska, Českej Republiky, Nového Zélandu a Poľska. Môžeme skonštatovať, že vybrané mikrosatelity sú dostatočne polymorfne a vhodné na analýzy tohto



druhu. Genetickú diverzitu a premiešanie jedincov sme vizualizovali pomocou dendrogramov na ktorých môžeme vidieť, že jedinci z daných populácií majú tendenciu vytvárať samostatné zhluky. Výsledky poukazujú na genetickú ustálenosť jednotlivých skupín zvierat. Na základe výsledkov môžeme taktiež konštatovať, že jednotlivé populácie majú dostatočné genetické vzdialenosti. Molekulárno-genetické údaje a ich vyhodnotenie pomocou štatistických programov nám umožňujú komplexný pohľad na populácie.

## LITERATÚRA

BARANDSE, W., ANMITAGE, S. M., KOSSAREK, L. M., SHALOM, A., KIRKPATRICK, B. W., RYAN, A. M., CLAYTON, D., LI, L., NEIBERGS, H. L., ZHANG, N., GROSSE, W. M., WEISS, J., CREIGHTON, P., MCCARTHY, F., RON, M., TEALE, A. J., FRIES, R., MCGRAW, R. A., MOORE, S. S., GEORGES, M., SOLLER, M., WOMACK, J. E., HETZEL, D. J. S. 1994. A genetic linkage map of the bovine genome. In *Nature Genetics*, vol. 6, 1994, no. 1, p 227-235.

BUCHANAN, F. C., ADAMS, L. J., LITTLEJOHN, R. P., MADDOX, J. F., CRAWFORD, A. M. 1994. Determination of evolutionary relationships among sheep breeds using microsatellite. In *Genomics*, vol. 22, 1994, p. 397-403.

HUSON, D. H., RICHTER, D. C., RAUSCH, CH., DEZULIAN, T., FRANZ, M., RUPP, R. 2007. Dendroscope: An interactive viewer for large phylogenetic trees. *BMC Bioinformatics* 8:460, 2007, software freely available from <<http://www.dendroscope.org>>.

ERNST, M., KLIMENT, J., LEVÝ, E., KOURKOVÁ, L., STEJSKAL, M. 2008. *Populace bílých jelenů – Využití mikrosatelitních analýz při šlechtění populace bílých jelenů u LČR*, s.p. Hradec Králové : Edice Grantové služby LČR, 2008. 28 s.03/07. ISBN 978-80-86945-01-9.

FRANTZ, A. C., HAMANN, J. L., KLEIN, F. 2008. Fine-scale genetic structure of red deer (*Cervus elaphus*) in a French temperate forest. In *Eur. J. Wildl. Res.*, vol. 54, 2008, p. 44-52.

JONES, K. C., LEVINE, K. F., BANKS, J. D. 2002. Characterization of 11 polymorphic tetranucleotide microsatellites for forensic applications in California elk (*Cervus elaphus canadensis*). In *Mol. Ecol.*, vol. 2, 2002, no. 4, p. 425-427.

LIU, K., MUSE, S. V. 2005. PowerMarker: Integrated analysis environment for genetic marker data. In *Bioinformatics*, vol. 21, 2005, p. 2128-2129.

NEI, M., 1987. *Molecular evolutionary genetics*. 1 vyd. New York: Columbia University Press, 1987. 512 p. ISBN 0-231-06320-2.

PÉREZ-ESPONA, S., PÉREZ-BARBERÍA, F. J., McLEOD, J. E., JIGGINS, C. D., GODON, I. J., PEMBERTON, J. M. 2008. Landscape features affect gene flow of Scottish Highland red deer (*Cervus elaphus*). In *Mol. Ecol.*, vol. 17, 2008, no. 4, p. 981-996.

POETSCH, M., SEEFELDT, S., MASCHKE, M., LIGNITZ, E. 2001. Analysis of microsatellite polymorphism in red deer, roe deer, and fallow deer – possible employment in forensic applications. In *Forensic Science International*, vol. 116, 2001, no. 1, p. 1-8.

SLATE, J., PEMBERTON, J. M. 2007. Admixture and patterns of linkage disequilibrium in a free-living vertebrate population. In *J. of Evol. Biol.*, vol. 20, 2007, no. 4, p. 1415-1427.

TALBOT, J., HAIGH, J., PLANTE, Y. 1996. A parentage evaluation test in North American Elk (Wapiti) using microsatellites of ovine and bovine origin. In *Anim. Genet.*, vol. 27, 1996, p. 117-119.

WEBLY, L. S., ZENGER, K. R., HALL, G. P., COOPER, D. W. 2007. Genetic structure of introduced European fallow deer (*Dama dama dama*) in Tasmania, Australia. In *Eur J. Wild. Res.*, vol 53, 2007, s. 40-46.

WILSON, G. A., STROBECK, C., WU, L., COFFIN, J. W. 1997. Characterization of microsatellite loci in caribou *Rangifer tarandus*, and their use in other artiodactyls. In *Mol. Ecol.*, vol. 6, 1997, p 697-699.

XU, Y. CH., PAN, Z. CH., XU, Z. R., YANG, S. H., JIN, Y., BAI, S. Y. 2001. Status of microsatellite as genetic markers in cervids. In *J. of Forest. Res.*, vol. 12, 2001, no. 1, p. 55-58.

ŽIDEK, R., JAKABOVA, D., TRANDZIK, J., BULECA, J., TAKACOVÁ, D., ŽITŇAN, R. 2011. Genetic admixture in pig population observed by microsatellite markers. In *Archiv fur tierzucht-archives of animal breeding*, vol. 54, 2011, no. 1, p. 51-60.

ŽIDEK, R., JAKABOWI-SATKOVA, D., TRANDŽÍK, J., JAKAB, F., BULECA, J., MASSANYI, P., LASZLO, Z. 2007. Genetic variability data of the Slovak large white improved swine breed. In *Magyar allatorvosok lapja*, vol. 129, 2007, no. 11, p. 656-660, ISSN 0025-004X.

## Acknowledgments:

This work was supported by the Department of Hygiene and Food Safety, Faculty of Biotechnology and Food Science, Slovak University of Agriculture in cooperation with the Xcell Slovakia.

## Contact address:

Lenka Maršáľková, Department of Food Hygiene and Safety, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Slovak University of Agriculture, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovakia, Email: marsalkova@gmail.com.

Ľubomír Belej, Department of Food Hygiene and Safety, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Slovak University of Agriculture, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovakia, Email: lubomir.belej@uniag.sk.

Pavol Bajzík, Department of Food Hygiene and Safety, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Slovak University of Agriculture, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovakia, Email: pavol.bajzik@uniag.sk.

Jaroslav Pokorádi, Xcell Slovakia Breeding Services, s.r.o., Ventúrska 1, 811 01 Bratislava, Slovakia, Email: pokoradi@xcell.sk.

## SEED OIL RESPONSE SURFACE METHODOLOGY FOR OPTIMIZATION OF THE EXTRACTION OF FLAX (*LINUM USITATISSIMUM*) SEED OIL

*Miroslav Ondrejovič, Daniela Chmelová, Tibor Maliar*

### ABSTRACT

Flax seed is an important source of  $\omega$ -3 polyunsaturated fatty acids essential for human physiology. The aim of this paper is to investigate the effects of major parameters of the lipid extraction from flax seed, in relation to the recovery of oil as well as the oil quality properties. The independent variables of extraction were proposed as: organic solvents, temperature, extraction time and solid-liquid ratio. The following quantitative and qualitative parameters were chosen as dependent variables: yield of the lipid fraction, acid value of oil and the absorbance at 490 nm. After calculating the optimal values of the extraction, the validation analysis was carried out and it was found out that the predicted and experimentally verified dependent variables were in agreement with the optimal extraction parameters.

**Keywords:** food extraction, flax seed, optimization

### INTRODUCTION

Omega-3 polyunsaturated acids (O3PUFA) are essential for many metabolic processes in human physiology. Human body is not able to synthesize O3PUFA within the own metabolic pathways, therefore it is necessary to consume it in food (Gorjão et al., 2009). The influence of O3PUFA may be categorised into several effects. They have a positive effect to visual, mental and psychomotoric function of human body. They both improve rheology blood properties and decrease systolic pressure. The food additive with O3PUFA, applied in the early postnatal phases is the prevention of the hypertension. Moreover, these components effect as antiarrhythmic, antithrombotic, antiinflammatory agents and decelerate creation of the atherosclerotic plaques (Vyhnánková, 2007; Teitelbaum, Walker, 2001; Turnbull, Cullen-Drill, Smaldone, 2008; Jordan, 2010).

Although the most known sources of the O3PUFA are marine fish (Gorjão et al., 2009), it is possible to find these lipids in plenty marine plants (*Phaeodactylum sp.* and *Monodus sp.*) and earth plants as rapeseed, walnut, hazelnut and almond (Dyerberg, Bang, Aagaard, 1980; Gecgel et al., 2011; Marangoni et al., 2007; Bell et al., 2003). From earth plants, the flax seed (*Linum usitatissimum*) has been found out as an important and rich source of the O3PUFA.

The aim of this paper is to determine optimal conditions for the extraction of lipid portion from the flax seed in relation to oil yield and quality. Oil quality parameters were proposed as follows: acid value and presence of the coloured accompanied lipid components (carotenoids, phospholipids etc.). In the literature, there are several scientific papers dedicated to this phase of the edible oil manufacturing (Rosenthal, Pyle, Niranjani, 1996; Gaur et al., 2007; Tigrine-Kordjani, Meklati, Chemat, 2006; Ayala, Luque de Castro, 2001) with application of the various physical, chemical techniques and enzyme processing. But the process of the flax seed oil has not been sufficiently published. Extraction solvent choice, temperature, extraction time, solid-liquid ratio (ratio between extracted material and extraction solvent volume) were proposed as independent variables. Yield of the lipid portion, acid value and optical density of the crude oil at

490 nm as a parameter of the quantification of the colour undesired components were dependent variables.

### MATERIAL AND METHODOLOGY

#### Material

Flax seeds (*Linum usitatissimum*) of the food quality were purchased from Ekvia, Ltd. (Czech Republic, harvested in year 2009). Primarily, before experiments was an aliquot amount of the tested material cut at particle size < 0.5 cm.

#### Extraction procedure

Varied conditions in logical relation to oil yield were as follows: solvent, solid – liquid ratio, temperature, extraction and time. Selection of the suitable solvent (hexane and petroleum ether) and solid – liquid ratio (20, 100 and 500 g of flax seed /L of extraction solvent) were evaluated during 24 hours under room temperature. The temperature influence at extraction process was evaluated at 20, 40 a 60 °C during 300 minutes at solid-liquid ratio 100 g/L (w/v). The obtained lipid portion (crude flax seed oil) was subjected to determination of the acid value.

#### Extraction experiment design

Three factors five level experiment was carried out with tested independent variables- temperature (17, 22, 30, 38 and 43 °C), extraction time (33, 100, 200, 300 and 367 minutes) solid-liquid ratio (11; 50; 107.5; 165 and 203.7 g/L). Real variables values were transformed into non-dimensional coded values (Table 1).

**Table 1** Designed experiments conditions for selected parameters

Parameter	Coded expression				
	-1.682	-1	0	1	1.682
<b>Temperature</b> [°C]	17	22	30	38	43
<b>Extraction time</b> [min.]	33	100	200	300	367
<b>Solid – liquid ratio</b> [g/L]	11	50	107.5	165	203.7

**Table 2** Independent variables in original and coded form and experimental results for response variables oil yield [g oil/100 g seeds], acid value [mg KOH/g oil] and optical density at 490 nm (OD 490)

Experiment No.:	Extraction time (X1)	Temperature (X2)	Solid – liquid ratio (X3)	Oil Yield (Y1)	Acid value (Y2)	OD 490 (Y3)
1	300 (1)	38 (1)	50 (-1)	27.45	3.24	0.874
2	100 (-1)	38 (1)	165 (1)	15.03	5.91	0.603
3	300 (1)	22 (-1)	165 (1)	13.75	4.69	0.615
4	100 (-1)	22 (-1)	50 (-1)	18.03	5.62	0.512
5	200 (0)	30 (0)	107.5 (0)	20.83	4.71	0.685
6	300 (1)	22 (-1)	50 (-1)	26.32	3.31	0.713
7	300 (1)	38 (1)	165 (1)	15.42	4.52	0.641
8	200 (0)	30 (0)	107.5 (0)	22.62	3.72	0.718
9	100 (-1)	22 (-1)	165 (1)	14.67	5.02	0.762
10	100 (-1)	38 (1)	50 (-1)	24.51	3.68	0.719
11	200 (0)	30 (0)	204 (1.682)	11.62	4.36	0.693
12	200 (0)	16.6 (-1.682)	107.5 (0)	14.12	4.01	0.679
13	200 (0)	43.4 (1.682)	107.5 (0)	18.31	3.42	0.814
14	200 (0)	30 (0)	107.5 (0)	19.95	3.68	0.705
15	200 (0)	30 (0)	11 (-1.682)	25.61	3.15	0.713
16	33 (-1.682)	30 (0)	107.5 (0)	17.03	4.01	0.531
17	367 (1.682)	30 (0)	107.5 (0)	20.06	4.62	0.673

Measured dependent variables were flax seed oil yield, acid value, expressed as amount of mg KOH per gram of oil and optical density of oil at 490 nm. Experimental data were fit by the polynomial regression of the second order (Equation 1), and regression coefficients  $b_i$  were calculated:

$$Y = b_0 + \sum_{i=1}^k b_i X_i + \sum_{i=1}^k b_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^{k-1} \sum_{j=2}^{k-i} b_{ij} X_i X_j \quad (1)$$

where  $X_i$  are independent variables responsible for response  $Y$  and  $b_i$  are regression coefficients, describing relations of the measured properties to coded levels of the selected parameters. For computer and statistical processing, software Statgraphics Plus 5.1 was applied. All experiments were carried out as four parallel attempts.

#### Acid value determination

Acid value were determined in according N.G.D. C10-1976 method (Equation 2), based upon the titration of the ethanol solution of the oil sample by the 0.1 M solution of sodium hydroxide on the phenolphthalein as indicator (NGD C10- 1976).

$$\text{Acid value} = (A * N * 56.1)/W \quad (2)$$

where  $A$  is volume (in mL) of 0.1 M KOH consumed for sample,  $N$  is normality of KOH and  $W$  is weight in grams of the sample.

#### Oil yield determination

Efficiency of extraction of the flax seed oil by organic solvent was to evaluate in relation to seeds amount and expressed in % in according with Equation 3.

$$\text{Yield [g oil/100 g flax seed]} = (\text{extracted oil [g]} * 100) / \text{flax seed amount [g]} \quad (3)$$

#### Oil colour photometric measurement

All prepared crude oil samples were subjected to measurement of the optical density at 490 nm (further OD490nm) aimed to quantify the amount of the accompanied colour components and thus oil sensorial quality.

## RESULTS

#### Extraction procedure

In general, it is well known, that oil extraction efficiency is dependent from four basic parameters: solvent selection, solid –liquid ratio, temperature and time of the extraction. All these parameters were put in positive optimization aimed to maximal oil yield under relevant oil quality.

As a first was processed and tested selection of the extraction solvent (hexane or petroleum ether) and solid – liquid ratio (20, 100 and 500 g of flax seed to L of extraction solvent). Achieved results are presented in Figure 1. As the results show, under applied solid – liquid ratio 20 and 100 g/L, petroleum ether was more effective extraction solvent than hexane. Therefore other experiments were carried out with petroleum ether as extraction solvent. The optimal value of this parameter can be around 20 g/L.

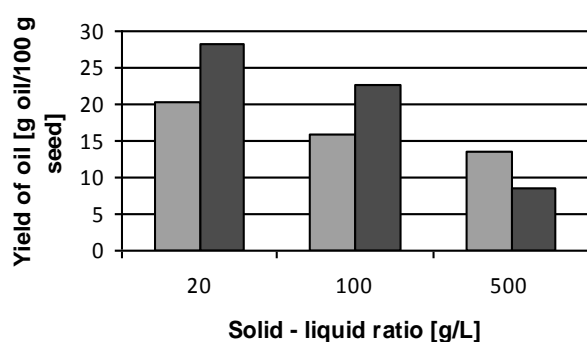
The influence of the temperature and time of the extraction on the flax seeds oil were evaluated by the kinetic measurement of the extraction process under three different temperatures (20, 40 a 60 °C).

Results are presented in Figure 2. From the results, it is evident that the highest yields were achieved in extraction carried out at all temperatures during 300 minutes. During whole extraction, the oil yields at 60 °C were the highest. The following experiments were carried out at adapted parameters: temperature 17 - 43 °C and extraction time 33 to 367 minutes.

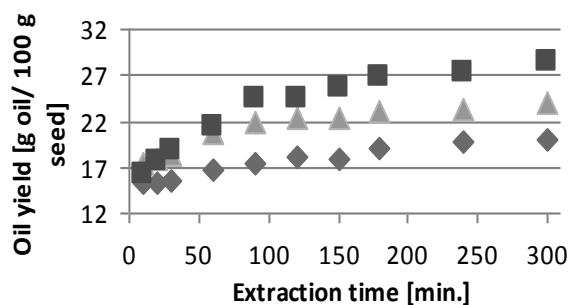
**Table 3** Regression coefficients of the model polynomial regression of the second order for dependent variables – oil yield [g oil/100g seeds], acid value [mg KOH /g oil] and optical density at 490 nm (OD 490)

Model parameters		Oil yield	Acid value	OD 490
Constant effect		-14,0916	9,1999	0,07385
Linear effect	Extraction time (A)	0,07822	-0,01797	0,00225
	Temperature (B)	1,69605	-0,141477	4,081.10-4
	Solid-liquid ratio (g/L) (C)	0,05003	-0,0206617	0,005842
Quadratic effect	A x A	-5,052.10-5	2,308.10-5	-3,655.10-6
	B x B	-0,0209	2,5809.10-4	2,353.10-4
	C x C	-1,452.10-4	9,3167.10-6	1,436.10-7
Interaction effect	A x B	-6,313.10-4	1,265.10-4	2,1719.10-5
	A x C	-2,556.10-4	2,239.10-5	-1,0109.10-5
	B x C	-1,516.10-3	7,418.10-4	-1,3614.10-4

Regression coefficient with statistical significance at  $p < 0,05$  are printed as bold



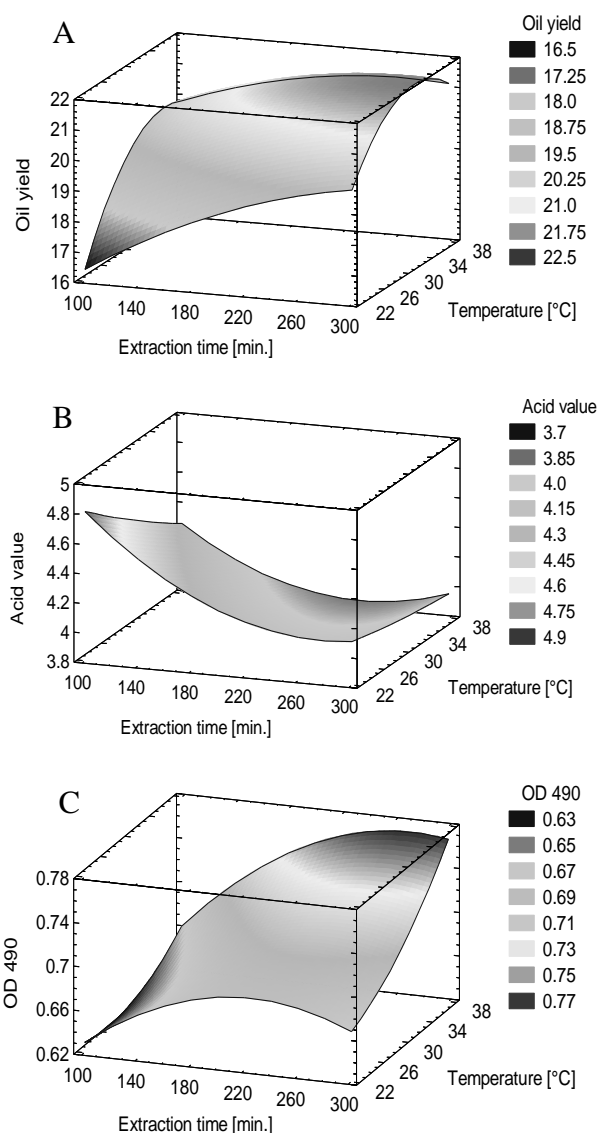
**Figure 1** The efficiency of the oil extraction from flax seeds by hexane and petroleum ether, expressed as oil yield [g oil/100 g seeds] during 24 hours at room temperature under following solid-liquid ratio – 20, 100 and 500 g/L; ■ – hexane; ■ – petroleum ether.



