

2

2011



číslo

Vedecký časopis pre potravinárstvo

Scientific Journal for Food Industry

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

ročník 5  
číslo 2  
apríl 2011

potravinárstvo 2 (5)  
ISSN 1338-0230 (tlačená verzia)  
ISSN 1337-0960 (elektronická verzia)

## Potravinárstvo

### Vedecký časopis pre potravinárstvo

**Šéfredaktor:**

Ing. Peter Zajác, PhD.  
SPU Nitra

**Zástupca šéf redaktora:**

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

**Redaktori:**

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

**Predseda redakčnej rady:**

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

**Redakčná rada:**

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

## Potravinárstvo

### Scientific Journal for Food Industry

**Editor:**

Peter Zajác  
SUA Nitra

**Deputy of Editor:**

Jozef Golian  
SUA Nitra

**Sub-Editor:**

Radoslav Židek,  
Jozef Čapla,  
Vladimír Vietoris  
SUA Nitra

**Chairman, Editorial Board:**

Jozef Golian,  
SUA Nitra

**Editorial Board:**

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

• **Potravinárstvo**® • **Ročník:** 5, č. 2/2011 • Vedecký časopis pre potravinárstvo • Scientific Journal for Food Industry • **Vydavateľ:** Ing. Peter Zajác, HACCP Consulting, Slivková 12, 951 01 Nitrianske Hrnčiarovce. Vydavateľ úzko spolupracuje s Katedrou hygieny a bezpečnosti potravín, FBP, SPU v Nitre • **Nakladateľ:** Združenie HACCP Consulting, Slivková 12, 951 01 Nitrianske Hrnčiarovce • **Periodicita:** vychádza 4x do roka • **Internetová stránka časopisu:** [www.potravinarstvo.com](http://www.potravinarstvo.com) • **Adresa redakcie:** Slivková 12, 951 01 Nitrianske Hrnčiarovce • **E-mail:** [info@potravinarstvo.com](mailto:info@potravinarstvo.com) • **Tel.:** +421908164361, +421904138562 • **Jazyková úprava:** Publikované články neprešli jazykovou úpravou • **Grafická úprava:** Flame-studio Nitra • **Tlač:** SPU Nitra • **Cena čísla:** nepredajné • **Distribuuje:** Združenie HACCP Consulting • **Náklad:** 150 ks • **Miesto vydania:** Nitra • **Právne informácie a autorské práva:** Za obsah jednotlivých článkov zodpovedajú autori. Za obsah inzerátov zodpovedajú inzerenti • Časopis je indexovaný v databázach: UIUC OAI registry, OAIster, AGRIS FAO, Google Scholar a CrossRef • **Názov a skratka pomocou ktorých je časopis indexovaný v medzinárodných databázach:** *Potravinarstvo, Potr.*

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



Katedra hygieny a bezpečnosti  
potravín



## MORPHOLOGY AND SENSORY EVALUATION OF TRADITIONAL PRODUCTS FROM DIFFERENT LANDRACES OF PUMPKIN (*CUCURBITA SPP.*)

Ján Brindza, Vladimír Vietoris, Lucia Kucelová, Maria Fil, Radovan Ostrovský, Eva Gondová

### ABSTRACT

The goal of study was analysis of morphological characteristics and organoleptic attributes of traditional food products from the pulp of regional varieties of pumpkin (*Cucurbita* spp.). For experimental purposes we used a landrace from Ukraine (A) and 5 landraces from Serbia (B, C, D, E and F). For the fruit of all landraces were determined by the average weight of fetuses in the range 1025.0 g (F) - 7680.0 g (B), stem weight 3.35 g (F) - 25 g (B), pulp weight 668.15 g (F) - 6351.10 g (B), placental weight of 90.47 g (E) - 515.50 g (B), seed weight 44.55 g (F) - 277.80 g (B) and mass exocarp 124.20 g (E) - 471.70 g (B). The dry matter content of flesh were determined in the range 7.8 to 11.6 %. The total weight of the fruit pulp was determined by weight in the range of 65.19 up to 88.50 % and the proportion of seed weight in the range of 1.65 to 6.58 %. Differences between genotypes were determined by the texture attributes of dry pulp of selected landraces using an electron microscope. For the sensory evaluation by traditional technology, we drafted three food products from the pulp of each landraces and mash, roast flesh, and baked rolls (traditional name strudel). All products have been heat-treated by boiling (slurry at 100 °C) and baked at 200 °C. Organoleptic evaluation of samples, we identified significant differences between rated landrace in perceptions of color, texture, consistency, hardness, juiciness, flavor, aftertaste, swallowed, sweetness, acidity, smell and overall impression. Experimental results of morphological analysis, we evaluated the descriptive statistics and the relationship between the characters were determined by linear correlations. Sensory analysis were evaluated by scaling and ranking methods. In general, we identified the best organoleptic properties in the landraces originating from Serbia (C). The results confirmed significant differences between test landrace in morphological and organoleptic characteristics.

**Keywords:** pumpkin, sensory analysis, economic value, morphology

### ÚVOD

Tekvice (*Cucurbita* spp. L.) sú plodiny starého ale aj nového sveta. V súčasnosti sú jej druhy rozšírené po celej zemeguli (Jeffrey, 1990). Dokazujú to mnohé kolekcie genetických zdrojov uchovávané v génových bankách v mnohých krajinách sveta (Křístková et al., 2003). Rôzne druhy tekvic majú vo svete dlhú tradíciu pestovania a všestranné využívanie ako zelenina, krmoviny, liečivé a okrasné rastliny, olejiny, suroviny pre rôzne potravinárske, farmaceutické a kozmetické výrobky, spotrebné predmety, bioenergetiku a ďalšie využitie (Bavec, 2002; Aleknavičienė et al., 2009; Hassan et al., 2009). Medzinárodná organizácia FAO odhaduje, že z hľadiska celosvetového pestovania druhov patria tekvice v produkcii na 10. miesto. Podľa štatistiky FAO (FAOSTAT) sa v roku 2002 evidovala produkcia všetkých druhov tekvic v objeme okolo 17,7 mil. ton z 1,4 milióna hektárov. Medzi najvýznamnejších producentov patrí Čína (4 mil. ton), India (3,5 mil. t), Ukrajina (0,9 mil. t) a USA (750 tis t.) a niektoré africké krajiny (Bisognin, 2002).

V období druhej svetovej vojny ako aj v povojnovom období, sa na základe nedostatku potravy a tukov začalo pestovanie tekvice aj v mnohých krajinách Európy (Buchter-Weisbrodt, 2004). Tekvice vytvárajú plody – bobule s priemerom 15 – 40 cm (Baranec et al., 1998). Vyznačujú sa variabilitou vo veľkosti, tvare a vo farbe. Sú často bradavičnaté a zriedkakedy hladké s pevnou šupkou, ktorá postupom času zdrevnatie. Pokožka je vo farbe premenlivá od svetlej po tmavo zelenú. Plody môžu byť jednofarebné až čiastočne škvrnité, poprípade dvojfarebné (Saade, Hernández, 1994), buď okrúhleho,

podlhovastého, alebo iného nezvyčajného tvaru. Veľkosť plodov sa určuje hmotnosťou plodov. Je závislá od odrody a dosahuje okolo 30 – 40 kg. Niektoré odrody dosahujú 40 – 60 kg a aj viac (Červenka, Dostál, 1992; Fulop et al., 1997). Dužina plodov je bielej, krémovej až žltej alebo svetlo oranžovej farby (Saade, Hernández, 1994) s veľkým počtom semien, ktoré sú najcennejšou časťou plodov.

V súčasnosti sa tekvice využívajú okrem potravinárstva aj pre liečebné účely. Tekvicové semená a tekvicový olej sa využívajú pri liečení rôznych bolestí močových ciest, obzvlášť pri podráždeniach močového mechúra, pri hypertrofii prostaty (Arioee, Omidbaigi, 2002; Šajbidor, 2005). V Thajsku skúmali účinok semena olejnej tekvice ako doplnok na vylučovanie kryštálikov kyseliny oxálovej a zloženie moču (Ngunboonsri et al., 1987). Li Quanhong et al. (2005) skúmali účinky hypoglykemickej látky – PBPP (protein-bound polysaccharide from pumpkin fruits) nachádzajúcej sa v tekvici. Zistili, že rôzne dávky PBPP môžu zvyšovať hladinu séroveho inzulínu, znižovať hladinu glukózy v krvi a zlepšovať toleranciu glukózy. Ogunlesi et al. (2010) vo svojej štúdii stanovili v tekvičných listoch obsah vitamínu C v rozsahu od 129,39 – 171,29 mg.100<sup>-1</sup>kg. Extrakt z listov vykazuje protizápalové účinky. Preto sa používajú na liečbu artritídy a rakoviny a ako krvné tonikum.

Chemické zloženie dužiny tekvic študovali aj iní autori Fennema et al., 2004; Senser a Scherz, 1999; Guine et al., 2010.

## MATERIÁL A METODIKA

Cieľom práce je určenie hospodárskej hodnoty plodov rôznych krajových odrôd tekvice obyčajnej a ich senzorickej kvality z pripravených potravín podľa tradičných receptov. Pre experimentálne účely sme vybrali 6 krajových odrôd. Plody z piatich krajových odrôd sme získali zo Srbska. V experimente sme ich označili ako B, C, D, E a F. Plody z jednej krajovej odrody pôvodom z Ukrajiny sme evidovali ako A. Na 5 plodoch z každej odrody sme určili základné morfológické znaky a to hmotnosť plodu (g), hmotnosť semena (g), hmotnosť placenty (g) a hmotnosť dužiny (g). Variabilitu hodnotených znakov sme určili opisnou štatistickou charakteristikou súborov. Závislosť medzi znakmi sme vyhodnotili lineárnou korelačnou analýzou.

S použitím elektrónového mikroskopu ZEISS EVO LS 15 sme zhodnotili textúru suchej dužiny a cieвне звязky vybraných krajových odrôd.

Pre senzoricke analýzy sme pripravili 3 tradičné výrobky, ktoré pripravujú obyvatelia Srbska, Ukrajiny ako aj na Slovensku z dužiny tekvic a to pečenú dužinu, tekvicovú kašu a závinu (štrúdle) s plnkou tekvicovej dužiny. Pre pečenie sme po odstránení semien a placenty z každej odrody nakrájali dužinu na menšie kusky, ktoré sme bez pridania cukru a iných prísad piekli pri teplote 250 °C v dĺžke 25 minút. Kašu z dužiny tekvic sme pripravili rozmixovaním 500 g dužiny z každej odrody.

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

Podľa štatistických údajov FAO sa rôzne druhy tekvic pestujú vo všetkých krajinách sveta (FAOSTAT). V menej rozvinutých krajinách sa využívajú takmer všetky časti rastliny hlavne pre potravinárske účely. V rozvinutých krajinách sa využíva hlavne semeno na extrakciu olejov pre potravinárske účely (Buchter-Weisbrodt, 2004; Brancucci, Bänziger, 2000).

### Morfologická charakteristika krajových odrôd tekvic

Pre komplexnejšie posúdenie hospodárskej hodnoty plodov krajových odrôd tekvic sme v prvom rade zabezpečili ich morfológickú analýzu. Z výsledkov tabuľky 1 vyplývajú značné rozdiely v hodnotených znakoch. Hmotnosť plodov sme určili v rozsahu 1025,00 – 7680,00 g. Tento kvantitatívny znak je vo všeobecnosti veľmi variabilný. Preto ho nepovažujeme ani za

Kašu sme mierne osolili a varili 5 minút po dosiahnutí 100 °C. Na prípravu závinu sme použili cesto zakúpené v potravinárskej predajni. Plnku sme pripravili nastrúhaním 700 g dužiny. Plnku sme nedochucovali aby bolo možné hodnotiť pôvodný pach, farbu a chuť dužiny odrôd vo výrobku. Závin sme piekli pri teplote 180 °C v dĺžke 45 minút. Všetky vzorky boli následne hodnotené v senzoricom laboratóriu na Inštitúte ochrany biodiverzity a biologickej bezpečnosti pri Slovenskej poľnohospodárskej univerzite v Nitre. Pre hodnotenie znakov senzorickej kvality jednotlivých výrobkov sme vyvinuli deskriptory pre znaky: farba, pach, vnímanie textúry v ústach, šľavnatosť, chuť, dochuť a celkový dojem. Na hodnotenie organoleptickej kvality tekvicovej pasty a pečenej tekvice sme použili stupnicovú metódu – bodový test. Pre analýzu vzoriek závinu s tekvicovou plnkou sme použili poradovú metódu (ISO 8587:2006). Senzorickú analýzu zabezpečilo 12 zaškolených hodnotiteľov. Výsledky hodnotiteľov, ktoré nedosahovali intervaly spoľahlivosti (IS) v jednotlivých deskriptoroch boli zo štatistickej analýzy vylúčené. Rozdiely medzi vzorkami a hodnotiteľmi sme vyhodnotili pomocou štatistického balíka R (R Development Core Team, 2010) so senzoricou nadstavbou SensomineR. Pre vizualizáciu výsledkov sme využili metódu analýzy hlavných komponentov.

rozhodujúci, preto že hmotnosť plodov tekvic závisí od rôznych iných faktorov ako je spon výsadby (Augustinovič et al., 2006), aplikácie hnojív a závlah, odrody a iných.

Pri hodnotených odrodách sme určili hrúbku dužiny v rozsahu 18,10 – 51,30 g. Hmotnosť semien sme určili v rozmedzí 44,55 – 277,80 g, hmotnosť placenty v rozmedzí 90,47 – 515,50 g, hmotnosť dužiny 668,15 – 6351,10 g a hmotnosť exokarpu v rozmedzí 124,20 – 471,70 g (Tabuľka 1). Z údajov tabuľky 1 súčasne vyplýva, že pri jednotlivých znakoch sme určili rôzny stupeň variability znakov, čo dokumentujú hodnoty variačných koeficientov určené v rozsahu 1,23 – 65,21 %. Pri prevažnej väčšine znakov sme však určili stredný až veľmi vysoký stupeň variability hodnotených znakov.

Tabuľka 1 Porovnanie odrôd tekvice obyčajnej (*Cucurbita pepo* L.) vo vybraných morfometrických znakoch

Znaky / krajové odrody		A	B	C	D	E	F
Celková hmotnosť plodu (g)	$\bar{x}$	2080,00	7680,00	2990,00	1295,43	1326,67	1025,00
	V%	16,25	-	8,99	22,60	32,30	42,08
Hrúbka dužiny (mm)	$\bar{x}$	18,10	51,30	33,65	33,47	22,19	22,98
	V%	13,68	-	6,35	19,71	25,24	44,17
Hmotnosť semien (g)	$\bar{x}$	54,53	277,80	49,35	85,25	56,57	44,55
	V%	20,58	-	39,69	52,67	27,30	7,14
Hmotnosť placenty (g)	$\bar{x}$	143,10	515,50	189,40	167,75	90,47	130,15
	V%	4,12	-	1,57	65,21	39,86	33,30
Hmotnosť dužiny (g)	$\bar{x}$	1649,77	6351,10	2646,20	906,8	1038,67	668,15
	V%	20,79	-	1,23	16,95	35,37	46,68
Hmotnosť exokarpu (g)	$\bar{x}$	204,00	471,70	192,95	128,35	124,20	164,30
	V%	24,29	-	7,37	6,01	23,74	34,09

**Brindza et al. (2011)** pri štúdiu variability jednotlivých častí plodov tekvice olejnej určili priemernú hmotnosť plodov v rozsahu 1436,30 – 8680,90 g, placenty v rozsahu 107,90 – 553,80 g a hmotnosť semien v rozsahu 33,40 – 647,00 g. Zo vzájomného porovnania dosiahnutých výsledkov z literárnymi poznatkami vyplýva značná zhoda.

Lineárnou korelačnou analýzou sme súčasne určili vysoko preukaznú mieru lineárnej závislosti medzi hmotnosťou plodov (g) a hmotnosťou placenty  $r = 0,63$ ,

hmotnosťou semien  $r = 0,48$  a hmotnosťou tisíc semien  $r = 0,50$ . Obdobné výsledky určila pri štúdiu závislosti medzi znakmi aj **Balátová et al. (2005)**.

Podiel jednotlivých častí plodov hodnotených krajových odrôd je uvedený v tabuľke 2. Z celkovej hmotnosti plodov sme určili podiel hmotnosti semien v rozsahu 1,65 % (C) – 6,58 % (D), podiel hmotnosti placenty v rozsahu 6,33 % (C) – 12,95 % (D), podiel hmotnosti exokarpu v rozsahu 6,14 % (B) – 16,03 % (F) a podiel dužiny v rozsahu 69,99 % (D) – 88,50 % (C).

**Tabuľka 2** Porovnanie hodnotených krajových odrôd tekvice obyčajnej (*Cucurbita pepo* L.) v podiele hmotnosti jednotlivých častí plodov z celkovej hmotnosti plodov (celková hmotnosť plodu = 100 %)

Znaky / krajové odrody	A	B	C	D	E	F
<b>Semená</b>	2,62	3,62	1,65	6,58	4,26	4,35
<b>Placenta</b>	6,88	6,71	6,33	12,95	6,82	12,69
<b>Dužina</b>	79,38	82,70	88,50	69,99	78,29	65,19
<b>Exokarp</b>	9,81	6,14	6,45	9,91	9,36	16,03

**Balátová et al. (2005)** pri štúdiu tekvice olejnej určili z celkovej hmotnosti plodov podiel hmotnosti dužiny v rozsahu 87 – 90 %, placenty 6 – 10 % a semien 3 – 4 %. Dosiahnuté výsledky v našej práci plne korešpondujú s výsledkami uvedených autorov, hoci sme v našom štúdiu použili iné biologické objekty.

Pri hodnotení plodov rôznych krajových odrôd tekvic sme súčasne hodnotili aj obsah sušiny v jednotlivých častiach. Výsledky z experimentálneho štúdia uvádzame v tabuľke 3. Z údajov vyplýva, že vo všeobecnosti sme

najvyšší obsah sušiny stanovili pri stopkách plodov a to v rozsahu 63,21 (F) – 87,47 % (B). Pomerne vyrovnaný obsah sušiny sme určili v dužine a to v rozsahu 7,80 (D) – 11,60 % (B) ako aj v placente 30,67 (A) – 40,87 % (F). Pri semenách sme určili výraznejšie rozdiely medzi krajovými odrodami, čo dokumentuje určený rozsah 36,26 (C) – 65,10 % (A). Výraznejšie rozdiely sme určili aj v obsahu sušiny exokarpu a to v rozsahu 42,61 (C) – 61,40 % (F). Obdobné hodnoty obsahu sušiny určila v prezentovaných výsledkoch aj **Balátová et al. (2005)**.

**Tabuľka 3** Porovnanie hodnotených krajových odrôd tekvice obyčajnej (*Cucurbita pepo* L.) v obsahu sušiny jednotlivých častí plodov (%)

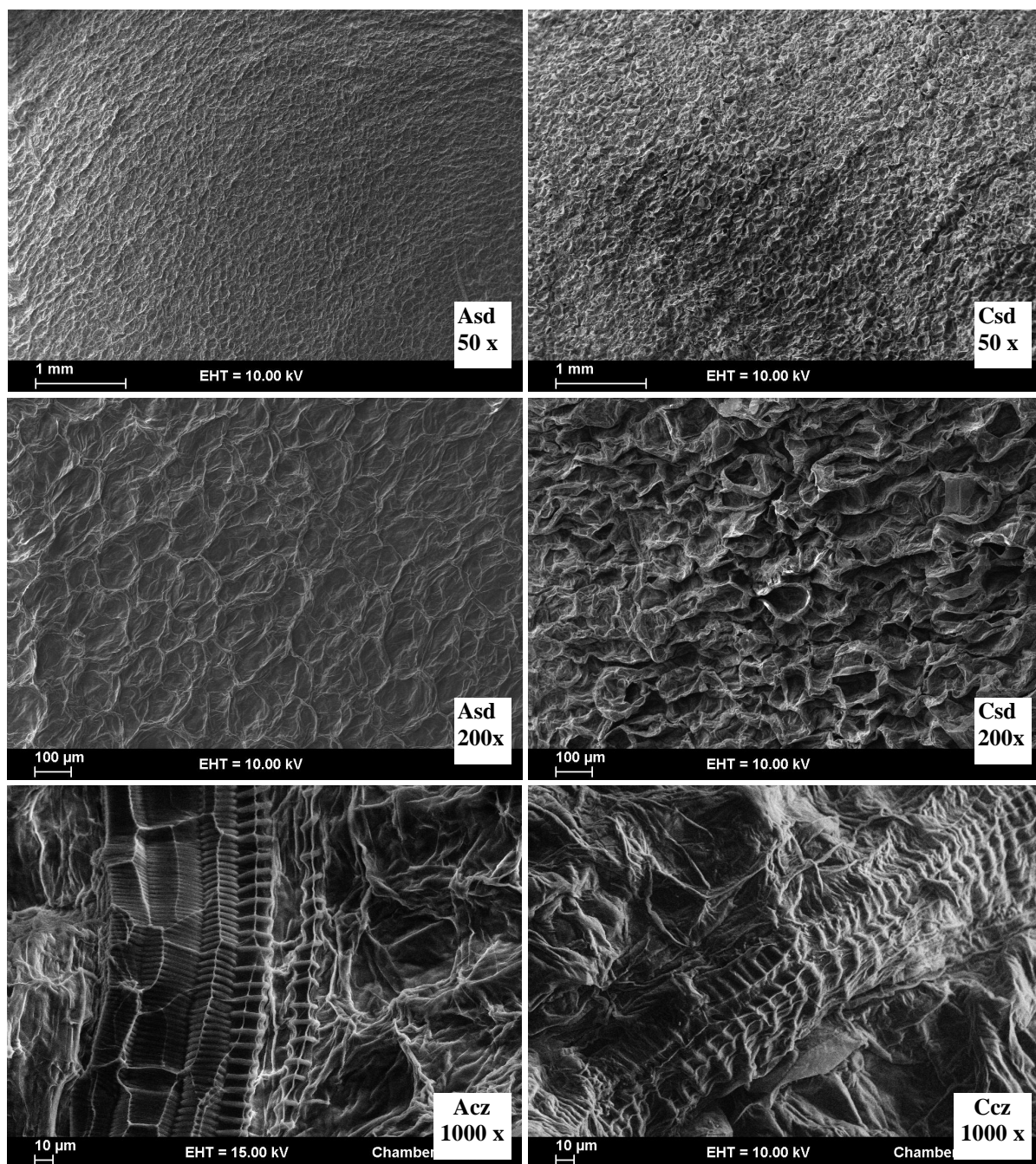
Znaky / krajové odrody	A	B	C	D	E	F
<b>Stopka</b>	78,94	87,47	82,22	64,06	69,32	63,21
<b>Semená</b>	65,10	61,18	36,26	42,65	41,46	42,12
<b>Placenta</b>	30,67	38,30	39,45	36,90	39,38	40,87
<b>Dužina</b>	8,13	11,60	9,00	7,80	8,46	9,48
<b>Exokarp</b>	55,41	51,30	42,61	45,50	51,96	61,45

V ďalšej časti experimentálneho štúdia sme porovnávali hodnotené krajové odrody aj v textúre suchej dužiny s použitím elektrónového mikroskopu. Z obrazovej dokumentácie (obrázok 1) vyplývajú určité rozdiely medzi dvoma porovnávanými krajovými odrodami z Ukrajiny (A) a Srbska (C). Rozdiely sme určili aj pri cievných zväzkoch.

Dužinu z niektorých odrôd využívajú obyvatelia aj v európskych krajinách sporadicky na prípravu mnohých tradičných pokrmov. Zaradenie konzumácie tekvic stravovania obyvateľstva môže významnou mierou rozšíriť nielen sortiment jedál ale aj rozšírenie príjmu ďalších

zdrojov biologicky aktívnych a pre ozdravovanie organizmu veľmi cenných komponentov. Tekvice ako také, obsahujú však aj niektoré antinutričné komponenty a to hlavne tanín (0,69 %), saponíny (0,56 %), trypsín inhibitory (2,7 TIU/g), stachyzoza (3,0 %) a rafinóza (0,8 %), čo potvrdzuje vo svojich výsledkoch **Atuonwu a Akobundu, 2010**.

Medzi významné faktory konzumácie každého produktu alebo výrobkov z produktov patrí aj sensorická kvalita. Z toho dôvodu sme zaradili do experimentálneho štúdia zhodnotenie sensorickej kvality troch výrobkov z rôznych odrôd tekvice obyčajnej.



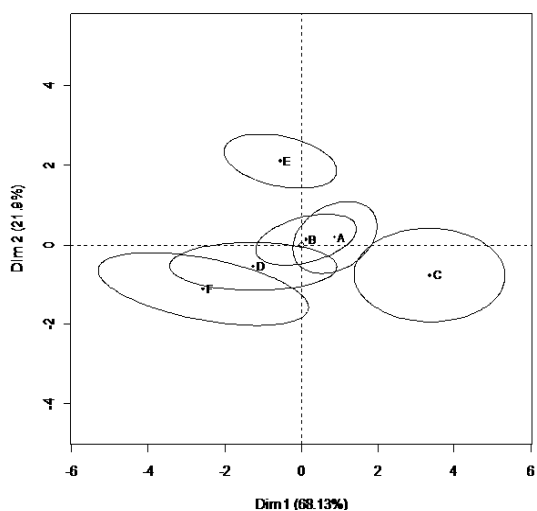
**Obrázok 1** Porovnanie textúry suchej dužiny (sd) a cievnych zväzkov (cz) krajovej odrody z Ukrajiny (A) a zo Srbska (C) s aplikáciou elektrónového mikroskopu pri rôznom zväčšení. Foto: R. Ostrovský 2011

### Senzorická kvalita pečenej dužiny

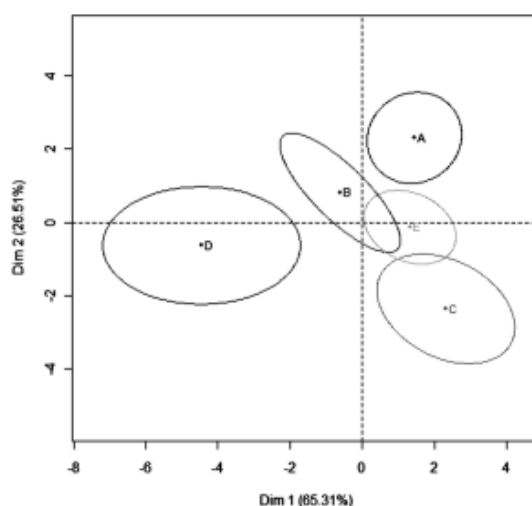
Po stanovení hospodárskej hodnoty sme vzorky dužiny krajových odrôd tepelne upravili a pripravili na organoleptické hodnotenie. Po prevode dát do elektronickej podoby sme využili na analýzu multivariačnú metódu stanovenia hlavných komponentov. Pôvodná variabilita dátového súboru po spracovaní 90 %, mnohí autori (Naes, Brockhoff, Tomic, 2010) uvádzajú, že je to dostatočné množstvo a takto spracované výsledky reprezentujú dáta pôvodné. Obrázok 2 demonštruje podobnosť hodnotených vzoriek. Pričom za najlepšiu vzorku je považovaná hodnotiteľmi vzorka C. Rozptyl konfidenčnej elipsy je relatívne veľký, čo znamená, že posúdená vzorka C bola hodnotená s väčšou variabilitou výsledkov ako vzorky A, B, C. Vzorky D a F sú hodnotené s vyšším rozptylom, čo opäť možno pozorovať zväčšenou

konfidenčnou elipsou. Všeobecne boli vzorky D a F hodnotené ako najhoršie, nevhodné na konzumáciu, so silne nepríjemnou dochuťou.