**Figure 2** Kinetic of the flax seed oil extraction by petroleum ether, solid –liquid ratio 1:10 during 300 minutes at following temperatures: ♦ - 20, ▲ - 40 a ■ – 60 °C.

**Flax seed oil extraction assisted by Response Surface Method (RSM)**

Optimal conditions of the extraction were calculated by the software Statgraphics Plus 5.1., processed by RSM approach. In Table 2, flax seed oil yield, acid number and value of OD490nm are presented. Based upon the regression analysis results, we can state, that compared dependent variable expressed self-independent relation.



**Figure 3** The relation of the dependent variables from the extraction time and temperature ratio at constant solid – liquid ratio 107.5 g/L; A – Yield of the oil [g oil/100 g seed]; B – acid value [mg KOH/g oil]; C – optical density of oil at 490 nm (OD 490).

**Table 4** Optimal extraction parameters for maximizing yield of extracted flax seed oil by petroleum ether and comparison of the predicted values of the dependent variables and experimentally measured values at these optimal conditions.

Optimal extraction parameters			
Extraction time [min.]	365		
Temperature [°C]	33,5		
Solid – liquid ratio [g/L]	15.4		
	Oil yield	Acid number	OD 490
Predicted values	32.31	3.01	0.914
Experimental values	33.14 ± 0.02	3.07 ± 0.13	0.897 ± 0.012

### Multiple linear regression

For the purpose of the fitting the presented results in Table 2, polynomial regression of the second order (Equation 1) with regression coefficient  $R^2 = 0.97$  for yield as parameter Y1,  $R^2 = 0.94$  for OD490nm as parameter Y2 and finally  $R^2 = 0.85$  for acid number as parameter Y3 was applied.

### Regression coefficient analysis

Regression coefficients of the model for yield, acid value and OD490nm obtained by multiple polynomial regression are presented in Table 3. Dependent variable in coded form (Table 1) allow direct interpretation of the effect (linear, quadratic and interaction) of the independent variables to dependent variables and visualization by 3D surface plots (Figure 3) assisted visualization of the statistically important factors (marked as bold in the Table 3) obtained from statistical analyse.

### Determination and experimental validation of the optimal conditions

Optimal values of the parameters for extraction of the flax seed oil by petroleum ether are presented in Table 4. Values of other dependent variables (acid value and OD490) at optimal conditions for flax seed oil extraction were predicted on the base of created models.

Predicted value for extraction yield of oil, acid value and OD 490 as dependent parameters were comparable with experimentally measured value at the level of the statistical significance at  $p < 0.05$ . Achieved results confirm the possibility to predict the course of the extraction flax seeds oil by petroleum ether by the model under particular experimental conditions.

### DISCUSSION

Commercial production of edible oils is based on mechanical pressing and extraction from oilreach materials (Pradhan et al., 2010). The yield obtained by mechanical pressing is usually lower than those extracted by solvents such as hexane or petroleum ether. The advantage of solvent extraction is the high yield that can be obtained economically with this method (>99 wt.%) (Bargale et al., 1999; Willems, Kuipers, Haan 2008).

Based upon the findings in this work, petroleum ether is better solvent for flax seed oil extraction (Figure 1). The maximum oil recovered was 27.5% with petroleum ether and 20.1% with hexane when the extraction process was carried out for 24 hours. Similar yields were obtained in work Gutiérrez et al. (2010).

The yield oil was increased with increasing temperature up (Figure 2). By increasing the temperature approaching to the boiling point of the solvent, both the diffusion coefficient and the solubility of the oil in the solvent are enhanced, thus improve the extraction rate (Richardson, Harker, 2002).

The solid to liquid ratio of 20 g/L would be sufficient for extraction of the maximum amount of oil (Figure 1). However, when the ratio continued to increase, the yield of oil was decreased. Therefore, 11; 50; 107.5; 165 and 203.7 (g/L) were selected as the variable levels for the solvent-liquid ratio. These results were observed other authors (Pinelo et al., 2005; Zhang et al., 2009).

Flax seed content approximately 31.9 – 37.8 % oil depending on the material (Carter, 1993). The oil yield obtained by 365 minutes extraction at 33.5 °C and with solid – liquid ratio 15.4 g/L, which were computed by response surface methodology, was about 33.14 %. In the work Pradhan et al. (2010) the flax seed was extracted using solvent hexane, supercritical carbon dioxide and mechanical pressing. They were found that the hexane extraction gave improved yield in comparing with supercritical CO<sub>2</sub> and screw press (9.02 and 34.3 %, respectively). In the other studies used supercritical fluid extraction of flax seed and they observed oil yield within 26.7 – 30.0 (Jiao et al. 2008, Özkal, 2009).

### CONCLUSION

The method of the designed experiment was successfully applied on optimization of the extraction of the oil from flax seeds. Model polynomial regression of the second order gives the successive description of the experiments. Calculated optimal conditions of the extraction process, expressed by the yield of the oil were as follows: temperature 33.5 °C, extraction time 365 minutes and solid-liquid 15.4 g of flax seed to 1 L of petroleum ether. Predicted values of dependent variables were comparable with the experimentally measured values.

### REFERENCES

- AYALA, R. S., LUQUE DE CASTRO, M. D. 2001. Continuous subcritical water extraction as a useful tool for isolation of edible essential oils. In *Food Chemistry*, vol. 75, 2001, no. 1, p. 109-113.
- BARGALE, P. C., FORD, R. J., SOSULSKI, F. W., WULFSOHN, D., IRUDAYARAJ, J. 1999. Mechanical oil expression from extruded soybean samples. In *Journal of the American Oil Chemists Society*, vol. 76, 1999, no. 2, p. 223-229.
- BELL, J. G., MCGHEE, F., CAMPBELL, P. J., SARGENT, J. R. 2003. Rapeseed oil as an alternative to

marine fish oil in diets of post-smolt Atlantic salmon (*Salmo salar*): changes in flesh fatty acid composition and effectiveness of subsequent fish oil wash out. In *Aquaculture*, vol. 218, 2003, no. 1-4, p. 515-528.

CARTER, J. F. 1993. Potential of flaxseed and flaxseed oil in baked goods and other products in human nutrition. In *American Association of Cereal Chemists*, vol. 38, 1993, no. 10, p. 753-759.

DYERBERG, J., BANG, H. O., AAGAARD, O. 1980.  $\alpha$ -Linolenic acid and eicosapentaenoic acid. In *Lancet*, vol. 315, 1980, no. 8161, p. 199.

GAUR, R., SHARMA, A., KHARE, S. K., GUPTA, M. N. 2007. A novel process for extraction of edible oils: Enzyme assisted three phase partitioning (EATPP). In *Bioresource Technology*, vol. 98, 2007, no. 3, p. 696-699.

GECGEL, U., GUMUS, T., TASAN, M., DAGLIOGLU, O., ARICI, M. 2011. Determination of fatty acid composition of  $\gamma$ -irradiated hazelnuts, walnuts, almonds, and pistachios. In *Radiation Physics and Chemistry*, vol. 80, 2011, no. 4, p. 578-581.

GORJÃO, R., AZEVEDO-MARTINS, A. K., RODRIGUES, H. G., ABDULKADER, F., ARCISIO-MIRANDA, M., PROCOPIO, J., CURI, R. 2009. Comparative effects of DHA and EPA on cell function. In *Pharmacology and Therapeutics*, vol. 122, 2009, no. 1, p. 56-64.

GUTIÉRREZ, C., RUBILAR, M., JARA, C., VERDUGO, M., SINEIRO, J., SHENE, C. 2010. Flaxseed and flaxseed cake as a source of compounds for food industry. In *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, vol. 10, 2010, no. 4, p. 454-463.

JIAO, S. S., LI, D., HUANG, Z. G., ZHANG, Z. S., BHANDARI, B., CHEN, X. D., MAO, Z. H. 2008. Optimization of supercritical carbon dioxide extraction of flaxseed oil using response surface methodology. In *International Journal of Food Engineering*, vol. 4, 2008, no. 4, p. 42-56.

JORDAN, R. G. 2010. Prenatal omega-3 fatty acids: review and recommendations original. In *Journal of Midwifery Womens Health*, vol. 55, 2010, no. 6, p. 520-528.

MARANGONI, F., COLOMBO, C., MARTIELLO, A., POLI, A., PAOLETTI, R., GALLI, C. 2007. Levels of the n-3 fatty acid eicosapentaenoic acid in addition to those of alpha linolenic acid are significantly raised in blood lipids by the intake of four walnuts a day in humans. In *Nutrition, Metabolism, and Cardiovascular Diseases*, vol. 17, 2007, no. 6, p. 457-461.

Norme Grassi e Derivati, edited by Stazione Sperimentale per le Industrie degli Oli e Grassi, Milano, Method NGD C10- 1976 (1976).

ÖZKAL, S. G. 2009. Response Surface Analysis and Modeling of Flaxseed Oil Yield in Supercritical Carbon Dioxide. In *Journal of the American Oil Chemists' Society*, vol. 86, 2009, no. 11, p. 1129-1135.

PINELO, M., RUBILAR, M., JEREZ, M., SINEIRO, J., NUNEZ, M. J. 2005. Effect of solvent, temperature, and solvent-to-solid ratio on the total phenolic content and antiradical activity of extracts from different components of

grape pomace. In *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 53, 2005, no. 6, p. 2111-2117.

PRADHAN, R. CH., MEDA, V., ROUT, P. K., NAIK, S., DALAI, A. K. 2010. Supercritical CO<sub>2</sub> extraction of fatty oil from flaxseed and comparison with screw press expression and solvent extraction processes. In *Journal of Food Engineering*, vol. 98, 2010, no. 4, p. 393-397.

RICHARDSON, J. F., HARKER J. H. 2002. Coulson and Richardson's Chemical Engineering-Particle. In *Technology and Separation Processes*. Butterworth-Heinemann, ISBN 0750644451, p. 1185.

ROSENTHAL, A., PYLE, D. L., NIRANJAN, K. 1996. Aqueous and enzymatic processes for edible oil extraction. In *Enzyme and Microbial Technology*, vol. 19, 1996, no. 6, p. 402-420.

TEITELBAUM, J. E., WALKER, W. A. 2001. Review: the role of omega 3 fatty acids in intestinal inflammation. In *Journal of Nutritional Biochemistry*, vol. 12, 2001, no. 1, p. 21-32.

TIGRINE-KORDJANI, N., MEKLATI, B. Y., CHEMAT, F. 2006. Microwave 'dry' distillation as an useful tool for extraction of edible essential oils. In *International Journal of Aromatherapy*, vol. 16, 2006, no. 3-4, p. 141-147.

TURNBULL, T., CULLEN-DRILL, M., SMALDONE, A. 2008. Efficacy of omega-3 fatty acid supplementation on improvement of bipolar symptoms: s systematic review. In *Archives of Psychiatric Nursing*, vol. 22, 2008, no. 5, p. 305-311.

VYHNÁNKOVÁ, L. 2007. PUFA omega-3 a jejich působení. In *Pediatrická prax*, vol. 3, 2007, no. 1, p. 141-143, ISSN 1803-5264.

WILLEMS, P., KUIPERS, N. J. M., DE HAAN, A. B. 2008. Hydraulic pressing of oilseeds: experimental determination and modeling of yield and pressing rates. In *Journal of Food Engineering*, vol. 89, 2008, no. 1, p. 8-16.

ZHANG, Q. A , ZHANG, Z. O., YUE, X. F., FAN, X. H., LI, T., CHEN, S. F. 2009. Response surface optimization of ultrasound-assisted oil extraction from autoclaved almond powder. In *Food Chemistry*, vol. 116, 2009, no. 2, p. 513-518.

#### Acknowledgements:

This paper was supported by the Slovak Research and Development Agency within the grant No. VMSP-P-0149-09.

#### Contact address:

RNDr. Miroslav Ondrejovič, PhD., Department of Biotechnology, Faculty of Natural Sciences, University of SS. Cyril and Methodius in Trnava, Nám. J. Herdu 2, 917 01 Trnava Email: miroslav.ondrejovic@ucm.sk  
Department of Biocentrum, Food Research Institute, Kostolná 5, 900 01 Modra, E-mail: ondrejovic@vup.sk.

Mgr. Daniela Chmelová, Department of Biochemistry and Biotechnology, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Slovak University of Agriculture, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra Slovakia, E-mail: aniela.chmelova@gmail.com.

Ing. Tibor Maliar, PhD., Department of Biotechnology, Faculty of Natural Sciences, University of SS. Cyril and Methodius in Trnava, Nám. J. Herdu 2, 917 01 Trnava E-mail: tibor.maliar@ucm.sk



## EVALUATION OF THE GROWTH OF SELECTED LACTOBACILLI IN PSEUDOCEREAL SUBSTRATE

Jana Pelikánová, Denisa Liptáková, Eubomír Valík, Katarína Stančeková

### ABSTRACT

The growth dynamics of *Lactobacillus* spp. in sweet water- and milk-based substrates from cooked buckwheat and amaranth flour were studied in this work. The numbers of lactobacilli were observed during fermentation in 5% CO<sub>2</sub> atmosphere at 37 °C and storage (3 weeks at 6 °C). The earned data and estimated growth parameters showed that certain strains grew well in the milk-based gruels, even water-based amaranth gruel. This was also the case of the species under study characterized with the fastest growth. Based on the rates, only the strains of *Lactobacillus rhamnosus* GG and VT1 were able to grow with the values higher than 0.6 log CFU.ml<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> that can be expressed as the times to double (t<sub>d</sub>) lower than 0.5 h. This was found in both the amaranth and buckwheat milk-based gruels and water-based amaranth gruels but fermented only by the probiotic GG strain. The 3-week storage tests aimed on survival of the lactobacilli at 6 °C showed minimal decrease of the counts in buckwheat gruels with the average rates of -0.084 and -0.004 log CFU.ml<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> in water- and milk-based gruels, respectively. On the other hand in amaranth gruels, the numbers of lactobacilli slightly increased with the rate of 0.02 log CFU.ml<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>, on average. The results of this pilot study pointed out that the selection of suitable lactic acid bacteria should be performed for optimal fermentation of pseudo-cereal substrates. The numbers of lactobacilli at the end of fermentation were not or very slightly affected by the type of substrate at 6 °C during three weeks.

**Keywords:** probiotic, lactic acid bacteria, pseudocereals

### ÚVOD

Medzi tradičné fermentované cereálne poživatiny zahŕňame obyčajne chlieb a kvasené nápoje, ako pivo, saké a iné. Vývoj potravín podporovaný viacerými výskumnými štúdiami ďalej vychádzal z tohto základu, nakoľko cereálie sú ľahko dostupné, pestujú sa približne na 73 % plochy obrábanej pôdy. Vyznačujú sa tiež vysokým obsahom niektorých vitamínov, vlákniny s prebiotickou funkciou a minerálnych látok. Skutočnosť, že môžu obsahovať niektoré antinutričné faktory, ako kyselinu fytovú, niektoré polyfenoly a enzýmové inhibitory, vedie výskumníkov k snahe obohatiť tieto substráty mliekom a okrem nutričného, zvýšiť aj ich fermentačný potenciál. Na druhej strane, so zvyšovaním sa incidencie potravinových alergií a intolerancií v ľudskej populácii sa všeobecne vo výžive a tiež i pred výskumníkmi zaoberajúcimi sa fermentáciami potravín objavili ďalšie vhodné substráty, ako napríklad pseudocereálie alebo prípadne strukoviny (Kocková a Valík, 2011; Moroni et al. 2011; Kohajdová et al., 2011). Napredujúci vývoj vhodne fermentovaných výrobkov vyrobených na báze týchto substrátov, vrátane probiotických, môže viesť nielen k obohateniu stravovania celiatikov, potravinových alergikov alebo inak metabolicky hendikepovaných ľudí, ale aj k vyváženiu stravovania zdravých ľudí.

Celiakia patrí k jedným z najčastejšie sa vyskytujúcich chronických ochorení v západných krajinách. Pred pár desiatkami rokov sa považovala za relatívne zriedkavú chorobu s výskytom jedného z 2500 obyvateľov (1:2500). V súčasnosti postihuje svetovú populáciu s výskytom 1:100 až 1:300 (Bai et al., 2007), pričom riziko tohto ochorenia sa zvyšuje tým, že sa môže objaviť kedykoľvek v priebehu života (Adams, 2007). Celiakia je známa

aj ako glutén senzitívna enteropatia. Toto ochorenie je charakterizované sekundárnou malabsorpciou, kedy sa deštruuje črevný epitel, zmenšuje sa črevná resorpčná plocha, a tým dochádza k malabsorpcii všetkých súčastí potravy (Turčáni a Maasová, 2002). Klinická i histologická náprava stavu pacienta s celiakiou nastáva pri striktnej bezlepkovej diéte (Krajčírová, 2007).

Súčasný trh poskytuje viac možností bezlepkového stravovania ako tomu bolo pred niekoľkými rokmi. Je však aj naďalej nutné, aby sa pozornosť potravinárskeho priemyslu obrátila na vývoj nových funkčných potravín, ktoré sú vhodné pre bezlepkovú diétu. Z nutričného hľadiska sú zaujímavé náhrady reálnych cereálií – tzv. pseudocereáliami, ktoré môžu spestriť jedálny lístok. V našej štúdií sme sa konkrétne zamerali na pohánku a amarant. Fermentácia týchto pseudocerálií probiotikami môže priniesť nový trend vo vývoji funkčných potravín. Probiotiká majú vedecky dokázaný pozitívny vplyv na organizmus človeka. Sú to mono- alebo zmesné kultúry živých organizmov, ktoré po aplikácii prospešne ovplyvňujú hostiteľa zlepšením vlastností jeho vlastnej mikroflóry (Nevoral, 2005). Hlavnými kmeňmi s probiotickými charakteristikami sú *Lb. acidophilus*, *Bifidobacterium* spp., a *Lb. casei* (Shah, 2007).

Baktérie mliečného kysnutia (BMK) musia spĺňať niekoľko kritérií, aby mohli byť použité ako probiotiká. Nesmú byť patogénne, ani toxické, musia byť geneticky stabilné a správne taxonomicky identifikované (Mercenier et al., 2003; Prado et al., 2008). Musia odolať tranzitu cez gastrointestinálny trakt, t. j. nízkej hodnote pH, prítomnosti kyseliny chlorovodíkovej, proteolytických enzýmov a najmä lyzozýmu, ktorý spôsobuje lýzu niektorých baktérií. V zažívacom trakte musia ďalej znášať žľové kyseliny a nízke povrchové napätie. Významným

selekčným faktorom, ktorý probiotické baktérie musia prekonať, je peristaltika čriev a rýchlosť, ktorou prechádza potrava tráviacim traktom. Musia byť humánneho pôvodu. Probiotikum musí vykazovať prospešný efekt pre hostiteľa a stabilizovať črevnú mikroflóru. Probiotická baktéria musí byť schopná adherovať na intestinálne bunky a kolonizovať lumen traktu, kde súčasťou jej pozitívneho pôsobenia je produkcia antimikrobiálnych látok proti patogénom. V probiotickom produkte musí byť zachovaný veľký počet buniek a ich viabilita. To znamená, že v čase končiacej trvanlivosti alebo najneskoršej spotreby musia byť prítomné v koncentráciách viac ako  $10^6$  KTJ.ml<sup>-1</sup>. Iba v tejto a vyššej koncentrácii majú v čreve požadovaný účinok (Görner a Valík, 2004; Parvez et al., 2006; Mattila-Sandholm et al., 2009).

Základný mechanizmus pôsobenia probiotických baktérií je spojený so znížením pH v súvislosti s tvorbou organických kyselín, s vlastnou činnosťou metabolitov alebo so syntézou antimikrobiálnych látok. Okrem toho, prichytenie probiotík na črevné epitelové bunky a následná dočasná kolonizácia čreva, má pravdepodobne zásadný význam pre ich priaznivý účinok na zdravie (Forestier et al., 2001; Buriti et al., 2004).