Vzorka C vynikala najmä chuťovým a texturálnym profilom a patrila medzi lídrov aj pri hodnotení ostatných atribútov. Obrázok 2 poukazuje na podobnosť vzoriek na hladine významnosti alfa = 0,05. V prípade, že sa elipsy prekrývajú, považujeme ich za štatisticky preukazne rovnaké. Identické výstupy prezentuje aj tabuľka 4, kde sú zaznamenané p-hodnoty viacnásobných porovnaní analyzovaných vzoriek tekvice príslušným štatistickým testom. Biele polia tabuľky znamenajú štatisticky preukazný rozdiel medzi vzorkami na hladine významnosti alfa = 0,05 (senzorická hladina).



**Obrázok 2** Determinácia rozdielov medzi vzorkami pečenej dužiny z rôznych odrôd tekvice obyčajnej (*Cucurbita pepo* L.) sensorickou analýzou s použitím metódy hlavných komponentov (PCA)



**Obrázok 3** Determinácia rozdielov medzi vzorkami tekvicovej pasty z rôznych odrôd tekvice obyčajnej (*Cucurbita pepo* L.) sensorickou analýzou s použitím metódy hlavných komponentov (PCA)

**Tabuľka 4** Determinácia rozdielov medzi vzorkami pečenej dužiny z rôznych odrôd tekvice obyčajnej (*Cucurbita pepo* L.) podľa sensorickej analýzy s použitím Wilcoxonového testu (p-hodnoty)

Odrody tekvic	F	E	D	C	B
A	0,00064	0,00037	0,03869	0,00765	<b>0,52890</b>
B	0,00149	0,00010	<b>0,09749</b>	0,00165	
C	0,00028	4,739e-06	0,00172		
D	<b>0,14821</b>	7,738e-07			
E	6,303e-08				

Rozdiely medzi vzorkami v jednotlivých deskriptoroch uvádza tabuľka 5. Zvýraznené hodnoty znamenajú štatistické preukazne vyššiu kvalitu ako zvyšok súboru, sivo zafarbené polia znamenajú preukazne nižšie hodnoty na hladine sensorickej významnosti. Vzorka C vynikala v deskriptoroch (textúra v ústach, chuť, šťavnatosť a celkový dojem). Vzorka E dominuje vo farebnosti no

zároveň panel určil jej texturálne správanie v ústach ako preukazne horšie oproti ostatným vzorkám. Farebne mdlé sa javili vzorky D a F. Vzorka F bola vyhodnotená ako najhoršia vzorka, nevhodná na pečenie. Pri hodnotení sa javila ako suchá (bola preukazne dokázaná znížená šťavnatosť) a nedosahovala texturálne atribúty ostatných vzoriek.

**Tabuľka 5** Determinácia rozdielov v testovaných znakoch pečenej dužiny z rôznych odrôd tekvice obyčajnej (*Cucurbita pepo* L.) podľa sensorického hodnotenia

Odrody	A	B	C	D	E	F
Farba	6,67	6,58	7,08	5,50	<b>8,75</b>	4,75
Vnímanie textúry v ústach	6,58	6,83	<b>8,00</b>	6,58	5,42	5,33
Chuť	5,58	4,58	<b>6,75</b>	4,33	4,50	4,58
Dochuť	6,25	6,00	6,25	4,67	5,00	5,00
Šťavnatosť	<b>6,50</b>	5,92	<b>6,42</b>	5,17	5,67	3,83
Pach	5,92	6,00	6,33	5,17	5,58	4,58
Celkový dojem	5,67	5,67	<b>7,75</b>	4,67	5,25	4,75

**Senzorická kvalita tekvicovej pasty.**

Pre analýzu tekvicovej pasty sme použili bodový test. Pri vzorkách sme hodnotili farbu, pach, chuť, roztierateľnosť, uvoľňovanie vody, húževnatosť, šťavnatosť, prehĺtavosť a dochuť. Spracované dáta sme vyhodnotili príslušnou štatistickou metódou analýzy hlavných komponentov. Výsledky sú prezentované na obrázku 3. V rozdielnom spôsobe tepelnej úpravy dužiny tekvice bola komisiou ohodnotená vzorka C, ako štatisticky preukazne najchutnejšia. Uvoľňovala menej vody s optimálnou roztierateľnosťou. Súbor tvoria vzorky A, B, E, ktoré sú

hodnotiteľmi vnímané ako rozdielne (čo potvrdzujú aj konfidenčné elipsy), no celkový dojem sa javí ako rovnaký (B a E). Vzorka D bola hodnotená ako najhoršia a nedosahovala atribúty ostatných vzoriek. Vzorka F bola z hodnotenia vylúčená, pretože nebolo možné ju spracovať podľa metodického postupu. Pri porovnaní výsledkov oboch bodových testov, možno konštatovať, že vzorka C je v sledovaných deskriptoroch preukazne lepšia a je vhodná na konzumáciu rôznou tepelnou úpravou. Rozdiely medzi vzorkami tekvicovej pasty zobrazuje tabuľka 6.

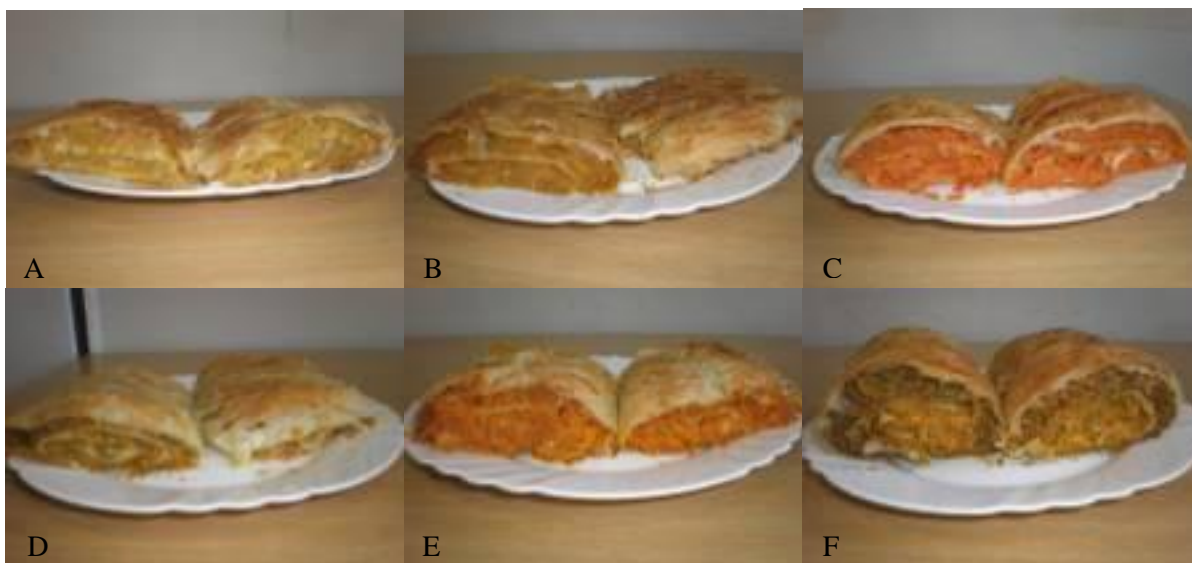
**Tabuľka 6** Determinácia rozdielov medzi vzorkami tekvicovej pasty z rôznych odrôd tekvice obyčajnej (*Cucurbita pepo* L.) podľa senzorickej analýzy s použitím Wilcoxonového testu (p-hodnoty)

Odrody tekvic	E	D	C	B
A	0,00508	4,330e-05	4,108e-05	0,00278
B	<b>0,08775</b>	0,00312	0,00568	
C	0,01917	0,00016		
D	0,00038			

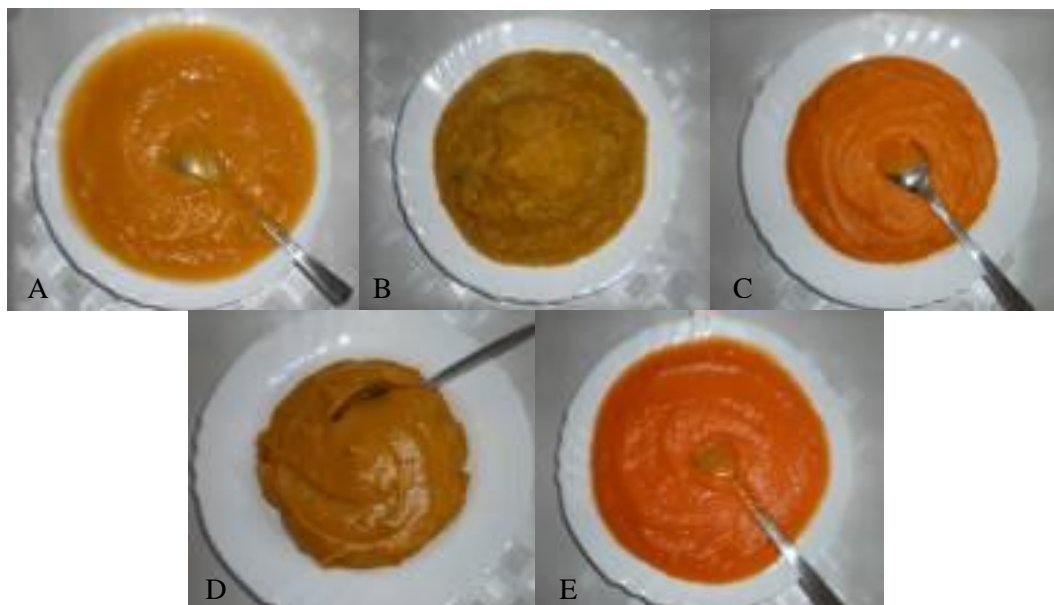
**Senzorická kvalita tekvicového závinu**

Tekvicový závin sme hodnotili pomocou poradovej metódy a výsledky následne spracovali neparametrickým Friedmanovým testom. Pre jednotlivé deskriptory boli vypočítané F, resp. F\* hodnoty, ktoré sa následne porovnali s tabuľkovou hodnotou ( $T_{tab}=10,81$ ) zodpovedajúcej počtu výrobkov a hodnotiteľov. Vlastnosti v ktorých senzorický panel nezistil rozdiel sú vzhľad

( $F=9,19$ ), farba ( $F^*=4,81$ ), textúra ( $F^*=5$ ). Vlastnosti v ktorých sa preferencie vzoriek preukazne líšili na senzorickej hladine významnosti sú pach ( $F=18,57$ ), celkový dojem ( $F^*=22,47$ ) a najmä chuť ( $F=30,1904$ ). Vo všetkých prípadoch jednoznačne dominovali vzorky B, C a vzorka F bola aj v tomto teste hodnotená ako štatisticky preukazne horšia.



**Obrázok 4** Porovnanie vzoriek závinov plnených dužinou z rôznych krajových odrôd tekvice obyčajnej (*Cucurbita pepo* L.) hodnotených senzoricou analýzou



**Obrázok 5** Porovnanie vzoriek kaše z dužiny rôznych krajových odrôd tekvice obyčajnej (*Cucurbita pepo* L.) hodnotených senzoricou analýzou



## ZÁVER

V práci sme zhodnotili morfológické znaky plodov 6 krajových odrôd tekvice a organoleptické znaky 3 potravinových výrobkov pripravených podľa tradičných technológií a poznatkov z dužiny tekvice (*Cucurbita* spp.). Medzi testovanými genotypmi sme určili významné rozdiely v hodnotených morfológických znakoch čo dokumentujú určené rozsahy pre priemernú hmotnosť plodov 1025,0 g (F) – 7680,0 g (B), hmotnosť stopky 3,35 g (F) – 25 g (B), hmotnosť dužiny 668,15 g (F) – 6351,10 g (B), hmotnosť placenty 90,47 g (E) – 515,50 g (B), hmotnosť semien 44,55 g (F) – 277,80 g (B) a hmotnosť exokarpu 124,20 g (E) – 471,70 g (B).

Významné rozdiely medzi krajovými odrodami sme určili aj v organoleptických znakoch hodnotených výrobkov. Vo všeobecnosti boli hodnotiteľmi preferované

záviny a najmenej kaša. Pri všetkých hodnotených výrobkoch pridelili hodnotitelia najvyššie hodnoty výrobkom z krajovej odrody pôvodom zo Srbska (C). Dužina uvedenej krajovej odrody sa vyznačovala lákavou prírodnou farbou sladkej chuti bez horkosti. Senzorická analýza vybraných druhov tekvic potvrdila, že existujú preukazné rozdiely v sledovaných atribútoch po tepelnom ošetrení.

Výsledky práce dokumentujú, že vhodné krajové odrody tekvic je možné revitalizovať a zaradiť do jedálneho programu obyvateľstva z dôvodu rozšírenia sortimentu druhov, využitia špecifickej biologickej hodnoty dužiny tekvic so súčasným využitím liečivých účinkov podmienených obsahom biologicky aktívnych látok dužiny na zlepšovanie zdravia obyvateľstva.

## LITERATÚRA

- ALEKNAVICIENE, P., DANILCENKO, P., JARIENE, H., KRAUJUTIENE, E., KULAITIENE, I., PAULASKIENE, J., TARASEVICIENE, A. 2009. Amino acid profile of organically grown alternative agricultural products. In *Agronomy Research 7 - Special issue II*, 2009, p. 565-571.
- ANDRES, T. C. 2000. An overview of the Oil Pumpkin. In *Cucurbit Genetic Cooperative*, 2000, no 23, p. 87-88. ISSN 1064-5594.
- ANONYM 1976. Common Vegetables for Seed and Fruit. Pumpkin and Squash. [online]. pp. 1–7. Retrieved from the web: <[http://www.beeculture.com/content/pollination\\_handbook/pumpkin](http://www.beeculture.com/content/pollination_handbook/pumpkin)>.
- ASIEGBU, J. E. 1987. Some biochemical evaluation of fluted pumpkin seed. In *Journal of the Science of Food and Agriculture*, vol. 40, issue 2, 1987, p. 151-155.
- ATUONWU, A. C., AKOBUNDU, E. N. T. 2010. Nutritional and Sensory Quality of Cookies Supplemented with Defatted Pumpkin (*Cucurbita pepo*) Seed Flour. In *Pakistan Journal of Nutrition*, vol. 9, 2010, no 7, p. 672-677. ISSN 1680-5194.
- AUGUSTINOVIĆ, Z., PEREMIN-VOLF, T., ANDREATA-KOREN, M., IVANEK-MARTINČIĆ, M., DADAČEK, N. 2006. Effect of spacing size and shape on oil pumpkin yield (*Cucurbita pepo* L. var. *oleifera*). In *Poljoprivreda*, vol. 12, 2006, no. 2, p. 23-28.
- BALÁTOVÁ, Z., BRINDZA, J., NÔŽKOVÁ, J., STEHLÍKOVÁ, B., POPIK, J. 2005. Špecializovaná databáza o variabilite hospodárskych znakov tekvice olejnej (*Cucurbita pepo* var. *styriaca*). In *Introdukcija a genetické zdroje rastlin - Botanické zahrady v novém tisíciletí*. Praha, 2005. p. 244. ISBN 80-903697-0-7.
- BAVEC, F., GRIL, L., GROBELNIK-MLAKAR, S., BAVEC, M. 2002. Production of Pumpkin for Oil. In *Trends in new crops and new uses. Proceedings of the fifth National Symposium New Crops and New Uses: Strength in Diversity*, 2002, p. 187-190. ISBN 0-970756-5-5.
- BISOGNIN, D. A. 2002. Origin and evolution of cultivated cucurbits. In *Ciencia Rural*, vol. 32, 2002, no. 4, p. 715-723. ISSN 0103-8478.
- BRANCUCCI, M., BÄNZIGER, E. 2000. *Das große Buch vom Kürbis*. Küttigen, Aarau : Miden & Fona, 2000. 61 p. ISBN 3-907108-20-5.
- BRINDZA, J., BALÁTOVÁ, Z., NÔŽKOVÁ, J. 2011. Proteins content and quality in selected plant parts of oily squash (*Cucurbita pepo* var. *styriaca*). In *Potravinárstvo*, vol. 5, February 2011, special issue, p. 249-253. ISSN 1338-0230.
- BUCHTER-WEISBRODT, H. 2004. *Genuss-Frucht – Kürbis*. Leopoldsdorf : Österr. Agrarverl., 2004. 144 p. ISBN 3-7040-1992-5.
- BURGMANS, J. 2000. Oil seed pumpkins – a new experience for New Zealand. [online]. Cucurbit Genetics Cooperative Report 23: 110-111. Retrieved from the web: <<http://www.umresearch.umd.edu/CGC/cgrepts.htm>>.
- CARBIN, B. E., LARSSON, B., LINDAHL, O. 1990. Treatment of benign prostatic hyperplasia with phytoosterols. In *Br. J. Urol.*, vol. 66, 1990, no. 6, p. 639-641.
- DUKE, J. A. 1998. Dr. Duke's Phytochemical and Ethnobotanical Databases. [online]. Retrieved from the web: <<http://www.ars-grin.gov/cgi-bin/duke/farmacy2.pl?327>>.
- FENNEMA, O., HUI, J., KAREL, M. 2004. *Handbook of Vegetable Preservation and Processing*. New York : Marcel Dekker, 2004.
- FIL, M., BRINDZA, J., GRYGORIEVA, O. 2009. MPK A23L 1/00. Tekvicová pasta s ebenovníkom – Patent № 2009 07309.
- FRIEDERICH, M., THEURER, C., SCHIEBEL-SCHLOSSER, G. 2000. Prosta Fink Forte capsules in the treatment of benign prostatic hyperplasia. Multicentric surveillance study in 2245 patients. In *Forsch Komplementarmed Klass Naturheilkd*, vol. 7, 2000, no. 4, p. 200-204.
- FULOP, J., STŘELEČEK, V., TÓTH, T., VALŠÍKOVÁ, M. 1997. *Technologické systémy vybraných druhov zeleniny - II časť*. Nové Zámky : Výskumný ústav zeleninársky Bratislava : Slovenská poľnohospodárska komora, 1997. p. 139-148. ISBN 80-967842-1-8.
- GLEW, R. H., GLEW, R. S., CHUANG, L. T., HUANG, Y. S., MILLSON, M., CONSTANS, D., VANDERJAGT, D. J. 2006. Amino acid, mineral and fatty acid content of pumpkin seeds (*Cucurbita* spp) and *Cyperus esculentus* nuts in the Republic of Niger. In *Plant Foods Hum. Nutr.*, vol. 61, 2006, no. 2, p. 51-56.
- ISO 8587:2006 *Sensory Analysis - Methodology Ranking*.
- HASSAN, L. G., USMAN, B. B., KAMBA, A. S., HASSAN, S. W. 2009. Protein and amino acid composition of 'hasta la pasta' spaghetti squash (*Cucurbita pepo* L.). In *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, vol. 10, 2009, no. 2, p. 295-299.
- HILLEBRAND, A., MURKOVIC, M., WINKLER, J., PFANNHAUSER, W. 1996. Ein hoher gehalt an vitamin E und ungesättigten fettsäuren als neues zuchtziel des kurbiszüchters. In *Ernahrung*, vol. 20, 1996, p. 525-527.

- IDOURAINE, A., KOHLHEPP, E. A., WEBER, C. W., WARID, W. A., MARTINEZ-TELLEZ, J. J. 1996. Nutrient constituents from eight lines of naked seed squash (*Cucurbita pepo* L.). In *J. Agr. Food Chem.*, vol. 44, 1996, p. 721-724.
- JACKS, T. J., HENSERLING, T. P., YATSU, L. Y. 1972. Mbegu za malenge. I. Sifa na matumizi ya mafuta na protini. A. review. In *Econ. Bot.*, vol. 26, p. 135-141.
- JEFFREY, C. 1990. An outline classification of the *Cucurbitaceae*. In BATES D. M., ROBINSON R. W. & JEFFREY C. (eds.), *Biology and utilization of the Cucurbitaceae*, p. 449-463. London : Cornell Univ. Press.
- KŘÍSTKOVÁ, E., KŘÍSTKOVÁ A., VINTER, V., LOSÍK, J. 2003. Morfologická variabilita pěstovaných druhů rodu *Cucurbita*. In *Hodnotenie genetických zdrojov rastlín. Zborník z 3. odborného seminára, Piešťany : VÚRV, 2003.* pp. 51-57.
- LAZOS, E. S. 1986. Nutritional, fatty acid and oil characteristics of Pumpkin and Melon Seeds. In *Journal of Food Science*, vol. 51, 1986, no. 5, p. 1382-1383.
- QUANHONG, LI., CAILI, FU., YUKUI, RUI., GUANGHUI, HU., TONGYI, CAI. 2005. Effects of Protein-Bound Polysaccharide Isolated from Pumpkin on Insulin in Diabetic Rats. In *Plant Foods for Human Nutrition*, vol. 60, 2005, no. 1, p. 13-16.
- LOY, J. B. 1990. Hull-less seeded pumpkins. A new edible snack food crop Pp. In *Advances in new crops*. Janick and Simon ed. Timber Press, Portland, p. 403-407.
- NÆS, T., BROCKHOFF P., TOMIC O. 2010. *Statistic for sensory and consumer science*. Willey, 2010. 294 p. ISBN-978-0470518212.
- NG, T. J. 1993. New opportunities in the Cucurbitaceae. p. 538-546. In J. Janick and J. E. Simon (eds.), *New crops*. New York.
- OGUNLESI, M., OKIEI, W., AZEEZ, L., OBAKACHI, V., OSUNSANMI, M., NKENCHOR, G. 2010. Vitamin C Contents of Tropical Vegetables and Foods Determined by Voltammetric and Titrimetric Methods and Their Relevance to the Medicinal Uses of the Plants. In *International Journal of Electrochemical Science*, vol. 5, 2010, p. 105-115.
- RAQUEL, P. F., PINHO, G. S., BARROCA, M. J. 2010. Study of the convective drying of pumpkin (*Cucurbita maxima*), Food and Bioproducts Processing, In *Press, Corrected Proof*, Available online 15 September 2010, ISSN 0960-3085.
- Self NutritionData-know what you eat*, 2010. [online]. Retrieved from the web: <<http://www.nutritiondata.com>>.
- SENSER, F., SCHERZ, H. 1999. *Tablas de composición de alimentos* (2nd ed.). Zaragoza : Editorial Acribia, 1999.
- SUPHAKARN, V. S., YARNNON, C., NGUNBOONSRI, P. 1987. The effect of pumpkin seeds on oxalocrystalluria and urinary compositions of children in hyperendemic area. In *Am. J. Clin. Nutr.*, vol. 45, 1987, no. 1, p. 115-121.
- SUPHIPHAT, V., MORJAROEN, N., PUKBOONME, I., NGUNBOONSRI, P., LOWHNOO, T., DHANAMITTA, S. 1993. The effect of pumpkin seeds snack on inhibitors and promoters of urolithiasis in Thai adolescents. In *J. Med. Assoc. Thai.*, vol. 76, 1993, no. 9, p. 487-493.
- R Development Core Team 2010. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0. URL ([r-project.org](http://r-project.org)).
- XU, Z., JIN-ZHI, O., YONG-SHANG, Z., BALLA, T. Y., XI-CAI, Z., SI-WEI, Z. 1994. Effect of the extracts of pumpkin seeds on the urodynamics of rabbits: an experimental study. In *J. Tongji. Med. Univ.*, vol. 14, 1994, no. 4, p. 235-238.

### Acknowledgments:

Táto publikácia bola vytvorená realizáciou projektu „Excelentné centrum ochrany a využívania agrobiodiverzity - ECOVA, ITMS 26220120015“, na základe podpory operačného programu Výskum a vývoj financovaného z Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

### 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, Slovenská republika. Tel.: +421 376 414 787, E-mail: [Jan.Brindza@uniag.sk](mailto:Jan.Brindza@uniag.sk)

Ing. Radovan Ostrovský. Institute of Biological Conservation and Biosafety, Faculty of Agrobiology and Food Resources, Slovak University of Agriculture in Nitra, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovenská republika. Tel.: +421376414792, E-mail: [radovan.ostrovsky@uniag.sk](mailto:radovan.ostrovsky@uniag.sk)

Ing. Lucia Kucelová. Institute of Biological Conservation and Biosafety, Faculty of Agrobiology and Food Resources, Slovak University of Agriculture in Nitra, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovenská republika. Tel.: +421376414787, E-mail: [lucia.kucelova@uniag.sk](mailto:lucia.kucelova@uniag.sk)

Mgr. Maria Fil, Lviv Commercial Academy in Lviv, Tugan-Baranovskogo str. 10, 79005 Lviv, Ukraine, Tel.: +380 32 275-68-66, E-mail: [merifil.ua@gmail.com](mailto:merifil.ua@gmail.com)

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, E-mail: [vietoris@afnet.uniag.sk](mailto:vietoris@afnet.uniag.sk)

## EFFECT OF SODIUM PHOSPHATES ON SELECTED FOOD GRADE BACTERIA

*Leona Buňková, Eva Lorencová, Dora Jurčová, František Buňka, Stanislav Kráčmar*

## ABSTRACT

The aim of this study was to examine the inhibitory effect *in vitro* of selected sodium phosphates (under the corporate names Hexa 68, Hexa 70, Trikrystal, FST, Pyro 52, KPS, Didi) on selected gram-positive and gram-negative bacteria. Seven different concentrations of each phosphate were used. Sensitivity of the bacterial strains to phosphates was observed in broth supplemented with salts. *In vitro* was showed a negative effect of various phosphates on growth of selected gram-positive bacteria. Orthophosphates and diphosphates (pyrophosphates) did not have significant inhibitory effect on tested bacteria at neutral pH. With the exception of phosphate Trikrystal has not been found *in vitro* significant inhibitory effects on gram-negative bacteria.

**Keywords:** gram-positive bacteria, gram-negative bacteria, sodium phosphate, antimicrobial effect

## ÚVOD

Antimikrobní účinek fosforečnanů je chápán jako pozitivní vedlejší efekt aplikace těchto solí v potravinách. Inhibiční účinky fosforečnanů jsou popisovány především u grampozitivních bakterií, některých mikromycet a kvasinek (Buňková et al., 2008; Knabel et al., 1991; Loessner et al., 1997). U grampozitivních bakterií je inhibiční efekt závislý na délce řetězce (kondenzačním stupni) fosforečnanů. Fosforečnany s delšími řetězci mají lepší inhibiční účinky než fosforečnany s kratšími řetězci (Buňková et al., 2008; Maier et al., 1999; Loessner et al., 1997). Uvedená skutečnost souvisí se strukturou buněčné stěny a schopností zvláště polyfosforečnanů vyvazovat dvojmocné kationty (vápenaté a hořečnaté) (Maier et al., 1999; Buňka a Buňková, 2009). Antibakteriální efekt je dán hlavně porušením integrity buněčné stěny, přičemž zároveň dochází ke ztrátě osmoregulace a porušení selektivní permeability cytoplazmatické membrány. Toto působení v konečném důsledku znamená snížení metabolických funkcí vyplývajících z úniku substrátů. Fosforečnanové soli mohou rovněž znemožnit klíčení spor nebo negativně ovlivnit tvar a tvorbu septa při dělení buněk (např. u *Bacillus cereus*) (Matsuoka et al., 1995; Molins, 1991). Antimikrobní účinek fosforečnanů je do značné míry ovlivněn pH. Změna pH, která je indukována přidávkou fosforečnanů, může hrát roli při uplatnění sekvestrační schopnosti.

S rostoucím pH roste i tvorba komplexů. Fosforečnany, které vykazovaly alkalickou reakci v kultivačním médiu, mají vyšší inhibiční kapacitu. Nízká pH totiž způsobují protonizaci vazebných míst, čímž dochází ke znatelnému poklesu žádaného sekvestračního účinku (Molins, 1991; Knabel et al., 1991). Inhibiční účinek fosforečnanů může být znehodnocen působením zářevu, který vyvolává jejich hydrolyzu. Rovněž některé bakterie disponují enzymy, které jsou schopny rozkládat fosforečnanové soli (Molins, 1991). Syrové, tepelně neupravené, potraviny disponují aktivní fosfatázou schopnou štěpit polyfosforečnany na nižší jednotky a zbavovat je tak sekvestračních účinků. Záhřevem dochází k její inaktivaci. Proto je pro zachování a maximalizaci inhibičního účinku fosforečnanových solí doporučován ihned po jejich přidání do potravinového výrobku tepelný záhřev (Knabel et al., 1991).