Cieľom práce bolo sledovať dynamiku rastu vybraných kmeňov/izolátov BMK v rastlinnom substráte počas 8 až 10 hodinovej fermentácie pri 37 °C a následne počas uchovávaní hotového produktu pri 6 °C.

## MATERIÁL A METÓDY

### Mikroorganizmy

V rámci práce sme sledovali rast nasledovných 8 kmeňov/izolátov BMK:

*Lb. acidophilus* 145 je komerčný kmeň od firmy Christian a Hansen a bol poskytnutý spoločnosťou Rajo a.s., Bratislava.

*Lb. rhamnosus* GG je zbierkový kmeň od fínskych mikrobiológov Owehanda a Salminen. Poskytla ho Dr. Lauková z Veterinárneho ústavu v Košiciach.

*Lb. rhamnosus* VT1 izolovaný z tatárskej omáčky je zaradený do Zbierky mikroorganizmov Ústavu technológie mlieka a tuků VŠCHT v Prahe. Poskytla ho Doc. M. Plocková, PhD.

Kmeň *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* 1753 je zbierkovým kmeňom z Masarykovej univerzity v Brne.

*Lb. helveticus* X A/2, *Lb. paracasei* VII B/10, *Lb. casei* VII B/6, *Lb. plantarum* III A/5 sú izoláty z rezortnej zbierky agropotravinárskych mikroorganizmov Výskumného ústavu potravinárskeho v Bratislave, Oddelenie mikrobiológie, molekulárnej biológie a biotechnológie.

Čisté kultúry laktobacilov boli uchovávané v MRS bujóne (Merck, Darmstadt, Nemecko) pri  $5 \pm 1$  °C.

### Štartovacia kultúra

Z 24 hodinovej čistej kultúry BMK sa získala štartovacia kultúra, ktorá sa scentrifigovala pri 6000 g 5 minút. Následne bola premytá sterilnou destilovanou vodou a opätovne scentrifigovaná pri rovnakých podmienkach. Po premytí sa zliál supernatant, pelet buniek sa rozsuspodoval v sterilnej destilovanej vode v pôvodnom objeme, pričom sme dodržiavali postup uvedený Angelovom et al. (2006).

### Príprava cereálnej kaše

Cereálna kaša bola pripravovaná z celozrnnéj pohánkovej alebo amarantovej múky (Mlyn Zrno, Šišov), mlieka alebo vody a sacharózy (2 %). Prídavok pohánkovej múky bol 8 % v prípade mliečnej kaše a 12 % pri príprave vodných kaší a amarantovej 14 % (mliečna kaša) a 20 % (vodná kaša). Tieto prídavky sa ukázali ako najvhodnejšie z hľadiska stability kaší. Po navážení zložiek bola kaša na vodnej báze tepelne ošetrená pri 100 °C počas 20 minút. Pri príprave mliečnych kaší nasledovala po varení aj sterilizácia. Po ochladnutí boli kaše anaeróbne inkubované pri 37 °C počas 8 až 10 hodín.

### Fermentácia a uskladnenie

Fermentácia sa začala po naočkovaní kaše 5 % štartovacej kultúry a realizovala sa po dobu 8 – 10 hodín anaeróbne pri 37 °C, pričom sa každé dve hodiny vyšetroval rast BMK. Okrem toho sa sledoval pokles pH každé štyri hodiny. Po skončení fermentačného procesu sa kaša uchovávala pri 6 °C a sledovalo sa prežívanie BMK a pokles pH počas troch týždňov.

### Stanovenie celkového počtu BMK

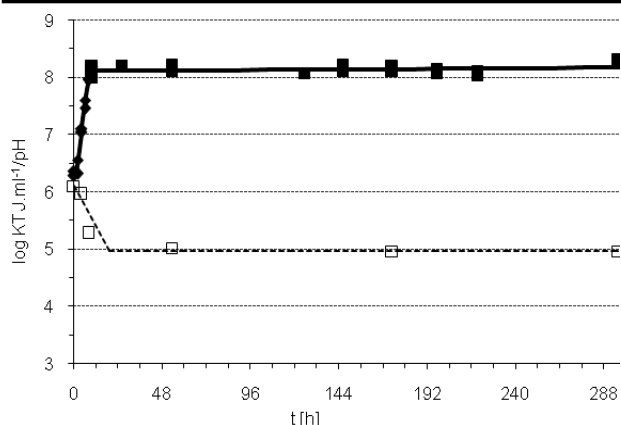
Predpokladané celkové počty laktobacilov sme stanovovali na MRS agare (Merck, Darmstadt, Nemecko) zriedovacou kultivačnou metódou podľa normy STN ISO 15214. Naočkované Petriho misky so stuhnutým MRS agarom sme kultivovali anaeróbne pri teplote  $37 \pm 1$  °C po dobu 48 až 72 hodín.

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

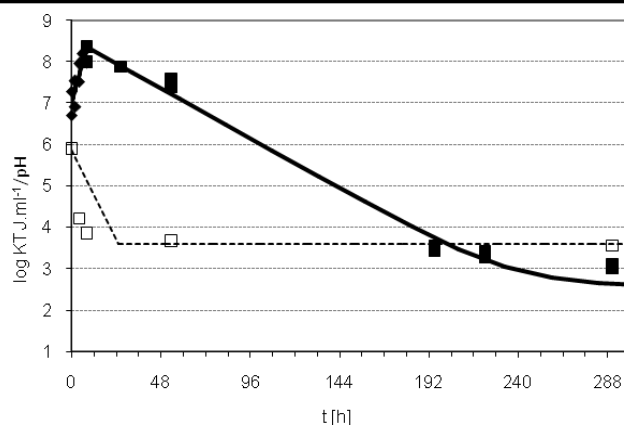
Dynamiku rastu jednotlivých laktobacilov sme sledovali v cereálnych kašiach pripravených z celozrnnéj pohánkovej alebo amarantovej múky, sacharózy a mlieka, resp. vody. Tieto múky sme zvolili hlavne kvôli tomu, že sú vhodné pre výživu celiakov vďaka vysokej nutričnej hodnote a predstavujú náhradu cereálnych múk, ktoré sú pri bezlepkovej diéte prísne zakázané (Sterr et al., 2009). Vodná pohánková kaša bola zvolená ako alternatíva pre ľudí trpiacich laktózovou intoleranciou, resp. alergiou na mliečne proteíny.

Pre ilustráciu je na obr. 1 a 2 znázornený priebeh rastových čiar kmeňa *Lb. acidophilus* 145 v pohánkovej mliečnej a vodnej kaši. V tabuľke 1 je uvedený prehľad rastových rýchlostí jednotlivých laktobacilov v závislosti od substrátu.

Vo všeobecnosti väčšina sledovaných kmeňov laktobacilov dosiahla vyššie koncentrácie pri raste v mliečnej kaši počas fermentácie pri 37 °C, kde nadobudli maximálne hodnoty  $10^8$  až  $10^9$  KTJ.ml<sup>-1</sup> v priebehu 8 až 10 h. Značne nižšie počty boli zaznamenané počas fermentácie a skladovania vodných kaší, čo naznačuje nižší rast a stabilitu probiotických kultúr v týchto produktoch. Vodná kaša pravdepodobne obsahovala oproti mliečnej menej špecifických nutričov potrebných pre rast laktobacilov. Laktobacily podľa Charalampopoulos et al. (2002) a Curryho a Crowa (2011) vyžadujú pre svoj rast fermentovateľné sacharidy, aminokyseliny, peptidy, masťné estery, soli, deriváty nukleových kyselín, a vitamíny, najmä B skupiny a minerálne látky, pričom tieto nároky sa líšia v závislosti od kmeňa.



**Obr. 1** Dynamika rastu *Lb. acidophilus* 145 v pohánkovej mliečnej kaši počas fermentácie  
 ◆ - pri 37 °C; a uskladnenia ■ - pri 6 °C; □ - zmena pH hodnoty



**Obr. 2** Dynamika rastu *Lb. acidophilus* 145 v pohánkovej vodnej kaši počas fermentácie  
 ◆ - pri 37 °C; a uskladnenia ■ - pri 6 °C; □ - zmena pH hodnoty

**Tab. 1** Rastová rýchlosť [ $\log \text{KTJ} \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ] BMK v závislosti od substrátu

	<i>Lb. rhamnosus</i> GG	<i>Lb. rhamnosus</i> VTI	<i>Lb. acidophilus</i> 145	<i>Lb. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> 1754	<i>Lb. casei</i> VII B/6	<i>Lb. paracasei</i> VII B/10	<i>Lb. helveticus</i> X A/2	<i>Lb. plantarum</i> III A/5
pohánka + voda	0,126	0,268	0,16	0,463	0,154	0,235	0,212	0,347
pohánka + mlieko	0,912	0,731	0,272	0,264	0,219	0,219	0,515	0,226
amarant + voda	0,636	0,513	0,28	0,416	0,2601	0,213	0,485	0,311
amarant + mlieko	0,69	0,69	0,543	0,431	0,227	0,223		

Najvyššiu rastovú rýchlosť ( $Gr = 0,912 \log \text{KTJ} \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ) počas fermentácie pohánkovej mliečnej kaše dosiahol *Lb. rhamnosus* GG. Valík et al. (2008) zaznamenali v UHT mlieku pri 35 °C rastovú rýchlosť kmeňa GG o 28 % nižšiu ako v pohánkovej kaši, čo naznačuje, že zloženie pohánky (obsah vitamínov alebo iných zložiek) podporuje rast laktobacila. Kmeň GG zároveň rástol o 86 % rýchlejšie v mliečnej kaši, v porovnaní s vodnou. Pri porovnaní rýchlostí rastu *Lb. rhamnosus* GG vo vodnom prostredí amarantového a pohánkového produktu bol zaznamenaný až 80 %-ný rozdiel, kde sa ako vhodnejší substrát ukázal amarant. Pravdepodobne preto, že amarant má vysoký obsah proteínov, aminokyselín a je bohatý na minerálne látky a vitamíny (Moroni et al., 2011). *Lb. acidophilus* 145 preukázal v tomto médiu približne dvojnásobne vyššie rastové rýchlosti v porovnaní s pohánkovým, v oboch fázach.

Z nameraných výsledkov vyplýva, že takmer vo všetkých produktoch sa po 3 týždňovom skladovaní pri 6 °C udržali počty laktobacilov nad hranicou ( $10^6 \text{KTJ} \cdot \text{ml}^{-1}$ ) potrebnou pre požadovaný probiotický účinok v tráviacom trakte, dokonca u väčšiny kmeňov sa konečné hodnoty pohybovali v rozmedzí  $10^7$  až  $10^8 \text{KTJ} \cdot \text{ml}^{-1}$ . Jediný pokles pod spomínanú hraničnú koncentráciu sme zaznamenali pre probiotický produkt fermentovaný *Lb. acidophilus* 145 (obr. 2). V pohánkovom produkte sa koncentrácia laktobacila

v mliečnej fáze udržiavala na stabilnej hodnote  $10^8 \text{KTJ} \cdot \text{ml}^{-1}$ , ale vo vodnej došlo k výraznému odumieraniu rýchlosťou -  $0,025 \log \text{KTJ} \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ , až na úroveň  $4,0 \cdot 10^2 \text{KTJ} \cdot \text{ml}^{-1}$ . Helland et al. (2004) sledovali rast *Lb. acidophilus* La5 v kukurično-ryžovom pudingu. Počas 12 h fermentácie vodného pudingu nezaznamenali významný nárast počtov a po ukončení 21 dní trvajúceho skladovania boli počty redukované takmer na nulovú koncentráciu. V rovnakom pudingu počty *Lb. acidophilus* 1748 klesli z koncentrácie  $10^7 \text{KTJ} \cdot \text{ml}^{-1}$  na konci 12 h fermentácie, na 3 až 4 log poriadky po ukončení 21 dňového skladovania.

Amarantová kaša sa osvedčila ako stabilnejšie médium z hľadiska prežívania kmeňa *Lb. acidophilus* 145 počas uchovávaní pri 6 °C, kde nastal mierny nárast jeho počtov v mliečnej aj vodnej kaši, dokonca vo vodnej bol nárast vyšší a konečné počty dosiahli hodnotu tesne pod  $10^8 \text{KTJ} \cdot \text{ml}^{-1}$  (obr. 1).

Vo všeobecnosti možno konštatovať, že koncentrácia laktobacilov v pohánkovom produkte sa počas 21 dňového skladovania udržiavala na stabilných hodnotách  $10^8 \text{KTJ} \cdot \text{ml}^{-1}$  s rozdielom 1 log poriadok, v závislosti od použitého laktobacila. Výnimkou bol už spomínaný *Lb. acidophilus* 145 a *Lb. helveticus* X A/2, ktorého koncentrácia v mliečnej kaši klesla až o 1,5 log poriadku. Najvyššie počty na konci obdobia skladovania boli zaznamenané v pohánkovej mliečnej kaši fermentovanej *Lb. casei* VII B/6 a v amarantovom mliečnom produkte

fermentovanom *Lb. rhamnosus* GG a VT1 a tieto sa tesne priblížili k úrovni  $10^9$  KTJ.ml<sup>-1</sup>.

Napriek tvrdeniu, že obsah mlieka v kaši viac vyhovuje spomínaným kmeňom, v prípade amarantovej kaše neboli rozdiely v rastových rýchlostiach laktobacilov medzi vodnou a mliečnou fázou produktov také výrazné. Zistili sme, že vodná pohánková kaša predstavovala najlepšie prostredie pre rast *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* 1754.

Vo väčšine pripravených pohánkových produktoch došlo k zmene pH o 1 až 2 jednotky, v závislosti od použitého laktobacila. V mliečnej kaši, kde pH pokleslo priemerne o 1 až 1,5 jednotky, sa konečná hodnota pohybovala v rozmedzí 4,5 až 5 a vo vodnom od 4 do 4,5. Amarantová kaša bola stabilnejšia z hľadiska zmeny pH. Pre prehľadnosť sú rýchlosti poklesu pH uvedené v tabuľke 2.

Tab. 2 Rýchlosť poklesu pH [h<sup>-1</sup>]

	<i>Lb. rhamnosus</i> GG	<i>Lb. rhamnosus</i> VT1	<i>Lb. acidophilus</i> 145	<i>Lb. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> 1754	<i>Lb. casei</i> VII B/6	<i>Lb. paracasei</i> VII B/10	<i>Lb. helveticus</i> X A/2	<i>Lb. plantarum</i> III A/5
pohánka + voda	-0,317	-0,234	-0,42	-0,329	-0,019	-0,025	-0,133	-0,026
pohánka + mlieko	-0,144	-0,114	-0,173	-0,075	-0,01	-0,001	-0,116	-0,003
amarant + voda	-0,243	-0,176	-0,006	-0,105	-0,012	-0,015	-0,024	-0,208
amarant + mlieko	-0,267	-0,19	-0,005	-0,002	-0,021	-0,172		

V pohánkovej vodnej kaši fermentovanej kmeňom *Lb. acidophilus* 145 bola zaznamenaná najvyššia zmena pH oproti počiatočnému stavu, až o 2,5 jednotky a po ukončení obdobia skladovania dosiahlo pH hodnotu 3,5. Tento fakt mohol prispieť k okamžitému nástupu fázy odumierania *Lb. acidophilus* 145 po ukončení 10 h fermentácie. Tento jav pozorovali aj Charalampopoulos et al. (2002) a Lönnner a Åkesson (1988). Charalampopoulos et al. (2002) sledovali rast *Lb. acidophilus* v sladovom médiu, jačmennom a pšeničnom extrakte bez akýchkoľvek prídavkov. Kvôli chemickému zloženiu bolo sladové médium vhodnejšie ako zvyšné dve cereálie, avšak jačmenný a pšeničný extrakt vykazovali značný protektívny efekt na viabilitu *Lb. acidophilus* v kyslom prostredí, keďže laktobacil prejavoval citlivosť na takéto prostredie. Zistili, že limitujúcou hodnotou pH pre rast *Lb. acidophilus* bolo pH 3,8 a laktobacil vstúpil po fermentácii priamo do fázy odumierania, pravdepodobne v dôsledku neschopnosti zniesť nízke pH média na konci exponenciálnej fázy. Lönnner a Åkesson (1988) vo svojej štúdií určili túto hodnotu na pH medzi 3,4 až 3,6, ktorá závisela od typu použitého cereálneho substrátu.

V amarantovej vodnej kaši, kde obsah *Lb. acidophilus* 145 počas obdobia skladovania dokonca narastal, bola konečná hodnota pH vplyvom fermentačnej činnosti kmeňa *Lb. acidophilus* 145 o 26 % vyššia ako v pohánke. Z toho vyplýva, že amarant má pravdepodobne svojim zložením lepšiu pufrovaciu schopnosť než pohánka.

Najnižšia zmena hodnoty pH počas uchovávanía bola pozorovaná v pohánkovej mliečnej kaši fermentovanej *Lb. paracasei* VII B/10, s konečnou hodnotou 5,5.

## ZÁVER

Cieľom práce bolo sledovať dynamiku rastu baktérií mliečneho kysnutia v rastlinnom substráte, konkrétne v pohánkovej a amarantovej kaši s rozdielnym zložením, za účelom ich selekcie pre ďalšie práce zamerané na vývoj funkčnej potraviny pre celiatikov.

Väčšina testovaných laktobacilov vykazovala dobrý rast v cereálnom produkte, dokonca sa ich obsah počas 21 dní skladovania udržiaval nad hranicou  $10^6$  KTJ.ml<sup>-1</sup>. K výraznému odumieraniu došlo len v pohánkovej vodnej kaši fermentovanej *Lb. acidophilus* 145, kde jeho obsah po ukončení skladovacieho procesu klesol o 4 log poriadky. Prídavok mlieka v kašovitých pseudocereálnych substrátoch mal pozitívny vplyv na rastové parametre, stabilitu počtov počas uchovávanía a na zmeny pH hodnôt, ktoré boli vyvážené lepšou pufrovacou schopnosťou takéhoto substrátu. Najvyššia rastová rýchlosť bola zaznamenaná v pohánkovom mliečnom produkte fermentovanom *Lb. rhamnosus* GG. Amarantová kaša tvorila svojim obsahom stabilnejšie médium, čo sa odrazilo na zmene pH a prežívaní laktobacilov.

## LITERATÚRA

- ADAMS, J. Celiac Disease Statistics, 2007. [online] 2007 [cit. 16.11.2011]. Retrieved from the web:<<http://www.celiac.com/articles/1164/1/Celiac-Disease-Statistics/Page1.html>>.
- ANGELOV, A., GOTCHEVA, V., KUNCHEVA, R., HRISTOZOVA, T. 2006. Development of a new oat-based probiotic drink. In *International Journal of Food Microbiology*, vol. 112, 2006, p. 75-80.
- BAI, J., ZEBALLOS, E., FRIED, M., CORAZZA, G. R., SCHUPPAN, D., FARTHING, M. J. G., CATASSI, C., GRECO, L., COHEN, H., KRABSHUIS, J. H. 2007. Celiac disease. In *World Gastroenterology Organisation*, 2007, p. 1-18.