Kromě sledování vlivu polyfosforečnanů na růst mikroorganismů v laboratorních podmínkách byly také studovány jejich účinky na mikroorganismy v reálných potravinách. Molins et al. (1985) zjistili, že přidavek fosforečnanů může snížit počet bakterií *Clostridium sporogenes* na skladovaných masných výrobcích. V literatuře jsou rovněž popisovány inhibiční účinky polyfosforečnanů na bakterie, které mohou způsobit kažení mléčných potravin, zejména roztíratelných sýrových výrobků. Přídavek polyfosforečnanů u těchto výrobků může zpomalit nebo zabránit růstu nežádoucích bakterií tvořících spory (zejména klostridií), které se mohou podílet na kažení těchto výrobků tvorbou plynu, kyseliny máselné nebo produkcí toxinů (Borch a Lycken, 2007; Briozzo et al., 1983; Eckner et al., 1994; Loessner et al., 1997; Varga, 2005).

Cílem práce bylo v podmínkách *in vitro* popsat inhibiční vliv sedmi fosforečnanů v různém kondenzačním stupni na vybrané potravinářsky významné bakterie.

## MATERIÁL A METODY

Pro dosažení cílů této práce byly využity následující kmeny bakterií získané z České sbírky mikroorganismů: *Bacillus cereus* CCM 2010, *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* CCM 2216, *Citrobacter freundii* CCM 7187, *Enterococcus faecalis* CCM 4224, *Escherichia coli* CCM 3954, *Micrococcus luteus* CCM 732, *Proteus mirabilis* CCM 7188, *Pseudomonas aeruginosa* CCM 3955, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ser. Enteritidis CCM 4420, *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* CCM 3953.

Pro přípravu bakteriální suspenze pro inokulaci k vlastnímu stanovení inhibičních účinků daných fosforečnanových solí bylo použito masopeptonového bujónu (MPB). Kultivace probíhala při  $30 \pm 1$  °C po dobu 24 hodin.

Za účelem zjištění inhibičních účinků 7 fosforečnanových solí (polyfosforečnany Hexa 68 a Hexa 70, tripolyfosforečnan FST, pyrofosforečnany Pyro 52 a KPS, ortofosforečnany Didi a Trikrystal) byly připraveny jejich 10% (w/v) roztoky, které byly vysterilizovány filtrací. Fosforečnanové soli byly získány z Fosfa a.s., Břeclav-Poštorná.

Pro zjištění senzitivity jednotlivých bakteriálních kmenů bylo využito devíti koncentrací každé soli (0,1; 0,2; 0,3;

0,4; 0,5; 0,6; 0,75; 1,0; 2,0% w/v). Připravená kultivační média s různou koncentrací fosforečnanů byla dávkována v množství 200 µl do mikrotitrační destičky a zaočkována 5 µl suspenze bakterií. Jako pozitivní kontrola posloužilo kultivační médium bez fosforečnanů, negativní kontrola byla tvořena pouze připraveným MPB s fosforečnanem bez bakteriální suspenze.

Testované bakterie byly kultivovány při pokojové teplotě ( $25 \pm 1$  °C) za protřepávání po dobu 24 hodin. Bakteriální nárůst, resp. změna optické hustoty, byla měřena na přístroji TECAN Sunrise TW/TC při vlnové délce 600 nm ve 30 minutových intervalech. Z naměřených hodnot optické hustoty byl vypočítán průměr a poté byly sestrojeny růstové křivky (závislost optické hustoty na čase). Sestrojené křivky byly využity ke zjišťování růstových konstant.

## VÝSLEDKY A DISKUSE

V experimentu byly provedeny testy na sledování inhibičních účinků sedmi fosforečnanových solí v podmínkách *in vitro* u pěti gram pozitivních (*Bacillus cereus*, *B. subtilis*, *S. aureus*, *M. luteus* a *E. faecalis*) a pěti gram negativních bakterií (*E. coli*, *S. enterica*, *P. mirabilis*, *C. freundii* a *P. aeruginosa*) a to tak, že byl sledován jejich růst po dobu 24 hodin. Testované gram pozitivní a gram negativní bakterie byly vybrány tak, aby zahrnovaly bakterie, které mohou být kontaminanty potravinářských provozů a potravin, popř. bakterie, které mohou způsobovat onemocnění z potravin.

Pokud porovnáme účinky jednotlivých fosforečnanů na *B. cereus* CCM 2010 a *B. subtilis* CCM 2216, je zřejmé, že nejvyšší inhibiční efekt měly soli Hexa 68 a Hexa 70. Důvodem je pravděpodobně vysoký stupeň kondenzace těchto solí. Delší řetězec fosforečnanových solí disponuje zesílenou schopností vyvazovat divalentní kationty kovů a narušit tak integritu buněčných stěn či membrán nebo zasáhnout do metabolismu bakterií (Molins, 1991). *M. luteus* CCM 732 se jevil jako velmi citlivý na přítomnost polyfosforečnanů Hexa 68 a Hexa

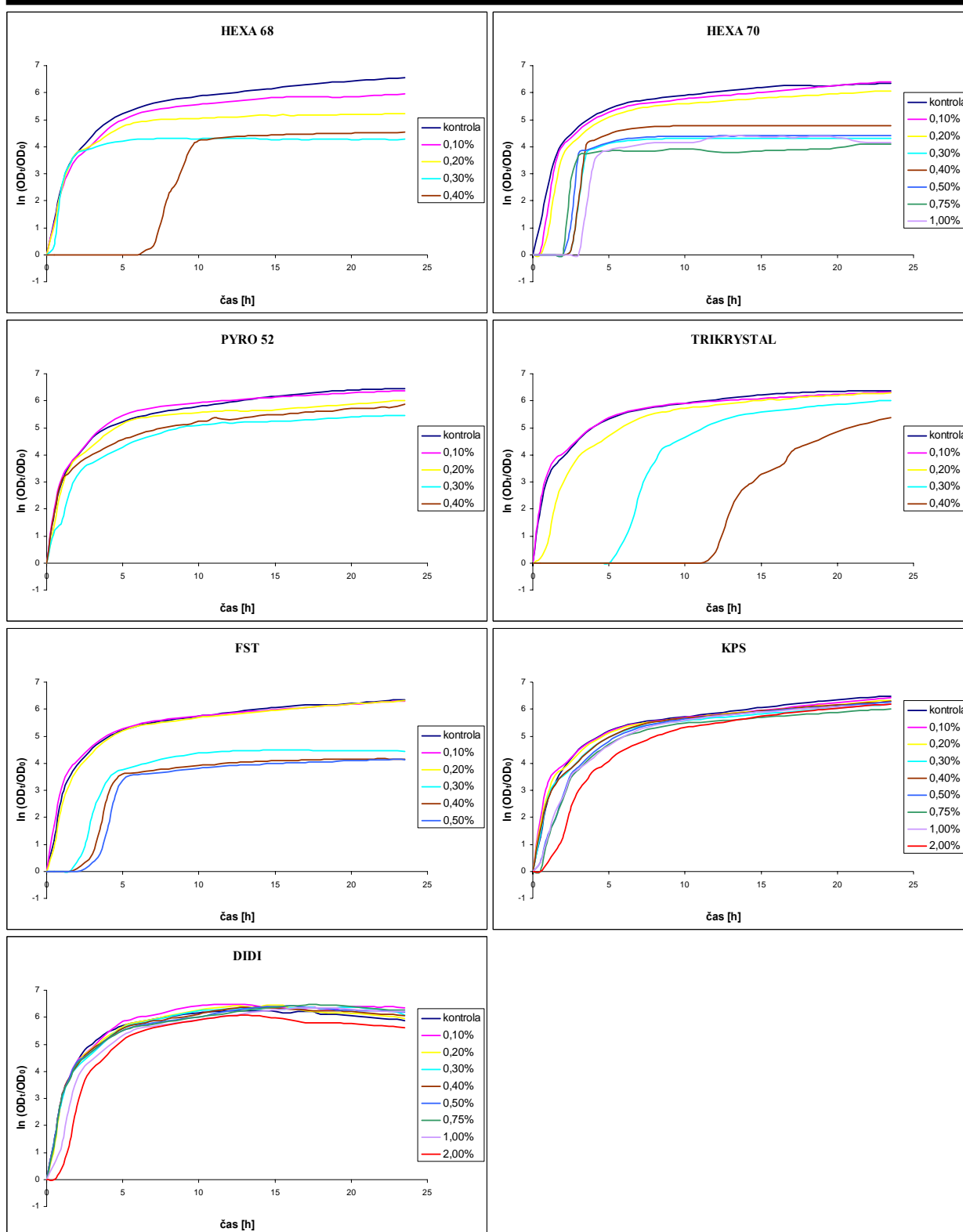
70, kdy již od 0,3% koncentrace byl spolehlivě znemožněn jakýkoliv nárůst. Stejněho účinku bylo dosaženo i u soli Pyro 52 (od 0,4 %). Soli Hexa 68, Pyro 52 a Trikystal od 0,5% obsahu vytvořily nevhodné podmínky pro rozvoj *S. aureus* CCM 3953 (obr. 1). FST znemožnil dělení bakterie při koncentracích 0,75 % a vyšších. Výsledky pyrofosforečnanu se shodují s jedním ze zdrojů, kdy se MIC *S. aureus* pohybuje okolo 0,5 % (Matsuoka et al., 1995).

V tabulce 1 jsou shrnuty inhibiční účinky testovaných fosforečnanů na vybrané gram pozitivní a gram negativní bakterie. Výsledky jsou vyjádřeny ve formě minimálních inhibičních koncentrací (MIC), tj. nejnižších koncentrací, které zcela zastavily růst testovaných bakterií.

Sůl Trikystal svou přítomností posouvala pH kultivačního prostředí do silně alkalické oblasti (pH ~ 11). Ze všech fosforečnanů působila v podmínkách *in vitro* nejvíce inhibičně, a to na 9 z 10 testovaných bakterií. Vliv změny pH v souvislosti s působením alkalického fosforečnanu byl již zkoumán u bakterie *Salmonella* Enteritidis, kdy byl zaznamenán vysoký účinek dané soli od 1,5% obsahu v kultivačním prostředí (Sampathkumar et al. 2003). Nicméně v potravinách lze tuto sůl použít až po následné úpravě pH a lze tedy očekávat výraznější snížení inhibičních účinků. Tuto hypotézu potvrzují i antimikrobní účinky soli Didi, která je stejně jako Trikystal ortofosforečnan. Po přidavku soli Didi do kultivačního média se pH pohybovalo v rozsahu neutrálních hodnot a tato sůl tak nezpůsobila striktní inhibici ani při nejvyšším aplikovaném množství. Lze se tedy domnívat, že neutrální či mírně zásadité pH (okolo pH 7,5) nepodpoří tolik komplexotvornou schopnost fosforečnanů jako silně alkalické prostředí a inhibiční efekt daného fosforečnanu. Obdobné pH jako Didi vytvářela v kultivačním médiu i sůl FST. FST má však delší řetězec, který mohl u většiny gram pozitivních bakterií způsobit podstatně vyšší inhibici než u fosforečnanu tvořeného jednou monomerní jednotkou.

**Tabulka 1:** Minimální inhibiční koncentrace fosforečnanových solí u testovaných gram pozitivních a gram negativních bakterií

Sledovaná bakterie	MIC pro danou sůl [%]						
	HEXA 68	HEXA 70	PYRO 52	TRI KRYSTAL	FST	KPS	DIDI
<i>Micrococcus luteus</i>	0,20%	0,40%	0,40%	0,50%	0,30%	>2,00%	>2,00%
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,50%	1,0%	0,50%	0,50%	0,75%	>2,00%	>2,00%
<i>Enterococcus faecalis</i>	2,00%	>2,00%	2,00%	1,00%	2,00%	2,00%	>2,00%
<i>Bacillus cereus</i>	0,40%	0,30%	2,00%	>2,00%	2,00%	>2,00%	>2,00%
<i>Bacillus subtilis</i>	0,50%	0,50%	2,00%	2,00%	>2,00%	>2,00%	>2,00%
<i>Escherichia coli</i>	>2,00%	2,00%	2,00%	0,30%	>2,00%	>2,00%	>2,00%
<i>Salmonella enterica</i>	>2,00%	>2,00%	2,00%	0,30%	>2,00%	>2,00%	>2,00%
<i>Proteus mirabilis</i>	>2,00%	>2,00%	>2,00%	0,40%	>2,00%	>2,00%	>2,00%
<i>Citrobacter freundii</i>	>2,00%	>2,00%	>2,00%	0,75%	>2,00%	>2,00%	>2,00%
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	>2,00%	>2,00%	>2,00%	0,50%	>2,00%	>2,00%	>2,00%



Obrázek 1 Vliv testovaných fosforečnanových solí na růst *Staphylococcus aureus* CCM 3953

Soli Didi a KPS u podstatné většiny testovaných grampozitivních i gramnegativních bakterií nezpůsobily žádný významnější pokles růstu. Výjimkou byl *E. faecalis* CCM 4224, kdy 2% koncentrace KPS v růstovém prostředí zabránila jakémukoliv projevu mikrobiální aktivity této bakterie. U ostatních sledovaných grampozitivních bakterií došlo při této nejvyšší koncentraci k prodloužení doby lag fáze a snížení maximální hodnoty růstu. Důvodem je zřejmě pH, kdy

alkalické hodnoty kultivačního prostředí významně zvyšují komplexotvornou schopnost fosforečnanů (Molins, 1991; Knabel et al., 1991). Polyfosforečnany Hexa 68 a Hexa 70 velmi často efektivně potlačovaly růst u vybraných grampozitivních bakterií při koncentracích do 1%. Většina sledovaných gramnegativních bakterií významněji reagovala na přítomnost těchto solí až při nejvyšších zkoumaných koncentracích (2%), a to většinou pouze zpomalením růstu, úplné inhibice dosaženo nebylo.

Je nutné podotknout, že vyvozené závěry platí pro modelové podmínky *in vitro*. Zvláště pH potravin, do kterých jsou fosforečnany přidávány, může významně ovlivnit antimikrobní působení fosforečnanů.

## ZÁVĚR

V podmínkách *in vitro* bylo prokázáno negativní působení sledovaných fosforečnanů v různém kondenzačním stupni na růstové chování vybraných bakterií. Výjimkou byly soli KPS a DIDI, které se projeví jako nejméně účinné. Výrazně citlivější k přítomnosti fosforečnanových solí byly gram pozitivní bakterie. Inhibiční působení fosforečnanových solí nespočívá jen v délce řetězce, ale závisí také na pH.

## LITERATURA

BORCH, E., LYCKEN, L. 2007. Influence of long-chain polyphosphate and heat treatment on *Clostridium cochlearium* and *Clostridium sporogenes* isolated from processed cheese spread. In *Journal of Food Protection*, vol. 70, 2007, p. 744-747.

BRIOZZO, J., DE LAGARDE, E. A., CHIRIFE, J., PARADA, J. L. 1983. *Clostridium botulinum* type A growth and toxin production in media and process cheese spread. In *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 45, 1983, p. 1150-1152.

BUŇKA, F., BUŇKOVÁ, L. 2009. Úloha tavicích solí při výrobě tavených sýrů. In *Potravinářská revue*, vol. 4, 2009, no. 1, p. 13-16.

BUŇKOVÁ, L., PLEVA, P., BUŇKA, F., VALÁŠEK, P., KRÁČMAR, S. 2008. Antibacterial effects of commercially available phosphates on selected microorganisms. In *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis*, vol. 56, 2008, p. 19-24.

ECKNER, K. F., DUSTMAN, W. A., RYSRODRIGUEZ, A. A. 1994. Contribution of composition, physicochemical characteristics and polyphosphates to the microbial safety of pasteurized cheese spreads. In *Journal of Food Protection*, vol. 57, 1994, p. 295-300.

KNABEL, S., WALKER, H., HARTMAN, P. 1991. Inhibition of *Aspergillus flavus* and selected Gram-positive bacteria by chelation of essential metal cations by polyphosphates. In *Journal of Food Protection*, vol. 54, 1991, p. 360-365.

LOESSNER, M. J., MAIER, S. K., SCHIWEK, P., SCHERER, S. 1997. Long-chain polyphosphates inhibit growth of *Clostridium tyrobutyricum* in processed cheese spreads. In *Journal of Food Protection*, vol. 60, 1997, p. 493-498.

MAIER, S., SHERER, S., LOESSNER M., 1999. Long-chain polyphosphate cause cell lysis and inhibits *Bacillus*

*cereus* septum formation, which is dependent on divalent cations. In *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 65, 1999, no. 9, p. 3942-3949.

MATSUOKA, A., TSUTSUMI, M., WATANABE, F. 1995. Inhibitory effect of hexameta-phosphate on the growth of *Staphylococcus aureus*. In *Journal of the Food Hygienic Society of Japan*, vol. 5, 1995, p. 588-594.

MOLINS, R. 1991. *Phosphates in Food*. CRC Press, Inc.

MOLINS, R. A., KRAFT, A. A., WALKER, H. W., OLSON, D. G. 1985. Effect of poly- and pyrophosphates on the natural bacterial flora and inoculated *Clostridium sporogenes* PA 3679 in cooked vacuum packaged bratwurst. In *Journal of Food Science*, vol. 50, 1985, p. 876-880.

SAMPATHKUMAR, B., KHACHATOURIANS, G., KORBER, R. 2003. High pH during trisodium phosphate treatment causes membrane damage and destruction of *Salmonella enterica* ser. Enteritidis. In *Food & Nutrition Press*, vol. 69, 2003, no.1, p. 122-129.

VARGA, L., 2005. Use a long-chain polyphosphate mixture for shelf-life extension of processed cheese spreads. In *Acta Alimentaria*, vol. 34, 2005, p. 493-498.

## Acknowledgments:

This study was supported by project MSM7088352101.

## Contact address:

Leona Buňková, Department of Fat, Tenside and Cosmetics Technology. Faculty of Technology, Tomas Bata University in Zlin, nám. T.G. Masaryka 275, 762 72 Zlín, Czech Republic, Tel: 00420 576 031 232, E-mail: bunkova@ft.utb.cz

Eva Lorencová, Department of Fat, Tenside and Cosmetics Technology. Faculty of Technology, Tomas Bata University in Zlin, nám. T.G. Masaryka 275, 762 72 Zlín, Czech Republic, E-mail: lorkal@seznam.cz

František Buňka, Department of Food Technology and Microbiology. Faculty of Technology, Tomas Bata University in Zlin, nám. T.G. Masaryka 275, 762 72 Zlín, Czech Republic, E-mail: bunka@ft.utb.cz

Dora Jurčová, Department of Food Technology and Microbiology. Faculty of Technology, Tomas Bata University in Zlin, nám. T.G. Masaryka 275, 762 72 Zlín, Czech Republic, E-mail: d.jurcova@centrum.cz

Stanislav Kráčmar, Department of Food Biochemistry and Analysis. Faculty of Technology, Tomas Bata University in Zlin, nám. T.G. Masaryka 275, 762 72 Zlín, Czech Republic, E-mail: kracmar@ft.utb.cz

doi: 10.5219/18

MICROBIAL BIOFILMS PRODUCED BY *PSEUDOMONAS FLUORESCENS* ON SOLID SURFACES

Jozef Čapla, Peter Zajác, Jozef Golian, Pavol Bajzík, Lucia Zeleňáková, Vladimír Vietoris, Dagmar Kozelová

## ABSTRACT

A biofilm is a complex aggregation of microorganisms growing on a solid substrate. Biofilms are characterized by structural heterogeneity, genetic diversity, complex community interactions, and an extracellular matrix of polymeric substances. The experimental part was focused on the adhesion of bacterial cells under static conditions and testing the effectiveness of disinfectants on created biofilm. In laboratory conditions we prepared and formed the bacterial biofilms *Pseudomonas fluorescens* in the four test surfaces of stainless steel, glass and plastic materials - PE (polyethylene) and EPDM (ethylene propylene diene monomer). Over the next 72 hours and 72 hours were observed numbers of adhesion bacterial cells of *P. fluorescens* on solid surfaces of tested materials. The highest values adhesion cells reached *P. fluorescens* cells after 72 hours of cultivation on plastic surfaces, where was increased in adhesion bacterial cells for EPDM in the values of  $10^5$  CFU/cm<sup>2</sup> and for PE up to  $10^6$  CFU/cm<sup>2</sup>. The subsequent repeated 72-hour cultivation *P. fluorescens* was an increase (growth) in the number of adhesion bacterial cells to all tested surfaces.

**Keywords:** biofilm, microbial attachment, *Pseudomonas fluorescens*.

## ÚVOD

Biofilm je definovaný ako matrica uzatvorená bakteriálnou populáciou adherovanou na povrchu alebo na sebe navzájom (Genigeorgis a Sofos, 1995, Marshall, 1992). Biofilmy sa vyznačujú charakteristickými biochemickými a biologickými vlastnosťami, odlišnými fyzikálnymi a fyzikálno-chemickými vlastnosťami (Harrison et al., 2008). Biofilmy môžu byť vytvorené všetkými typmi mikroorganizmov, vrátane kazenie spôsobujúcich a patogénnych mikroorganizmov za vhodných podmienok (Nivens et al., 1995). Niektoré baktérie majú vyššiu tendenciu vytvoriť biofilm. Najbežnejšie z nich sú *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Flavobacterium*, *Alcaligenes*, *Staphylococcus* a *Bacillus* (Genigeorgis a Sofos, 1995, Mattila-Sandholm a Wirtanen, 1992). K tvorbe biofilmu dochádza takmer na všetkých materiáloch, povrchoch a akomkoľvek prostredí bohatom na živiny, kde sú prítomné životaschopné mikroorganizmy a biofilm predstavuje tak problém i v oblastiach potravinárskeho priemyslu (Lee Wong, 1998). *P. fluorescens* je známy ako modelový organizmus pre skúmanie tvorby biofilmu, pretože bolo preukázané, že vytvára mikrobiálny biofilm na rôznych povrchoch (Carpentier a Chassaing, 2004).

## MATERIÁL A METODIKA

K príprave biofilmu sme použili mikroorganizmus *Pseudomonas fluorescens* (CCM 7141, Česká zbierka mikroorganizmov). Na experimenty sme vybrali materiály vo forme platničiek z nerezovej ocele - STN 17 240, 17 241 W Nr. 1.4301 AISI 304, z polyetylénu - PE, laboratórneho skla (mikroskopické podložné sklo) a z etylén propylén dién monoméru - EPDM.

Na prípravu štandardizovanej suspenzie mikroorganizmu bola použitá čistá kultúra modelovej baktérie *P. fluorescens*. Pripravená kultúra bola kultivovaná 24 h na trepačke o frekvencii  $130 \text{ min}^{-1}$  pri laboratórnej teplote 22 – 25 °C. Pripravená suspenzia

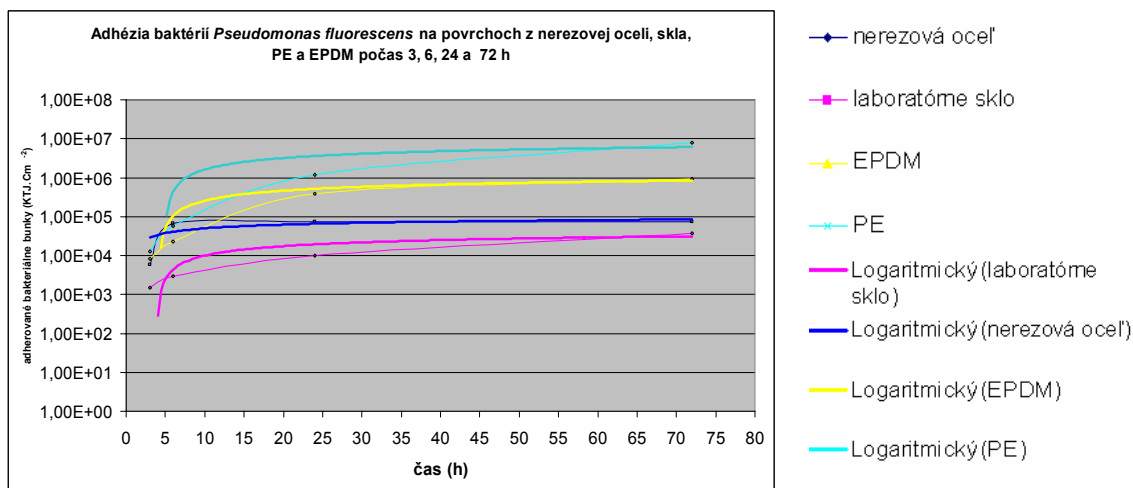
baktérií bola zriadená sterilným bujónom tak, aby ich hodnota OD<sub>615</sub> sa rovnala 0,32 čo zodpovedá počtu  $10^8$  KTJ.cm<sup>-3</sup>. Testované povrchy boli umiestnené do sklenenej vamičky a zaliate štandardizovanou suspenziou tak, aby v nej boli ponorené. Inkubácia prebiehala pri teplote 25 °C po dobu 3, 24 a 72 h za občasného premiešavania. Povrchy boli potom z roztoku vybraté a premyté sterilným fyziologickým roztokom fosfátového pufru (PBS pH 7,4), aby sa odstránili nezadržané bunky. Následne boli povrchy po 72 h kultivácii opláchnuté prúdom sterilnej vody, zaliate pripravenou štandardizovanou suspenziou a kultivované opäť ďalších 72 hodín.

Účinnosť sterovej metódy a následného uvoľňovania zachytených bakteriálnych buniek z tampónu do roztoku (počas pretrepávania pomocou vortexu) bola porovnávaná s metódou využívajúcou kombinované pôsobenie vortexu a ultrazvuku. Testované povrchy po 3 a 24 h kultivácii pri teplote 25 °C boli umyté roztokom fosfátového pufru a spracované sterovou metódou. Časť tampónu so zotretými bakteriálnymi bunkami bola po použití vortexu vložená na 3 minúty do ultrazvukového kúpeľa. Rozdiely v počte prežívajúcich životaschopných mikroorganizmov boli vyhodnotené kultiváciou na živnom médiu.

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

Na obrázku 1 je možné vidieť, že počet adherovaných bakteriálnych buniek *P. fluorescens* presiahol už po 3 h  $10^3$  KTJ.cm<sup>2</sup> u troch testovaných materiáloch z nerezovej ocele, skla, EPDM a u PE sme dosiahli hodnoty až  $1,3 \cdot 10^4$  KTJ.cm<sup>-2</sup>.

Najlepšie sa *P. fluorescens* adheroval na materiály z PE a EPDM, kde počas 72 h adhézie došlo k nárastu adherovaných bakteriálnych buniek u EPDM na hodnotu  $10^5$  KTJ.cm<sup>-2</sup> a u PE až na hodnotu  $10^6$  KTJ.cm<sup>-2</sup>. Výnimku tvorili testované povrchy z nerezovej ocele,



**Obrázok 1** Adhécia baktérií *P. fluorescens* na povrchoch z nerezovej ocele, skla, PE a EPDM po 72 hodinovej kultivácii

kde bol najväčší nárast po 6 h adhécie, potom začal rast stagnovať a zostal približne rovnaký.