- BURITI, F. C. A., DA ROCHA, J. S., ASSIS, E. G., SAAD, S. M. I. 2004. Probiotic potential of Minas fresh cheese prepared with the addition of *Lactobacillus paracasei*. In *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*, vol. 38, 2004, p. 173-180.
- CURRY, B., CROW, V. 2003. *Lactobacillus* spp. General characteristics. In: ROGINSKI, H., FUQUAY, J.W., FOX, P.W. Encyclopedia of Dairy Sciences. Academic Press, London, 3, 2003, p. 1479-1484. ISBN 0-12-227235-8.
- FORESTIER, CH., DE CHAMPS, CH., VATOUX, C., JOLY, B. 2001. Probiotic activities of *Lactobacillus casei rhamnosus*: in vitro adherence to intestinal cells and antimicrobial properties. In *Res. Microbiol.*, vol. 152, 2001, p. 167-173.
- GÖRNER, F., VALÍK, E. 2004. *Aplikovaná mikrobiológia požívatin*. Malé centrum : Bratislava, 2004, 528 p. ISBN 80-967064-9-7.
- HELLAND, M. H., WICKLUND, T., NARVHUS, J. A. 2004. Growth and metabolism of selected strains of probiotic bacteria in milk- and water-based cereal puddings. In *International Dairy Journal*, vol. 14, 2004, p. 957-965.
- CHARALAMPOPOULOS, D., WANG, R., PANDIELLA S. S., WEBB, C. 2002. Application of cereals and cereal components in functional foods: a review. In *International Journal of Food Microbiology*, vol. 79, 2002, p. 131-141.
- KOCKOVÁ, M., VALÍK, E. 2011. Potential of cereals and pseudocereals for lactic acid fermentations. In *Potravinárstvo*, vol. 5, 2011, no. 2, p. 27-40.
- KOHAJDOVÁ, Z., KAROVIČOVÁ, J., MAGALA, M. 2011. Utilisation of chickpea flour for crackers production. In *Acta Chimica Slovaca*, vol. 4, 2011, no. 2, p. 98-107.
- KRAJČIROVÁ, M. 2007. Celiakálna choroba v primárnej starostlivosti. In *Pediatr. prax*, vol. 5, 2007, p. 268-269.
- LONNER, C., AKESSON, P. K. 1988. Acidification properties of lactic acid bacteria in rye sour doughs. In *Food Microbiology*, vol. 5, 1988, p. 43-58.
- MATTILA-SANDHOLM, T., MATTO, J., SAARELA, M. 2009. Lactic acid bacteria with health claims- interactions and interference with gastrointestinal flora. In *International Dairy Journal*, vol. 9, 2009, p. 25-35.
- MERCENIER, A., PAVAN, S., POT, B. 2003. Probiotics as biotherapeutic agents: Present knowledge and future prospects. In *Current Pharmaceutical Desin.*, vol. 9, 2003, p. 175-191.
- MORONI, A. V., ARENDT, E. K., BELLO, F. D. 2011. Biodiversity of lactic acid bacteria and yeast in spontaneously-fermented buckweath and teff sourdoughs. In *Food Microbiology*, vol. 28, 2011, p. 497-502.
- NEVORAL, J., 2005. Prebiotika, probiotika a synbiotika. In *Pediatric pro praxi*, vol. 2, 2005, p. 59-65.
- PARVEZ, S., MALIK, K. A., AH KANG S., KIM, H. Y. 2006. Probiotics and their fermented food products are beneficial for health. In *Journal of Applied Microbiology*, vol. 100, 2006, p. 1171-1185.
- PRADO, F. C., PARADA, J. L., PANDEY, A., SOCCOL, C. R. 2008. Trends in non-dairy probiotic beverages. In *Food Research International*, vol. 41, 2008, p. 111-123.
- SHAH, N. P. 2007. Functional cultures and health benefits. In *International Dairy Journal*, vol. 17, 2007, p. 1262-1277.
- STERR, Y., WEISS, A., SCHMIDT, H. 2009. Evaluation of lactic acid bacteria for sourdough fermentation of amaranth. In *International Journal of Food Microbiology*, vol. 136, 2009, p. 75-82.
- STN ISO 15214, 2002. *Mikrobiológia potravín a krmív: Horizontálna metóda stanovenia mezofilných baktérií mliečného kysnutia. Metóda počítania kolónií kultivovaných pri 30 °C*. Bratislava: Slovenský ústav technickej normalizácie, 2002.
- TURČÁNI, M., MAASOVÁ, D. 2002. Sekundárna malabsorbcia. In: HULÍN, I. *Patofyziológia*, SAP, Bratislava, 2002, p. 950-952, ISBN 80-89104-05-3.
- VALÍK, E., MEDVEĐOVÁ, A., LIPTÁKOVÁ, D., 2008. Characterization of the growth of *Lactobacillus rhamnosus* GG in milk at suboptimal temperatures. In *Journal of Food and Nutrition Research*, vol. 47, 2008, no. 2, p. 60-67.

### Acknowledgments:

This work was supported by grant VEGA no. 1/0094/10 and APVV-0590-10.

### Contact address:

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

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

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

Ing. Katarína Stančeková, Email: Institute of Biochemistry, Nutrition and Health Protection, Faculty of Chemical and Food Technology, Slovak University of Technology, Radlinského 9, 812 37 Bratislava, E-mail: stancekova.katarina@gmail.com

doi: 10.5219/143

**RELATIONSHIP OF RATIONAL NUTRITION FOR THE RISK OF CANCER OF THE BREAST IN THE FEMALE POPULATION IN SLOVAKIA***Michaela Tirpáková, Viera Lovayová***ABSTRACT**

Cancers are very specific cause of mortality in developed countries with multifactorial etiology and some cancer study data are showing the multi-play chain of hazard factors. The aim of this thesis is to point out to importance of prevention, of nutrition health and lifestyle to decrease of carcinoma of the breast generation risk. In the study was to transfer theoretical knowledge into clinical practice and to assess the of selected risk factors on the incidence and character of carcinoma of the breast in the Slovak population. Epidemiologic and clinical data demonstrated that environmental, demographic, lifestyle risk factors (nutrition health, alcohol, obesity) increase the risk of development of the disease. Used study methodology based on the „case – control“ study is the full harmonization with data collection from IARC (International Agency for Cancer Research). Using correlation analyses we found a significant linkage between selected risk factors and the development of carcinoma of the breast. Within the frame of case-control study 100 carcinoma of the breast and 100 controls have been analyzed. The test of robustness tested Chi-Square statistic. The robustness have been judged based on the p-values. On the base of received scientific outputs will be created the recommendation for preventive measures in the population so as to decrease cancer morbidity and mortality.

**Keywords:** carcinoma, breast, risk factor, primary and secondary prevention, nutrition health, health lifestyle

---

**ÚVOD**

Hodnoty morbidity a mortality onkologických ochorení dokazujú v medzinárodnom meradle stále stúpajúci trend v porovnaní s incidenciou a prevalenciou nádorov v minulých desaťročiach (Ferlay et al., 2004). Trendy výskytu a súčasne aj zmeny v postavení jednotlivých lokalizácií sú na Slovensku porovnateľné s krajinami západnej Európy a indikujú orientáciu preventívnych a intervenčných programov (Pleško, 2006). Karcinóm prsníka je najčastejšou neopláziou u žien vo vyspelých krajinách. Najohrozenejšou skupinou sú ženy po 50. roku života, ale ochorenie čoraz viac postihuje aj mladšiu ženskú populáciu.

Celosvetovo je najvyššia incidencia medzi americkými beloškami. Najnižšia incidencia je v krajinách juhovýchodnej Ázie a v Japonsku (Strnad, Daneš, 2001). Avšak i v Japonsku došlo k zvýšeniu incidence karcinómu prsníka v posledných rokoch paralelne so zmenami tradičných nutričných zvyklostí a životného štýlu. Za geografické rozdiely v incidencii karcinómu prsníka a za trend incidence je vo veľkej miere zodpovedný životný štýl, stav výživy, životosprávy a nutričných zvyklostí danej oblasti. Orientálne krajiny majú výrazne nižšie riziko, súčasne aj incidenciu a mortalitu na karcinóm prsníka. Západný životný štýl je spojený so stúpajúcou incidenciou tohto onkologického ochorenia v ženskej populácii. Pre súčasný životný štýl a životosprávu je typický vysoký príjem proteínov a živočíšnych tukov.

Viac než 40 % prijatej energie pochádza zo živočíšnej potravy. Opakom je tzv. východný typ životosprávy, ktorý má protektívny vplyv ako na incidenciu, tak na mortalitu karcinómu prsníka. Stravovanie v súčasnej dobe vo vyspelých krajinách možno charakterizovať ako nevyvážené, založené na relatívne obmedzenom výbere potravín s nízkou spotrebou rastlinných potravín (Blackburn et al., 2010).

Štúdie dokumentujú vplyv nesprávnej výživy ako rizikový faktor v patogeneze závažných zdravotných

problémov dnešnej doby, kam patria aj onkologické ochorenia. Môžeme konštatovať, že ide o ochorenia ktoré sa zväčša prejavia v dospelom veku, vyvíjajú sa však roky až desaťročia a často sú dôsledkom nesprávnej výživy v detstve a mladosti (Fussenegger et al., 2008; Hlavatá, 2007).

Množstvo a zloženie prijímanej potravy tvorí komplexný faktor s priamym vzťahom k riziku vzniku onkologického ochorenia prsníka. Jedným z hlavných problémov epidemiologických štúdií, ktoré sú zamerané na hľadanie súvislosti medzi stravovacími návykmi a rizikom rozvoja ochorenia, je problematická parametrizácia stravovacích návykov. Energetická hodnota ovplyvňuje energetický metabolizmus organizmu a tým produkciu steroidných hormónov. Zastúpenie a typ tuku v potrave, spolu s podielom príjmu zeleniny a ovocia, hrajú významnú úlohu pri vzniku malignít. Zdá sa, že diéta bohatá na vlákninu, ovocie a zeleninu je spojená s nižším rizikom vývoja karcinómu prsníka (Abrahámová, Dušek et al., 2003).

Vláknina, ktorá sa nachádza v zelenine a ovocí sa líši od vlákniny pochádzajúcej z obilia. Podľa niektorých štúdií zvýšený príjem pšeničných otrúb rezultuje do zníženia sérových hladín estrogénov, vláknina z ovsených alebo kukuričných otrúb nemá vplyv na hladiny estrogénov. Iba vláknina z ovocia a zeleniny má vplyv na zníženie rizika rakoviny prsníka, vláknina z obilia nemá protektívny účinok. Výsledky štúdií naznačujú, že ochranné pôsobenie dostatočného príjmu ovocia a zeleniny nemožno pripísať jednému konkrétnemu nutrientu, ale s najväčšou pravdepodobnosťou ide o synergické pôsobenie celého komplexu viac alebo menej známych látok a ich vzájomných pomerov, ktoré vo svojom komplexe, pri pravidelnom dlhodobom príjme, majú výrazný protektívny účinok pri znižovaní rizika rakoviny prsníka (Magalová, 1999).



Zelenina a ovocie sú veľmi komplexné potraviny, ktoré obsahujú široké spektrum potencionálne prospešných látok, ako sú vitamíny, minerálne látky, vláknina, karotenoidy, flavonoidy, terpény, steroly, indoly, fenoly a mnoho ďalších bioaktívnych substancií, ktoré môžu pomáhať proti vzniku rakoviny prsníka. Z hľadiska možného efektu na riziko vzniku rakoviny boli v odborných štúdiách hodnotené karotenoidy (prekursor vitamínu A), retinol (vitamín A), vitamín C a E. Bol hodnotený príjem potravou a vo forme suplementu. Štúdie potvrdili protektívny efekt vitamínov nachádzajúcich sa v strave, naopak vitamíny podávané v purifikovanej forme suplement sa javia ako neúčinné a niektoré štúdie, ktoré majú pôvodne overiť protektívny účinok vitamínových preparátov, dokonca naopak zistili zvýšenie rizika rakoviny po podávaní beta-karoténu (Cummings, Bingham 1998). Nezanedbateľný je tiež aj nepriamy efekt, hlavne cestou účinku na energetický príjem a udržiavanie zdravej váhy. Konzumácia zeleniny a ovocia tak môže byť obzvlášť dôležitá tým, že nahradí iné, energeticky výdatnejšie alternatívy (Fiala, 2008).

Množstvo telesného tuku, jeho rozloženie v organizme a vek v dobe výskytu nadváhy ovplyvňujú metabolizmus estrogénov a môžu tak zvýšiť riziko vzniku karcinómu prsníka. Celosvetové epidemiologické štúdie preukázali zvýšené riziko vývoja ochorenia u obeznych žien diagnostikovaných po menopauze. Pritom bolo u žien s karcinómom prsníka, zaznamenaným pred menopauzou, preukázané znížené riziko spojené s prítomnosťou telesnej nadváhy. Aktuálne epidemiologické štúdie preukázali nepriaznivý vplyv zvýšenej konzumácie alkoholu ako riziko vzniku onkologického ochorenia prsníka. Mechanizmus účinku alkoholu na zvýšení rizika vzniku malígneho ochorenia je daný predovšetkým ovplyvnením hladiny estrogénov v ženskom organizme, narušením integrity bunkových membrán a inhibíciou reparačných zmien v DNA (Abrahámová, Dušek et al., 2003).

Cieľom práce bolo:

- zistiť výskyt rizikových faktorov v období pred ochorením u respondentiek s potvrdeným karcinómom prsníka a porovnať ich s kontrolnou skupinou zdravých žien
- overiť vedecké tvrdenia, že nesprávna výživa, spôsob života a zanedbanie prevencie prispievajú k vzniku nádorového ochorenia prsníka
- potvrdiť význam zdravej výživy, spôsobu života a prevencie pri znižovaní rizika karcinómu prsníka.

## MATERIÁL A METÓDY

Pre účel našej práce sme použili štruktúrne vyváženú analytickú štúdiu prípadov a kontrol. Použitá metodika výskumu „prípado - kontrola“ sa zhoduje so zberom údajov IARC (Medzinárodná agentúra pre výskum rakoviny). Retrospektívne boli sledované vybrané parametre, ako možné rizikové faktory pri vzniku rakoviny prsníka. Prioritou bolo podrobnejšie sa zamerať na analýzu rizikových faktorov životného štýlu, negenetických preventabilných rizikových faktorov, na riziko vzniku onkologického ochorenia prsníka u chorých žien

a porovnať výskyt týchto rizikových faktorov v skupine zdravých žien.

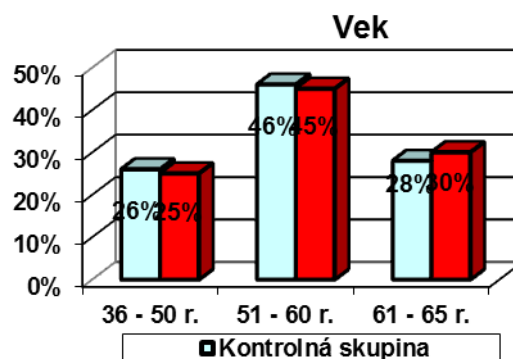
Výskumu sa zúčastnilo 200 respondentiek, ktoré tvorili dve skupiny. Jednu skupinu tvorilo 100 žien s potvrdeným karcinómom prsníka a druhú skupinu tvorilo 100 žien bez karcinómu prsníka, ktoré predstavovali kontrolnú skupinu. Kontrolná skupina sa vyberala náhodne, podľa pohlavia, veku a vzdelania, a porovnávali sa údaje od skupiny žien, ktoré mali diagnostikovanú malignitu prsníka. Výskumu sa zúčastnili pacientky Východoslovenského onkologického ústavu, ako aj členky Klubu Liga proti rakovine. Prvú skupinu respondentiek, teda s nádorovým ochorením, tvorili ženy s vekovým rozpätím od 38 rokov do 75 rokov, pričom priemerný vek bol 56,5 rokov. Kontrolnú skupinu tvorili ženy s vekovým rozpätím od 36 do 74 rokov, pričom priemerný vek bol 55 rokov. Dotazník obsahoval otázky 4 väčších celkov - osobné údaje, stravovacie návyky, údaje o spôsobe života a rodinná a gynekologická anamnéza. Odpovede, získané pomocou dotazníka, sme štatisticky vyhodnotili, pričom sme použili opisné vyhodnotenie formou tabuliek a grafov, a analytické vyhodnotenie pomocou chí kvadrátového testu a stupňa významnosti. Potom sme jednotlivé rizikové faktory vzájomne porovnávali u oboch sledovaných skupín.

## VÝSLEDKY

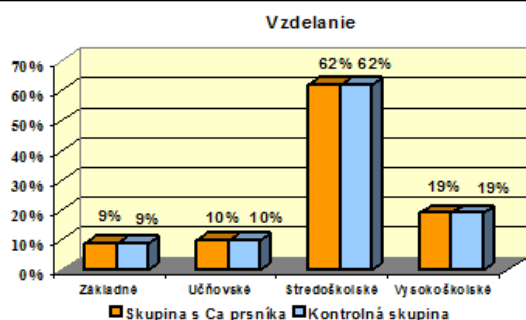
Analýzou údajov o veku sme zistili, že najviac postihnutých žien s touto chorobou bolo vo veku 41 – 50 rokov (40 %). Druhá v poradí s výskytom rakoviny prsníka bola veková kategória 51 – 60 rokov (37,5 %). Vo vekovej kategórii 62 – 67 rokov to už bolo len 12,5 % , 35 – 40 rokov 7,5 % a 28 – 31 rokov 2,5 %. Z týchto výsledkov sme zistili, že najviac postihnutou skupinou žien v našom

Tabuľka 1 Rozdelenie sledovaných skupín podľa veku

VEK	KONTROLNÁ SKUPINA	SKUPINA s karcinómom PRSNÍKA
36 – 50 r.	26 %	25 %
51 – 60 r.	46 %	45 %
61 – 75 r.	28 %	30 %



Obrázok 1 Rozdelenie sledovaných skupín podľa veku sledovanom súbore je veková kategória od 41 – 60 rokov (viď. tab. 1, obr. 1).



**Obrázok 1** Rozdelenie sledovaných skupín podľa vzdelania

Ďalším rizikovým faktorom, ktorý do veľkej miery prispieva k zvyšovaniu rizika vzniku karcinómu prsníka a ktorému sa venuje veľká pozornosť, je nadváha a obezita. Preto nás v našom dotazníku zaujímala telesná výška a hmotnosť, aby sme mohli vypočítať u našich respondentiek hodnoty BMI a tak zistiť, či spĺňajú kritériá normálnej váhy alebo či už majú nadváhu alebo až obezitu. Kritérium podváhy (BMI pod 18,5) v oboch sledovaných skupinách spĺňalo 1 % respondentiek. V skupine s karcinómom prsníka 7 % respondentiek malo BMI v rozpätí 18,5 - 21, čo predstavuje štíhlosť. V kontrolnej skupine v tomto rozpätí bolo až 13 % žien. Pri BMI 21,1 - 24,9 boli medzi oboma sledovanými skupinami veľké rozdiely. Kým v skupine s nádorom prsníka malo normálnu váhu len 23 % žien, v kontrolnej ich bolo až 45 %, čo je dvakrát viac ako v skupine s ochorením. Pri nadváhe (BMI 25 - 29,9) bol pomer opačný. V skupine s ochorením prsníka malo nadváhu až 46 % žien, kým v kontrolnej skupine ich bolo len 19 %, čo predstavuje skoro dva a pol krát menej ako u respondentiek s karcinómom prsníka. Pri našom výskume sme zistili, že určité % žien v oboch sledovaných skupinách trpí obezitou rôzneho stupňa, pričom pomer bol približne rovnaký. Pri obezite I. stupňa (BMI 30 - 35) bol pomer 15 % pre skupinu s ochorením a 16 % pre kontrolnú skupinu. Obezitu II. stupňa (BMI 35 - 40) v skupine s nádorom prsníka malo 6 % a v kontrolnej skupine 4 % respondentiek. Obezitou III. stupňa v oboch sledovaných skupinách trpí 2 % žien (tab. 2).

**Tabuľka 2** Rozdelenie sledovaných skupín podľa BMI

BMI	KONTROLNÁ SKUPINA	SKUPINA S KARCINÓMOM PRSNÍKA
pod 18 (podváha)	1 %	1 %
18,5 – 21 (štíhlosť)	13 %	7 %
21,1 – 24,9 (normálna váha)	45%	23 %
25 – 29,9 (nadváha)	19 %	46 %
30 – 35 (bezita I.st.)	16%	15 %
35 – 40 (obezita II.st.)	4 %	6 %
nad 40 (obezita III.st.)	2 %	2 %

K správnej výžive patrí aj konzumácia ovocia a zeleniny, ktorá je však u nás ešte stále v pozadí. Mnohí ľudia ešte nepochopili, že konzumáciou dostatočného množstva ovocia a zeleniny môžu upevniť svoje zdravie a tak znížiť riziko vzniku onkologického ochorenia. Naše respondentky síce konzumujú ovocie a zeleninu, ale pomerne v malom množstve, ako sme zistili pri našom výskume. Ovocie v kontrolnej skupine konzumuje 82 % a príležitostnú konzumáciu priznalo 18 %. V skupine s nádorovým ochorením prsníka konzumuje ovocie 88 % a príležitostne 12 % (tab. 3). Čo sa týka porcií ovocia prevažná časť respondentiek konzumuje len 1 - 2 porcie ovocia (v kontrolnej skupine 85 % a v skupine s ochorením 77 %). V skupine s karcinómom prsníka bolo 8 % žien, ktoré konzumujú 3 porcie a len 1 % konzumácie 5 porcií ovocia. V kontrolnej skupine bola situácia o niečo lepšia. Niektoré ženy z tejto skupiny konzumovali oveľa viac ovocia: 3 porcie 9 %, 6 porcií 1 %, 7 porcií 1 % a dokonca bolo 1 %, ktoré konzumujú 15 porcií ovocia (v kontrolnej skupine bol priemer = 1,7; v skupine s karcinómom prsníka priemer = 1,5; v oboch skupinách bol medián = 1, modus = 1).