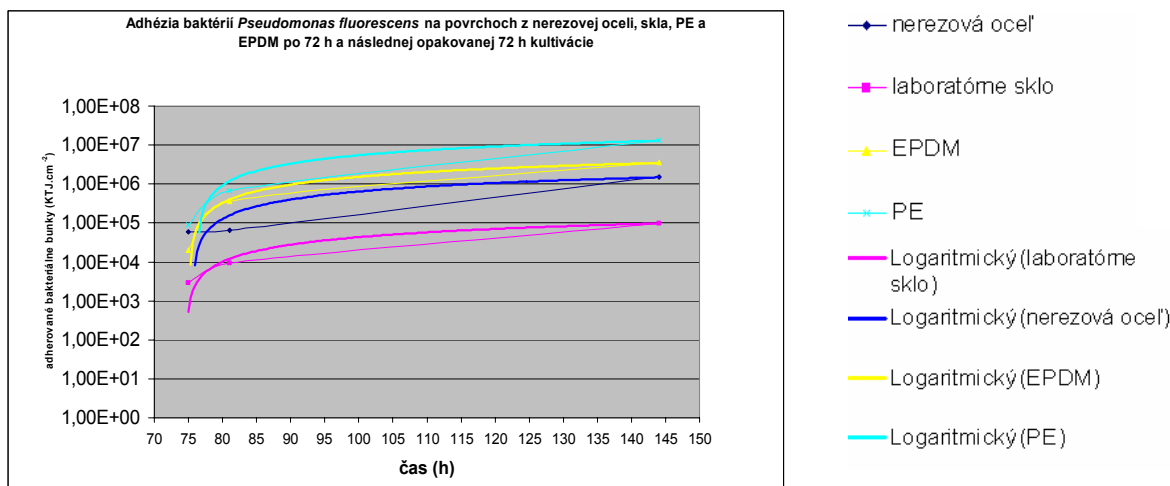
Po 72 h adhécii môžeme u všetkých testovaných povrchoch hovoriť o vzniku bakteriálneho biofilmu.

Na obrázku 2 je možné vidieť, že sa adherovali bunky po 72 h kultivácie a následnej opakovanej kultivácii ďalších 72 h. Počet adherovaných bakteriálnych buniek *P. fluorescens* na povrchoch z PE a EPDM presiahol rast po opakovanej 72 h kultivácii u EPDM hodnotu 10<sup>7</sup> a u PE hodnotu 10<sup>8</sup> adherovaných bakteriálnych buniek na povrchoch z nerezovej ocele, skla, EPDM a PE postupne stúpal a môžeme predpokladať, že pri následných opakovaných kultiváciách došlo k rozmnoženiu bakteriálnych buniek biofilmu.

u ostatných testovaných povrchoch a v priebehu oplachu po kultivácii s prídavkom živného média došlo k odplaveniu buniek z povrchu.

Biologické mechanizmy ako je napríklad prítomnosť adhézných molekúl na povrchu buniek by mohli byť hlavným faktorom v procese mikrobiálnej adhécie a tvorby biofilmu (Doyle, 2000). Podľa Pasmore et al. (2002) prítomnosť medzi baktériou a povrchom má dôležitú úlohu v schopnosti odstrániť biofilm z povrchu. Podľa viacerých autorov (Liu et al., 2007), bakteriálny rast a životaschopnosť ovplyvňuje schopnosť buniek adherovať na abiotické povrchy.

Súhlasíme so zisteniami autorov Mosteller a Bishop (1993), ktorí uviedli, že typ a druh kultivačného média rovnako ako koncentrácia mikroorganizmov sú faktory,



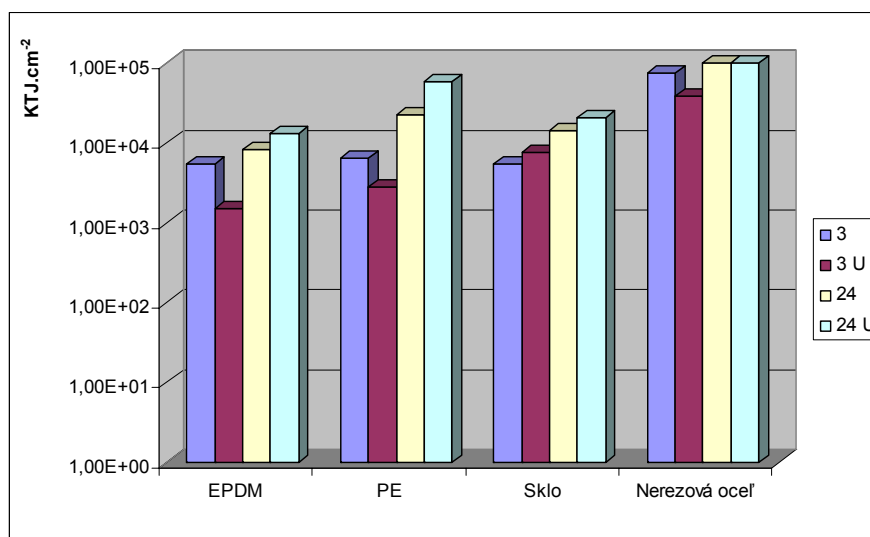
**Obrázok 2** Adhécia baktérií *P. fluorescens* na povrchoch z nerezovej ocele, skla, PE a EPDM po 72 h kultivácie a následnej opakovanej 72 h kultivácii

Najmenší nárast už adherovaných bakteriálnych buniek je spozorovaný na sklenenom povrchu, kde po 3 h u opakovanej 72 h kultivácii bola hodnota adherovaných bakteriálnych buniek 2,9.10<sup>3</sup> KTJ.cm<sup>-2</sup>, po šesť hodinovej opakovanej kultivácii bola hodnota adherovaných buniek 9,3.10<sup>3</sup> KTJ.cm<sup>-2</sup> a na konci opakovanej 72 h kultivácie bola hodnota adherovaných buniek 9,8.10<sup>4</sup> KTJ.cm<sup>-2</sup>. Môžeme predpokladať, že v priebehu následnej opakovanej kultivácie síce došlo k rastu adherovaných bakteriálnych buniek, ale väzba nebola natoľko pevná ako

ktoré môžu mať vplyv na proces adhécie mikrobiálnych buniek na povrchy, preto sme na zabezpečenie adhécie bakteriálneho druhu *P. fluorescens* starostlivo vybrali živné médium selektívny agar pre pseudomonády a taktiež súhlasíme s autormi

Vadillo-Rodriguez et al. (2004), ktorí uviedli že pri tvorbe mikrobiálneho biofilmu musí byť počet adherovaných buniek v intervale od 10<sup>6</sup> alebo až 10<sup>8</sup> KTJ.cm<sup>-2</sup>, pričom v našom experimente sme zvolili počiatočnú hodnotu bakteriálnej suspenzie aplikovanej na





**Obrázok 3** Uvoľňovanie bakteriálnych buniek *P. fluorescens* z vatových tampónov po pôsobení vortexu a po pôsobení kombinácie vortexu a ultrazvuku (U – ultrazvuk)

testované povrchy  $10^8$  KTJ.cm<sup>-3</sup>. Autori ďalej uvádzajú, že nižšie hodnoty ako  $10^6$  iba indikujú adhéziu mikrobiálnych buniek. Dôležitý pozorovaný ukazovateľ, ktorý sme zistili v našom experimente pri produkcii značného množstva exopolysacharidovej matrice buniek *P. fluorescens* na testovaných povrchoch zo skla, nerezovej ocele, gummy a plastu je obdobný poznatkom, ktorí potvrdili **Tsuneda et al. (2003)**, produkciu značného množstva exopolysacharidovej matrice buniek *S. aureus* rastúcich na povrchoch zo skla, z nerezovej ocele a z plastových materiálov.

Autori poukázali na to, že príľnavosť heterotrofnej baktérie izolovanej z povrchov bola inhibovaná elektrostatickou interakciou, čo má relevantný význam, pretože takouto interakciou sú ovplyvnené fyzikálno-chemické vlastnosti povrchu ako napríklad náboj, hydrofóbnosť a polymérne vlastnosti. Na obr. 3 je vidieť je vidieť uvoľňovanie bakteriálnych buniek *P. fluorescens* z vatových tampónov po pôsobení vortexu a po pôsobení kombinácie vortexu a ultrazvuku. Počty uvoľnených bakteriálnych buniek *P. fluorescens* pomocou vortexu korešponujú s počtami bakteriálnych buniek uvoľnených kombináciou vortexu a ultrazvuku, čo znamená že rozdiely medzi počtami uvoľnených buniek sú minimálne. Vatové tampóny používané na odber sterov z povrchov by mali byť schopné udržať životaschopnosť prítomných mikroorganizmov a tampón by mal umožniť uvoľnenie dostatočnej reprezentatívnej časti vzorky materiálu a zachovanie integrity nukleových kyselín pre účinné testovanie (**Drake et al., 2005**, **Österblad et al., 2003**, **Roelofsen et al., 1999**). Využitie ultrazvukového vlnenia sa v mikrobiológii využíva pre uvoľňovanie, rozbíjanie buniek a bakteriálnych kultúr (**Mott et al., 1998**).

## ZÁVER

Sledovali sme vplyv štyroch rôznych povrchov a času ich statického kontaktu s bakteriálnou suspenziou na podiel adherovaných bakteriálnych buniek. Preukázala sa relatívne dobrá schopnosť adhézie bakteriálnych buniek na povrchy, pričom najlepšie sa *P. fluorescens* adheroval na materiály z PE a EPDM, kde počas 72 h adhézie došlo

k nárastu adherovaných bakteriálnych buniek u EPDM na hodnoty  $10^5$  KTJ.cm<sup>-2</sup> a u PE až na  $10^6$  KTJ.cm<sup>-2</sup>. Výnimku tvorili testované povrchy z nerezovej ocele, kde bol najväčší nárast po 6 hodinách adhézie, potom začal rast stagnovať a zostal približne rovnaký. Možno sa domnievať, že nižšie počty adherovaných bakteriálnych buniek na povrchu z nerezovej ocele mohli byť spôsobené aj dôsledkom použitej sterovej metódy, kde vzhľadom k drsnejšiemu povrchu materiálu nemuseli byť zotreté všetky adherované bunky. Po 72 h adhézie môžeme u všetkých testovaných povrchoch hovoriť o vzniku bakteriálneho biofilmu. Pri následnej ďalšej 72 h (144 h) kultivácii *P. fluorescens* došlo k zvýšeniu počtu adherovaných bakteriálnych buniek na všetkých testovaných povrchoch v porovnaní len so 72 h kultiváciou. Analyzovaním porovnania vplyvu pôsobenia vortexu a kombinácie vortexu a ultrazvuku na uvoľňovanie bakteriálnych buniek sme potvrdili vhodnosť a dostatočnosť použitej metódy uvoľňovania bakteriálnych buniek z odobratého steru pomocou vortexu, pretože rozdiely medzi oboma metódami boli minimálne pri analyzovaní steru odobratých bakteriálnych buniek adherovaných počas 3 a 24 hodín

## LITERATÚRA

- CARPENTIER, B., CHASSAING, D. 2004. Interactions in biofilms between *Listeria monocytogenes* and resident microorganisms from food industry premises. In *International Journal of Food Microbiology*, vol. 97, 2004, p. 111-122.
- DOYLE, R. J. 2000. Contribution of the hydrophobic effect to microbial adhesion, In *Microbes and Infection*, vol. 2, 2000, p. 391-400.
- DRAKE, C., BARENFANGER J., LAWHORN J., VERHULST, S. 2005. Comparison of Easy-Flow Copan liquid Stuart's and Starplex swab transport systems for recovery of fastidious aerobic bacteria. In *J. Clin. Microbiol.*, vol. 43, 2005, p. 1301-1303.
- GENIGEORGIS, C., SOFOS, J. 1995. Inactivating human pathogens by processing and packaging. In *Proc. Int. Conf. Veterinary Aspects of Meat Production, Processing and*

- Inspection* 11–15 October 1993, Eceamst, Utrecht, In Press 1995, p. 78-79.
- HARRISON, J. J., TURNER, R. J., JOO, D. A., STAN, M. A., CHAN, C. S., ALLEN, N. D., VRIONIS, H. A., OLSON, M. E., CERI, H. 2008. Copper and Quaternary ammonium cations exert synergistic bactericidal and anti-biofilm activity against *Pseudomonas aeruginosa*. In *Antimicrobial Agents and Chemother.*, vol. 52, 2008, p. 2870-2881.
- Lee WONG, A. C. 1998. Biofilms in food processing environments. In *Journal of Dairy Science*, vol. 81, 1998, p. 10.
- LIU, Y., STRAUSS, J., CAMESANO, T. A. 2007. Thermodynamic investigation of *Staphylococcus epidermidis* interactions with protein-coated substrata, In *Langmuir*, vol. 23, 2007, p. 7134-7142.
- MARSHALL, K. C. 1992. Biofilms: an overview of bacterial adhesion, activity and control at surfaces. In *ASM News*, vol. 58, 1992, p. 202-207.
- MATTILA-SANDHOLM, T., WIRTANEN, G. 1992. Biofilm formation in the industry: A Review. In: *Food Reviews International*, vol. 8, 1992, p. 573-603.
- MOSTELLER, T. M., BISHOP, J. R. 1993. Sanitizer efficacy against attached bacteria in a milk biofilm. In *J. Food Prot.*, vol. 56, 1993, p. 34-41.
- MOTT, I. E. C., STICKLER, D. J., COAKLEY, W. T., BOTT, T. R. 1998. The removal of bacterial biofilm from water-filled tubes using axially propagated ultrasound. In *J. Appl. Microbiol.*, vol. 84, 1998, p. 509-514.
- NIVENS, D. E., PALMER, R. Jr., WHITE, D. C. 1995. Continuous nondestructive monitoring of microbial biofilms: A review of analytical techniques. In *Journal of Industrial Microbiology*, vol. 15, 1995, p. 263-276.
- ÖSTERBLAD, M., JÄRVINEN, H., LÖNNQVIST, K., HUIKKO, S., LAIPPALA, P., VILJANTO J., ARVILOMMI, H., HUOVINEN, P. 2003. Evaluation of a new cellulose spongetipped swab for microbiological sampling: a laboratory and clinical investigation. In *J. Clin. Microbiol.*, vol. 41, 2003, p. 1894–1900.
- PASMORE, M., TODD, P., PFIEFER, B., RHODES, M., BOWMAN, C. N. 2002. Effect of polymeric surface properties on the reversibility of attachment of *Pseudomonas aeruginosa* in the early stages of biofilm development, In *Biofouling*, vol. 18, 2002, p. 65-71.
- TSUNEDA, S., AIKAWA, H., HAYASHI, H., YUASA, A., HIRATA, A. 2003. Extracellular polymeric substances responsible for bacterial adhesion onto solid surface. In *Microbiol. Lett.*, 223, vol. 2, 2003, p. 287-292.
- VADILLO-RODRIGUEZ, V., BUSSCHER, H. J., NORDE, W., DE VRIES, J., VAN DER MEI, H. C. 2004. Atomic force microscopic corroboration of bond aging for adhesion of *Streptococcus thermophilus* to solid substrata. In *J. Colloid Interface Sc.*, vol. 278, 2004, p. 251–254.

**Acknowledgments:**

This work was supported by grant VEGA.3/7255/09.

**Contact address:**

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

Ing. Peter Zajác, PhD. Slovak University of Agriculture, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Department of Food Hygiene and Safety, Tr. A. Hlinku 2, 94976 Nitra, Slovakia, E-mail: zajac@potravinarstvo.com

doc. Ing. Jozef Golian, Dr., Slovak University of Agriculture, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Department of Food Hygiene and Safety, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovakia, E-mail: jozef.golian.af@uniag.sk

Ing. Pavol Bajzík. Slovak University of Agriculture, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Department of Food Hygiene and Safety, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovakia, E-mail: bajzik2@gmail.com

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

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

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

## CHEMICAL STRUCTURE OF EUROPEAN BISON MUSCULUS LONGISSIMUS DORSI AT DIFFERENT STAGES OF AGE

*Peter Haščik, Miroslav Müller, Adriana Pavelková, Miroslava Kačaniová, Juraj Čuboň, Emília Benzová, Marta Habánová, Michal Mihok, Jozef Garlík*

## ABSTRACT

The aim of this study was to investigate the chemical composition of musculus longissimus dorsi muscle in European bison (*Bison bonasus*) of the age 6, 9, 12 and 14 years. In *m. longissimus dorsi* water content was from 74.90 g (group until 6 years of age) until 75.70 g.100 g<sup>-1</sup> (group until 12 years of age). Non statistically significant differences ( $P \geq 0.05$ ) were found between groups of age. In *m. longissimus dorsi* the protein content was statistically significant during aging ( $P \geq 0.05$ ) of the European bison from 21.23 (group until 12 years of age) until 22.34 g.100 g<sup>-1</sup> (group until 14 years of age). The protein content is comparable with the values of steers and bulls of different breeds of cattle feedlot and meat buffalo. The *m. longissimus dorsi* fat content of European bison was represented from 1.26 g (group until 12 years of age) to 2.11 g.100 g<sup>-1</sup> (group until 9 years of age), without statistical differences ( $P \geq 0.05$ ) between groups of age. Fat levels are comparable with American bison fat levels and European bison meat from this perspective be regarded as high dietary, maybe. Tendency increasing of fat content in muscle with increasing age of animals was not confirmed ( $P \geq 0.05$ ) but was confirmed that this variable indicator has the greatest potential impact nutrition. Energy value in 100 g *m. longissimus dorsi* was from 402.81 kJ (group until 12 years of age) to 447.07 kJ.100 g<sup>-1</sup> (group to 9 years of age). The energy value in 100 g muscle was recorded only statistical differences ( $P \leq 0.05$ ) in the group 9 and 12 years of age. Experiment results confirmed that the European bison meat is good article and possible supplement in the diet and the human food chain especially in states where the farm is kept in a manner respectively, as a delicacy, because it contains low representation of fat, what ultimately increases its particular dietary value, moving it from this perspective, even before the beef meat.

**Keywords:** European bison, chemical composition, *musculus longissimus dorsi*

## ÚVOD

Mäso zvierat predstavuje významný zdroj biologicky plnohodnotnej potraviny s vysokým zastúpením živočíšnych bielkovín, s vysokou chutnosťou a často aj vysokou dietetickou hodnotou (Haščik et al., 2005ab, 2009ab, 2010; Horniaková et al., 2006; Barteczko a Lasek, 2008). Súčasťou rôznych druhov mias je aj mäso prežúvavcov, ktoré Geay et al. (2001) označujú za zdroj dôležitých živín a za mäso s vysokou senzoricou hodnotou, avšak význam a povaha týchto vlastností závisí zásadne od výživy prežúvavcov. Geay a Robelin (1979) zistili, že príjem potravy má vplyv tak na prírastok mäsa ale aj na ukládanie depozitného a intramuskulárneho tuku, avšak keď sa príjem potravy zvyšuje počas nariadenej diéty u zvierat, dochádza k zvyšovaniu krytia vonkajšieho tukového tkaniva a znižuje sa podiel intramuskulárneho tuku (Hornick et al., 1998). Menovaní autori zároveň konštatujú, že okrem výživy má vplyv na kvalitu mäsa aj metabolická aktivita, rovnako ako aj štruktúra a zloženie svaloviny.

V poslednom období tak v celom svete ako aj v Európe dochádza k celkovému poklesu spotreby hovädzieho mäsa, čo môže byť spôsobený tým, že hovädzie mäso obsahuje príliš veľa nenasýtených mastných kyselín (SFA) a a transmononenasýtených mastných kyselín (MUFA), ktoré môžu byť významným rizikom pre rozvoj ischemickej choroby srdca (Gey et al. 1976). Pokles spotreby mäsa prežúvavcov je aj vzhľadom k mediálnym akciám ako napríklad zakazovanie a bojkot v spotrebe telacieho mäsa, nezákonné obchodovanie a používanie hormónov a vznik ochorenia BSE, ale aj zavedením ekonomických transformácií (industrializácia, intenzifikácia poľnohospodárstva a urbanizácia), ktoré zvyšujú potencionálnu vzdialenosť medzi výrobcami a

spotrebiteľmi a zároveň vytvorili nový typ spotrebiteľa, ktorý je menej informovaný o definícii výrobku, jeho kvalite a pôvode. Tieto ťažkosti zvyšujú v prvom rade nespokojnosť spotrebiteľov, čo platí najmä v prípade červeného mäsa, t.j. mäsa dobytka a oviec. Kvalita je teda v súčasnosti dôležitým sociálnym a ekonomickým problémom, ktorý je zosilňovaný aj nasýtením trhu s potravinami, vzhľadom k vysokej účinnosti moderného poľnohospodárstva. Pre zabezpečenie požadovanej kvality mäsa z hľadiska jeho diéty a organoleptických vlastností sa v štátoch Európskej únie ako aj v celom svete vykonáva kontrola biologických vlastností svalov, sleduje sa množstvo intramuskulárneho tuku a tukových tkanív v jatočne opracovanom tele. Tieto vlastnosti tkaniva a jeho biochemické zloženie závisí na mnohých faktoroch ako sú spôsob chovu výživa, fyziologický stav a genetický typ zvierat (Berg a Butterfield, 1976; Huerta-Leidenz et al, 1996; Marchello a Driskell, 2001; De Smet et al. 2004).

Biochemické zloženie mäsa podľa Fauconneau (1997) predstavuje predovšetkým významný zdroj bielkovín (17 až 22 %) bohatého na esenciálne aminokyseliny (55,2 g 16 g N). Tieto proteíny sú mierne deficitné v sýrnych aminokyselinách, ale sú bohaté na lyzín (9,1 g pre 16 g N).

Mäso prežúvavcov, najmä hovädzieho dobytka je tiež dôležitým zdrojom hémového železa (asi 2 až 5 mg.100 g<sup>-1</sup> čerstvého tkaniva) v závislosti od typu svaly, ktorý je približne 3 až 4 krát vyšší ako v mäse bravčovom a kuracom a ktoré sa 5 až 6 krát rýchlejšie vstrebáva ako nehémové železo z rastlín. Obsah zinku v hovädzom mäse je tiež vysoký (3 až 11 mg.100 g<sup>-1</sup>) a závisí hlavne od výsekovej časti JOT zvierat (Enser et al., 1999). Okrem toho je mäso prežúvavcov dôležitým zdrojom vitamínov

skupiny B (B1, B2, B6, B12) a niacínu (Favier et al., 1995), najmä vitamínu B6 (0,3 až 0,4 mg.100g<sup>-1</sup> v hovädzom mäse; 0,15 až 0,25 mg.100g<sup>-1</sup> v jahňacom mäse) a vitamínu B12 (1,5 až 2,5 mg.100g<sup>-1</sup>), ktorý v podstate chýba v rastlinách, ale je dôležitý pre syntetizovanie mikroorganizmov tráviaceho systému prežúvavcov. Na celkovom prijme tukov sa mäso hovädzie podieľa dávkou 5 % (Demeyer a Doreau, 1999) a vyznačuje sa vysokým pomerom bielkovín a tukov, ktorý môže dosiahnuť hodnoty medzi 12 a 2. Tieto hodnoty sú oveľa vyššie ako v iných potravinách bohatých na bielkoviny, napr. vajcia (1,20), syr Cantal (0,75) a niektoré ryby s vyšším obsahom tuku (makrela: 0,80). Všeobecne platí, že vysoký podiel nenasýtených mastných kyselín (FA) vo výžive prežúvavcov vedie k vyššiemu ukladaniu intramuskulárneho tuku a tým je v mäse hovädzieho dobytká a oviec ďaleko menej nenasýtených mastných kyselín ako u ošípaných a hydiny (Hocquette a Bauchart, 1999).

Konzumácia potravín je v dnešnom období jednou z hlavných tém výživovej politiky štátov Európskej únie ako aj celého sveta (Galbraith et al., 2006). Dôležité je predovšetkým v konzumácii potravín zníženie obsahu tukov, nežiaducich mastných kyselín a najmä cholesterolu. Z tohto dôvodu v poslednom období dochádza k využívaniu alternatívnych zdrojov mäsa, ktoré sú blízke hovädziemu mäsu, akým je napríklad aj mäso bizóna amerického, resp. zobra európskeho, ktoré sa využíva prevažne v severnej Amerike, nakoľko tieto druhy zvierat sú v týchto podmienkach chované aj farmovým spôsobom. Viacerí autori poukazujú na konzumáciu bizónieho a zubrieho mäsa z dôvodu nižšieho zastúpenia energie, zapríčineného nižším obsahom tuku v porovnaní s hovädzím mäsom (McClenahan a Driskell, 2002). Uvádza sa, že mäso z bizónov a zubrov je zdravšie ako mäso hovädzie (Rule et al., 2002). Existuje niekoľko štúdií o obsahu živín v mäse bizóna (Koch et al., 1995; Marchello et al., 1998; Marchello a Driskell, 2001; Rule et al., 2002), ale tieto štúdie vykazujú údaje najmä z USA.

V nadväznosti na uvedené literárne zdroje bolo cieľom nášho experimentu preveriť chemické zloženie vybranej časti jatočného tela zobra európskeho (*bison bonasus*) s ohľadom na vek chovaného v podmienkach Slovenskej republiky polofarmovým chovom.

## MATERIÁL A METODIKA

Selektívnym odstrelom sme v ostatných rokoch získali po 3 kusy zobra európskeho zo Štátnych lesov SR, Zubria obora - Topolčianky v rozmedzí ich veku do 6, 9, 12 a 14 rokov.

Na vyhodnotenie chemického zloženia mäsa sme po základnej jatočnej rozrábke 3 ks z každej vekovej skupiny vykonanej na bitútku Štátnych lesov SR v Topolčiankach odobrali vzorky svaloviny *musculus longissimus dorsi*.

Základné chemické zloženie svalu *musculus longissimus dorsi* bolo spracované pomocou prístroja INFRADEC 1265 (NSR) v Centre výskumu živočíšnej výroby (Nitra), kde sme vyhodnocovali obsah sušiny, resp. vody, bielkovín, tuku a popola v g .100 g<sup>-1</sup> a zo zistených hodnôt obsahu tuku a bielkovín sme vypočítali cez príslušné koeficienty (Strmiska et al., 1988) energetickú hodnotu svaloviny v kJ.100 g<sup>-1</sup>.

Výsledky chemického zloženia svalu *musculus longissimus dorsi* boli spracované štatistickým programom Statgraphics 5.0, kde boli vypočítané základné štatistické charakteristiky (aritmetický priemer, smerodajná odchýlka, minimum, maximum, variačný koeficient) a na určenie preukaznosti rozdielov medzi skupinami (podľa veku) bol použitý F-test s následným t-testom.

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

Základné ukazovatele chemického zloženia *musculus longissimus dorsi* zobra európskeho z obory Topolčianky sú znázornené v tabuľke 1.

**Tabuľka 1** Chemické zloženie *M. longissimus dorsi* zobra európskeho

Sledovaný ukazovateľ	Skupina (podľa veku)	$\bar{x}$	s	min.	max.	v %	Preukaznosť rozdielov medzi skupinami (t-test)
Obsah vody (g.100 g <sup>-1</sup> )	do 6 rokov (a)	74,90	1,56	73,80	76,00	2,08	a:b <sup>*</sup> a:c <sup>*</sup> a:d <sup>*</sup> b:c <sup>*</sup> b:d <sup>*</sup> c:d <sup>*</sup>
	do 9 rokov (b)	74,92	1,24	74,76	75,20	0,32	
	do 12 rokov (c)	75,70	1,41	74,70	76,70	1,87	
	do 14 rokov (d)	75,11	1,77	73,20	75,70	2,36	
Obsah bielkovín (g.100 g <sup>-1</sup> )	do 6 rokov (a)	22,31	0,86	21,70	22,92	3,87	a:b <sup>*</sup> a:c <sup>*</sup> a:d <sup>*</sup> b:c <sup>*</sup> b:d <sup>*</sup> c:d <sup>*</sup>
	do 9 rokov (b)	21,94	0,19	21,76	22,15	0,90	
	do 12 rokov (c)	21,23	0,67	20,75	21,70	3,16	
	do 14 rokov (d)	22,34	1,56	21,13	24,10	6,98	
Obsah tuku (g.100 g <sup>-1</sup> )	do 6 rokov (a)	1,80	0,71	1,30	2,30	39,28	a:b <sup>*</sup> a:c <sup>*</sup> a:d <sup>*</sup> b:c <sup>*</sup> b:d <sup>*</sup> c:d <sup>*</sup>
	do 9 rokov (b)	2,11	0,17	1,97	2,30	8,01	
	do 12 rokov (c)	1,26	0,93	0,60	1,91	73,81	
	do 14 rokov (d)	1,84	1,17	0,50	2,70	63,91	
Obsah popola (g.100 g <sup>-1</sup> )	do 6 rokov (a)	1,01	0,04	1,98	1,04	4,20	a:b <sup>*</sup> a:c <sup>*</sup> a:d <sup>*</sup> b:c <sup>*</sup> b:d <sup>*</sup> c:d <sup>*</sup>
	do 9 rokov (b)	1,03	0,04	1,00	1,074	3,60	
	do 12 rokov (c)	1,05	0,07	1,00	1,10	6,73	
	do 14 rokov (d)	1,05	0,07	1,00	1,13	6,91	
Energetická hodnota (kJ.100 g <sup>-1</sup> )	do 6 rokov (a)	441,51	41,09	412,45	470,57	9,31	a:b <sup>*</sup> a:c <sup>*</sup> a:d <sup>*</sup> b:c <sup>*</sup> b:d <sup>*</sup> c:d <sup>*</sup>
	do 9 rokov (b)	447,07	7,57	438,71	453,48	1,69	
	do 12 rokov (c)	402,81	23,65	386,08	419,53	5,87	
	do 14 rokov (d)	443,40	60,83	383,83	505,42	13,72	

Chemické zloženie svalov je relatívne konštantné (75 % vody, 19-25 % bielkovín, 1-2 % minerálnych látok a sacharidov) ale chemické zloženie mäsa je veľmi variabilné a to predovšetkým z hľadiska obsahu lipidov.