**Tabuľka 3** Konzumácia ovocia v sledovaných skupinách

KONZUMÁCIA OVOCIA	KONTROLNÁ SKUPINA	SKUPINA S KARCINÓMOM PRSNÍKA
áno	82 %	88 %
príležitostne	18 %	12 %
nie	0 %	0 %

Pri analýze údajov o konzumácii zeleniny bola situácia analogická. V kontrolnej skupine konzumuje zeleninu 77 % a príležitostne 23 % respondentiek. V skupine s ochorením bol pomer trochu iný. Pravidelnú konzumáciu priznalo 87 % a príležitostnú 13 % žien (tab. 4).

**Tabuľka 4** Konzumácia zeleniny v sledovaných skupinách

KONZUMÁCIA ZELENINY	KONTROLNÁ SKUPINA	SKUPINA S KARCINÓMOM PRSNÍKA
áno	77 %	87 %
príležitostne	23 %	13 %
nie	0 %	0 %

Z mnohých našich štatistík vyplýva, že naši obyvatelia konzumujú aj zeleninu v malých množstvách. To sa potvrdilo aj pri našom výskume. V oboch sledovaných skupinách respondentky väčšinou konzumujú len 1 porciu (kontrolná skupina 61 % a skupina s ochorením 74 %) alebo 2 porcie (v kontrolnej skupine 24 %, kým v tej druhej len 15 %). V kontrolnej skupine bolo 2 % žien, ktoré konzumujú až 10 porcií zeleniny, kým v skupine s karcinómom prsníka konzumujú maximálne 6 porcií a aj to len 1 % (v kontrolnej skupine bol priemer = 1,5; v druhej priemer = 1,3; medián = 1, modus = 1 v oboch sledovaných skupinách rovnaký). Ako vidíme, mnohé ženy oboch sledovaných skupín nepovažujú za potrebné konzumovať ovocie a zeleninu, napriek tomu, že mnohí odborníci to odporúčajú. Respondentky kontrolnej skupiny, ako aj skupiny s ochorením priznali, že konzumáciu ovocia a zeleniny podceňujú, pričom sú si vedomé toho, že je potrebné tento stav zlepšiť.

**Tabuľka 5** Štatistické vyhodnotenie kontrolnej skupiny a skupiny s karcinómom prsníka

Otázky z dotazníka	Kontrolná skupina			Skupina s ca prsníka		
	priemer	medián	modus	priemer	medián	modus
Vek	55	55	53	56,5	57	58
BMI	26	24,2	21,3	27,4	27	28,4
Porcie ovocia /deň	1,7	1	1	1,5	1	1
Porcie zeleniny /deň	1,5	1	1	1,3	1	1
Konzumácia piva (dl)	9,5	5	2	6	3	1
Konzumácia vína (dl)	5,4	4	2	3	2	1
Konzumácia destilátov	2,3	1	1	2,5	1	1

**Tabuľka 6** Výpočty analytickou metódou

Otázky z dotazníka	OR	X <sup>2</sup>	SV	P	
BMI	3,2	15,8	1	> 0,001	99,9%
Konzumácia ovocia	0,64	1,41	1	< 0,05	95 %
Konzumácia zeleniny	0,5	3,38	1	< 0,05	95 %
Konzumácia alkoholu	0,64	2,03	1	< 0,05	95 %

Medzi ďalšie rizikové faktory vzniku rakoviny prsníka patrí alkohol. Jeho konzumácia podporuje u premenopauzálnych, ako aj postmenopauzálnych žien rozvoj karcinogenézy. Preto sme sa našich respondentiek pýtali aj na túto komoditu. V kontrolnej skupine potvrdilo konzumáciu alkoholu 3 %, kým v skupine s ochorením to bolo 0 %. Príležitostnú konzumáciu alkoholu potvrdili obe sledované skupiny. Kým v kontrolnej skupine je to 74 %, v skupine s karcinómom prsníka je to o niečo menej, teda 68 %. Pri nepotvrdennej konzumácii sú medzi oboma sledovanými skupinami trochu väčšie rozdiely. V kontrolnej skupine alkohol nekonzumuje 23 %, v druhej skupine je to 32 % respondentiek. Zároveň nás v našom dotazníku zaujímalo, aký druh alkoholu respondentky preferujú a aké množstvo konzumujú. V kontrolnej skupine pije pivo 18 %, víno 50 % a destiláty 26 % žien, pričom v priemere vypijú mesačne 9,5 dl piva; 5,42 dl vína; a 2,3 dl destilátov. V skupine s karcinómom prsníka pije pivo 25 %, víno 50 % a destiláty 18 % žien. Tieto ženy vypijú za mesiac v priemere 6 dl piva, 3 dl vína a 2,5 dl destilátov.

V kontrolnej skupine boli jednotlivé % rovnomerne rozdelené medzi rôzne množstvá alkoholu ako napr. pri pive: 2 % pije 1 dl, 3 % 2 dl, 1 % 3 dl a pod. Našli sa aj respondentky, ktoré mesačne vypijú až 10 - 15 dl piva. Pri víne bola situácia trochu iná. Až 5 % žien pije mesačne 1 dl vína, 15 % pije 2 dl, 5 % pije 4 dl, 8 % 5 dl a pod. Medzi týmito ženami sú konzumentky aj väčšieho množstva vína, ako 10 dl, 15 dl a 45 dl. V tejto skupine konzumujú respondentky destiláty v množstve 1 dl (11 %), 2 dl (3 %), 3 dl (3 %), ale aj napr. 10 dl (1 %).

V skupine s karcinómom prsníka je situácia podobná. Pivo konzumujú ženy mesačne v množstve 1 dl (6 %), 2 dl (3 %), 3 dl (5 %), 4 dl (2 %) a pod. 1 % respondentiek pije až 20 dl a 2 % dokonca 25 dl piva. Pri víne najviac žien konzumuje 1 dl (16 %), 2 dl (14 %), 3 dl (2 %), 4 dl (4 %), 5 dl (6 %) vína, niektoré z nich aj 8 dl (1 %) a 10 dl (4 %). Destiláty konzumuje v tejto skupine v množstve 1 dl (13 %), 2 dl (3 %), 4 dl (1 %) a 20 dl (1 %). Z týchto čísel je vidieť, že medzi respondentkami oboch sledovaných skupín sú ženy, ktoré konzumujú alkohol v malom množstve, ale sú aj ženy s konzumáciou alkoholu vo väčších množstvách (kontrolná skupina: medián pri pive =

5, pri víne = 4, pri destilátoch = 1, modus pri pive a víne = 2, pri destilátoch = 1; skupina s karcinómom prsníka: medián pri pive = 3, pri víne = 2, pri destilátoch = 1, modus je pri všetkých troch druhoch alkoholu je rovnaký = 1).

Okrem opisnej metódy sme pri spracovaní našich výsledkov použili aj analytickú metódu. Rozdiely jednotlivých odpovedí v dotazníku medzi respondentkami kontrolnej skupiny a skupiny s karcinómom prsníka boli testované Chí kvadrátovým testom priznaním miery významnosti. Na základe Chí kvadrátu, stupňa významnosti a pomeru šancí sme mohli vyhodnotiť pravdepodobnosť ochorenia karcinómom prsníka u našich respondentiek. Z číselných údajov, získaných v našom dotazníku sme zase zistili priemer, medián a modus, ktoré sme interpretovali pomocou nasledujúcej tabuľky (tab. 5).

Ďalšie analyzované údaje, teda Chí kvadrát (Chí kv.), stupeň významnosti (P), stupeň voľnosti (SV) a pomer šancí (OR), sme vyhodnotili pomocou tabuľky 6.

Z výsledkov nášho dotazníkového prieskumu vyplýva, že počet porcií ovocia a zeleniny konzumovaných denne bol nižší v skupine respondentiek s rakovinou prsníka, pri analýze konzumácie alkoholu respondentky v kontrolnej skupine pijú mesačne viac dl piva a vína, ale v skupine s malignitou prsníka mesačne viac dl destilátov. Z výpočtu hodnôt BMI vyplynulo, že respondentky s karcinómom prsníka trpia 3,2 krát častejšie obezitou ako ženy v kontrolnej skupine (chí kvadrát = 15,8; SV = 1, P = > 0,001; 99,9 %, OR = 3,2). Pri ostatných otázkach nám z výpočtov vyšli hodnoty, ktoré neboli štatisticky významné. OR sme sice vypočítali, ale nemôžeme ho pri našej teórii uplatniť.

## DISKUSIA

V dnešnej dobe sa často stretávame, v súvislosti s onkologickými ochoreniami, s pojmom „životný štýl“. Ide spravidla o výzvu na zmenu spôsobu života v rámci primárnej prevencie. Čo vlastne treba zmeniť a na čo sa zamerať v súvisi s prevenciou vzniku karcinómu prsníka. So zmenou životného štýlu treba začať už v rodinách a školách. Výživovými faktormi je možné zabrániť vzniku 30 - 40 % rakoviny prsníka. Ako najvýznamnejšie rizikové faktory sa ukazujú nadváha a obezita, konzumácia

alkoholu, vysoká konzumácia mäsa a údenín, naopak najvýznamnejšími ochrannými faktormi sa javí vysoká konzumácia zeleniny a ovocia a pohybová aktivita. Je preto potrebné preferovať zdravú výživu s obsahom zeleniny a ovocia, pohyb, šport, svieži vzduch, vyhýbať sa nadváhe, fajčeniu a konzumácii alkoholických nápojov, najmä koncentrovaných (**Kuzma, 2007; Fiala, 2004**). Podľa agentúry Reuters môže až tretina bežných prípadov zhubného ochorenia prsníka vo vyspelých štátoch predísť zdravý životný štýl. Potvrďuje to štúdia, na ktorej sa podieľalo 23 odborníkov z organizácií World Cancer Research, na čele s Michaelom Marmotom, ktorí analyzovali výskyt rakoviny na celom svete a údaje o stravovaní, množstve pohybu a hmotnosti, s cieľom zistiť ako tieto faktory prispievajú k vzniku malígneho ochorenia. Vedci zistili, že zdravý životný štýl by zabránil v Británii 42 % a v USA 38 % prípadov karcinómu prsníka. Vedci, odborníci na výživu a WHO odporúčajú vysokú konzumáciu zeleniny a ovocia, celozrnného pečiva a obmedzenie červeného mäsa, tukov a cukrov (**Mrocek, 2009**).

Predpokladá sa, že aspoň jedna tretina karcinómu prsníka je spôsobená tým, čo jeme. Štúdia žien v Lowe ukázala, že ženy, ktoré v strave uprednostňovali hovädzie steaky, hamburgery, šunku alebo slaninu mali 4,62 násobne vyššie riziko vzniku zhubného nádoru prsníka.

V poslednom období sa stále väčšia pozornosť venuje determinovaniu účinku jednotlivých druhov tukov a ich komponentov, najmä polynenasýtených mastných kyselín na karcinóm prsníka. Mastné kyseliny prijímané potravou alebo syntetizované v organizme sa využívajú jednak ako energetická rezerva, jednak na syntézu bunkových komponentov, hlavne plazmatických membrán a membrán bunkových organel. Oxidácia MK je jednou z metabolických ciest, ktorou bunky získavajú energiu pre syntézu ATP. Hlavnou cestou je  $\beta$ -oxidácia MK prebiehajúca v mitochondriách a peroxizómoch. V malej miere sú MK metabolizované  $\alpha$ -hydroxyláciou a  $\omega$ -oxidáciou. Tieto dve metabolické cesty oxidácie MK, za fyziologických podmienok využívané len minimálne, môžu byť veľmi dôležité pre rast nádorov alebo ich inhibíciu tým, že generujú produkciu cytotoxických lipoperoxidov PNMK, ako aj enzýmov týchto oxidačných ciest. Strava s vysokým obsahom n-6 PNMK (rastlinné oleje a tuky) účinne zvyšuje tumorigénny proces, kým tuky s vysokým obsahom n-3 PNMK (rybí olej) má menej stimulačné účinky a často potláča karcinogénu prsnej žľazy. Esenciálne MK môžu modulovať toto riziko prostredníctvom prostaglandínov, ktoré podporujú progresiu nádorového procesu ako kokarcinogény alebo promotory tumorov. Mastné kyseliny môžu vstupovať do procesov karcinogézy rakoviny prsníka a mať podľa svojho zloženia, či už stimulačnú alebo inhibičnú úlohu v tomto procese (**Magalová T., 1999**). O vzťahu alkoholu ku karcinómu prsníka existujú mnohé rozsiahle štúdie, ktoré oveľa jednoznačnejšie, ako pri tuku dokazujú pozitívny vzťah medzi konzumáciou alkoholu a výskytom nádoru prsníka, a to u premenopauzálnych aj postmenopauzálnych žien. Ani pri konzumácii alkoholu nie je jasný patofyziologický mechanizmus, ktorý môže viesť k zvýšeniu karcinogézy, aj keď sa v súčasnosti venuje zvýšená pozornosť tejto otázke.

Predpokladá sa niekoľko možných mechanizmov: alkohol môže ovplyvňovať endokrinný systém, vrátane alternácie metabolizmu estrogénov, môže ovplyvňovať reparáciu DNA alebo schopnosť imunologickej kontroly, môže urýchľovať transport karcinogénov do tkaniva prsníkov, poškodzovať membránové funkcie alebo ovplyvňovať hepatálny metabolizmus karcinogénov. Vo vzťahu alkoholu a karcinómu prsníka sa diskutuje o závislosti tohto vzťahu od veľkosti dávky. Niektoré práce nezistili závislosť medzi miernym príjmom alkoholu (menej ako 20g/deň) a zvýšeným rizikom zhubného nádoru prsníka. Konzumácia 2-3 nápojov denne (30-40g/deň) veľmi významne zvyšuje riziko vzniku karcinómu prsníka, pričom výsledky rozsiahlej metaanalýzy naznačujú, že zvýšené riziko spôsobuje konzumácia alkoholu ako takého, bez rozdielu, o aký alkoholický nápoj ide. Predpokladá sa, že prsníky sú vnímavejšie na rizikové faktory karcinogézy prsníka v priebehu adolescencie a v rannej dospelosti, preto by v mladosti mali ženy obmedziť konzumáciu alkoholu, a tak znížiť možné riziko neskoršieho nádorového ochorenia prsníkov. Úplnú abstinenciu je preto vhodné odporúčať ženám s vysokým rizikom karcinómu prsníka (**Magalová, 1999**). Epidemiologické štúdie potvrdzujú názory, že u obéznych žien je vyššie riziko onkologického ochorenia prsníka. Strava s vysokým obsahom tuku je stravou s vysokým obsahom kalórií, ktorá významne napomáha k získaniu nadváhy a k obezite a je charakterizovaná nadmerným ukladaním tuku v celom tele. U postmenopauzálnych žien je tukové tkanivo hlavným zdrojom tvorby estrogénov, ktoré vznikajú premenou nadobličkových a vaječnickových androgénov v tukovom tkanive. Schopnosť podkožného tuku meniť androgény na estrogény stúpa s pribúdajúcim vekom a s pribúdajúcou váhou. Inými slovami, čím staršia a obéznejšia je žena, tým je lepšie vybavená produkciou estrogénov v tukovom tkanive. **Dr. Hershcopf a Dr. Bradlow** dokázali, že obezita je výrazne spojená so zvýšeným výskytom karcinómu prsníka, spôsobeným estrogénom a že prognóza takeého nádoru sa zhoršuje s nadmernou váhou. Po sledovaní vzorky viac než 400 000 žien mohlo American Cancer Society konštatovať, že úmrtnosť na zhubný nádor prsníka bola o 50 % vyššia u obéznych žien než u žien, ktoré mali normálnu váhu. Podľa najnovších výskumov existuje pozitívna asociácia medzi celkovým príjmom energie a tukov a plazmatickými koncentraciami estrogénov aj u premenopauzálnych žien.

Je pravdepodobné, že obezita ako rizikový faktor karcinómu prsníka pôsobí prostredníctvom hormonálneho mechanizmu, ktorý podporuje predpoklad, že strava bohatá na tuky je spojená so skorším nástupom menarché, ako aj neskoršou menopauzou, čo predlžuje časovú periódu, počas ktorej je žena vystavená vysokým hladinám estrogénov. Zvýšený celkový príjem energie však možno považovať za rizikový faktor len vtedy, keď vedie k obezite, ale nie, keď je spojený s vysokým výdajom energie (**Starenskyj, 2009; Ryšavá, 2009**).

V Japonsku konzumujú ženy 40 - 50 g tuku denne a ročný výskyt karcinómu prsníka je 30 - 35 prípadov na 100 000 žien za obdobie roka. V USA konzumujú ženy 145 g tuku denne a ročný výskyt karcinómu prsníka je 100 prípadov na 100 000 žien za rok, teda 3x viac. To znamená, že keď príjem tukov prevyší 20 % kalórií, zvýši

sa počet prípadov zhubného nádoru prsníka. Nacional Cancer Institute zverejnil oficiálne stravovacie doporučenie. Ženy môžu jednoduchou zmenou stravy znížiť svoje riziko karcinómu prsníka. Ak prestanú fajčiť a piť, a začnú jesť stravu s nízkym obsahom tukov a vysokým obsahom vlákniny, založenú na celozrnných obilovinách, ovocí a zelenine, ktorá im umožní dosiahnuť alebo udržať normálnu váhu, všetky tieto opatrenia im účinne znížia riziko rakoviny prsníka (Starenskyj, 2009).

### ZÁVER

Vplyv faktorov, ktoré tiež prispievajú k vzniku malignity prsníka a ktoré nemožno ovplyvniť, ako napr. vek a genetické dispozície, sa zdá byť obrovský. Ale stále existujú faktory, nad ktorými môže každá žena prevziať kontrolu. Sú to hlavne nevhodné stravovacie zvyklosti, spolu s konzumáciou alkoholu a fajčenie. Ich prítlačivosť, návykovosť a pôsobenie reklamy u mnohých žien víťazi nad tradičnou skromnou zdravotne - výchovnou argumentáciou. Všetky v súčasnosti navrhované opatrenia patria do tzv. zdravého životného štýlu. Žena by mala predovšetkým žiť tak, aby čo najviac obmedzila vplyv všetkých rizikových faktorov, okrem tých, ktoré sa nedajú ovplyvniť, teda vek, genetická predispozícia a reprodukčné faktory. Oblasť, ktorú môže každá žena ovplyvniť, sú stravovacie návyky. Prevenciu proti nádorovému ochoreniu prsníka poskytuje strava bohatá na ovocie, zeleninu a cereálie, s potlačením červeného mäsa, nasýtených tukov, cukru a konzumácie alkoholu. Je vhodné užívať rastlinné tuky, najmä olivový olej. Alkohol je zvlášť nebezpečný, najmä ak je kombinovaný s fajčením. Správna výživa je spojená s normálnou hmotnosťou, ktorá tiež predstavuje dôležitý prvok v prevencii karcinómu prsníka. Súčasťou zdravého životného štýlu musí byť dostatok primeranej telesnej aktivity a znižovanie psychického zaťaženia organizmu. Aj v tejto oblasti musia ženy mnoho urobiť. Zanedbávanie zdravého životného štýlu u žien vedie k zvýšenému výskytu nádorového ochorenia prsníka. Ďalším dôležitým prvkom pri znižovaní morbidity a mortality karcinómu prsníka sú pravidelné preventívne prehliadky. Je potrebné, aby sa ich zúčastňovala každá žena a nepodceňovala túto oblasť prevencie. Z výsledkov nášho výskumu vyplýva, že je potrebné zvyšovať nutričné uvedomenie populácie, apelovať na vplyv stravovania na vznik a rozvoj onkologických ochorení, aby zmeny viedli k dodržiavaniu nutričných odporúčaní v dennom príjme potravy a obmedzeniu konzumácie alkoholu, a tým k zlepšovaniu zdravotného stavu populácie.

### LITERATÚRA

- ABRAHÁMOVÁ, J., DUŠEK, L. 2003. Možnosti včasného záchytu rakoviny prsu. Praha:Grada, 2003, s. 227. ISBN: 8024704994
- 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.
- CUMMINGS, J. H., BINGHAM, S. A. 1998. Diet and prevention of cancer. In *British Medical Journal*, vol. 317, 1998, p.1636-1640.
- FERLAY, J., BRAY, P., PIZANI, P., PARKIN, D. M. 2004. Cancer incidence, mortality and prevention worldwide. IARC cancerbase No 5, version 20 IARC Press, Lyon 2004.
- FIALA, J. 2004. Výživa a riziko rakoviny – časť I: Základní princípy. In *Výživa a potraviny*, vol. 59, 2004, no. 1, p. 16-19.
- FIALA, J. 2008. Současný stav vnímání výživy v prevenci rakoviny. In *Onkologická péče*, vol. 12, 2008, no. 1, p. 7-11.
- FUSSENEGGER, D., PIETROBELLI, A., WIDHALM, K. 2008. Childhood obesity: political developments in Europe and related perspectives for future action on prevention. In *Obesity Reviews*, vol. 9, 2008, no. 1, p.76-82.
- HLAVATÁ, A. 2007. Obézne dieťa v ambulancii lekára pre deti a dorast. Klinické odporúčania I. In *Pediatrica pre prax*, vol. 8, 2007, p.12-16.
- KUZMA, I. 2007. Rakovina prsníka. Liga proti rakovine. Bratislava: Komprint s.r.o., 2007, p.55.
- MAGALOVÁ, T. 1999. Výživa a nádorové ochorenia ženského prsníka. In *Bratislavské lekárske listy*, vol. 100, 1999, no. 9, p. 503-514.
- MROCEK, T. 2009. Zdravý životný štýl pomáha. In *Onkomagazín*, vol. 3, 2009, no. 1, p. 58-59.
- PLEŠKO, I. 2006. Aktuálne globálne a lokálne poznatky a problémy epidemiológie zhubných nádorov. In *Onkológia*, vol. 1, 2006, no. 1, p.8-13.
- RYŠAVÁ, L. 2006. Výživa a rakovina (potraviny snižujúci její riziko). In *Moje zdraví*, vol. 4, 2006, no. 3, p. 44-46.
- STRNAD, P., DANEŠ, J. 2001. Nemoci prsu pro gynekology. Praha: Grada, 2001, s.324. ISBN: 8071697141

### Contact address:

Michaela Tirpáková, Department of Public Health, Pavol Jozef Šafárik University in Košice, Trieda SNP 1, 040 11 Košice, Slovak Republic, E-mail: michaelat99@gmail.com

Viera Lovayová, Department of Medical Microbiology and Clinical Microbiology, Pavol Jozef Šafárik University in Košice, Trieda SNP 1, 040 11 Košice, Slovak Republic, E-mail: Viera-l@email.cz



doi: 10.5219/170

## NATURAL SURFACTANTS AND THEIR USE IN FOOD INDUSTRY

*Lenka Tmáková, Stanislav Sekretár, Štefan Schmidt, Jarmila Hlásniková, Lenka Vrbíková, František Kreps*

### ABSTRACT

Microorganisms produce wide range of surfactants, generally called biosurfactants. These compounds are mainly divided according to their molecular weight, physico - chemical properties and mode of action. Saponins, plant surfactants, have properties of soap and they are high foaming and therefore are used in cosmetic (shampoos, liquid soaps et cetera) and food industry (sweeteners, food additives into the effervescent et cetera). Most of them are spread in plants of agriculture importance and some of them are basic segments in human food. They often occur in plants (in more than 100 species). Saponins can be found in vegetables as a soya, a bean, a lentil, a spinach, a tomato, a potato, a garlic, a onion. Today biosurfactants are mainly used in bioremediation but they can be utilized in many sectors of food industry. We have paid attention to some microbial and plant surfactants and their prospects of exploitation in this industry.

**Keywords:** biosurfactant, saponin, surface activity, bioemulsifier

### ÚVOD

Tenzidy sú amfifilné látky, ktoré obsahujú v molekule hydrofóbnu (nepolárnu) a hydrofilnú (polárnu) časť. To im umožňuje akumulovať sa medzi fluidnými fázami ako je olej/voda alebo vzduch/voda. Znižujú povrchové a medzypovrchové napätia a vytvárajú emulzie (Satpute et al., 2010; Desai a Banat, 1997; Kokare et al., 2007). Povrchovo aktívne vlastnosti robia z tenzidov jednu z najdôležitejších tried chemických výrobkov, používaných na rôzne aplikácie v domácnosti, priemysle a poľnohospodárstve (Deleu a Paquot, 2004). V poslednej dobe sa začínajú uplatňovať tzv. „biotenzidy“ (Hayes et al., 2009; Kosaric, 1993; Lin, 1996; Muthusamy et al., 2008; Rahman and Gakpe, 2008; Soberón-Chávez, 2011; Sen, 2010, Makkar a Cameotra, 2002; Vater, 1986), ktoré sa vyrábajú väčšinou z obnoviteľných surovín (Kjellin et al., 2010).

### Biotenzidy

#### Mikrobiálne tenzidy

Niektoré mikroorganizmy (baktérie, kvasinky, huby) produkujú pri raste na hydrofóbných substrátoch povrchovo aktívne látky rozmanitej štruktúry, ktoré im pomáhajú pri transporte nerozpustných látok cez bunečné membrány (Tab. 1).

Hydrofóbnu časť molekuly týchto biotenzidov tvorí proteín alebo peptid s hydrofóbnymi bočnými reťazcami.

Často to býva i uhlíkovodíkový reťazec mastných kyselín, ktoré môžu byť nasýtené, nenasýtené, vetvené, prípadne obsahujú hydroxylové skupiny. Niekedy sa vyskytujú i mastné alkoholy. Hydrofilná časť zväčša obsahuje mono-, oligo- alebo polysacharidy, aminokyseliny alebo peptidy, estery, karboxylové, hydroxylové alebo fosfátové skupiny. Mastné kyseliny sú spojené s hydrofilnou časťou molekuly najčastejšie glykozidovou esterovou alebo amidovou väzbou (Kokare et al., 2007; Sekretár et al., 2001). Mikrobiálne tenzidy sa dnes pripravujú komerčne a majú rozmanité použitie (Banat et al., 2000; Desai a Banat, 1997; Mukherjee et al., 2006).

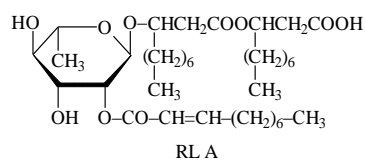
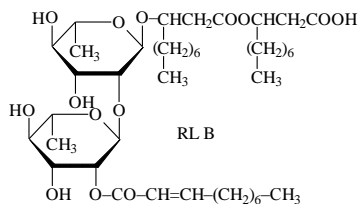
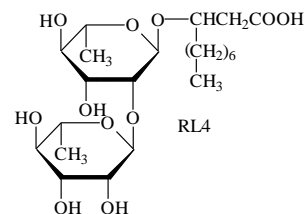
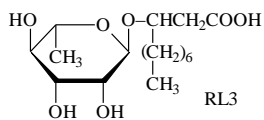
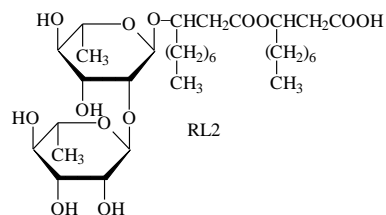
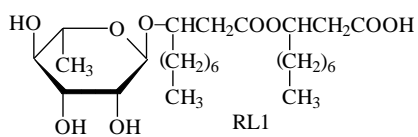
**Tabuľka 1** Hlavné druhy mikrobiálnych tenzidov (Desai a Banat, 1997; Deleu a Paquot, 2004; Rosenberg a Ron, 1999; Muthusamy et al., 2008).

Trieda tenzidu	Mikroorganizmus
Glykolipidy	
Ramnolipidy	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Trehalózové lipidy	<i>Rhodococcus erithropolis</i> , <i>Arthobacter sp.</i>
Soforolipidy	<i>Candida bombicola</i> , <i>Candida apicola</i>
Manozylerytritólové lipidy	<i>Candida antarctica</i>
Lipopeptidy	
Surfaktín/ iturín/ fengycín	<i>Bacillus subtilis</i>
Viscozín	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
Lichenizín	<i>Bacillus licheniformis</i>
Serrawetín	<i>Serratia marcescens</i>
Fosfolipidy	<i>Acinetobacter sp.</i> , <i>Corynebacterium lepus</i>
Mastné kyseliny/ neutrálne lipidy	
Corynomicolické kyseliny	<i>Corynebacterium insidibasseosum</i>
Polymérické tenzidy	
Emulsan	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
Alasan	<i>Acinetobacter radioresistens</i>
Liposan	<i>Candida lipolytica</i>
Lipomanan	<i>Candida tropicalis</i>
Particulate biosurfactants	
Vesicles	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
Celé mikrobiálne bunky	<i>Cyanobacteria</i>

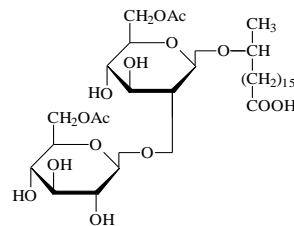
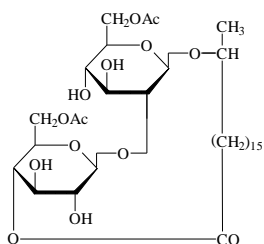
Chemické štruktúry niektorých mikrobiálnych tenzidov sú znázornené na obr. 1 (Sekretár et al., 2001).



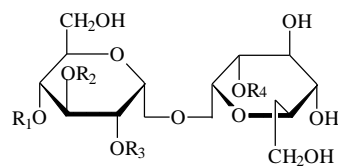
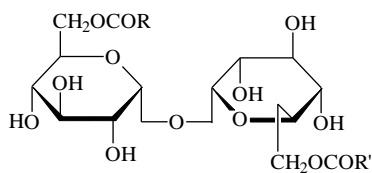
Ramnofolipidy



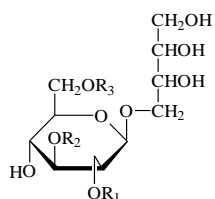
Soforolipidy



Trehalolipidy



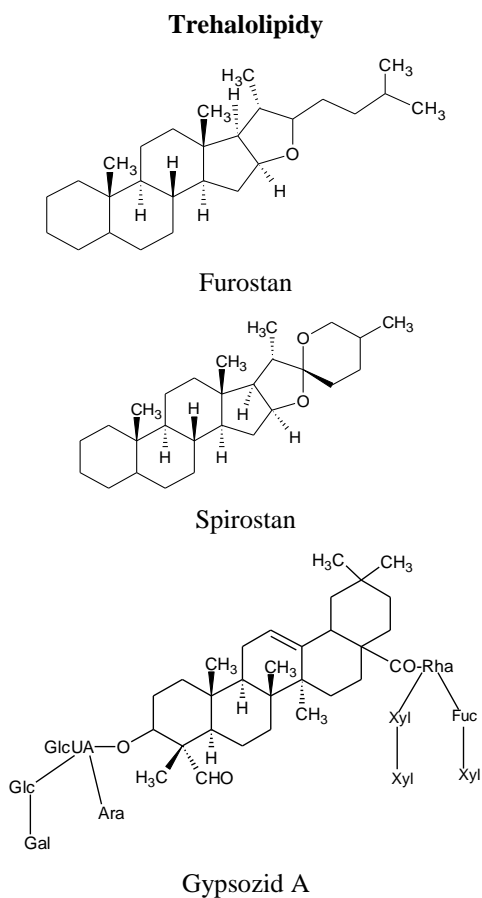
Manozylerytritolový lipid



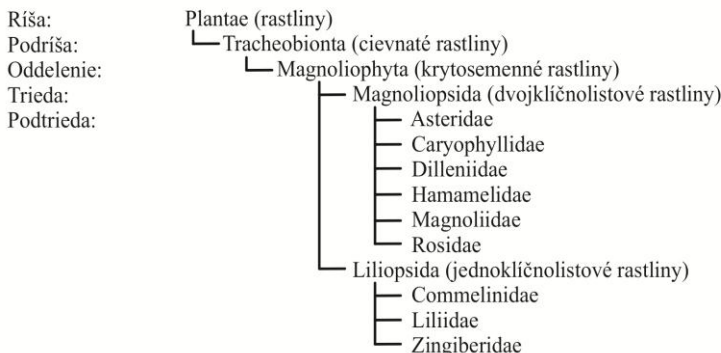
Obrázok 1 Typické štruktúry niektorých mikrobiálnych tenzidov

**Saponíny**

Saponíny sú prírodné látky glykozidickej povahy a vlastností mydla. Majú lipofilný aglykón (steroid alebo triterpén) a hydrofilnú časť (cukorná zložka). Znižujú povrchové napätie a v minimálnej koncentrácii silno penia (Hostettmann a Marston, 1995; Ozlem a Mazza, 2007). Vyskytujú sa hlavne v rastlinnej ríši, aj keď boli izolované aj z nižších morských živočíchov (niektoré druhy triedy Holothuroidea a Asteroidea a v kmeni Echinodermata) (Mučaji a Nagy, 2010). Na ich analýzu sa využívajú chromatografické metódy (Oleszek, 2002). Chemické štruktúry niektorých saponínov sú znázornené na obr. 2. Ich výskyt v rastlinách zobrazujú obr. 3 a tabuľky 2 a 3.



**Obrázok 2** Typické štruktúry niektorých saponínov



**Obrázok 3** Výskyt saponínov v rastlinách (Mučaji a Nagy, 2010; Vincken et al., 2007).

**Tabuľka 2** Výskyt steroidných saponínov v rastlinách používaných vo výžive a v potravinárskom priemysle (Mučaji a Nagy, 2010; Vincken et al., 2007).

Čeľad'	Latinský názov rastliny	Slovenský názov rastliny
<b>I. Jednokľúčolistové</b>		
Poaceae	<i>Avena sativa</i> L.	ovos siaty
Liliaceae	<i>Allium ampeloprasum</i> L. subsp. <i>Ampeloprasum</i>	cesnak pórový (pór) pravý
	<i>Allium ampeloprasum</i> L. subsp. <i>Porrum</i>	cesnak pórový (pór) pestovaný
	<i>Allium cepa</i> L.	cesnak cibuľový (cibuľa)
	<i>Allium sativum</i> L.	cesnak kuchynský (cesnak)
	<i>Allium schoenoprasum</i> L.	cesnak pažítkový (pažítka)
	<i>Asparagus officinalis</i> L.	asparágus lekársky (špargľa)
	<i>Smilax officinalis</i> Kunth.	smilax lekársky
<b>II. Dvojkľúčolistové</b>		
Fabaceae	<i>Trigonella foenum-graecum</i> L.	senovka grécka

**Tabuľka 3** Výskyt triterpénových saponínov v rastlinách používaných vo výžive a v potravinárskom priemysle (Mučaji a Nagy, 2010; Vincken et al., 2007).

Čeľad'	Latinský názov rastliny	Slovenský názov rastliny	
<b>I. Jednokľúčolistové</b>			
Poaceae	<i>Avena sativa</i> L.	ovos siaty	
<b>II. Dvojkľúčolistové</b>			
Amaranthaceae	<i>Amaranthus</i> spp.	druhy rodu láskavec	
Chenopodiaceae	<i>Beta vulgaris</i> L.	repa obyčajná	
	<i>Chenopodium quinoa</i> Willd.	mrlík čilsky	
	<i>Spinacea oleracea</i> L.	špenát siaty	
Asteraceae	<i>Helianthus annuus</i> L.	slnečnica ročná	
Fabaceae	<i>Arachis hypogaea</i> L.	podzemnica olejná	
	<i>Cicer arietinum</i> L.	cícer baraní	
	<i>Glycine max</i> Merrill	sója fazuľová	
	<i>Lens culinaris</i> L.	šošovica kuchynská	
	<i>Medicago sativa</i> L.	lucerna siata	
	<i>Phaseolus acutifolius</i> Gray	fazuľa končistolistá	
	<i>Phaseolus aureus</i>	fazuľa zlatá (mungo)	
	<i>Phaseolus coccineus</i> L.	fazuľa šarlátová	
	<i>Phaseolus lunatus</i> L.	fazuľa mesiacovitá	
	<i>Phaseolus mungo</i> L.	fazuľa urdová (urd)	
	<i>Phaseolus vulgaris</i> L.	fazuľa záhradná	
	<i>Pisum sativum</i> L.	hrach siaty	
	<i>Pueraria lobata</i>	puerária laločnatá	
	<i>Vicia</i> spp.	druhy rodu vika	
	<i>Vigna sinensis</i> Endl.	vigna čínska	
	isticaceae	<i>Myristica fragrans</i> Houtt.	muškátovník voňavý
	iliaceae	<i>Sesamum indicum</i> L.	sezam indický
mnaceae	<i>Zizyphus jujuba</i> Mill.	jujuba holá	
icea	<i>Quillaja saponaria</i> Molina	kvilája mydlová	
iceae	<i>Rubus fruticosus</i> L.	ostružina černicová (černica)	
	<i>Thea sinensis</i> L.	čajovník čínsky	
Lygophyllaceae	<i>Guaiacum officinale</i> L.	guajak liečivý	

## Možné aplikácie v potravinárstve

Mikrobiálne tenzidy aj saponíny, pre svoje povrchovo aktívne a antimikrobiálne vlastnosti, nachádzajú čoraz širšie uplatnenie v potravinárstve a v poľnohospodárskej výrobe (Hasenhuetti a Hartel, 2008; Iyer et al., 2006; Kachholz a Schlingmann, 1987; Kralova and Sjöblom, 2009; Krog, 1977; Nitschke a Costa, 2007; Oakenfull, 1981; Oleszek, 2000; Oleszek a Marston, 2000; Price et al., 1987; Waller a Yamasaki, 1996).

## Ingrediencie potravinárskych formulácií

Okrem obvyklej úlohy (zníženie povrchového a medzipovrchového napätia, čo sa využíva na tvarovanie a stabilizáciu emulzií) (Whitehurst, 2004; Nakai a Li-Chan, 1988) majú tenzidy aj niekoľko iných funkcií v potravinách. Napríklad: kontrola zhlukovania tukových guľčiek, stabilizovanie prevzdušnených systémov, vylepšovanie textúry (štruktúry, tkaniva) a trvanlivosti škrob obsahujúcich produktov, modifikovanie reologických vlastností pšeničného cesta a zlepšovanie konzistencie textúry na báze tukových produktov (Muthusamy et al., 2008; Nitschke a Costa, 2007).

V pekárstve a zmrzlinových formuláciách biotenzidy hrajú rolu pri kontrole konzistencie (tuhosti), spomaľovaní starnutia (opotrebovania) a rozpúšťania vonných olejov. Využívajú sa ako stabilizátory tukov a zabraňujú rozstrekovaniu olejov a tukov pri smažení a fritovaní vlhkých potravín. Zlepšovanie stability cesta, textúry, sýtosť (plnosť, mohutnosť) a konzervácie pekárenských výrobkov sa dosahuje pridaním ramnolipidových tenzidov (Muthusamy et al., 2008; Van Haesendonck a Vanzeveren, 2004). Štúdie taktiež naznačujú možné použitie rhamnolipidov na zlepšenie vlastností maslových krémov, croissantov a mrazených cukrárenských výrobkov. L-ramnóza má značný potenciál ako prekursor pre vôňu. Taktiež je využívaná v priemysle ako prekursor vysoko kvalitných vonných komponentov ako je furaneol.