Je dokázané, že obsah tukov závisí aj na výbere príslušných častí jatočného tela zvierat, ktoré majú relatívny podiel intermuskulárneho a podkožného tukového tkaniva (CIV, 1996).

Z výsledkov experimentu vyplýva, že obsah vody v *m. longissimus dorsi* zubra európskeho v nami preverovanom experimente bol od 74,90 g (skupina do 6 rokov veku) až do 75,70 g.100 g<sup>-1</sup> (skupina do 12 rokov veku). Obsah vody sa mierne zvyšoval len do 12 rokov veku zubra európskeho a so zvyšovaním veku nad 12 rokov hodnoty obsahu vody zaznamenali mierny pokles, ale štatisticky významné rozdiely medzi skupinami podľa veku neboli zistené (P≥0,05).

Výsledky obsahu vody v *m. longissimus dorsi* zubra európskeho z obory Topolčianky (Slovenská republika) sú mierne vyššie ako zistili u volov a býkov plemena norde **Grac et al. (2006)**, ktorí zistili obsah vody na úrovni (72,34 až 73,73 g.100 g<sup>-1</sup>), porovnateľné s hodnotami 74,50 až 75,70 g .100 g<sup>-1</sup> u kráv a býkov plemena belgické modré (**Fiems et al. (2003)**) a v priemere vyššie ako zistili u bizóna amerického **Galbraith et al. (2006)** s hodnotami od 72,18 do 75,11 g. 100 g<sup>-1</sup>.

Zo sušiny mäsa sú najdôležitejšími zložkami tuk a bielkoviny, nakoľko tieto zložky sú pre človeka nepostradatelné a to z dôvodu obsahu dôležitých aminokyselín a mastných kyselín (**Benková et al., 2005; Duclos et al., 2007; Berri et al. 2008**).

Obsah bielkovín sa štatisticky nemenil počas starnutia (P≥0,05) zubra európskeho a bol v 100 g *m. longissimus dorsi* od 21,23 (skupina do 12 rokov veku) až do 22,34 g.100 g<sup>-1</sup> (skupina do 14 rokov veku). Obsah bielkovín v sledovanej svalovine je porovnateľný s hodnotami 20,43 až 24,00 g.100 g<sup>-1</sup> z výsledkov experimentov CIV (1996), **Fiems et al. (2003)**, **Graca et al. (2006)** v mäse volov a býkov rôznych plemien výkrmového hovädzieho dobytku ako aj v mäse bizónov (**Marchello et al., 1996, 1998; Marchello a Driskell, 2001; Mc Clenahan a Driskell, 2002; Aalhus et al., 2003; Galbraith et al., 2006 a i.**), ale mierne nižší v porovnaní s výsledkami **Faviera et al. (1995)**, ktorí zistili v hovädzom mäse obsah bielkovín až 28,10 g.100 g<sup>-1</sup>.

Tuk je považovaný za hlavný rezervoár energie, ale aj ako dôležitý prvok z hľadiska senzorickej kvality mäsa, nakoľko obsahuje vysoký obsah aromatizujúcich látok (**Suchý et al., 2002**), ale v konečnom dôsledku je dôležitý aj pre samotné vyjadrenie dietetiky mäsa (**Haščík et al., 2005ab, 2009ab, 2010; Horniaková et al., 2006; Barteczko a Lasek, 2008**).

Hodnoty obsahu tuku podľa veku zubra európskeho v *m. longissimus dorsi* boli od 1,26 g (skupina do 12 rokov veku) až do 2,11 g.100 g<sup>-1</sup> (skupina do 9 rokov veku), bez štatistických rozdielov (P≥0,05) medzi vekovými skupinami. Vyššie hodnoty obsahu tuku, t.j. od 3,38 g (**Grac et al., 2006**) až po 6,4 g.100 g<sup>-1</sup> (**Favier et al., 1995; CIV, 1996**) zistili menovaní autori v hovädzom mäse rôznych plemien, ale u býkov plemena belgické modré **Fiems et al. (2003)** zistili nižšie hodnoty a to na úrovni 1,1 g.100 g<sup>-1</sup>. Nami dosiahnuté hodnoty obsahu tuku sú porovnateľné s hodnotami, ktoré u bizóna amerického zistili **Koch et al. (1995)**, **Rule et al. (2002)** a **Galbraith et al. (2006)** s úrovňou priemerného obsahu tuku v mäse od 1,17 g až po 2,14 g.100 g<sup>-1</sup>.

Energetická hodnota v 100 g svaloviny je úzko spojená s obsahom tuku a bielkovín (**Haščík et al., 2009b**). V *m. longissimus dorsi* zubra európskeho bola energetická hodnota od 402,81 kJ (skupina do 12 rokov veku) až 447,07 kJ.100 g<sup>-1</sup> (skupina do 9 rokov veku), čo je v súlade s hodnotami **Aalhusa et al. (2003)** a **Galbraitha et al. (2006)**. Štatistické rozdiely (P≤0,05) v energetickej hodnote v 100 g svaloviny sme zaznamenali len medzi skupinou do 9 a 12 rokov veku.

## ZÁVER

V pokuse sme hodnotili chemické zloženie vybraného svalu jatočného tela zubra európskeho *musculus longissimus dorsi* vo veku do 6, 9, 12 a 14 rokov chovaného v podmienkach zubej obory Topolčianky, Štátnych lesov SR. Na základe výsledkov sme nezistili zásadné rozdiely (P≥0,05) v chemickom zložení *m. longissimus dorsi* v obsahu vody, bielkovín a tuku, ale preukazné rozdiely sme zistili len v energetickej hodnote medzi skupinami do 9 a 12 rokov. V preverovanom experimente sa nepotvrdila tendencia zvyšovania obsahu tuku vo svalovine *m. longissimus dorsi* s narastajúcim vekom zvierat, ale potvrdilo sa, že na tento ukazovateľ má najvýznamnejší vplyv výživa.

Na základe dosiahnutých výsledkov a publikácii iných autorov môžeme skonštatovať, že chemické zloženie mäsa zubra európskeho je vhodným artiklom a možným doplnkom vo výžive a potravinovom reťazci človeka predovšetkým v štátoch, kde je chovaný aj farmovým spôsobom, resp. ako delikatesa, nakoľko obsahuje nízke zastúpenie tuku, čo v konečnom dôsledku zvyšuje predovšetkým jeho dietetickú hodnotu a posúva ho z tohto pohľadu aj pred mäso hovädzie.

## LITERATÚRA

- AALHUS, J. L., LARSEN, L., ROBERTSON, W. M., GIBSON, L. L., RUTLEY, B. D. 2003. Carcass and quality characteristics of bison heifers compared to bison bulls. *A final report to the Peace Country Bison Association*, 2003, (p. 31). [online], [2003], [cit. 10.1.2011] Retrieved from the web: <[http://www.bisoncentre.com/producer/resources/heifer\\_meat\\_trial.pdf](http://www.bisoncentre.com/producer/resources/heifer_meat_trial.pdf)>.
- BARTECZKO, J., LASEK, O. 2008. Effect of varied protein and energy contents in mixture on meat quality of broiler chicken. In *Slovak J. Anim. Sci.*, vol.41, 2008, no. 4, p. 173-178, ISSN 1337-9984.
- BENKOVÁ, J., BAUMGARTNER, J., HETÉNYI, L. 2005. Hydinové mäso - významná zložka racionálnej výživy obyvateľstva. In *Realizácia komplexného programu ozdravenia výživy obyvateľstva SR - využitie nutričných poznatkov v primárnej a sekundárnej prevencii neinfekčných chorôb*. Zborník no. 49, SAPV, Nitra, 2005, p. 31-32. ISBN 80-89162-18-5.
- BERG, R. T., BUTTERFIELD, R. M. 1976. New concepts of cattle growth. Sydney, Australia: 1976, University of Sydney Press.
- BERRI, C., BESNARD, J., RELANDEAU, C. 2008. Increasing dietary lysine increases final pH and decreases driploss of broiler breast meat. In *Poultry Sci.*, March 1, vol. 87, 2008, no.3, p. 480-484.
- CENTRE D'INFORMATION DES VIANDES (CIV). 1996. Valeurs nutritionnelles des viandes, *Analyses réalisées par la Société Scientifique d'Hygiène Alimentaire*, CIV, 64 rue Taitbout, 75009 Paris, 1996.

- DEMEYER, D., DOREAU, M. 1999. Targets and procedures for altering ruminant meat and milk lipids. In *Proc. Nutr. Soc.*, vol. 58, 1999, p. 1-15.
- DE SMET, S., RAES, K., DEMEYER, D. 2004. Meat fatty acid composition as affected by fatness and genetic factors: a review. In *Animal Research*, vol. 53, 2004, p. 81-98.
- DUCLOS, M. J., BERRI, C., LE BIHAN-DUVAL, E. 2007. Muscle growth and meat quality. In *J. Appl. Poult. Res.*, January 1, vol. 16, 2007, no.1, 2007, p. 107-112.
- ENSER, M., SCOLLAN, N. D., CHOI, N. J., KURT, E., HALLET, K., WOOD, J. D. 1999. Effect of dietary lipid on the content of conjugated linoleic acid in beef muscle. In *J. Anim. Sci.*, vol. 69, 1999, p. 143-146.
- FAUCONNEAU, G. 1997. Aspects nutritionnels de la consommation des viandes. In *Perspectives d'avenir, Viandes Prod. Carnés.*, vol. 18, 1997, p. 79-83.
- FAVIER, J. C., IRELAND-RIPERT J., TOQUE C., FEINBERG, M. 1995. Répertoire Général des Aliments. In *Tables de composition*, INRA Éditions, 1995, 879 p.
- FIEMS, L. O., De CAMPENEERE, W., Van CAELLENBERGH, J. L., De BOEVER, J. M. 2003. Vanacker Carcass and meat quality in double-muscled Belgian Blue bulls and cows. In *Meat Science*, vol. 63, 2003, p. 345-352.
- GALBRAITH, J. K., HAUER, G., HELBIG, L., WANG, Z., MARCHELLO, M. J., GOONWARDENE, L. A. 2006. Nutrient profiles in retail cuts of bison meat. In *Meat Science*, vol. 74, 2006, p. 648-654.
- GEAY, Y., ROBELIN, J., BERANGER, C. 1976. Influence du niveau alimentaire sur le gain de poids vif et la composition de la carcasse de taurillons de différentes races. In *Ann. Zootech.*, vol. 25, 1976, p. 287-298.
- GEAY, Y., ROBELIN, J. 1979. Variation of meat production capacity in cattle due to genotype and level of feeding, Genotype-nutrition interaction. In *Livest. Prod. Sci.*, vol. 6, 1979, p. 263-276.
- GEAY, Y., BAUCHART, D., HOCQUETTE, J. F., CULIOLI, J., 2001. Effect of nutritional factors on biochemical, structural and metabolic characteristics of muscles in ruminants, consequences on dietetic value and sensorial qualities of meat. In *Reprod. Nutr. Dev.*, vol. 41, 2001, p. 1-26.
- GRAC-ROSSELI, R., ARISCCETI, A. J., MOREIRA, F. B., MIZUBUTI, I. Y., NUNES, I., VISENTAINERA, V. J., SOUZA, E. N., MATSUSHITA, M. 2006. Fatty acid profile, and chemical composition of Longissimus muscle of bovine steers and bulls finished in pasture system. In *Meat Science*, vol. 74, 2006, p. 242-248.
- HAŠČÍK, P., ČUBOŇ, J., HORNIAKOVÁ, E., KRIVÁNEK, L., KULÍŠEK, V. 2005a. Vzťah medzi aplikáciou probiotického preparátu a množstvom abdominálneho tuku u výkrmových kurčiat. In *Agriculture (Poľnohospodárstvo)*, vol. 51, Nitra, 2005, no. 11, p. 574-579, ISSN 0551-3677.
- HAŠČÍK, P., WEIS, J., ČUBOŇ, J., KULÍŠEK, V., MAKOVICKÝ, P., KAČÁNIOVÁ, M. 2005b. Vplyv probiotického preparátu v KKZ brojlerových kurčiat ROSS 308 na chemické zloženie mäsa. In *Acta fytotechnica et zootechnica*, Nitra, vol. 8, 2005, no. 1, p. 20-24, ISSN 1335-258X.
- HAŠČÍK, P., KAČÁNIOVÁ, M., ČUBOŇ, J., BOBKO, M., NOVÁKOVÁ, I., VAVRIŠINOVÁ, K., ARPÁŠOVÁ, H., MIHOK, M. 2009a. Application of *Lactobacillus fermentum* and its effect on chemical composition of Ross PM3 chicken meat. In *Acta fytotechnica et zootechnica*, Nitra, vol. 12, 2009, Special issue, p. 197-205, ISSN 1335-258X.
- HAŠČÍK, P., KAČÁNIOVÁ, M., ČUBOŇ, J., BOBKO, M., VAVRIŠINOVÁ, K., ARPÁŠOVÁ, H., MIHOK, M., PAVLIČOVÁ, S. 2009b. Vplyv aplikácie *Lactobacillus fermentum* cez vodu na chemické zloženie mäsa kurčiat Ross 308. In *Potravinárstvo*, vol. 3, 2009, no. 2, p. 22-27, ISSN 1338-0230.
- HAŠČÍK, P., MIHOK, M., KAČÁNIOVÁ, M., ČUBOŇ, J., BOBKO, M., PRÍVARA, Š., VAVRIŠINOVÁ, K., ARPÁŠOVÁ, H., KUNOVÁ, S. 2010. Vplyv probiotického preparátu s multikmeňovým zložením na postmortálne zmeny v prsnej a stehennej svalovine kurčiat Hybro. In *Potravinárstvo*, vol. 4, Februar 2010, Special issue, p. 143-151, ISSN 1337-0230.
- HOCQUETTE, J. F., BAUCHART, D. 1999. Intestinal absorption, blood transport and hepatic and muscle metabolism of fatty acids in preruminant and ruminant animals. In *Reprod. Nutr. Dev.*, vol. 39, 1999, p. 27-48.
- HORNIAKOVÁ, E., BUŠTA, L., FLATNITZER, F. 2006. Application of probiotic preparation IMB 52 in laying hens' nutrition. In *Slovak J. Anim. Sci.*, vol. 39, 2006, no. 4, p. 191-196, ISSN 1337-9984.
- HORNICK, J. L., Van EENAEME, C., CLINQUART, A., DIEZ, M., ISTASSE, L. 1998. Different periods of feed restriction before compensatory growth in Belgian Blue Bulls: animal performance, nitrogen balance, meat characteristics, and fat composition. In *J. Anim. Sci.*, vol. 76, 1998, p.249-259.
- HUERTA-LIEDENZ, N. O., CROSS, H. R., SAVELL, J. W., LUNT, D. K., BAKER, J. F., SMITH, S. B. 1996. Fatty acid composition of subcutaneous adipose tissue from male calves at different stages of growth. In *Journal of Animal Science*, vol. 74, 1996, p. 1256-1264.
- KOCH, R. M., JUNG, H. G., CROUSE, J. D., VAREL, V. H., CUNDIFF, L. V. 1995. Growth, digestive capability, carcass and meat characteristics of *Bison bison*, *Bos taurus* and *Bos x Bison*. In *Journal of Animal Science*, vol. 73, 1995, p. 1271-1281.
- MARCHELLO, M. J., HADELY, M., SLANGER, W. D., MILNE, D. B., DRISKELL, J. A. 1996. Nutrient composition of fed bison. In *Bison World*, 1996, p. 27-32.
- MARCHELLO, M. J., SLANGER, W. D., HADLEY, M., MILNE, D. B., DRISKELLI, J. A. 1998. Nutrient composition of bison fed concentrate diets. In *Journal of Food Composition and Analysis*, vol. 11, 1998, p. 231-239.
- MARCHELLO, M. J., DRISKELL, J. A. 2001. Nutrient composition of grass and grain finished bison. In *Great Plains Research*, vol. 11, 2001, p. 65-82.
- Mc CLENAHAN, J. M., DRISKELL, J. A. 2002. Nutrient content a sensory characteristics of bison meat. In *NebFacts*, Nebraska Cooperative and Extension NF01-502. Lincoln, Nebraska: University of Nebraska., 2002.
- RULE, D. C., BROUGHTON, K. S., SHELLITO, S. M., MAIORANO, G. 2002. Comparison of muscle fatty acid profiles and cholesterol concentrations of bison, beef cattle, elk and chicken. In *Journal of Animal Science*, vol. 80, 2002, p. 1202-1211.
- SUCHÝ, P., JELÍNEK, P., STRAKOVÁ, E., HUCL, J. 2002. Chemical composition of muscles of hybrid broiler chickens during prolonged feeding. In: *Czech J. Anim. Sci.*, vol. 47, 2002, no.12, p. 511-518.

**Contact address:**

doc. Ing. Peter Haščík, PhD., Slovak University of Agriculture in Nitra, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Department of Evaluation and Processing of Animal Products, Trieda Andreja Hlinku 2. Tel.: 0376414708, E-mail: peter.hascik@uniag.sk

Ing. Miroslav Müller, Slovak University of Agriculture in Nitra, Faculty of Agrobiological and Food Resources, Department of Genetics and Breeding Biology, Trieda Andreja Hlinku 2. Tel.: 0376414289, E-mail: miroslav.muller@uniag.sk

Mgr. Ing. Adriana Pavelková, PhD., Slovak University of Agriculture in Nitra, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Department of Evaluation and Processing of Animal Products, Trieda Andreja Hlinku 2. Tel.: 0376414313, E-mail: adriana.pavelkova@uniag.sk

doc. Ing. Miroslava Kačániová, PhD., Slovak University of Agriculture in Nitra, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Department of Microbiology, Trieda Andreja Hlinku 2. Tel.: 0376414494, E-mail: miroslava.kacaniova@uniag.sk

prof. Ing. Juraj Čuboň, CSc., Slovak University of Agriculture in Nitra, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Department of Evaluation and Processing of Animal Products, Trieda Andreja Hlinku 2. Tel.: 0376414709, E-mail: juraj.cubon@uniag.sk

RNDr. Emília Benczová, Slovak University of Agriculture in Nitra, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Department of Evaluation and Processing of Animal Products, Trieda Andreja Hlinku 2. Tel.: 0376414348, E-mail: emilia.benczova@uniag.sk

Ing. Marta Habánová, PhD., Slovak University of Agriculture in Nitra, Faculty of Agrobiological and Food Resources, Department of Human Nutrition, Trieda Andreja Hlinku 2. Tel.: 0376414467, E-mail: marta.habanova@uniag.sk

Ing. Michal Mihok, Slovak University of Agriculture in Nitra, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Department of Evaluation and Processing of Animal Products, Trieda Andreja Hlinku 2. Tel.: 0376414113, E-mail: michal.mihok@uniag.sk

Ing. Jozef Garlík, Slovak University of Agriculture in Nitra, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Department of Evaluation and Processing of Animal Products, Trieda Andreja Hlinku 2. Tel.: 0376414113, E-mail: jozef.garlik@uniag.sk

## DIETARY FIBER: DEFINITION, SOURCES AND EXTRACTION

*Michaela Jurasová, Zlatica Kohajdová, Jolana Karovičová***ABSTRACT**

The interest in food rich in dietary fiber increased in the recent decades, and the importance of this food constituent has led to the development of a large market for fibre-rich products and ingredients. A high dietary fiber intake has been related to several physiological and metabolic effects. By-products of plant food processing represent a major disposal problem for the industry concerned, but they are also promising sources of compounds which may be used because of their favourable technological or nutritional properties. Soluble dietary fiber is those components that are soluble in water and includes pectic substances and hydrocolloids. Good sources of soluble fibers include fruits, vegetables, legumes, soybeans, psyllium seeds and oat bran. Insoluble dietary fiber is those components that are insoluble in water and includes cellulose, hemicellulose and lignin. Whole grains are good sources of insoluble fiber. Commercialize fibre product have to perform some characteristic properties.

**Keywords:** dietary fiber, source of fiber, fiber isolation

**ÚVOD**

V posledných desaťročiach sa zvyšoval záujem o potraviny bohaté na vlákninu. Dôležitosť tejto potravinovej zložky viedla k vývoju produktov so zvýšeným obsahom vlákniny. Zvýšený príjem vlákniny súvisí s viacerými fyziologickými a metabolickými vplyvmi (Vergara-Valencia et al., 2007). Vlákna hrajú dôležitú úlohu v znižovaní rizika mnohých porúch ako je napríklad zápcha, cukrovka, kardiovaskulárne ochorenia, divertikulóza a obezita (Ramulu a Udayasekhara Rao, 2003).

Mnoho štúdií zvyrazňuje vplyv potravín obohatených o vlákninu na zdravie, pričom odporúčaná denná dávka dosahuje 30 – 45 g, zatiaľ čo bežná spotreba vlákniny je na západe okolo 20 g/deň. (Colin-Henrion et al., 2009). V Slovenskej republike je od roku 1997 odporúčaná výživová dávka potravinovej vlákniny pre priemerného spotrebiteľa stanovená vo výške 22,5 g/deň (Kováčiková et al., 2003).

Po rozptýlení vo vode sa vlákna rozdeľuje na dve časti: rozpustnú a nerozpustnú. Každá z nich má iný fyziologický efekt. Nerozpustná časť súvisí s absorpciou vody a reguláciou trávenia, zatiaľ čo rozpustná časť sa spája s redukciami cholesterolu v krvi a znižovaním absorpcie glukózy v tráviacom trakte (Grigelmo-Miguel et al., 1999). Ako nerozpustná vlákna sa okrem celulózy, časti hemicelulózy a rezistentného škrobu označuje aj lignín, ktorý nepatrí medzi sacharidy (Kováčiková et al., 2003). Nerozpustná vlákna sa nachádza v cereáliách (McKee a Latner, 2000) a v celozrnných pekárenských výrobkoch (Kováčiková et al., 2003). Hlavnou zložkou rozpustnej vlákniny je pektín. K rozpustnej vláknine sa ďalej radí malé množstvo hemicelulózy, rastlinné slizy, polysacharidy morských rias, modifikované škroby a celulózy (Kováčiková et al., 2003). Zdrojom rozpustnej vlákniny je hlavne v ovocie, zelenina, strukoviny a ovsené otruby (McKee a Latner, 2000).

Využitie vedľajších rastlinných produktov potravinárskeho priemyslu predstavuje pre príslušné odvetvie významný problém, na druhej strane sú však tieto produkty sľubným zdrojom látok, ktoré vykazujú priaznivé technologické a nutričné vlastnosti (Schieber et al., 2001). Použitie vlákniny z nových zdrojov, ktoré sa práve nevyužívajú a možnosť jej modifikácie chemickým,

enzymatickým alebo fyzikálnym spôsobom len rozširuje rozsah použitia potravinovej vlákniny (de Escalada Pla et al., 2007).

**Definícia vlákniny**

Termínom vlákna sa označujú polysacharidy, oligosacharidy a ich hydrofilné deriváty. Chemicky definovaná vlákna zahŕňa skupinu heterogénnych zlúčenín ako je celulóza, hemicelulóza, lignín, pektín a gúmy získané z rias a produkované baktériami (Soukoulis et al., 2009). Najviac akceptovaná definícia uvádza, že: vlákna je jedlá časť rastlín alebo analogických polysacharidov, ktoré sú odolné voči tráveniu a absorpcii v ľudskom tenkom čreve a kompletnej alebo čiastočnej fermentácii v hrubom čreve (Turowski et al., 2007).

Slovenská legislatíva definuje potravinovú vlákna ako: „časť potravín rastlinného pôvodu, ktorá sa nestrávi endogénnymi enzýmami ľudského organizmu a tvoria ju predovšetkým neškrobové polysacharidy (napr. celulóza, hemicelulóza, pektínové látky,  $\beta$  - glukány, rastlinné gúmy) a lignín“ (Výnos MP SR, 2002).

**Zdroje vlákniny**

Hlavnými zdrojmi vlákniny sú zložky bunkovej steny (celulóza, hemicelulóza, lignín a pektínové látky) a neštruktúrne komponenty (gúmy a slizy), ako aj priemyselné aditíva (modifikovaná celulóza, modifikovaný pektín, komerčné gúmy a polysacharidy z rias) (Grigelmo – Miguel et al., 1999). Prehľad obsahu vlákniny v jednotlivých zdrojoch je uvedený v tabuľke 1. Celulóza, hemicelulóza a lignín sú tri hlavné zložky akéhokoľvek lignocelulózoového zdroja a ich pomer závisí od veku, typu suroviny a podmienok použitého typu extrakcie. Prírodné vlákna celulózy sa získavajú z lignocelulózoových vedľajších produktov pomocou baktérií, mikroskopických húb, mechanickými a chemickými metódami (Reddy a Yang, 2005).

Tradične sa ako zdroj vlákniny využívajú vedľajšie produkty mletia zŕn cereálií, ako sú: pšenica, kukurica, cirok, ako aj vedľajšie produkty vlhkého mletia kukurice a pšenice (McKee a Latner, 2000). Vlákna v cereáliách zahŕňa  $\beta$ -glukány a arabinoxylany, polysacharidy ako



rezistentný škrob a oligosacharidy (galacto- a frukto-oligosacharidy) (Ötles a Cagindi, 2006).

Ovocie a zelenina sú významným zdrojom vlákniny, hoci jej obsahujú menej ako obilniny (de Escalada Pla et al., 2007).

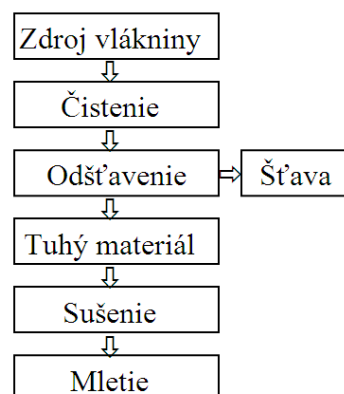
### Príprava vláknových preparátov

Aby sa získaná vláknina mohla nazývať vlákninovým preparátom, musí spĺňať určité parametre.

K základným charakteristikám vlákninového produktu patrí: obsah celkovej potravinovej vlákniny vyšší ako 50 %, obsah vlhkosti nižší ako 9 %, nízky obsah tuku, nízka kalorická hodnota a neutrálna vôňa a chuť (Figueroa et al., 2005). Na charakterizáciu vlákninových preparátov sa využívajú aj ich funkčné vlastnosti. Z nich najdôležitejšie sú hydratačné vlastnosti, ako je napučívanie, schopnosť vlákniny adsorbovať vodu a schopnosť viazať vodu. Tieto vlastnosti závisia tiež od chemických a fyzikálnych (plocha povrchu, veľkosť častíc) vlastností, chemickom prostredí a priebehu spracovania (Tosh a Yada, 2010).