## Antiadhézne prípravky

Biovrstva je opísaná ako skupina baktérií, ktoré sa usídlili na povrchu. Biovrstva neobsahuje iba baktérie, ale tiež extracelulárny materiál produkovaný na povrchu a akýkoľvek materiál uväznený (zachytený) vnútri tejto vrstvy (ložiska). Bakteriálne biovrstvy vyskytujúce sa na povrchoch produktov potravinárskeho priemyslu sú potenciálnym zdrojom kontaminácie, ktorá môže viesť ku skazeniu výrobku a k prenosu chorôb. Z tohto dôvodu kontrola adhézie mikroorganizmov na povrchu potravín je podstatným krokom pri zabezpečovaní bezpečnosti a kvality produktov pre konzumentov. Účasť biotenzidov pri mikrobiálnej adhézii a oddeľovaní od povrchu sa študuje. Tenzid uvoľňovaný baktériou *Streptococcus thermophilus* sa používal pre kontrolu znečistenia dosiek výmenníka tepla pastérov tak, že spomaľoval zhlukovanie sa iných termofilných rodov *Streptokoka* zodpovedných za znečistenie. Predbežná úprava povrchov z nehrdzavejúcej ocele s biotenzidom získavaným z baktérie *Pseudomonas fluorescens* zabraňuje adhézii *L. monocytogenes* L028. Bioúprava povrchov prostredníctvom používania mikrobiálnych tenzidov bola označená ako nová stratégia na redukciu adhézie (Muthusamy et al., 2008).

## Iné

V potravinárskom priemysle sa biotenzidy zvyčajne využívajú ako potravinárske aditíva (emulgátory). Ako napríklad lecitín a jeho deriváty, estery mastných kyselín obsahujúcich glycerol, sorbitan alebo etylén glykol a oxyetylované deriváty monoacylglyceridov vrátane posledných syntetizovaných oligopeptidov. Tieto emulgátory zvyšujú vôňu, chuť a kvalitu produktov s minimálnym zdravotným rizikom (Rahman and Gakpe, 2009).

V poľnohospodárskom priemysle sa tiež ťaží z výroby biotenzidov. Stanghellini a Miller (1997) preukázali vysokú účinnosť rhamnolipidov voči trom zástupcom rodov zoosporických rastlinných patogénov: *Pythium aphanidermatum*, *Phytophthora capsici* a *Plasmopara lactucea-radiciis*. Preto purifikovali mono- a di-rhamnolipidy v rozsahu koncentrácie od 5-30 mg. L<sup>-1</sup>, čo spôsobilo zastavenie pohyblivosti a dezintegráciu buniek celej populácie zoospór za menej ako jednu minútu. Bioemulgátory sú potenciálne používané v rôznych formuláciách herbicídov a pesticídov (Rosenberg a Ron, 1999; Rahman a Gakpe, 2009).

*Yucca schidigera* a *Quillaja saponaria* uznal americký Food and Drugs Administration (FDA) v roku 2003 za potravinové aditíva. Kvilájové extrakty sú klasifikované v dvoch typoch (1 a 2) podľa obsahu saponínov, 20 až 26 % alebo 75-90 % (Joint FAO/ WHO 2004). V Európskej únii je ich možné použiť ako penotvornú látku (E 999) do koncentrácie 200 mg/l pri výrobe nealkoholických ochutených nápojov (office). Extrakt z kviláje typu 1 sa používa ako penotvorná surovina do koncentrácie 100 ppm pri výrobe „soft drinkov“, extrakt typu 2 ako emulgátor lipofilných farbív alebo príchuť v týchto nápojoch v koncentrácii pod 10 ppm.

Potvrdené priaznivé biologické účinky kyseliny oleanolovej boli využité pri formulovaní patentov s obohateným olivovým olejom, na prekrytie nepríjemnej dochute náhradných sladidiel alebo protikryštalizačná látka v potravinárskych tukoch (Mučaji a Nagy, 2010).

## ZÁVER

So zvyšujúcim záujmom o životné prostredie sa zvyšuje aj záujem o prírodné povrchovo aktívne látky (biotenzidy) a to najmä z dôvodu nízkej toxicity, biologickej odbúrateľnosti a relatívne zvládnutej produkcie fermentáciou.

Biotenzidy majú rôznorodé vlastností a tým aj rozsiahle využitie v priemysle. Nachádzajú uplatnenie najmä v oblastiach, kde je na prvom mieste ekologický aspekt a kde je požadovaný tenzid „ušitý na mieru“, čo sa využíva v kozmetike a medicíne.

Ale len 3% biotenzidov je aplikovaných v potravinárskom a 2% v poľnohospodárskom priemysle.

## LITERATÚRA

BANAT, I. M., MAKAR, R. S., CAMEOTRA, S. S. 2000. Potential commercial applications of microbial surfactants. In *Appl. Microbiol. Biotechnol.* vol. 53, 2000, no. 5, p. 495-508.

DELEU, M., PAQUOT, M. 2004. From renewable vegetables resources to microorganisms: new trends in

- surfactants. In *Comptes Rendus Chimie*. vol. 7, 2004, no. 6-7, p. 641-646.
- DESAI, J. D., BANAT, I. M. 1997. Microbial production of surfactants and their commercial potential. In *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. vol. 61, 1997, no. 1, p. 47-64.
- HASENHUETTL, G. L., HARTEL, R. W., eds. 2008. *Food Emulsifiers and Their Applications*. Springer Science+Business Media, LLC. 433 p. ISBN: 978-0-387-75283-9.
- HAYES, D. G., KITAMOTO, D., SOLAIMAN, D. K. Y., ASHBY, R. D. 2009. *Biobased Surfactants and Detergents Synthesis, Properties, and Applications*. AOCs Press, Urbana, IL. 512 p. ISBN 978-1-893997-67-7.
- HOSTETTMANN, K., MARSTON, A. 1995. *Saponins: Chemistry and Pharmacology of Natural Products*. Cambridge University Press, Cambridge, UK 1995. 546 p. ISBN 0-521-32970-1.
- IYER, A., MODY, K., JHA, B. 2006. Emulsifying properties of a marine bacterial exopolysaccharide. In *Enzyme Microbial Technol.* vol. 38, 2006, p. 220-222.
- KACHHOLZ, T., SCHLINGMANN, M. 1987. Possible food and agricultural application of microbial surfactants: an assessment. In: Kosaric, N., Cairns, W. L., Grey, N. C. C., eds. *Biosurfactant and Biotechnology*, vol 25. 1987, p. 183-208. Marcel Dekker Inc., New York.
- KJELLIN, M., JOHANSSON, I. eds. 2010. *Surfactants from Renewable Resources*. John Wiley & Sons, Ltd. Chichester UK 2010, 342 p. ISBN 978-0-470-76041-3.
- KOKARE, C. R., KADAM, S. S., MAHADIK, K. R., CHOPADE, B. A. 2007. Studies on bioemulsifier production from marine *Streptomyces* sp. S1. In *Indian Journal of Biotechnology*. vol. 6, 2007, no. 1, p. 78-84.
- KOSARIC, N. ed., 1993. *Biosurfactants : production, properties, applications. Surfactant Science Series Vol. 48*. Marcel Dekker, Inc., New York 1993. 498 p. ISBN 978-0-8247-8811-7.
- KRALOVA, I., SJÖBLOM, J. 2009. Surfactants used in food industry: a review. In *J. Dispersion Sci. Technol.* vol. 30, 2009, no. 9, p. 1363-1383.
- KROG, N. 1977. Functions of emulsifiers in food systems. In *J. Am. Oil Chem. Soc.* vol. 54, 1977, no. 3, p. 124-131.
- LIN, S. C. 1996. Biosurfactants : Recent Advances. In *J. Chem. Tech. Biotechnol.* vol. 66, 1996, p. 109-120.
- MAKKAR, R., CAMEOTRA, S. S. 2002. An update on the use of unconventional substrates for biosurfactant production and their application. In *Appl. Microbiol. Biotechnol.* vol. 58, 2002, p. 428-434.
- MUČAJI, P., NAGY, M. 2010. Saponíny: Výskyt, vlastnosti a možnosti využitia vo farmácii., Martin: Vyd. Osveta, 2010, 134 p. ISBN 978-80-8063-346-2.
- MUKHERJEE, S., DAS, P., SEN, R. 2006. Towards commercial production of microbial surfactants. In *Trends Biotechnol.* vol. 24, 2006, no. 11, p. 509-515.
- MUTHUSAMY, K., GOPALAKRISHNAN, S., RAVI, T. K., SIVACHIDAMBARAM, P. 2008. Biosurfactants: Properties, commercial production and application. In *Current science*. vol. 94, 2008, no. 6, p. 736-747.
- NAKAI, S., LI-CHAN, E. 1988. *Hydrophobic Interactions in Food Systems*, CRC Press, Boca Raton, FL, 1988, pp. 145-151.
- NITSCHKE, M., COSTA, S. G. V. A. O. 2007. Biosurfactants in food industry. In *Trends in Food Science & Technology*. vol. 18, 2007, no. 5, p. 252-259.
- OAKENFULL, D. 1981. Saponins in food - a review. In *Food Chem.* vol. 7, 1981, p. 19-40.
- OLESZEK, W. 2000. Saponins. In Naidu, A. S. ed.: *Natural Food Antimicrobial Systems*, CRC Press, LLC, New York. p. 295-324. ISBN 978-0849320477. 818 p.
- OLESZEK, W. 2002. Chromatographic determination of plant saponins – review. In *J. Chromatogr. A*, vol. 967, 2002, no. 1, p. 147-162.
- OLESZEK, W., MARSTON, A. eds. 2000. Saponins in food, feedstuffs and medicinal plants. In *Proceedings of the Phytochemical Society of Europe*, vol. 45. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht 2000, The Netherlands, 304 p. ISBN 978-0-7923-6023-0.
- OZLEM, G. U., MAZZA, G. 2007. Saponins: Properties, Applications and Processing. In *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, vol. 47, 2007, p. 231-258.
- PRICE, K. R., JOHNSON, I. T., FENWICK, G. R. 1987. The chemistry and biological significance of saponins in foods and feeding stuffs. In *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* vol. 26, 1987, no. 1, p. 27-135.
- RAHMAN, P. K. S. M., GAKPE, E. 2009. Production, characterisation and applications of biosurfactants – Review. In *Biotechnology*. vol. 7, 2008, no. 2, p. 360-370.
- ROSENBERG, E., RON, E. Z. 1999. High- and low-molecular-mass microbial surfactants. In *Applied Microbiology and Biotechnology*. vol. 52, 1999, no. 2, p. 154-162.
- SATPUTE, K. S., BANPURKAR, G. A., DHAKEPHALKAR, K. P., BANAT, M. I., CHOPADE, A. B. 2010. Methods for investigating biosurfactants and bioemulsifiers. In *Critical Reviews in Biotechnology*. vol. 30, 2010, no. 2, p. 127-144. ISSN 0738-8551.
- SEKRETÁR, S., ZEMANOVIČ, J., SCHMIDT, Š. 2001. Mikrobiálne tenzidy a ich využitie. In *Sborník prednášok XXXV. seminár o tenzidech a detergentech*. 2001, p. 89-93, ISBN 80-7149-382-7.
- SEN, R. ed., 2010. *Biosurfactants. Advances in experimental medicine and biology*, vol. 672. Landes Bioscience and Springer Science+Business Media, LLC., New York 2010, 330 p. ISBN 978-1-4419-5978-2.
- SOBERÓN-CHÁVEZ, G. ed. 2011. *Biosurfactants: From Genes to Applications*. (Microbiology Monographs, Volume 20). Springer Verlag, Berlin 2011. 220 p. ISBN 978-3-642-14489-9.
- STANGHELLINI, M. E., MILLER, R. M. 1997. Biosurfactants: Their identity and potential efficacy in the biological control of zoospore plant pathogens. In *Plant Disease*. vol. 81, 1997, no. 1, p. 4-12.
- VAN HAESSENDONCK, I. P. H., VANZEVEEREN, E. C. A. 2004. *Rhamnolipids in Bakery Products*. WO/2004/040984.
- VATER, P. J. 1986. Lipopeptides in food application. In: Kosaric, N., ed. *Biosurfactant-Production, Properties and Applications*. Marcel Dekker Inc., New York 1986, p. 419-446.
- VINCKEN, J. P., HENG, L., DE GROOT, A., GRUPPEN, H. 2007. Saponins, classification and occurrence in the plant kingdom. In *Phytochemistry*. vol. 68, 2007, no. 3, p. 275-297.
- WALLER, G. R., YAMASAKI, K. eds. 1996. Saponins used in food and agriculture. In *Advances in experimental biology*. vol. 405. *Proceedings of the American Chemical Symposium on saponins Chemistry and Biological Activity*, August 22-25, Chicago, IL. Plenum Press, New York. 453 p. ISBN 978-0306453946.

WHITEHURST, R. J. 2004. *Emulsifiers in Food Technology*. Blackwell Publishing Ltd. Oxford, UK, 262 p. ISBN 1-4051-1802-4.

**Acknowledgments:**

This article was part of the Project STU for support of young researchers No. 6404.

**Contact address:**

Lenka Tmáková, Department of Food Science and Technology, Institute of Biotechnology and Food Science, Faculty of Chemical and Food Technology, Slovak University of Technology in Bratislava, Radlinského 9, 812 37 Bratislava, Slovakia, E-mail: lenka.tmakova@stuba.sk

Stanislav Sekretár, Department of Food Science and Technology, Institute of Biotechnology and Food Science, Faculty of Chemical and Food Technology, Slovak University of Technology in Bratislava, Radlinského 9, 812 37 Bratislava, Slovakia, E-mail: stanislav.sekretar@stuba.sk

Štefan Schmidt, Department of Food Science and Technology, Institute of Biotechnology and Food Science, Faculty of Chemical and Food Technology, Slovak University of Technology in Bratislava, Radlinského 9, 812 37 Bratislava, Slovakia, E-mail: stefan.schmidt@stuba.sk

Jarmila Hlásniková, Department of Food Science and Technology, Institute of Biotechnology and Food Science, Faculty of Chemical and Food Technology, Slovak University of Technology in Bratislava, Radlinského 9, 812 37 Bratislava, Slovakia, E-mail: jarmila.hlasnikova@stuba.sk

Lenka Vrbíková, Department of Food Science and Technology, Institute of Biotechnology and Food Science, Faculty of Chemical and Food Technology, Slovak University of Technology in Bratislava, Radlinského 9, 812 37 Bratislava, Slovakia, E-mail: lenka.vrbikova@stuba.sk

František Kreps, Department of Food Science and Technology, Institute of Biotechnology and Food Science, Faculty of Chemical and Food Technology, Slovak University of Technology in Bratislava, Radlinského 9, 812 37 Bratislava, Slovakia, E-mail: frantisek.kreps@stuba.sk

doi: 10.5219/171

## BACTERIA *STAPHYLOCOCCUS* SPP. ISOLATED FROM MASTITIS OF SHEEP AND THEIR ENTEROTOXIGENIC PROPERTIES

František Zigo, Milan Vasil', Marián Kadáši, Juraj Elečko, Zuzana Farkašová

### ABSTRACT

In our study was followed occurrence of staphylococcal mastitis in herd of 350 sheep during one lactation season. We found, the bacteria *S. schleiferi* was identified in 88 from all 204 isolates. In high number were identified also *S. caprae* (33), *S. chromogenes* (21), *S. aureus* (19), *S. epidermidis* (17), respectively. Important was occurrence *S. intermedius*, *S. simulans*, *S. xylosus* a *S. warneri*, too. The *Staphylococcus* spp. caused latent and subclinical forms of mastitis predominantly, showed into subacute mastitis (26.5%). Acute mastitis was determined in 7.8 %. Eight bacteria *S. aureus*, two *S. chromogenes*, and two *S. epidermidis* produced staphylococcal enterotoxins

**Keywords:** *Staphylococcus* spp., sheep mastitis, staphylococcal enterotoxin, SE

### ÚVOD

Výskyt mastitíd pri ovciach je v jednotlivých krajinách rôzny. Britskí autori udávajú, že výskyt klinických mastitíd u bahnic pri zabití je od 13 do 50%. Naznačuje to, že dôležitým dôvodom brakovania bahnic v UK je pravdepodobne klinická mastitída. V podmienkach Slovenska podľa našich skúsenosti (preto, že v SR neexistuje komplexný údaj) môžeme konštatovať, že hladiny premorenia bakteriologickými pôvodcami sa pohybujú v rozpätí od 5,6 do 64,5 % (a to v závislosti na celkovej hygiene a technológii chovu), pričom na výskyte mastitíd sa zvyčajne podieľajú hlavne baktérie *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp. a koliformné baktérie. V etiológii mastitíd oviec sú v našich podmienkach dominantné *Staphylococcus aureus*, v ostatnom čase hlavne koaguláza-negatívne stafylokoky, avšak na mastitídach malých prežúvavcov sa podieľajú aj baktérie *Streptococcus* spp. (hlavne *S. dysgalactiae* a *Streptococcus uberis*, resp. *S. agalactiae*), baktérie *Pasteurella* spp., *Escherichia coli*, *P. aeruginosa* a *Klebsiella pneumonia*, baktérie *Salmonella* spp., ale aj *Mycoplasma agalactia*, baktérie *Micrococcus* spp., *Corynebacterium* spp. a mikroskopické vláknité huby, pričom aspergilóza a candidóza vemená sa vyskytuje najčastejšie po intenzívnej liečbe antibiotikami. Výskyt zápalu mliečnej žľazy oviec v konkrétnom chove je dôsledkom spolupôsobenia viacerých faktorov ako sú etiologické agens (mikroorganizmy), chovateľská vyspelosť a organizácia práce, úroveň hygieny ustajnenia, hygieny prvovýroby mlieka, a pod. Snahou je minimalizovať výskyt mastitíd stafylokokovej etiológie a z dôvodu zabezpečenia produkcie zdravotne bezpečného mlieka o požadovanej kvalite (Vasil', 2007).

Riziko spočíva v niektorých vlastnostiach stafylokokov a to takých ako sú faktory patogenity, resp. významnou vlastnosťou baktérií rodu *Staphylococcus* je schopnosť produkovať tzv. stafylokokové enterotoxíny (Bergdoll, 1991).

Počas mnohých rokov produkcia enterotoxínov bola spájaná hlavne s kmeňmi druhu *Staphylococcus aureus*. Viacerí autori uvádzajú, že aj ostatné druhy koagulázo-pozitívnych stafylokokov (ako napr. *S. intermedius*, *S. hyicus*) môžu tvoriť enterotoxíny (Adesiyum et al., 1984; Becker et al., 2001). Aj niektoré koagulázo-

negatívne stafylokoky sú enterotoxigénne (Bautista et al., 1988; Vernozy et al., 1996; Beatriz et al., 2006).

Cieľom práce bolo zistiť výskyt druhov rodu *Staphylococcus* a ich podiel na jednotných formách mastitíd v sledovanom chove počas sezóny dojenia a označiť baktérie produkujúce stafylokokové enterotoxíny

### MATERIÁL A METÓDY

Individuálne vzorky ovčieho mlieka boli odoberané v priebehu roka trikrát pri komplexných vyšetreniach stáda (na začiatku, v polovici a na konci sezóny dojenia v dojárni). Bakteriologické vyšetrenie vzoriek mlieka a vyšetrenie mliečnej žľazy boli vykonané podľa Hariharana et al. (2004). Taxonomické zatriedenie druhov stafylokokov sa vykonalo STAPHY- testom 24 (Pliva-Lachema, Brno, ČR).

Identifikácia génov kódujúcich stafylokokové enterotoxíny (*sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*) bola vykonaná metódou PCR podľa Becker et al. (1998). DNA bola separovaná pomocou QiAMP tissue kit-u (OIAGEM, Hilden, Germany). Pre kontrolu výsledkov PCR metódy boli použité referenčné kmene pre typy: SEA, SEB SEC, SED, SEE (Bergdoll; CNCTC, Brno). Pre detekciu génov boli použité oligonukleotidové primery *sea* až *see* (Becker et al., 1998). Dôkaz produkcie SE *in vitro* bol u každého kmeňa s potvrdeným génom vykonávaný ELISA metódou testovacím setom Ridascreen® Set A,B,C,D,E (R-Biopharm AG, Darmstadt, Nemecko) podľa návodu výrobcu.

### VÝSLEDKY A DISKUSIA

V tabuľke 1 je uvedený podiel baktérií *Staphylococcus* spp. na klinických mastitídach oviec počas sezóny dojenia. Z výsledkov je zrejme, že dominantnou baktériou rodu *Staphylococcus* z 204 identifikovaných bol *S. schleiferi* (88), pričom významný podiel mali ja baktérie *S. caprae* (33), *S. chromogenes* (21), *S. aureus* (19), *S. epidermidis* (17) a nezanedbateľný bol aj výskyt *S. intermedius*, *S. simulans*, *S. xylosus* a *S. warneri*.