Zjednodušený postup laboratórnej prípravy ovocnej alebo zeleninovej vlákniny podľa Marín et al. (2007), Sudha et al. (2007), Grigelmo-Miguel et al. (1999) znázorňuje rámcová schéma (obrázok 1). Zo zdroja (ovocie alebo zelenina) sa po jeho čistení odstráni prevažná časť šťavy a zvyšný vlhký materiál sa vysuší pri nižšej teplote, aby nedošlo k nežiaducim zmenám. (napr. De Escalada Pla et al. (2007) použili pri sušení tekvice teplotu 50 °C). Po vysušení sa vláknina pomelie na požadovanú veľkosť častíc. Pri príprave preparátu z citrusového ovocia Marín et al. (2007) použili a sledovali vlastnosti vedľajších produktov z troch zdrojov: odpad z konzervárenských podnikov (ktoré sa zaujímajú o extrakciu prírodných zložiek, ako sú napríklad flavonoidy), odpad z konzervárenských podnikov (ktorých hlavnou činnosťou je konzervovanie citrusových segmentov) a odpady z výroby citrusových štiav. Príprava preparátu pozostávala z vylisovania prebytočnej tekutiny pomocou špirálového lisu, sušenia pri teplote 50 ± 5 °C počas 24 h (na zvýšenie

trvanlivosti bez pridania konzervačných látok), a následnom mletí a preosievaní na veľkosť častíc menšiu ako 0,2 mm.



**Obrázok 1** Rámcová schéma prípravy potravinovej vlákniny (Marín et al., 2007, Sudha et al., 2007, Grigelmo-Miguel et al., 1999)

Sudha et al. (2007) použili na prípravu jablkovej vlákniny vysušené jablkové výlisky z výroby džusov obsahujúce šupky, stonky, jadrovník a zároveň zvyšky po extrakcii šťavy. Suché výlisky sa pomleli na prášok s veľkosťou častíc 150 µm. Takto pripravenú vlákninu následne použili pri výrobe keksov, ako náhradu múky v množstve 10, 20 a 30 %.

Vlákninový koncentrát z broskýň pripravili Grigelmo-Miguel et al. (1999) zo sušených výliskov po extrakcii šťavy pomletím v drviacom mlyne na svetlosť sita 30.

Na prípravu vlákninových preparátov z viacerých zdrojov použili Grigelmo-Miguel a Martín-Belloso (1999) zvyšky ovocia (jablká, hrušky, pomaranče a broskyne) po lisovaní pri výrobe štiav a šupky artičokov a špargle získané pri ich konzervovaní. Po premytí vodou ich sušili v teplovzdušnej sušiarňi pri 60 °C počas 48 hodín a pomleli na svetlosť sita 30 (0,8/10<sup>3</sup> µm). Následne v jednotlivých preparátoch stanovili chemické parametre a schopnosť zadržiavať vodu.

**Tabuľka 1** Prehľad obsahu potravinovej vlákniny v jednotlivých zdrojoch

Zdroj	TDF (%)	SDF (%)	IDF (%)	Literatúra
<b>Ovocie a zelenina</b>				
Jablká	51,10	14,6	36,50	Sudha et al., 2007
Citrusy	76	22	54	
Broskyne	31 - 36	11 - 12	20 - 24	McKee a Latner, 2000
Hrozno	77,89	9,53	68,36	
Mrkva	45,47	10,42	33,55	Chantaro et al, 2008
Biela kapusta	32,2	13,7	18,5	
Zemiaky	83,15	38,6	45,2	Raghavendra et al., 2004
Karfiol	33,7	12,2	21,5	
<b>Strukoviny</b>				
Fazuľa	19,95	3,66	16,85	Garcia et al., 1977
Hrach	14 - 26	2 - 9	10 - 15	
Šošovica	18 - 20	2 - 7	11 - 17	Tosh a Yada, 2010
Cícer	18 - 22	4 - 8	10 - 18	
<b>Cereálie</b>				
Pšenica	12,48	2,84	9,64	Ramulu a Udayasekhara Rao, 1997
Círok	9,67	1,64	12,48	
Ryža	4,11	0,92	3,19	

TDF (total dietary fibre) – celková potravinová vláknina, SDF (soluble dietary fibre) – rozpustná potravinová vláknina, IDF (insoluble dietary fibre) – nerozpustná potravinová vláknina

**Gorinstein et al. (2001)** sledovali obsah celkovej, rozpustnej a nerozpustnej vlákniny vo vzorkách citrusového ovocia, pričom ho po umytí v destilovanej vode ručne rozdelili na šupky a očistené ovocie.

Ryžové stebľa ako zdroj vlákniny použili vo svojej práci **Sangnark a Noomhorm (2004)**. Úpravu začali najskôr čistením - namáčaním vo vode počas jednej hodiny. Po odčerpaní vody ponechali stebľa sušiť na slnku ( $35 \pm 5$  °C) počas štyroch hodín. Potom ich narezali na 5 cm pásy. Získaný materiál ošetrili zásaditým peroxidom vodíka, čím sa znížil obsah lignínu a zlepšili hydratačné vlastnosti. Po následnej neutralizácii kyselinou chlorovodíkovou vzorky prefiltrovali, premyli vodou a vysušili v sušiarňi pri 60 °C počas štyroch hodín. Takto ošetrovaný materiál pomleli v drviacom mlyne na viacero veľkostí. Pripravené preparáty rozdelené podľa veľkosti častíc autori použili pri výrobe chleba.

**Elleuch et al. (2008)** extrahovali vlákninu z datlí, ktoré najskôr odkôstkovali. Datľovú dužinu potom rozomleli, extrahovali v horúcej vode, odstredili. Zvyšok päťkrát prepláchli 40 °C vodou a odstredili ( $6\,500\text{ min}^{-1}$ , 10 min, 25 °C), aby sa odstránili cukry. Takto upravený materiál sušili lyofilizáciou. V pripravenom preparáte stanovili chemické parametre, funkčné vlastnosti a po zmiešaní s vodou v množstve 20, 30, 40 a 50 g.l<sup>-1</sup> aj reologické vlastnosti.

Pripravu vlákninového prášku z mrkvy vykonali **Chantaro et al. (2008)** z čerstvých šupiek mrkvy, ktoré sušili pri teplote 60, 70 a 80 °C do ustálenia vlhkosti. V práci taktiež použili šupky, ktoré najskôr blanšírovali pri  $90 \pm$  °C počas jednej minúty v pomere šupiek k vode 1:6. Po blanšírovaní šupky ochladili v studenej vode (4 °C) a následne vysušili do konštantnej

hmotnosti v rovnakých rozsahoch teploty. Vysušený materiál pomleli na veľkosť častíc 125 a 425 μm. V získaných preparátoch stanovili chemické zloženie, hydratačné vlastnosti a antioxidačnú aktivitu.

#### Využitie potravinovej vlákniny

Na prídavok vlákniny do pekárskeho produktov existujú dva dôvody: zvýšenie príjmu vlákniny a zníženie nutričnej hodnoty (**Kohajdová et al., 2009**).

Dôležitú úlohu pre funkčnosť vlákniny majú jej fyzikálno-chemické vlastnosti (**Guillon a Champ, 2000**). Hydroxylové skupiny v štruktúre vlákniny poskytujú početnejšie interakcie s vodou, vďaka čomu sa s prídavkom vlákniny zvyšuje absorpčná schopnosť (**Gómez et al. 2003**) Každý druh vlákniny preto nemožno použiť rovnakým spôsobom (v rovnakom množstve, forme) a ani v tom istom type potravín (nápoje, mliečne výrobky, polievky, omáčky, mäsové výrobky, snacky, pečivo a pekárské výrobky). Prídavok vlákniny ovplyvňuje hlavne hydratačné vlastnosti produktu (**Guillon a Champ, 2000**). Z hydratačných vlastností sa najčastejšie stanovuje napučiacia schopnosť, schopnosť viazať vodu a schopnosť zadržiavať vodu, ktoré sú uvedené aj v tabuľke 2.

Napučiavanie je definované ako pomer objemu, ktorý zaberá vzorka vo vode po ustálení k pôvodnej hmotnosti. Schopnosť zadržiavať vodu je definovaná ako množstvo vody, ktoré zostane naviazané na vláknine aj po použití vonkajšej sily ako je napríklad tlak alebo odstredovanie. Schopnosť viazať vodu je definovaná ako množstvo vody, ktoré je naviazané na vlákninu bez použitia nejakej vonkajšej sily (okrem gravitácie a atmosférického tlaku) (**Raghavendra et al., 2004**).

**Tabuľka 2** Hydratačné vlastnosti vlákniny v jednotlivých zdrojoch

Zdroj	S (ml.g <sup>-1</sup> )	WRC (g.g <sup>-1</sup> )	WAC (g.g <sup>-1</sup> )	Literatúra
Pšenica	7,07	4,15	6,49	<b>Rosell et al., 2009</b>
Ovos	4,98 – 7,60	3,11 – 4,79	3,69 – 6,89	
Jablko	6,89	3,85	6,12	
Inulin	11,79	1,16	11,05	
Zemiaky	12,0	-	9,7	<b>Kaack et al., 2006</b>
Hrášok	6,64 - 7,48	3,82 - 3,94	-	<b>Robertson et al., 2000</b>
Jablko	7,42	5,43	-	
Citrusy	10,45	10,66	-	
Mrkva	7,50	3,10	3,80	<b>Raghavendra et al., 2006</b>
Hrášok	5,50	2,70	3,50	
Pšenica	7,50	2,50	3,10	
Jablko	9,00	3,50	4,50	
Citrusy	15,7	11,2	5,2	<b>Guillon a Champ, 2000</b>
Jablko	5,6 - 9,9	3,8 – 7,1	1,9 – 4,6	
Ovsené otruby	5,53	3,5	-	
Rasca	4 – 4,5	3 – 3,9	3 – 3,8	<b>Sowbhagya et al., 2007</b>
Pšeničné otruby	4,65 – 5,79	3,05 – 4,61	3,45 – 5,89	<b>Zhu et al. 2010</b>
Celulóza	-	0,71	-	<b>Lecumberri et al., 2007</b>
Jablčný pektín	7,42	16,51	-	
Citrusový pektín	10,45	28,07	-	

S (swelling) – napučiavanie, WRC (water retention capacity) – schopnosť zadržiavať vodu; WAC (water absorption capacity) – schopnosť viazať vodu

Na fyzikálnu štruktúru a teda aj na schopnosť zadržiavať vodu vplýva aj veľkosť častíc. **Chantaro et al. (2008)** uvádzajú zvýšenie tejto hodnoty pri znižovaní veľkosti častíc.

Pre kompletnú charakteristiku hydratačných vlastností vlákniny je dôležité poznať kinetiku absorpcie vody. To umožňuje zistiť čas potrebný na to, aby vláknina absorbovala potrebné množstvo vody potrebnej pre istý proces. Kinetika absorpcie vody je však dôležitá aj pre vplyv na trvanlivosť suchých a polosuchých systémov (**de Escalada Pla et al., 2007**).

Upraviť hydratačné vlastnosti možno aj procesom sušenia počas prípravy potravinovej vlákniny. Ako uvádzajú **Massiot a Renard (1997)**, sušenie má vplyv hlavne na napučiavaciu schopnosť vlákniny.

V pekárenských výrobkoch sa vláknina z rôznych zdrojov používa ako náhrada určitého podielu múky (**Sudha et al., 2007**). Prídavkom potravinovej vlákniny do chlebového cesta sa zvyšuje nutričná hodnota a zlepšujú sa reologické vlastnosti cesta. Zároveň to vplýva na predĺženie trvanlivosti chleba, znížením tendencie jeho tvrdnutia a celkovo sa zlepšuje senzoričná hodnota a kvalita chleba. Prídavok vlákniny vplýva tiež na zvýšenie tolerancie a stability nezávisle od zdroja, ktorý sa použil (**Gómez et al., 2003**). Výsledkom prídavku vlákniny je aj pokles špecifického objemu výrobkov, ktorý sa pripisuje interakcii vlákniny s lepkom, čo vedie k zníženej schopnosti zadržiavať plyn (**Gómez et al., 2003**). Je preto veľmi dôležité pri každom prídavku vlákniny upraviť receptúru výrobku. Vplyv na senzoričnú hodnotu potravín s prídavkom vlákniny sa zvyšuje aj úpravou veľkosti častíc vlákniny (čím sa odstráni pocit zrnitosti v ústach) (**Thebaudin et al., 1997**).

## ZÁVER

Vďaka značnému obsahu potenciálne zaujímavých látok vo vedľajších produktoch je priemysel stále viac legislatívou a enviromentálnymi dôvodmi nútený k ich využívaniu (**Laufenberg et al., 2003**).

Potravinová vláknina sa ako prídavok začlenila do širokého množstva potravín ako sú mliekárenské a mäsové výrobky, ryby, ale hlavným zdrojom vlákniny sú pekárenské výrobky (**Rosell et al., 2009**). Funkčné vlastnosti vlákniny závisia od zdroja, z ktorého sa pridáva, typu (rozpustná, nerozpustná) a stupňa spracovania výrobku. Najskôr sa pridávala vo forme vedľajších produktov mletia obilného zrna (**McKee a Latner, 2000**), ale čoraz častejšie sa využívajú aj ďalšie zdroje ako je ovocie a zelenina.

Dôležitosť potravinovej vlákniny v strave vedie stále k hľadaniu jej nových zdrojov (**Garau et al., 2007**).

Komerčne sú dostupné aj viaceré preparáty nerozpustnej vlákniny na báze celulózy, predovšetkým prášková a mikrokryštalická celulóza. Niektoré celulózové deriváty, ako napr. metylcelulóza slúžia zase ako zdroj rozpustnej vlákniny. Na trhu sú prítomné i výživové doplnky z hl'úz topinambura, ktoré slúžia ako zdroj inulínu (**Kováčiková et al., 2003**).

## LITERATÚRA

COLIN-HENRION, M., MEHINAGIC, E., RENARD, C. M. G. C., RICHOMME, P. 2009. From Apple to applesauce: Processing effects on dietary fibres and cell wall

polysaccharides, In *Food Chemistry*, vol. 117, 2009, no. 2, p. 254-260.

DE ESCALADA PLA, M. F., PONCE, N. M., STORTZ, C. A., GERSCHENSON, L. N., ROJAS, A. M. 2007. Composition and functional properties of enriched fiber products obtained from pumpkin (*Cucurbita moschata* Duchesne ex Poiret), In *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*, vol. 40, 2007, no. 7, p. 1176-1185.

ELLEUCH, M., BESBES, S., ROISEUX, O., BLECKER, Ch., DEROANNE, C., DRIRA, N. E., ATTIA, H. 2008. Date flesh: Chemical composition and characteristics of the dietary fibre, In *Food chemistry*, vol. 111, 2008, no. 3, p. 676-682.

FIGUEROLA, F., HURTADO, M. L., ESTEVEZ, A. M., CHIFFELLE, I., ASENJO, F. 2005. Fibre concentrates from Apple pomace and citrus peel as potential fibre sources for food enrichment, In *Food Chemistry*, vol. 91, 2005, no. 3, p. 395-401.

GARCIA, O. E., INFANTE, R. B., RIVERA, C. J. 1997. Determination of total, soluble and insoluble dietary fibre in two new varieties of *Phaseolus vulgaris* L. using chemical and enzymatic gravimetric methods, In *Food Chemistry*, vol. 59, 1997, no. 1, p. 171-174.

GRIGELMO – MIGUEL, N., GORINSTEIN, S., MARTÍN – BELLOSO, O. 1999. Characterisation of peach dietary fibre concentrate as a food ingredient, In *Food Chemistry*, vol. 65, no. 2, p. 175-181.

GRIGELMO-MIGUEL, N., MARTÍN-BELLOSO, O. 1999. Comparison of dietary fibre from by-products of processing fruits and greens and from cereals, In *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*, vol. 32, 1999, no. 8, p. 503-508.

GUILLO, F., CHAMP, M. 2000. Structural and physical properties of dietary fibres, and consequences of processing on human physiology, In *Food Research International*, vol. 33, 2000, no. 3-4, p. 233-245.

CHANTARO, P., DEVAHASTIN, S., CHIEWCHAN, N. 2008. Production of antioxidant high dietary fiber powder from carrot peels, In *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*, vol. 41, 2008, no. 10, p. 1987-1994.

KAACK, K., PEDERSEN, L., LAERKE, H. N., MESER, A. 2006. New potato fibre for improvement of texture and colour of wheat bread, In *European Food Research and Technology*, vol. 224, 2006, no. 2, p. 199-207.

KOHAJDOVÁ, Z., KAROVIČOVÁ, J., ŠIMKOVÁ, S. 2009. Use of Apple fibre in bakery products, In *Acta fytotechnica et zootechnica*, vol. 12, 2009, Special issue., p. 286-290.

KOVÁČIKOVÁ, E., VOJTAŠÁKOVÁ, A., MOSNÁČKOVÁ, J., PASTOROVÁ, J., HOLČÍKOVÁ, K., SIMONOVÁ, E., KOŠICKÁ, M. 2003. *Vláknina v potravinách*, Bratislava: NOI, 2003, p. 30, ISBN 80-89088-27-9.

LAUFENBERG, G., KUNZ, B., NYSTROEM, M. 2003. Transformation of vegetable waste into value added products: (A) the upgrading concept; (B) practical implementations, In *Bioresource Technology*, vol. 87, 2003, no. 2, p.167-198.

LECUMBERRI, E., MATEOS, R., IZQUIERDO-PULIDO, M., RUPÉREZ, P., GOYA, L., BRAVO, L. 2007. Dietary fibre composition, antioxidant capacity and physico-chemical properties of a fibre-rich product from cocoa (*Theobroma cacao* L.), In *Food Chemistry*, vol. 104, 2007, no. 3, p. 948-954.

MARÍN, F., R., SOLER-RIVAS, C., BENEVENTE-GARCÍA, O., CASTILLO, J., PÉREZ-ALVAREZ, J., A. 2007. By-products from diferent citrus processes as a source

- of customized functional fibres, In *Food Chemistry*, vol. 100, 2007, no. 2, p. 736-741.
- MASSIOT, P., RENARD, C. M. G. C. 1997. Composition, physico-chemical properties and enzymatic degradation of fibres prepared from defferent tissues of Apple. In *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*, vol. 30, 1997, no. 8, p. 800-806.
- McKEE, L. H., LATNER, T. A. 2000. Underutilized sources of dietary fiber: A review, In *Plant Foods for Human Nutrition*, vol. 55, 2000, no. 4, p. 285-304.
- ÖTLES, S., CAGINDI, Ö. 2006. Cereal based functional foods and nutraceuticals, In *Technologia alimentaria*, vol. 5, 2006, no. 1, p. 107-112.
- RAGHAVENDRA, S. N., RAMACHANDRA SWAMY, S. R., RASTOGI, N. K., RAGHAVARAO, K. S. M. S., KUMAR, S., THARANATHAN, R. N. 2006. Grinding characteristics and hydration properties of coconut residue: A source of dietary fiber, In *Journal of Food Engineering*, vol. 72, 2006, no. 3, p. 281-286.
- RAMULU, P., UDAYASEKHARA RAO, P. 2003. Total, insoluble and soluble dietary fiber contents of Indian Fruits, In *Plant Foods for Human Nutrition*, vol. 16, 2003 no. 6, p. 677-685.
- REDDY, N., YANG, Y. 2005. Boifibers from agricultural byproducts for industrial applications, In *Trends in Biotechnology*, vol. 23, 2005, no. 1, p. 22-27.
- ROBERTSON, J. A., DE MONREDON, F. D., DYSSSELER, P., GUILLON, F., AMADO, R., THIBAUT, J. F. 2000. Hydration properties of dietary fibre and resistant starch: a european collaborative study, In *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*, vol. 33, 2000, no. 2, p. 72-79.
- ROSELL, C. M., SANTOS, E., COLLAR, C. 2009. Physico-chemical properties of commercial fibres from different sources: A comparative approach, In *Food Research International*, vol. 42, 2009, no. 1, p. 176-184.
- SANGNARK, A., NOOMHORM, A. 2004. Chemical, physical and baking properties of dietary fiber prepared from rice straw, In *Food Research International*, 2004, vol. 37, 2004, no. 1, p. 66-74.
- SCHIEBER, A., STINTZING, F. C., CARLE, R. 2001. By-products of plant food processing as a source of functional compounds – recent developments, In *Trends in Food Science & Technology*, vol. 4, 2001, no. 12, p. 401-413.
- SOUKOULIS, CH., LEBESI, D., TZIA, C. 2009. Enrichment of ice cream with dietary fibre: Effects on rheological properties, ice crystallisation and glass transition phenomena, In *Food Chemistry*, vol. 115, no. 2, p. 665- 671.
- SOWBHAGYA, H. B., FLORENCE SUMA, P., MAHADEVAMMA, S., THARANATHAN, R. N. 2007. Spent residue from cumin – a potential source of dietary fiber, In *Food chemistry*, vol. 104, 2007, no. 3, p. 1220-1225.
- SUDHA, M., L., BASKARAN, V., LEELAVATHI, K. 2007. Apple pomace as a source of dietary fiber and polyphenols and its effect on the rheological characteristics and cake making, In *Food Chemistry*, vol. 104, 2007, no. 2, p. 686-692.
- THEBAUDIN, J. Y., LEFEBVRE, A. C., HARRINGTON, M., BOURGEOIS, C. M. 1997. Dietary fibres: Nutritional and technological interest, In *Trends in Food Science & Technology*, vol. 8, 1997, no. 2, p. 41-48.
- TOSH, S. M., YADA, S. 2010. Dietary fibres in pulse seeds and fractions: Characterization, functional attributes, and applications. In *Food Research International*, vol. 43, 2010, no. 2, p. 450-460
- TUROWSKI, M., DESHMUKH, B., HARFMANN, R., CONKLIN, J., LYNCH, S. 2007. A method for determination of soluble dietary fiber in methylcellulose and hydroxypropyl methylcellulose food gums, 2007, In *Journal of Food Composition and Analysis*, vol. 20, no. 5, p. 420-429
- VERGARA-VALENCIA, N., GRANADOS-PÉREZ, E., AGAMA-ACEVEDO, E., TOVAR, J., RUALES, J., BELLO-PÉREZ, L. A. 2007. Fibre concentrate from mango fruit: Characterization, associated antioxidant capacity and application as a bakery product, In *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*, vol. 40, 2007, no. 4, p. 722-729.
- Vestník MP SR (2002): Výnos MP SR z 24 júna 2002 č. 1519/2002-100 o ustanovení rozsahu výživového tvrdenia, spôsobe uvádzania výživovej hodnoty potravín a spôsobe jej výpočtu. roč. 34, 2002, čiastka 14: 74.
- ZHU, K., HUANG, S., PENG, W., QIAN, H., ZHOU, H. 2010. Effect of ultrafine grinding on hydration and antioxidant properties of wheat bran dietary fiber. In *Food Research International*, vol. 43, 2010, no. 4, p. 943-948.

#### Acknowledgments:

This work was supported by grant VEGA no. 1/0570/08.

#### Contact address:

Ing. Michaela Jurasová, PhD., Institute of Biotechnology and Food Technology, Department of Food Technology, Faculty of Chemical and Food Technology, Slovak University of Technology, Radlinského 9, 812 37 Bratislava, Slovakia, E-mail: michaela.jurasova@stuba.sk

Ing. Zlatica Kohajdová, PhD., Institute of Biotechnology and Food Technology, Department of Food Technology, Faculty of Chemical and Food Technology, Slovak University of Technology, Radlinského 9, 812 37 Bratislava, Slovakia, E-mail: zlatica.kohajdova@stuba.sk

doc. Ing. Jolana Karovičová, PhD., Institute of Biotechnology and Food Technology, Department of Food Technology, Faculty of Chemical and Food Technology, Slovak University of Technology, Radlinského 9, 812 37 Bratislava, Slovakia, E-mail: jolana.karovicova@stuba.sk

# POTENTIAL OF CEREALS AND PSEUDOCEREALS FOR LACTIC ACID FERMENTATIONS

*Monika Kocková, Lubomír Valík*

## ABSTRACT

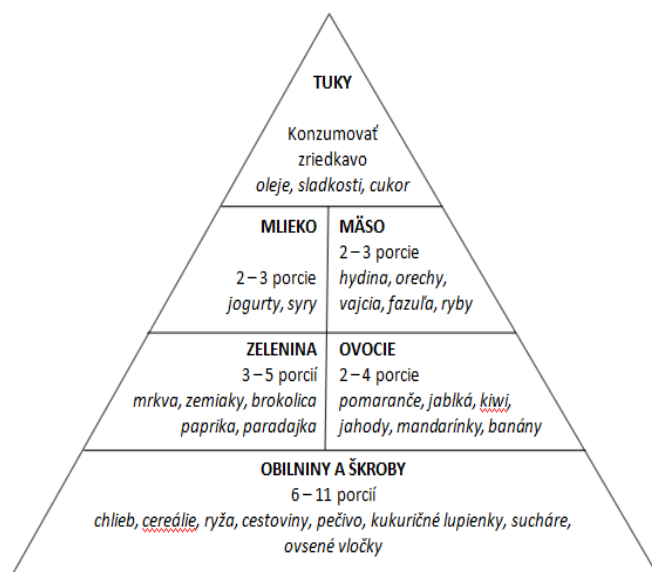
Cereals and pseudocereals has a significant role in human nutrition. They are source of specific carbohydrates, proteins, lipids, fibre and wide spectrum of vitamins and minerals. Moreover, pseudocereals have a higher content of essential amino acids, e.g. lysine and tryptophan. Cereals and pseudocereals may also contain some antinutrition factors, such as phytic acid, polyphenols, trypsin inhibitors and inhibitors of  $\alpha$ -amylase. These are responsible for reducing of protein and carbohydrate digestibility and decreasing accessibility of minerals due to complex formation. This review assesses the applications of cereals and pseudocereals in fermentation technology including the effects of lactic acid bacteria on nutrition, sensory quality and shelf-life. This work is focusing also on fermentation process of cereal matrice leading in degradation of antinutritional factors increase of nutritional value and availability of minerals, proteins and carbohydrates. Lactic acid bacteria produce many aromatic compounds that are beneficial to organoleptic attributes of the products. However, a few questions have been not answered in experiments, yet. For example, is there any space for evaluation of their suitability to act as carriers of probiotics? Could such the attempts lead in development some special formulae suitable for consumers with food allergies or deficiencies?

**Keywords:** cereal, pseudocereal, lactic acid bacteria, probiotic bacteria, fermentation

## ÚVOD

Prevažnú časť ľudskej stravy historicky tvorili potraviny rastlinného pôvodu. Najdôležitejšou a základnou potravinou, ktorá je v prirodzenom stave zdrojom sacharidov, ale dodáva nám aj vysokohodnotné proteíny, vitamíny, minerálne látky i dôležitú vlákninu, sú aj v súčasnosti. Ich pravidelnou konzumáciou je možné prispieť k zníženiu rizika takých civilizačných ochorení, ako napríklad, kardiovaskulárnych, príp. rakoviny hrubého čreva alebo zmiernovať priebeh a dôsledky *diabetes melitus* (Fletcher, 2004).

Nutričná hodnota akýchkoľvek plodín je daná kvalitou a kvantitou proteínov, škrobu a lipidov prítomných v tkanivách zŕn (embryo, endosperm, osemenie). Zloženie zŕn je ovplyvnené podmienkami rastu, spôsobom uskladnenia a spracovania a obsahom antinutričných faktorov.



**Obrázok 1** Potravinová pyramída zdravej výživy (prevzaté z: [http://en.wikipedia.org/wiki/File:USDA\\_Food\\_Pyramid.gif](http://en.wikipedia.org/wiki/File:USDA_Food_Pyramid.gif))

Cereálie a pseudocereálie a výrobky z nich tvoria základ potravinovej pyramídy (Obrázok 1). V rámci konceptu zdravej výživy sú v nej podľa vlastností, rôznosti obsahu živín, a tým aj podľa odporúčanej frekvencie konzumácie rozdelené zložky potravy do príslušných skupín (USDA, 2000).

V ostatnom období sa objavili aj ďalšie koncepty optimálneho zloženia ľudskej potravy. Americký národný inštitút srdca, pľúc a krvi (The US National Heart, Lung, and Blood Institute) vyšiel s novým konceptom rozdelenia potravín s rôznou energetickou hodnotou zameraným na ich lepšiu rozlíšiteľnosť deťmi. Potraviny sú rozdelené do troch skupín („Go“, „Slow“ a „Whoa“) na základe obsahu tuku, prídavných cukrov a kalorickej hodnoty. Potravinová a nutričná databáza diétnych štúdií (Food and Nutriene Database for Dietary Studies) rozdelila potraviny podľa 9 odporúčaných nutričov (vláknina, vitamíny A, C a E, vápnik, železo, horčík, draslík) a troch, ktorých príjem by mal byť obmedzený (nasýtené tuky, prídavné cukry a sodík). Z cereálnych potravín podľa týchto kritérií boli do skupiny „Go“ (môžu byť konzumované takmer kedykoľvek) zaradené celozrnný chlieb, celozrnné cestoviny, hnedá ryža a nesladené celozrnné raňajkové cereálie. Do skupiny „Slow“ patrí, napríklad, biely chlieb, ryža a cestoviny, francúzsky toast, kukuričný chlieb, sušienky a palacinky. Do kategórie „Whoa“ boli zaradené croassanty, muffiny, šišky, sladké pečivo, sušienky s obsahom trans-nenasýtených mastných kyselín a sladené raňajkové cereálie (US Department of Health and Human Services, National Heart Lung and Blood Institute; Drewnowski, Fulgoni, 2011).

Svetová produkcia všetkých cereálií predstavuje priemerne 2 miliardy ton ročne, čo reprezentuje približne 700 g cereálií na osobu a deň. Z ekonomickeho hľadiska sú najdôležitejšími obilninami pšenica, jačmeň, ovos, raž, ryža, kukurica, cirok a proso (Wrigley, 2004).

Produkcia pseudocereálií je nižšia, a to asi 485 miliónov ton ročne. Ich konzumácia je nedostatočná,

spotrebiteľskou verejnosťou podceňovaná. Amarant, pohánka a mrlík sú najznámejšími pseudocereáliami.

## CHEMICKÉ ZLOŽENIE CEREÁLIÍ A PSEUDOCEREÁLIÍ NUTRIČNÉ ZLOŽKY

Cereálie a pseudocereálie sú zdrojom makroživín – sacharidy, proteíny, lipidy a mikroživín – vitamíny a minerálne prvky. Priemerné zloženie zŕn vybraných cereálií a pseudocereálií je zhrnuté v tabuľke 1.

Sacharidy sú kvantitatívne najdôležitejšou zložkou týchto plodín, tvoria dve tretiny až tri štvrtiny sušiny. Sú klasifikované na základe ich chemickej štruktúry a stráviteľnosti. Z monosacharidov sú v zrnách najčastejšie zastúpené hexózy (fruktóza, glukóza a galaktóza) a pentózy (arabínóza a xylóza). Sacharóza a maltóza sú bežne sa vyskytujúce disacharidy cereálnych zŕn. Polysacharidy sú polyméry pozostávajúce z viac ako 20 monosacharidových jednotiek. V zrnách sa vyskytujú najmä škrob, celulóza a xylány (Navhrus, Sorghaug, 2006; Chibbar et al., 2004).

Celkový obsah mono-, di- a oligosacharidov v cereáliách a pseudoceráliách varíruje od 1 do 3 % (Chibbar et al., 2004). Najviac zastúpeným sacharidom v zrnách je škrob. Skladá sa z amylopektínu a amylozy. Ich pomer je závislý od druhu obilniny a jej odrody. Cereálie a pseudocereálie ďalej obsahujú malé množstvá rozpustných cukrov (glukóza, fruktóza, sacharóza, maltóza). Obalové vrstvy zŕn

sú bohatým zdrojom vlákniny, najmä nerozpustnej (celulóza, nerozpustná hemicelulóza). Dobrým zdrojom rozpustnej vlákniny (pentózany,  $\beta$ -glukány a rozpustná hemicelulóza) sú najmä ovos, jačmeň a raž (Topping, 2007). Mnohé z poly- alebo oligo-sacharidov vykazujú prebiotické vlastnosti.

Cereálie v ľudskej výžive patria tiež k hlavným zdrojom proteínov. Prijímame ich nielen priamo vo forme rôznych cereálnych výrobkov, ale niektorí autori k tomu priradujú aj ich nepriamu úlohu pri získavaní ostatných potravín živočíšneho pôvodu (Bekes, Wrigley, 2004).

Kvalita proteínov je daná zložením aminokyselín (podielom esenciálnych aminokyselín) a ich stráviteľnosťou. Cereálne proteíny sú dobrým zdrojom väčšiny esenciálnych aminokyselín (tabuľka 2), okrem lyzínu a tryptofánu, ktorých obsah je v cereáliách nižší v porovnaní so živočíšnymi proteínmi. Proteínové zloženie jednotlivých cereálií a pseudocerálií je rozdielne, pričom

odráža taxonomickú príbuznosť medzi nimi (Serna Saldívar, 2003; Bekes, Wrigley, 2004).

Obsah proteínov v pseudocereáliách je všeobecne vyšší v porovnaní s cereálnymi zrnami, s dobre vyváženým obsahom aminokyselín (tabuľka 2) a vyšším obsahom esenciálnych aminokyselín, najmä lyzínu. Navyše, dostupnosť proteínov v pseudoobilninách je vyššia (Alvarez-Jubete et al., 2010).

Niektoré obilniny obsahujú celiakálne aktívne polypeptidy, ktoré u citlivých jedincov vyvolávajú alergické reakcie. Ide o bielkoviny s molekulovou hmotnosťou 5 - 100 kDa, vyznačujú sa nízkou stráviteľnosťou a nízkym zastúpením esenciálnych aminokyselín. Celiakálne aktívne zložky sa nachádzajú v prolaminovej frakcii. Ak sa obsah prolaminových bielkovín pohybuje v množstve 4-8 %, príslušné produkty je možné považovať za vhodné pre diету pri celiakii (Michalík et al., 2006). Obsah prolaminov v troch druhoch cereálií a v piatich druhoch pseudocereálií a v strukovine analyzovali Gálová et al. (2011). Autori potvrdili, že amarant, pohánka, proso a cicer požiadavkám pre výrobu bezlepkových potravín vyhovovali, nakoľko obsah prolaminov v nich bol nižší ako 5 %. Podobne všetky testované pseudocereálie splnili ďalšie kritérium, obsah gluténu < 200 mg.kg<sup>-1</sup> (Výnos MP SR z roku 2004). Prirodzene pšenica, raž a jačmeň tomuto kritériu nemohli vyhovieť. (Pozn.: vo Výnose MP SR 16826/2007-OL z roku 2007, ktorý nahradil Výnos 608/2/2004, sa kritérium na obsah gluténu nenachádza). Podľa Nariadenia Komisie ES 41/2009 sa však za bezgluténové potraviny môžu označovať iba také, v ktorých je obsah gluténu 10-krát prísnejší, nižší ako 20 mg.kg<sup>-1</sup>.

Stráviteľnosť proteínov sa pohybuje v rozmedzí od 80 do 90 % a zvyšuje sa mletím, lúpaním, fermentáciou a klíčením. Nižšia stráviteľnosť proteínov cereálií a pseudocerálií v porovnaní so živočíšnymi proteínmi je zapríčinená kyselinou fytoovou, tanínmi a polyfenolmi, ktoré viažu proteíny do nerozpustných komplexov (Charalampopoulos, 2002; Serna Saldívar, 2003).

Lipidy sú minoritnou zložkou cereálnych zŕn, sú však bohaté na esenciálne mastné kyseliny a neobsahujú takmer žiadne nasýtené mastné kyseliny. Obilniny obsahujú stopové množstvá fytoosterolov, bez prítomnosti cholesterolu (Serna Saldívar, 2003).

Najviac lipidov je obsiahnutých v klíčku. Pšenica, jačmeň, ryža, raž a cirok majú nižší obsah lipidov ako ostatné obilné plodiny. Všetky cereálne zrná majú vyšší obsah nepolárnych ako polárnych lipidov (Day, 2004).

Tabuľka 1 Priemerné zloženie vybraných cereálií a pseudocereálií (v g/100g zrna) (Valencia-Chamorro, 2004; Taylor, 2004; Cai et al., 2004a; Cai et al., 2004b)

	Proteíny	Lipidy	Vláknina	Popol	Sacharidy
<b>Pšenica</b> (lat. <i>Triticum</i> )	14,3	2,3	2,8	2,2	78,4
<b>Raž</b> (lat. <i>Secale</i> )	13,4	1,8	2,6	2,1	80,1
<b>Jačmeň</b> (lat. <i>Hordeum</i> )	10,8	1,9	4,4	2,2	80,7
<b>Proso</b> (lat. <i>Panicum</i> )	14,5	5,1	8,5	2,0	71,6
<b>Ovos</b> (lat. <i>Avena</i> )	11,6	5,2	10,4	2,9	69,8
<b>Amarant</b> (lat. <i>Amaranthus</i> )	16,6	7,2	4,1	3,3	59,2
<b>Pohánka</b> (lat. <i>Fagopyrum</i> )	12,3	2,3	10,1	2,3	66,0
<b>Mrlík</b> (lat. <i>Chenopodium</i> )	16,5	6,3	3,8	3,8	69

**Tabuľka 2** Obsah esenciálnych aminokyselín vo vybraných cereáliách a pseudocereáliách (Serna Saldívar, 2003; Cai et al., 2004a; Cai et al., 2004b; Valencia-Chamorro, 2003)

Aminokyselina (g/100g proteínov)	Pšenica	Raž	Jačmeň	Proso	Ovos	Amarant	Pohánka <sup>a</sup>	Mrlík
Fenylalanín	4,6	5	5,2	5,2	5,4	4,5	0,57	6,9 <sup>b</sup>
Histidín	2	2,4	2,1	2,2	2,4	-	0,26	3,2
Izoleucín	3	3,7	3,6	4,4	4,2	4,1	0,46	4,9
Leucín	6,3	6,4	6,6	11	7,5	6,3	0,77	6,6
Lyzín	2,3	3,5	3,5	2,9	4,2	6,4	0,66	6,0
Metionín	1,2	1,6	2,2	2	2,3	3,3	0,17	5,3 <sup>c</sup>
Treonín	2,4	3,1	3,2	3,9	3,3	4,3	0,44	3,7
Tryptofán	1,5	0,8	1,5	2,3	-	4,0	0,12	0,9
Valín	3,6	4,9	5	5,7	5,8	4,7	0,58	4,5

a – vyjadrené v %/sušinu

b – fenylalanín + tyrozín

c – metionín + cysteín

**Tabuľka 3** Priemerné zloženie minerálnych prvkov a vitamínov skupiny B vybraných cereálií a pseudocereálií (mg/100g zrna, vitamín B9 v µg/100g zrna) (Schakel, S.F. et al., 2004)

Plodina	K	Na	Ca	Fe	P	Zn	Cu	Mg	B1	B2	B3	B9	B5	B6
Jačmeň	280	9	29	2,51	220	2,13	0,42	80	0,19	0,11	4,60	22	0,28	0,26
Proso	196	4	9	3,00	284	1,69	0,76	113	0,42	0,29	4,72	84	0,85	0,38
Ovos	502	4	51	4,80	653	2,76	0,36	209	1,04	0,20	0,83	47	1,32	0,14
Raž	264	7	33	2,67	373	3,73	0,44	120	0,32	0,25	4,27	60	1,46	0,29
Cirok	351	7	29	4,40	287	1,40	0,64	131	0,24	0,14	2,93	84	1,25	0,17
Pšenica	431	2	31	4,56	356	3,33	0,36	93	0,39	0,11	4,38	38	0,95	0,37
Pohánka	284	9	16	2,20	284	2,16	0,56	196	0,20	0,24	4,57	38	1,09	0,31
Amarant	367	20	153	7,60	456	3,18	0,78	267	0,08	0,21	1,29	49	1,05	0,22
Mrlík	740	20	60	9,24	411	3,31	0,82	211	0,20	0,40	2,93	49	1,05	0,22

Lipidy pseudocerálií sú charakteristické vysokým obsahom nenasýtených mastných kyselín, najmä kyseliny linolovej (približne 50 % zo všetkých mastných kyselín v amarante a 35 % v pohánke) (Alvarez-Jubete et al., 2010; Bonafaccia et al., 2003).

Perikarb, klíček a aleurónová vrstva cereálnych zŕn sú bohaté na vitamíny a minerálne látky. Všeobecne môžeme obilniny považovať za zdroj vitamínov skupiny B. V obalových vrstvách sa vyskytujú najmä vitamíny B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> a B<sub>6</sub>. Pšenica a jačmeň obsahujú aj vyššie množstvá kyseliny nikotínovej a nikotiamidu. V klíčkoch sa v značnom množstve vyskytuje aj vitamín E. Minerálne látky sa súhrnne označujú ako popol, anorganický zvyšok po spálení rastlinného materiálu. Obsah popola v celých zrnách sa pohybuje v rozmedzí od 1,25 do 2,5 %. Celé zrná poskytujú minerálne ako vápnik, draslík, horčík, železo, zinok, meď, fosfor, ktorých obsah sa však znižuje lúpaním a mletím (Serna Saldívar, 2003; Poutanen et al., 2009).

Pseudocereálie sú tiež významným zdrojom vitamínov a minerálnych látok. Amarant je dobrým zdrojom riboflavínu, pohánka okrem toho aj tiamínu a pyridoxínu. Navyše sú výborným zdrojom vitamínu E (Alvarez-Jubete et al., 2010). Obsah vitamínov a minerálnych látok vybraných cereálií a pseudocereálií je zhrnutý v tabuľke 3. Z nutričného hľadiska je dôležitý aj obsah fenolických látok, ktoré vznikajú v zrnách ako sekundárne metabolity. Delia sa na dve skupiny: hydrolyzovateľné taníny (estery kyseliny galovej a glukózy, resp. iných cukrov) a fenylypropanoidy (ligníny, flavonoidy a kondenzované taníny, prekursorom je L-fenylalanín). Záujem o tieto látky vzrástol v ostatných desaťročiach, najmä v súvislosti s prevenciou obezity, kardiovaskulárnych ochorení,

cukrovky a rakoviny. Podľa viacerých autorov najviac preskúmané sú flavonoidy, ktoré vykazujú tzv. antioxidačnú aktivitu, schopnosť zhášať voľné radikály v in-vitro podmienkach. Mikulajová et al. (2007) sledovali antioxidačnú aktivitu a celkový obsah fenolových zlúčenín v 20 genotypoch ovsu, 13 genotypoch pšenice,

6 genotypoch jačmeňa a 2 genotypoch pohánky. Podľa ich výsledkov, najvyššiu antioxidačnú aktivitu (DPPH test, ABTS test a EPR/ spintrapping test) a najvyšší obsah fenolových zlúčenín (stanovených na základe reakcie s Folin-Ciocalteuvým činidlom) vykazovali vzorky pohánky. Antioxidačnú aktivitu a obsah polyfenolov ovsu sledovali aj Brindzová et al. (2008). Zistili, že najvyšší obsah celkových polyfenolov z deviatich kultivarov ovsu bol v kultivaroch s čiernou šupkou. Mikušová et al. (2008) stanovovali celkový obsah fenolických zlúčenín v jačmeni, amarante, mrlíku, pohánke a ciroku, pričom najvyšší obsah celkových fenolov v prepočte na kyselinu galovú zistili vo vzorke prosa (*Echinochloa frumentacea L.*), čo sa odrazilo aj na stanovení celkovej antioxidačnej aktivity, ktorá bola pomocou ABTS testu zistená najvyššia práve v prose. Podobné výsledky dosiahli Brindzová et al. (2009), ktorí zistili, že okrem prosa vykazuje vysokú antioxidačnú aktivitu a vysoký obsah celkových polyfenolov aj pohánka a jačmeň (z 20 kultivarov 4 cereálií a 16 kultivarov 6 pseudocereálií).

Mnohé polyfenoly vykazujú aj antimikrobiálnu aktivitu. Významným zdrojom týchto fytochemikálií sú najmä pseudocereálie, čo dokázali aj Mošovská et al. (2010) sledovaním antimikrobiálnej aktivity extraktov amarantu, pohánky a prosa voči gramnegatívnym a grampozitívnym

baktériám. Najvýraznejšia inhibícia bola zaznamenaná voči *Salmonella typhimurium*.

Dôležitou súčasťou cereálií a pseudocereálií sú polysacharidy a oligosacharidy s prebiotickými vlastnosťami. Tieto nie sú strávené v horných častiach tráviacej sústavy človeka. V zažívacom systéme stimulujú rast probiotickej črevnej mikroflóry, ktorá preventívne nepôsobí len lokálne, ale v konečnom dôsledku pozitívne pôsobí na zdravie hostiteľa (Manning, Gibson, 2004; Charalampopoulos et al., 2002). Z pomedzi prebiotík najväčšie zastúpenie v cereáliách a pseudocereáliách vykazujú škrob, vláknina a oligosacharidy (Rivera-Espinoza, Gallardo-Navarro, 2010).

De Souza Oliveira et al. (2011) hodnotili vplyv inulínu (rozpuštná vláknina) na rast *Lb. acidophilus*, *Lb. rhamnosus*, *Lb. bulgaricus* and *B. lactis*, ktoré boli spoločne kultivované so *S. termophilus* v mlieku. Potvrdili skutočnosť, že prídavok inulínu skrátil generačný čas (zvýšil rýchlosť rastu) testovaných baktérií mliečného kysnutia.

Su et al. (2007) sledovali vplyv niekoľkých komerčných prebiotických preparátov (fruktoooligosacharidy, inulín, arabinogalaktán, sójové oligosacharidy,  $\beta$ -glukán a pentahydrát D(+)-rafinózy) na rast troch probiotických kultúr *Lb. acidophilus* LAFTI L10, *B. animalis lactis* LAFTI B94 and *Lb. casei* LAFTI L26. Autori zistili, že všetky tri kmene boli schopné utilizovať tieto komerčné prípravky sacharidov.

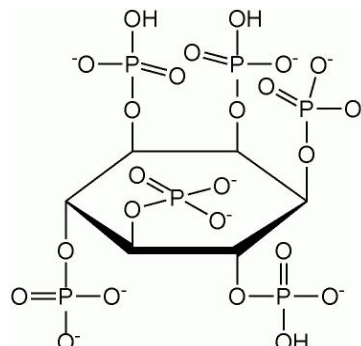
Vplyv fruktánov na rast a metabolickú aktivitu bifidobaktérií (*B. angulatum*, *B. adolescentis*, *B. longum*, *B. pseudolongum*, *B. bifidum*, *B. catenulatum*, *B. pseudocatenulatum*, *B. globosum* and *B. animalis*) hodnotili Bielecka et al. (2002). Dokázali, že väčšina bifidobaktérií utilizovala fruktány, pričom súčasnú stimuláciu rastu zaznamenali u najviac u *B. longum* a *B. animalis*. Začlenenie oligofruktánov do stravy spôsobilo zvýšenie počtu fekálnych bifidobaktérií u potkanov o 1,6 logaritmickeho poriadku v porovnaní s kontrolou (glukóza). Avšak symbiotické podanie probiotík s prebiotikami spôsobilo zvýšenie iba o 1,4 logaritmickeho poriadku bifidobaktérií v ich stolici. Aj Banuelos et al. (2008) preukázali pozitívny vplyv fruktánov na rast probiotických kmeňov, konkrétne *Lb. gasseri* CECT5714 a *Lb. fermentum* CECT5716.

## ANTINUTRIČNÉ ZLOŽKY

Okrem množstva významných nutričných látok obilniny a pseudoobilniny obsahujú aj látky antinutričné. Sú to zložky potravy, ktoré majú negatívny vplyv na výživu organizmu tým, že zhoršujú využiteľnosť živín, alebo ich rozkladajú či inak menia. Patria medzi ne najmä kyselina fytová, niektoré polyfenoly, trypsinové inhibítory a inhibítory amylázy, ktoré znižujú stráviteľnosť proteínov a sacharidov a dostupnosť minerálnych prvkov.

Významným antinutričným faktorom je najmä kyselina fytová (alebo myoinozitolhexafosfát, obrázok 2), ktorá sa vyskytuje vo všetkých cereáliách a pseudocereáliách, najmä v aleurónovej vrstve. Je to vysokofosforylovaná, negatívne nabitá molekula, ktorá je schopná viazať zinok, železo, vápnik a iné dvojmočné kationy a proteíny, čím zabraňuje ich absorpcii a znižuje ich dostupnosť (Zotta et al., 2007; García-Esteva et al., 1999; Febles, 2001; Svandberg, Lorri, 1997).

Priemerný obsah kyseliny fytovej v obilnách (vyjadrené v mg na g sušiny) je pre ovos v rozmedzí 12,4–29,6, pre kukuricu 12,5 až 14,2, 1,4 až 2,9 pre ryžu a 5,6 až 9,8 pre cirok. V pšenici sa nachádza približne 3,6 až 4,4 mg/g sušiny, v jačmeni 6,1 až 6,5, v prose 10,4 až 10,8 a v raži 4,3 až 4,8. Vysoký obsah je aj v pseudoobilninách, a to 12,6 až 14,3 mg na g sušiny pre amarant a 10,3 až 14,1 pre pohánku (Konietzny, Greiner, 2003; García-Esteva et al., 1999).



Obrázok 2 Kyselina fytová

Ďalším antinutričným faktorom sú niektoré polyfenoly. Antinutričné vlastnosti vykazujú najmä taníny, ktoré viažu proteíny, tvoria s nimi hydrofilné alebo hydrofóbne komplexy, čím znižujú ich stráviteľnosť a inhibujú absorpciu minerálnych prvkov, napr. železa. Taníny sa vyskytujú najmä v ciroku. (Serna Saldívar, 2003; Swanson, 2003; Svandberg, Lorri, 1997; Wikipedia, 2011a).

Obsah polyfenolov v cereáliách a pseudocereáliách závisí od druhu plodiny a od stupňa vymletia. Polyfenoly sa môžu vyskytovať ako voľné alebo esterifikované, prípadne viazané na zložky bunkovej steny ako sú polysacharidy, proteíny alebo lignín. V obilných zrnách sa vyskytujú najmä kyselina hydroxyškoricová, galová, ferulová a kumárová. Množstvo stanovených polyfenolov závisí od použitej extrakčnej metódy, pretože napr. pri kyslej hydrolýze dochádza k degradácii kyseliny benzoovej (Arranz, Calixto, 2010). Medzi fenolickými zlúčeninami sú najmä kyselina galová a katecholová známe svojou schopnosťou viazať železo (Towo et al, 2006).

V cereáliách a pseudocereáliách boli identifikované aj ďalšie antinutričné pôsobiace látky, a to trypsinové inhibítory a inhibítory  $\alpha$ -amylázy. Trypsinové inhibítory inhibujú aktivitu dvoch enzýmov: trypsinu a chymotrypsínu, indukujú hypersekreciu pankreatických enzýmov a stimulujú pankreatickú hypertrofiu (zväčšenie pankreasu v dôsledku zväčšenia buniek) a znižujú absorpciu a trávenie proteínov zo stravy (Olli et al., 1994; Pisulewska, Pisulenski, 2000).

Enzým  $\alpha$ -amyláza zohráva dôležitú úlohu v metabolizme škrobu prostredníctvom štiepenia glykozidickej väzby. Medzi inhibítory amylázy patria kovové chelátory, kyselina citrónová a šťavelová a ťažké kovy, ako ortuť a olovo. Inhibítory  $\alpha$ -amylázy špecificky inhibujú syntézu izoenzýmu, pričom ich biologická úloha v plodinách je nejasná (Muralikrishna, Nirmala, 2005; Nielsen et al., 2004). Sú zodpovedné za inhibíciu slinnej a pankreatickej  $\alpha$ -amylázy, čím negatívne ovplyvňujú trávenie škrobu a iných polysacharidov prijímaných stravou (Feng et al., 1996).



## VYUŽITIE BAKTÉRIÍ MLIČNEHO KYSNUTIA PRE CEREÁLNE FERMENTÁCIE

Skupina baktérií mliečného kysnutia (BMK) zahŕňa grampozitívne fakultatívne anaeróbne (mikroaerofilné) acidotolerantné nespórotvorné kokovité a paličkovité baktérie, ktoré majú podobné fyziologické a metabolické vlastnosti. Ich hlavným produktom pri fermentácii využiteľných sacharidov je kyselina mliečna. Do tejto nesytematickej skupiny baktérií patria rody: *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, ako aj menej alebo špecificky sa vyskytujúce rody *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Oenococcus*, *Sporolactobacillus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*, a *Weissella*. V minulosti boli do tejto skupiny priradované aj koryneformné bifidobaktérie. V súčasnosti táto skupina obsahuje celkom 16 rodov, z ktorých 12 je priamo spojených s potravinami (Görner, Valík, 2004; Narvhus, Axelsson, 2003).

História výroby fermentovaných potravín siaha až do čias starovekého Egypta, kedy bol proces výroby veľmi jednoduchý, bez uvedomovania si prítomnosti a úlohy mikroorganizmov v ňom. Až koncom 19. storočia sa začali vyvíjať kyslé kultúry, ktorými sa zabezpečila stabilita technologického procesu a rozvoj výroby fermentovaných potravín. Dlhou históriou ich využívania s antagonistickým účinkom voči nežiaducim kontaminantom si tieto baktérie vydobyli výsostné postavenie v potravinárstve. Ich aplikácie sa považujú za všeobecne bezpečné a navyše ich čisté kultúry využívané v praxi musia vlastniť certifikát GRAS (angl. generally regarded as safe).

Fermentácia cereálií a pseudocereálií mliečnymi baktériami je známa už od antických čias. Medzi tradičné fermentované cereálne produkty patrí chlieb, ovsená kaša a nápoje (alkoholické aj nealkoholické), ktoré sú rozšírené najmä v Ázii a Afrike (Helland et al., 2004; Charalampopoulos et al., 2002). Obilie, najmä pšenica a raž, sa v západných krajinách využívali najčastejšie, napríklad, pri výrobe kvásku, na zlepšenie kvality cesta, reologických vlastností finálneho produktu a pod. (Charalampopoulos et al., 2002).

Podľa Hammesa et al. (2005) je fermentácia cereálií a pseudocereálií ovplyvňovaná najmä variabilitou vlastností týchto plodín a príslušných faktorov ich vnútorného ako aj vonkajšieho prostredia, medzi ktoré patria:

- obsah fermentovateľného substrátu, živín, rastových faktorov, minerálnych látok,
- aktivita vody,
- stupeň vymletia zŕn,
- teplota a dĺžka trvania fermentácie,
- amylolytická aktivita.

Kľúčovú úlohu hrá typ plodiny a jej chemické zloženie. Obsah fermentovateľných sacharidov v cereálnych substrátoch sa pohybuje v rozmedzí 0,5 až 3 %, čo je podľa viacerých autorov postačujúce. Hlavným sacharidom cereálií a pseudocereálií je sacharóza. Činnosťou  $\alpha$ -amyláz sa zo škrobu uvoľňuje maltóza, ktorá poskytuje ďalšie voľné cukry, ktoré môžu byť využité BMK. Výberom druhov BMK s vyššou amylolytickou aktivitou môžeme zvýšiť rýchlosť fermentácie ako aj tvorbu konečných produktov.

Prostredníctvom proteolytickej aktivity dochádza k uvoľneniu peptidov a aminokyselín, ktoré sú jednak

nutrične významné pre rast BMK a sú prekurzorom aromatických látok a látok s antimikrobiálnou aktivitou. Preto výber BMK s vyššou proteolytickou aktivitou nám optimalizuje podmienky fermentácie a zvyšuje sa produkcia látok podieľajúcich sa na tvorbe arómy.