Baktérie *Staphylococcus* spp. sa podieľali hlavne na latentných a subklinických mastitídach, ktoré sa často prejavili klinicky subakútnym zápalom (až v 26,5 %),



## potravinárstvo

pričom výskyt akútnych mastitíd bol tiež významný (7,8 %). Odrazom vysokého výskytu mastitíd v chove je 4,4% výskyt chronických, t.j. už neliečiteľných foriem záplv mliečnej žľazy.

Najčastejšie sme produkciu enterotoxínov zaznamenali

pri koagulázo–pozitívnych stafylokokoch, menovite pri *S. aureus*. Z koagulázo–negatívnych stafylokokov sa na produkcii enterotoxínov podieľali *S. chromogenes* a *S. epidermidis*.

**Tabuľka 1** Výskyt infekčných mastitíd v chove oviec počas sezóny dojenja

Bakteriálny pôvodcovia mastitíd			Formy mastitíd									
Druh	Celkom		Klinicky zjavná						subklinická		latentná	
			subakútna		akútna		chronická					
	Σ	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
<i>Staphylococcus</i> spp.	204	20,0	54	5,29	16	1,57	9	0,89	51	5,0	74	7,25
<i>Streptococcus</i> spp.	27	2,64	11	1,01	1	0,1	3	0,29	5	0,49	7	0,67
<i>Bacillus</i> spp.	22	2,16	1	0,1	0	0	1	0,1	3	0,29	17	1,67
<i>E. coli</i>	10	0,98	2	0,19	0	0	2	0,19	2	0,19	4	0,39
<i>Enterococcus</i> spp.	9	0,89	3	0,29	0	0	1	0,1	2	0,19	3	0,29
<i>Corynebacterium</i> spp.	8	0,78	4	0,39	0	0	0	0	2	0,19	2	0,19
<i>Proteus</i> spp.	4	0,39	0	0	0	0	1	0,1	1	0,1	2	0,19
<i>Arcanobacterium</i> spp.	3	0,29	1	0	0	0	0	0	1	0,1	1	0,1
<i>Rhodococcus</i> spp.	2	0,19	2	0,19	0	0	0	0	0	0	0	0
pozit.	289	28,33	78	7,64	17	1,67	17	1,67	67	6,57	110	10,7
negat.	731	71,66										
<b>spolu</b>	<b>1020</b>	<b>100</b>										

n – počet bahnic

**Tabuľka 2** Podiel baktérii *Staphylococcus* spp. na klinických mastitídach oviec počas sezóny dojenja

<i>Staphylococcus</i> spp.	Formy mastitíd											
	Celkom		Klinicky zjavná						subklinická		latentná	
			subakútna		akútna		chronická					
	Σ	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
<i>S. schleiferi</i>	88	43,1	17	8,3	9	4,4	3	1,5	19	9,3	40	19,6
<i>S. caprae</i>	33	16,2	11	5,4	0	0	0	0	7	3,4	15	7,4
<i>S. chromogenes</i>	21	10,3	8	3,9	1	0,5	1	0,5	5	2,5	6	2,9
<i>S. aureus</i>	19	9,3	9	4,4	3	1,5	1	0,5	4	2,0	2	1,0
<i>S. epidermidis</i>	17	8,3	3	1,5	0	0	2	1,0	10	4,9	2	1,0
<i>S. intermeius</i>	7	3,4	1	0,5	0	0	1	0,5	1	0,5	4	2,0
<i>S. simulans</i>	6	2,9	1	0,5	2	1,0	0	0	2	1,0	1	0,5
<i>S. xylosus</i>	6	2,9	2	1,0	1	0,5	0	0	2	1,0	1	0,5
<i>S. warneri</i>	5	2,5	1	0,5	0	0	0	0	1	0,5	3	1,5
<i>S. lentus</i>	2	0,98	1	0,5	0	0	1	0,5	0	0	0	0
<b>spolu</b>	<b>204</b>	<b>100</b>	<b>54</b>	<b>26,5</b>	<b>16</b>	<b>7,8</b>	<b>9</b>	<b>4,4</b>	<b>51</b>	<b>25,0</b>	<b>74</b>	<b>36,3</b>

n- počet bahnic

**Tabuľka 3** Výskyt stafylokokových enterotoxínov a génov pre produkciu stafylokokových enterotoxínov u baktérii *Staphylococcus* sp. (n = 204) v chove oviec

<i>Staphylococcus</i> spp.	produkcia enterotoxínov			prítomnosť génov		
	SEC	SED	SEE	sec	sed	see
<i>S.aureus</i> (9)	4	3	1	6	3	1
<i>S.chromogenes</i> (3)	1	1		2	1	
<i>S.epidermidis</i> (3)	1		1	1		2
<b>celkom</b>	<b>6</b>	<b>4</b>	<b>2</b>	<b>9</b>	<b>4</b>	<b>3</b>

### ZÁVER

V súčasnej dobe sa venuje veľká pozornosť tzv. Výskyt stafylokových mastitíd v chove oviec počas jednej sezóny dojenia bol nasledovný:

- v rámci 204 izolovaných baktérií *Staphylococcus* spp. boli dominantné *S. schleiferi* (88), potom baktérie *S. caprae* (33), *S. chromogenes* (21), *S. aureus* (19), *S. epidermidis* (17).
- významný bol aj výskyt *S. intermeius*, *S. simulans*, *S. xylosum* a *S. warneri*.

*Staphylococcus* spp. spôsobovali hlavne mastitídy s latentným a subklinickým priebehom a subakútnym zápalom sa prejavili 26,5 % a výskyt akútnych mastitíd bol 7,8 %,

Enterotoxíny najčastejšie produkoval *S. aureus* (8 baktérií) a 4 baktérie koagulázo–negatívnych stafylokokov: *S. chromogenes* (2) a *S. epidermidis* (2).

### LITERATÚRA

ADESIYUM, A. A., TATINI, S. R., HOOVER, D. G., 1984. Production of enterotoxins by *Staphylococcus hyicus*. In *Veter. Microbiol.*, vol. 9, 1984, p. 487-495.

BAUTISTA, L., GAYA, P., MEDINA, M., NUNEZ, M., 1988. A quantitative study of enterotoxin production by sheep milk staphylococci. In *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 54, 1988, p. 566-569.

BEATRIZ, M., BORELLI, E. G., FERREIRA, I. C., LACERDA, D. A., SANTOS, L. S., CARMO, R. S., DIAS, M., CRISOLITA C., SILVA, C. A., 2006. Enterotoxigenic *Staphylococcus* spp. and other microbial contaminants during production of Canastra cheese, Brazil. In *Braz. J. Microbiol.*, vol. 37, no. 4, 2006, p. 545-550.

BECKER, K., ROTH, R., PETERS, G., 1998. Rapid and specific detection of toxigenic *Staphylococcus aureus*: use of two multiplex PCR enzyme immunoassays for amplification and hybridization of staphylococcal enterotoxin genes, exfoliative toxin genes, and toxic syndrome toxin-1 gene. In *J. Clin. Microbiol.*, vol. 36, 1998, p. 2548-2553.

BECKER, K., KELLER, B., VON E. C., BRÜCK, M., LUBRITZ, G., ETIENNE, J., PETERS, G. 2001. Enterotoxigenic potential of *Staphylococcus intermedius*. In *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 67, 2001, p. 5551-5557.

BERGDOLL, M. S., 1991. *Staphylococcus aureus*. In *J. of the Assoc. of Offic. Analyt. Chemists*, vol. 74, no. 4, 1991, p. 706-710.

HARIHARAN, H., DONACHIE, W., MACALDOWIE, C., KEEFE G., 2004. Bacteriology and somatic cell counts in milk samples from ewes on a Scottish farm. In *Can. J. Vet. Res.*, July, vol. 68, no. 3, 2004, p. 188-192.

VASIL, M., 2007. Aetiology of mastites and enterotoxin production by *Staphylococcus* spp. isolated from milk of two sheep herds. In *Slovak J. Anim. Sci.*, vol. 40, 2007, p. 189-195.

VERNOZ, Y., ROZAN, D. C., MAZURY, C., PREVOST, G., LAPEYRE, C., BES, M., BRUN, Y., FIEURETTE, J., 1996. Enterotoxin production by coagulase- negative staphylococci isolated from goat's milk a cheese. In *Int. J. Food Microbiol.*, vol. 30, 1996, p. 271-280.

### Acknowledgments:

This work was supported by grant APVV-0629-07 and APVV-0679-10.

### Contact address:

František Zigo, Department of Nutrition, Dietetics and Animal Husbandry, Institute of Animal Husbandry, University of Veterinary Medicine and Pharmacy, Komenského 71, 041 81 Košice, Slovakia

Milan Vasil, Department of Nutrition, Dietetics and Animal Husbandry, Institute of Animal Husbandry, University of Veterinary Medicine and Pharmacy, Komenského 71, 041 81 Košice, Slovakia, E-mail: vasil@uvm.sk

Marián Kadáši, Department of Nutrition, Dietetics and Animal Husbandry, Institute of Animal Husbandry, University of Veterinary Medicine and Pharmacy, Komenského 71, 041 81 Košice, Slovakia

Juraj Elečko, Department of Nutrition, Dietetics and Animal Husbandry, Institute of Animal Husbandry, University of Veterinary Medicine and Pharmacy, Komenského 71, 041 81 Košice, Slovakia, E-mail: elecko@uvm.sk

Zuzana Farkašová, Department of Nutrition, Dietetics and Animal Husbandry, Institute of Animal Husbandry, University of Veterinary Medicine and Pharmacy, Komenského 71, 041 81 Košice, Slovakia, E-mail: farkasova@uvm.sk

**H A C C P**  

---

**C O N S U L T I N G**  

---

**PODPORUJEME VEDU A VÝSKUM**

[www.haccp.szm.sk](http://www.haccp.szm.sk)



**KATEDRA HYGIENY  
A BEZPEČNOSTI POTRAVÍN**

**Predmety zabezpečované katedrou na bakalárskom a inžinierskom  
stupni štúdia**

<b>Predmet</b>	<b>Gestor</b>	<b>Vyučujúci</b>
Hygiena potravín*	prof. Ing. Jozef Golian, Dr.	prof. Ing. Jozef Golian, Dr. Ing. Lucia Zeleňáková, PhD. Ing. Simona Kunová, PhD. Ing. Ondrej Revák
Legislatíva a kontrola potravín*	prof. Ing. Jozef Golian, Dr.	prof. Ing. Jozef Golian, Dr. Ing. Jozef Čapla, PhD. Ing. Pavol Bajzík
Bezpečnosť potravín*	prof. Ing. Jozef Golian, Dr.	prof. Ing. Jozef Golian, Dr. MVDr. Ľubomír Lopašovský, PhD.
Hygiena výživy a stravovania	Ing. Lucia Zeleňáková, PhD.	Ing. Lucia Zeleňáková, PhD. Ing. Ľubomír Belej Ing. Jana Tkáčová
Ochorenia z potravín*	Ing. Lucia Zeleňáková, PhD.	Ing. Lucia Zeleňáková, PhD. Ing. Jana Tkáčová
Sanitácia v potravinárstve*	Ing. Simona Kunová, PhD.	Ing. Simona Kunová, PhD. Ing. Pavol Bajzík
Falšovanie a autentifikácia potravín	Ing. Alica Bobková, PhD.	Ing. Martina Fikselová, PhD. Ing. Alica Bobková, PhD.
Všeobecná hygiena potravín	MVDr. Ľubomír Lopašovský, PhD.	MVDr. Ľubomír Lopašovský Ing. Ľubica Mrázová
Ochrana zvierat a produkcia potravín*	prof. Ing. Mária Angelovičová, CSc.	prof. Ing. Mária Angelovičová, CSc. Ing. Martin Kliment
Správna hygienická prax v potravinárstve*	Ing. Jozef Čapla, PhD.	Ing. Jozef Čapla, PhD.
Hygiena distribúcie a predaja potravín	Ing. Peter Zajác, PhD.	Ing. Peter Zajác, PhD. Ing. Ľubomír Belej
Verejné zdravie a produkcia potravín	Ing. Alica Bobková, PhD.	Ing. Alica Bobková, PhD.
Epidemiológia a alergie z potravín	MVDr. Ľubomír Lopašovský, PhD.	MVDr. Ľubomír Lopašovský, PhD. Ing. Martina Fikselová, PhD.
Riziká pri produkcii potravín*	prof. Ing. Mária Angelovičová, CSc.	prof. Ing. Mária Angelovičová, CSc.
Hodnotenie rizík	prof. Ing. Mária Angelovičová, CSc.	prof. Ing. Mária Angelovičová, CSc. Ing. Simona Kunová, PhD.
Akreditácia a certifikácia v potravinárstve	Ing. Peter Zajác, PhD.	Ing. Peter Zajác, PhD.
Zdravotná bezpečnosť potravín	Ing. Martina Fikselová, PhD.	Ing. Martina Fikselová, PhD.
Imunoanalýzy v biológii a potravinárstve*	Ing. Radoslav Židek, PhD	Ing. Radoslav Židek, PhD. Ing. Lenka Maršáľková
Seminár k praxi	Ing. Dagmar Kozelová, PhD	Ing. Dagmar Kozelová, PhD.
Teória metodológia záverečnej práce	prof. Ing. Jozef Golian, Dr.	prof. Ing. Jozef Golian, Dr. Ing. Dagmar Kozelová, PhD.
Informačné zdroje v biológii a potravinárstve	Ing. Jozef Čurlej, PhD.	Ing. Jozef Čurlej, PhD.

\* Predmety označené hviezdíčkou sa vyučujú aj v anglickom jazyku.

## Prihláška

na vedeckú konferenciu s medzinárodnou účasťou

### Bezpečnosť a kontrola potravín v dňoch 28. –29. marca 2012

Priezvisko a meno, tituly: .....

Pracovisko a adresa: .....

Tel.: ..... E-mail: .....

#### Prihlasujem:

prednášku: .....

poster: .....

### Objednávka na ubytovanie

#### Žiadam o ubytovanie na noc\* :

z 27.3. na 28. 3. 2012       áno       nie

z 28. 3. na 29. 3. 2012       áno       nie

.....  
podpis účastníka

\* Ubytovanie si hradí každý účastník sám na mieste.

#### Ubytovanie je možné telefonicky zabezpečiť do 10. marca 2012:

Hotel Agroinštitút Nitra, tel.: +421 37 7910 111, [www.agroinstitut.sk](http://www.agroinstitut.sk),

Hotel Olympia, Nitra, tel.: +421 37 65 36 727-9, [www.hotelolympia.sk](http://www.hotelolympia.sk),

ŠD Poľnohospodár, tel.: +421 37 65 34 541, [www.uniag.sk](http://www.uniag.sk)

FAKULTA BIOTECHNOLÓGIE A POTRAVINÁRSTVA

SLOVENSKEJ POĽNOHOSPODÁRSKEJ UNIVERZITY  
V NITRE

KATEDRA HYGIENY A BEZPEČNOSTI POTRAVÍN



IX. VEDECKÁ KONFERENCIA S MEDZINÁRODNOU  
ÚČASŤOU

**BEZPEČNOSŤ A KONTROLA  
POTRAVÍN**

**28. – 29. marca 2012  
Nitra, Slovenská republika**



# Školenia pre potravinárske firmy

Školenia sú akreditované Ministerstvom školstva SR

- **Školenie:** Zásady Správnej výrobnjej praxe a systému HACCP. Osobná hygiena a prevádzková hygiena.
- **Školenie:** Systém manažérstva bezpečnosti potravín podľa STN EN ISO 22000:2005
- **Individuálny prístup, školenie priamo u Vás, modelové situácie**

**Vydávame osvedčenie o absolvovaní školenia s  
celoživotnou platnosťou**

- HACCP
- IFS
- BRC
- ISO 22000
- ISO 9001
- Recenzia etikiet
- Prevádzkové poriadky
- Audity

**HACCP Consulting**  
**0908164361, 0904138562**  
**[www.haccp.szm.sk](http://www.haccp.szm.sk)**



<b>MORPHOLOGICAL AND ORGANOLEPTIC NATURE OF ZIZIPHUS JUJUBA MILL.</b> <i>Ján Brindza, Margita Karmatovská, Olga Grygorieva, Vladimír Vietoris, Lucia Kucelová, Gabriela Erdélyová</i> .....	1-11
<b>FLAVONOID NATURAL SOURCES AND THEIR IMPORTANCE IN THE HUMAN DIET</b> <i>Martina Danihelová, Ernest Šturdík</i> .....	12-24
<b>CHARACTERIZATION OF GLIADIN AND HMW GLUTENIN PROTEIN COMPOSITION IN COLOURED WHEAT (<i>TRITICUM AESTIVUM</i> L.) VARIETIES</b> <i>Edita Gregova, Svetlana Šliková, Valéria Šudyová, Zuzana Šramková, Pavol Hauptvogel</i> .....	25-27
<b>THE EVALUATION OF ANTIOXIDANT ACTIVITY OF MILLING FRACTIONS OF SELECTED CEREALS GROWN IN THE YEAR 2010</b> <i>Eva Ivanišová, Miroslav Ondrejovič, Štefan Dráb, Marián Tokár</i> .....	28-33
<b>VIABILITY OF THE PROBIOTIC BACTERIA <i>L. ACIDOPHILUS</i> IN DAIRY PRODUCTS</b> <i>Janka Koreňová</i> .....	34-37
<b>MULTIVARIATE GEOGRAPHICAL CHARACTERISATION OF SLOVAK FRUIT DISTILLATES THROUGH MINERAL ELEMENTS PROFILE</b> <i>Mária Koreňovská, Milan Suhaj</i> .....	38-41
<b>ENTEROCOCCI AND THEIR ABILITY LIVE OUT ACTIVITY OF SANITATION DETERGENTS</b> <i>Monika Lavová, Viera Ducková, Margita Čanigová, Miroslav Kročko</i> .....	42-44
<b>MONITORING OF GENETIC DIVERSITY IN FARMED DEER POPULATIONS USING MICROSATELLITE MARKERS</b> <i>Lenka Maršáľková, Ľubomír Belej, Pavol Bajzík, Jaroslav Pokorádi</i> .....	45-47
<b>RESPONSE SURFACE METHODOLOGY FOR OPTIMIZATION OF THE EXTRACTION OF FLAX (<i>LINUM USITATISSIMUM</i>) SEED OIL</b> <i>Miroslav Ondrejovič, Daniela Chmelová, Tibor Maliar</i> .....	48-52
<b>EVALUATION OF THE GROWTH OF SELECTED LACTOBACILLI IN PSEUDOCEREAL SUBSTRATE</b> <i>Jana Pelikánová, Denisa Liptáková, Ľubomír Valík, Katarína Stančeková</i> .....	53-57
<b>RELATIONSHIP RATIONAL NUTRITION FOR THE RISK OF CANCER OF THE BREAST IN THE FEMALE POPULATION IN SLOVAKIA</b> <i>Michaela Tirpáková, Viera Lovayová</i> .....	58-63
<b>NATURAL SURFACTANTS AND THEIR USE IN FOOD INDUSTRY</b> <i>Lenka Tmáková, Stanislav Sekretár, Štefan Schmidt, Jarmila Hlásniková, Lenka Vrbíková, František Kreps</i> .....	64-69
<b>BACTERIA <i>STAPHYLOCOCCUS</i> SPP. ISOLATED FROM MASTITIS OF SHEEP AND THEIR ENTEROTOXIGENIC PROPERTIES</b> <i>František Zigo, Milan Vasil, Marián Kadáši, Juraj Elečko, Zuzana Farkašová</i> .....	70-72

**FAKULTA BIOTECHNOLÓGIE A POTRAVINÁRSTVA**  
**SLOVENSKEJ POĽNOHOSPODÁRSKEJ UNIVERZITY V NITRE**  
**KATEDRA HYGIENY A BEZPEČNOSTI POTRAVÍN**



**KATEDRA HYGIENY  
A BEZPEČNOSTI POTRAVÍN**

**IX. VEDECKÁ KONFERENCIA S MEDZINÁRODNOU ÚČASŤOU**

**BEZPEČNOSŤ A KONTROLA  
POTRAVÍN**

**28. – 29. marca 2012**  
**Nitra, Slovenská republika**