Výroba fermentovaných potravín bola v minulosti založená na spontánnej fermentácii tzv. pôvodnou alebo autochtónnou mikroflórou nachádzajúcou sa v surovinách. Tento spôsob bol neskôr vylepšený prídávaním časti fermentovanej potraviny z predchádzajúcej dávky, čo bolo charakteristické pre výrobu chleba alebo syrov. V prvom prípade sa používala tzv. drobenka, v druhom kyslá srvátka. Koncentrovaná priemyselná výroba potravín sa v súčasnosti nezaobíde bez priemyselne pripravovaných špeciálnych kultúr. Tieto na jednej strane obsahujú vyššie počty buniek, skracujú proces fermentácie, a na druhej strane znižujú riziko zlyhania procesu, vrátane vzniku chýb vyplývajúcich z kontaminácie, ktoré by mohol personál pri príprave kultúr spôsobiť (Görner a Valík, 2004; Leroy, De Vuyst, 2004).

## METABOLIZMUS BMK A ZMENY ZLOŽENIA CEREÁLIÍ A PSEUDOCEREÁLIÍ POČAS FERMENTÁCIE

V dôsledku metabolickej aktivity BMK sa mení zloženie cereálnych a pseudocereálnych substrátov. Sacharidy, proteíny aj tuky podliehajú degradácii a sú zapájané do mnohých reakcií schématicky zosumarizovaných v obrázku 3. Jednoduché cukry sú priamo fermentovateľné a sú prekurzorom najmä organických kyselín. Pôsobením amyláz, enzýmov prítomných v cereáliách a pseudocereáliách a produkovaných aj BMK, sa štiepi škrob a to podľa aktivity až na konečný produkt – glukózu, ktorá je následne utilizovaná.

BMK majú slabú proteolytickú aktivitu a štiepia proteíny na aminokyseliny, ktoré sú významným prekurzorom aromatických aktívnych zlúčenín, ale aj látok s antimikrobiálnou aktivitou. Lipolytickou činnosťou BMK sa z lipidov uvoľňujú voľné masťné kyseliny, ktoré sa tak isto podieľajú na tvorbe arómy.

## METABOLIZMUS SACHARIDOV

Na základe utilizácie cukrov rozdeľujeme BMK do troch skupín: obligátne homofermentatívne, fakultatívne heterofermentatívne a obligátne heterofermentatívne

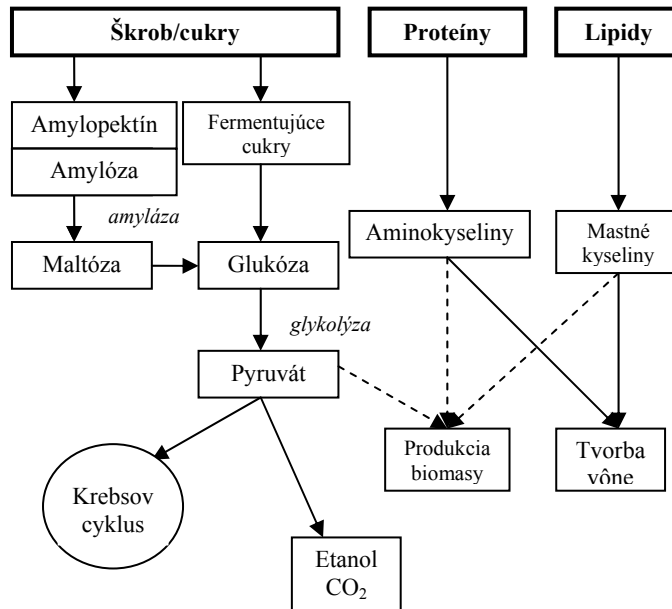
Homofermentatívne druhy (*Pediococcus*, *Streptococcus*, *Lactococcus* a niektoré druhy rodu *Lactobacillus*) tvoria viac ako 85 % kyseliny mliečnej z glukózy. Hexózy sú metabolizované enzýmami glykolytickej (Embden-Mayerhoffovej) cesty. Baktérie sfermentujú 1 mól glukózy na 2 móly pyruvátu, pričom energetický výnos predstavuje 2 móly ATP na molekulu glukózy.

Pyruvát je následne redukovaný na L- alebo D-kyselinu mliečnu enzýmom laktátdehydrogenáza (Hutkins, 2006). Schopnosť BMK produkovať L(+), D(-) izomér alebo ich zmes závisí od rodu a druhu BMK a môže sa využiť na ich klasifikáciu (De Angelis et al., 2007; Plessas et al., 2008). L(+)-laktát je produkovaný druhmi rodov *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Tetragenococcus*, *Streptococcus* a *Vagococcus*. D(-)-laktát tvoria druhy rodov *Leuconostoc* a *Oenococcus*. Rody *Lactobacillus*, *Pediococcus* a *Weissella* produkujú L(+)-, D(-)- and DL-izomér (Liu, 2003). Heterofermentatívne

baktérie r. *Weisella*, *Leuconostoc* a niektoré laktobacily produkujú iba 50 % kyseliny mliečnej z glukózy (Warburg-Dickensova cesta). Hexózy sú metabolizované prostredníctvom fosfoketolázovej cesty.

Z jedného mólu glukózy vzniká 1 mól kyseliny mliečnej, 1 mól etanolu a 1 mól CO<sub>2</sub> pri energetickej výťažnosti ekvivalentnej 1 mólu ATP (obrázok 4; **Hutkins, 2006**).

Väčšina druhov BMK fermentuje najmä maltózu, sacharózu, fruktózu a glukózu, ale aj monosacharidy z rastlinných polysacharidov arabinoxylánu a arabinogalaktánu. Pentózy ako arabinóza a xylóza sú obvyčajne utilizované obligátne heterofermentatívnymi, fakultatívne heterofermentatívnymi a len zriedkavo obligátne homofermentatívnymi druhmi BMK (**De Vuyst et al., 2009**).



**Obrázok 3** Biochemické zmeny sacharidov, proteínov a lipidov počas fermentácie (**Navrhus, Sørhaug, 2006**)

Kyselina mliečna môže byť baktériami mliečného kysnutia produkovaná z rôznych substrátov. Primárnym substrátom sú cukry (hexózy a pentózy), vznikajú však aj z takých substrátov ako polyoly (polyhydroxilované alkoholy – manitol, sorbitol), organické kyseliny (jablčná, citrónová) a aminokyseliny (serín, alanín, kyselina asparágová) (**Liu, 2003**).

Hlavným medziproduktom metabolizmu kyseliny pyrohrozovej je kyselina mliečna. V závislosti od enzymatického aparátu BMK z pyrohroznanu môžu vznikáť ďalšie metabolity, ako napr. kyselina octová, mravčia, etanol, acetaldehyd, diacetyl, acetoín a 2,3-butándiol (obrázok 5; **Liu, 2003**).

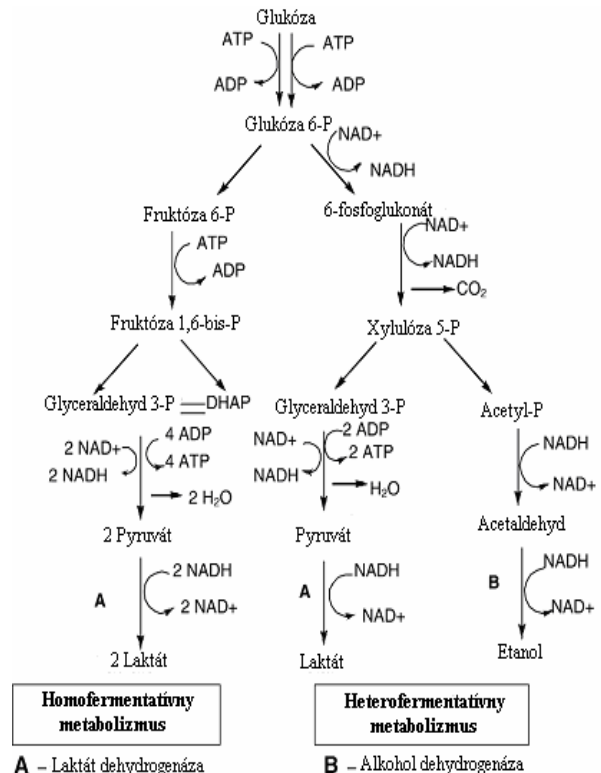
**METABOLIZMUS PROTEÍNOV**

BMK, rovnako ako mnoho iných baktérií, nie sú schopné asimilovať anorganický dusík, a preto v prostredí vyžadujú prítomnosť rastových faktorov, vrátane voľných aminokyselín. Pretože väčšina potravín ich obsahuje málo, BMK sa vyznačujú proteolytickými vlastnosťami. Proteolýzou vzniknuté malé peptidy a aminokyseliny sú už schopné transportovať cez bunkovú stenu (**Hutkins, 2006**).

Katabolizmom aminokyselín, deamináciou, dekarboxyláciou, transamináciou a zmenou postranného reťazca, vznikajú zlúčeniny, ktoré prispievajú k tvorbe arómy. Sú to najmä ketokyseliny, amoniak, amíny, aldehydy, kyseliny a alkoholy (**Gänzle et al., 2007; Gobetti et al., 2005**).

Špeciálnu pozornosť si zaslúži metabolizmus kyseliny glutámovej a glutamínu, pretože glutamín je v proteínoch pšenice zastúpený v najvyšších koncentráciách.

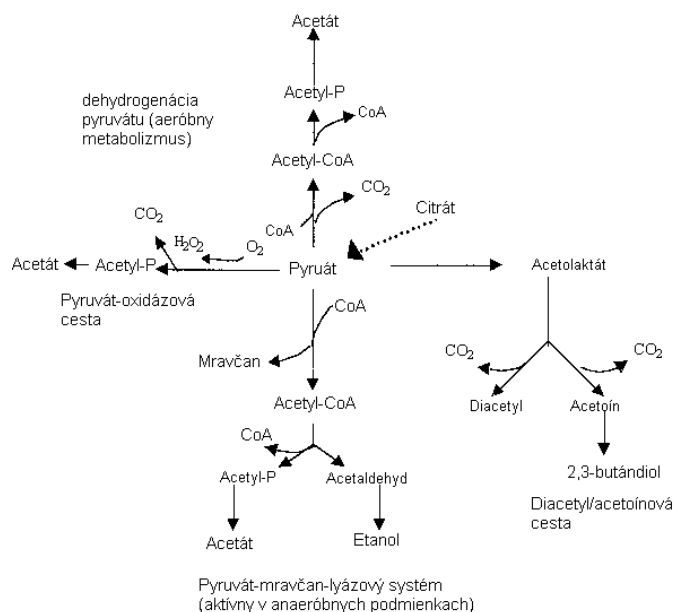
Transamináciou kyseliny glutámovej vzniká kyselina α-ketoglutarová, ktorá je dôležitým akceptorom amino skupiny v transaminačných reakciách ostatných aminokyselín (**Gänzle et al., 2007; Ferenčík et al., 2000**).



**Obrázok 4** Metabolizmus sacharidov baktérií mliečného kysnutia (**Reddy et al., 2008**)

Fenylalanín a tyrozín môžu byť činnosťou laktobacilov premenené na antifungálne zlúčeniny. Výsledkom metabolizmu fenylalanínu laktobacilmi *Lb. plantarum* a *Lb. sanfranciscensis* je kyselina fenylmličná a jej 4-

hydroxy derivát, ktoré okrem toho, že vykazujú fungicídnu aktivitu, sa podieľajú aj na tvorbe vône (Gänzle et al., 2007; Thiele et al., 2002; Valerio et al., 2004).



Obrázok 5 Tvorba dôležitých metabolických produktov z pyruvátu BMK (Caplice, Fitzgerald, 1999)

### ÚŽITKOVÉ VLASTNOSTI BMK

Primárnym účelom fermentácie potravín bolo predĺženie trvanlivosti východných surovín. Neskoršie štúdium a pochopenie podstaty procesov prebiehajúcich počas fermentácie viedlo k vývoju nových konzervačných metód. Fermentácia sa stala žiadanou aj vďaka tomu, že jej prostredníctvom sa začali vyrábať potraviny s unikátnymi organoleptickými vlastnosťami. Okrem toho, že fermentáciou sa predlžuje skladovateľnosť potravín, zvyšuje sa ich nutričná hodnota, stráviteľnosť, v niektorých prípadoch sa môže znížiť aj toxicita východiskových surovín, napr. odbúrание lepku v pšenici, fermentácia sa stala aj procesom zabezpečujúcim zdravotnú neškodnosť potravín vyrobených aj bez teplotného opracovania (Leroy, De Vuyst, 2004, Caplice, Fitzgerald, 1999).

### PREDĹŽENIE TRVANLIVOSTI

Pri predlžovaní trvanlivosti potravín sa využívajú viaceré vlastnosti BMK, z ktorých k najdôležitejším patrí produkcia organických kyselín (kyseliny mliečnej, octovej, propiónovej, mravčej a kaprónovej),  $\text{CO}_2$ , etanolu, peroxidu vodíka, diacetylu, fungicídnych látok, ako sú mastné kyseliny alebo kyselina fenylmličná, bakteriocínov a antibiotík (Caplice, Fitzgerald, 1999; Navrhus, Sorhaug, 2006; Valerio et al., 2008; Katina, et al., 2002; Messens, De Vuyst, 2002).

Mechanizmus fyziologického účinku jednotlivých antimikrobiálnych látok je rozdielny. Organické kyseliny inhibujú aktívny transport živín do bunky, oxidujú cytoplazmu a navyše ich vplyvom dochádza ku kolapsu elektrochemického protónového gradientu, čo má bakteriostatický až bakteriocídny účinok (Caplice, Fitzgerald, 1999).

Peroxid vodíka, ktorý je typický pre laktobacily, sa akumuluje v prostredí a prostredníctvom silného

oxidačného stresu na membránové lipidy a bunkové proteíny pôsobí na bunku katalázo-negatívnych mikroorganizmov inhibične (Caplice, Fitzgerald, 1999).

Diacetyl zasahuje do využitia arginínu a je účinný najmä voči gramnegatívnym baktériám, kvasinkám a vláknitým hubám.

Ďalšími antimikrobiálne pôsobiacimi metabolitmi BMK sú bakteriocíny, peptidy alebo malé proteíny, inhibujúce variabilné spektrum mikroorganizmov. V mnohých prípadoch však bakteriocíny nepôsobia špecificky len na nežiaducu mikroflóru, ale aj na príbuzné druhy BMK. Bakteriocíny narušujú celistvosť bunkových membrán a inhibujú syntézu bunkovej steny. Inhibícia mikrobiálneho rastu je spôsobená predovšetkým stratou transmembránového elektrického potenciálu. Silný cytotoxický efekt je pravdepodobne spôsobený prísunom protónov  $\text{Na}^+$ , ktorý vedie k poklesu vnútrobunkového pH a následne k inhibícii mnohých enzymatických procesov (Caplice, Fitzgerald, 1999; Hugenholz, 1993; Corsetti, Settanni, 2007; Konings et al., 2000; Twomey et al., 2002).

Izolovaných a identifikovaných bolo niekoľko bakteriocínov produkovaných laktobacilmi využívanými v pekárstve. Plantaricín, produkovaný *Lb. plantarum* bol účinný voči gram-pozitívnym baktériám, ale nie voči listériám a bavaricín (*Lb. bavaricum*), ktorý bol účinný voči niektorým listériám a gram-pozitívnym baktériám (Corsetti, Settanni, 2007).

Široké antimikrobiálne spektrum majú reuterín ( $\beta$ -hydroxypropiónavý aldehyd) a reutericyklín (cyklický dimér reuterínu), ktoré boli izolované z *Lb. reuteri*. Reutericyklín inhibuje gram-pozitívne baktérie, ako napr. laktobacily, *Bacillus subtilis*, *B. brevis*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* a *Listeria innocua*, a je bakteriocídny voči *B. subtilis*, *S. aureus* a *Lb. sanfranciscensis* (Navrhus, Sorhaug, 2006).

**Corsetti et al. (2004)** objavili antimikrobiálne molekuly produkované laktobacilmi v kvásku, ktoré boli označené ako inhibujúce látky podobné bakteriocinom (BLIS – bacteriocin-like inhibitory substances). *Lb. pentosus* 2MF8 izolovaný z kvásku bol prvý laktobacil, ktorý produkoval antimikrobiálne látky charakteru bakteriocinov s aktivitou pri fermentačných podmienkach (**Corsetti, Settanni, 2007**).

BMK tvoria aj širokú škálu antifungálnych zlúčenín. **Schnürer, Magnusson (2006)** publikovali ich prehľad a zaradili medzi ne kyselinu mliečnu a octovú, CO<sub>2</sub>, diacetyl, peroxid vodíka, kyselinu kaprónovú, 3-hydroxy mastné kyseliny, kyselinu fenylmliečnu, cyklické dipeptidy, reuterín a fungicíny. Medzi produkčné druhy patrili *Lb. casei*, *Lb. pentosus*, *Lb. paracasei* ssp. *paracasei* a *Lb. coryniformis* ssp. *coryniformis*

### ZLEPŠENIE NUTRIČNEJ A ZDRAVOTNEJ HODNOTY

Zvýšenie celkovej hodnoty fermentovaných potravín v porovnaní so surovými materiálmi spočíva podľa viacerých autorov (**Arora et al., 2010; Charalampopoulos, et al., 2002; Rivera-Espinoza, Gallardo-Navarro, 2010; Taylor, 2003**):

- v zlepšení kvantity a kvality proteínov a ich dostupnosti prostredníctvom bakteriálnej enzymatickej hydrolýzy, pričom sa uvoľňujú voľné aminokyseliny,
- vo zvýšení stráviteľnosti škrobu,
- vo zvýšení obsahu vitamínov, najmä skupiny B (riboflavín, tiamín, niacín, kyselina listová),
- vo zvýšení dostupnosti minerálnych prvkov,
- v redukcii antinutričných faktorov,
- v produkcii bakteriocínov a prebiotík,
- v možnosti byť nosičom probiotických baktérií,
- v zlepšení chutnosti a vo zvýšení akceptovateľnosti spotrebiteľmi.

BMK svojou proteolytickou aktivitou môžu prispievať k uvoľňovaniu bioaktívnych peptidov, ktoré môžu stimulovať imunitný systém, zlepšovať absorpciu v tráviacom systéme, môžu vykazovať antihypersenzitívny alebo antitrombotický efekt a môžu mať funkciu nosičov minerálnych látok, najmä vápnika (**Wouters et al., 2002**).

BMK majú významnú schopnosť znižovať celiakiu indukujúce efekty lepku, ktorý u citlivých jedincov vyvoláva ochorenie nazývané celiakia (**Korus, et al., 2009**).

Preukázaná bola degradácia glyadínovej frakcie lepku štartovacou kultúrou zloženou z *Lb. alimentarius*, *Lb. brevis*, *Lb. sanfranciscensis* a *Lb. hilgardii*, ktorá umožnila výrobu chleba obsahujúceho 30 % pšeničnej múky a 70 % celiakiu neidkujúcej múky (ovsenej, ražnej, pohánkovej) vyhovujúceho pre celiatikov (**Corsetti, Settanni, 2007**). S rovnakým úspechom bol testovaný probiotický preparát VSL#3, obsahujúci *Streptococcus thermophilus*, *Lb. plantarum*, *Lb. acidophilus*, *Lb. casei*, *Lb. delbrueckii* ssp. *Bulgarius*, *Bifidobacterium breve*, *B. longum* a *B. infantis* (**De Angelis et al., 2006**).

Preukázal sa aj vplyv BMK na antioxidačnú aktivitu fermentovaných produktov na báze cereálií a pseudocereálií. **Đorđević et al. (2010)** sledovali vplyv dvoch typov mikroorganizmov (*Lb. rhamnosus* a *S. cerevisiae*) počas fermentácie na antioxidačnú aktivitu

a celkový obsah fenolových zlúčenín 4 cereálií, a to pohánky, pšenice, jačmeňa a raže. Fermentácia viedla k zvýšeniu obsahu fenolových zlúčenín aj celkovej antioxidačnej aktivity vo všetkých vzorkách.

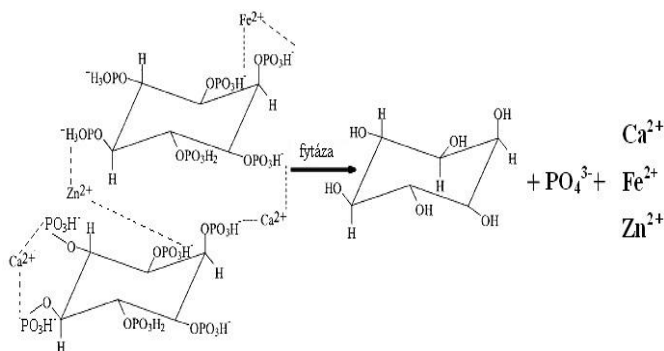
Preskúmaná bola aj schopnosť tvorby  $\gamma$ -aminomaslovej kyseliny kyslomliečnymi baktériami. Kyselina  $\gamma$ -aminomaslová je štvoruhlíková neproteínová aminokyselina, ktorá vzniká konverziou L-glutamátu za prítomnosti enzýmu glutamátdekarboxylázy. Je hlavným inhibítorom neurotransmiterov centrálného nervového systému, znižuje hypersenzitivitu, je účinná v prevencii diabetu a má diuretické a sedatívne účinky (**Coda et al., 2010**). Tvorba kyseliny  $\gamma$ -aminomaslovej bola závislá od druhu BMK, kultivačných podmienok a zloženia média (**Li, Cao, 2010**).

### REDUKCIA ANTINUTRIČNÝCH FAKTOROV

Počas fermentácie cereálií a pseudocereálií dochádza k redukcii antinutričných faktorov čím sa zvyšuje ich nutričná hodnota.

BMK produkujú enzýmy fytázy, ktoré sa nachádzajú aj v samotných zrnách a sú zodpovedné za degradáciu kyseliny fytovej a uvoľnenie minerálnych prvkov, ktoré je schopná viazať (obrázok 6). Činnosťou baktérií sa znižuje hodnota pH prostredia, čo pozitívne vplyva na aktivitu fytáz, ktoré majú optimum pri pH 4,5 (**Corsetti, Settanni, 2007; De Angelis et al., 2003; Lönnerdal, 2002**).

Kyselina fytová sa odbúrava enzymatickou hydrolýzou cez inozitolpentafosfát, inozitoltetrafosfát, inozitoltrifosfát, eventuálne inozitol di- a monofosfát počas skladovania, fermentácie, klíčenia, technologického spracovania a trávenia (**García-Esteva et al., 1999; Palacios et al., 2008**). Navyše, nižšie deriváty inozitolfosfátu sú zdraviu prospešné, zabraňujú kornataniu ciev srdca, arterioskleróze a nervovým ochoreniam (**Corsetti, Settanni, 2007**).



Obrázok 6 Degradácia kyseliny fytovej

**Leenhardt et al. (2005)** uvádzajú, že mierny pokles pH na hodnotu 5,5 počas fermentácie kvásku znižuje obsah kyseliny fytovej až o 70 %. **El Hag et al. (2002)** dosiahli 14 hodinovou fermentáciou prosa pokles kyseliny fytovej o 59,5 % (z 943 na 380 mg/100g). **Reale et al. (2004)** uverejnili výsledky svojej práce, v ktorej dosiahli 80-90% redukcii kyseliny fytovej zmesnou štartovacou kultúrou (*Lb. plantarum*, *Lb. brevis*, *Lb. curvatus*). Podobné percento odbúrania kyseliny fytovej dokumentovali **De Angelis et al. (2003)** s použitím *Lb. sanfranciscensis* CB1.

Okrem odbúrania kyseliny fytovej sa fermentáciou znižoval aj obsah tanínov a polyfenolov, čím sa zvyšila

stráviteľnosť proteínov (Bekes, Wrigley, 2004; Towo et al., 2006). Podľa El Hag et al. (2002) pokleslo množstvo polyfenolických látok v prose z pôvodných 304 na 122 mg/100 g po 14 hodinovej fermentácii. Towo et al. (2006) rovnako preukázali pokles celkových polyfenolov počas fermentácie v ciroku v priemere o 57 %.

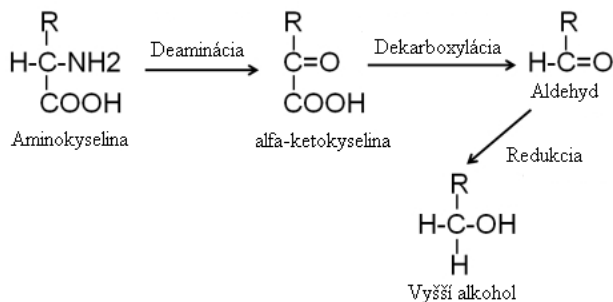
Počas mikrobiálnej fermentácii dochádza aj k inaktivácii a denaturácii enzýmových inhibítorov (inhibítory trypsínu a amyláz), čím sa zvyšuje stráviteľnosť proteínov a sacharidov (Hoffmann et al., 2003).

### ZVÝŠENIE SENZORICKEJ KVALITY

Organoleptické vlastnosti sú základom úspešnosti fermentovaných pokrmov, pretože tieto produkty majú výrazne lepšiu arómu, chuť a vzhľad v porovnaní s východzími materiálmi (Hutkins, 2006; Corsetti, Settanni, 2007).

BMK prispievajú k zlepšeniu chuti a vône fermentovaných výrobkov tým, že okysľujú potravinu, čím sa zvyšuje ich proteolytická a lipolytická aktivita, ktorá prispieva k produkcii aromatických zlúčenín. Ako príklad je možné uviesť zlepšenie senzorickej kvality syrov činnosťou *Lb. lactis* subsp. *cremoris* (Leroy, De Vuyst, 2004; Guldfeldt, 2001). V tomto zmysle, pri tvorbe aromaticky účinných látok je dôležitý metabolizmus pyruvátu (obrázok 5), počas ktorého dochádza k tvorbe mnohých zlúčenín, napr. acetátu, etanolu, diacetylu a acetaldehydu (Leroy, De Vuyst, 2004).

K tvorbe arómy prispievajú aj degradačné reakcie aminokyselín, z ktorých kľúčová je Ehrlichova cesta (obrázok 7), ktorá vedie k tvorbe aldehydov a príslušných alkoholov. Rozklad lepku laktobacilmi a pediokokmi zvyšuje koncentráciu amonikyselín, a to najmä prolínu, ktorý je prekursorom aromaticky aktívnej látky 2-acetyl-1-prolínu (Thiele et al., 2002).



Obrázok 7 Ehrlichova cesta odbúrania aminokyselín

BMK sú schopné produkovať širokú škálu exopolysacharidov, ktoré môžeme rozdeliť do dvoch skupín: homo- a heteropolysacharidy. Homopolysacharidy sú tvorené iba jedným typom monosacharidu a sú syntetizované extracelulárnymi transferázami. Delíme ich na dve hlavné skupiny, a to polysacharidy tvorené iba glukózou (glukány) a tie, ktoré sa skladajú iba z fruktózy (fruktózy). Heteropolysacharidy sú zložené z viacerých typov monosacharidov (Tieking, Gänzle, 2005; Van Der Meulen et al., 2007). Využitím BMK produkujúcich exopolysacharidy sa redukuje použitie polysacharidových aditív, ktoré slúžia na zlepšenie textúry a ako emulgačné a želirovacie činidlá (Smitinont et al., 1997).

### TRADIČNÉ FERMENTOVANÉ POTRAVINY A NÁPOJE NA BÁZE CEREÁLIÍ A PSEUDOCEREÁLIÍ

V ostatnom čase sa z rôznych, často krát subjektívnych dôvodov zvyšuje záujem konzumentov o fermentované potraviny rastlinného pôvodu. Zdá sa, že zvýšený dopyt sa stáva trendom, ktorý je často spájaný aj so záujmom o remeselné pripravované alebo tradičné výrobky, občasne využívajúce aktivitu pôvodnej (autochtónnej) mikroflóry. Široké spektrum cereálnych alebo pseudocereálnych substrátov, ako aj obrovská pestrosť mikrobiálnych druhov inšpirujú potravinársky orientovanú vedeckú komunitu nielen k identifikácii a popisu mikroorganizmov, dejov a ich vzájomných vzťahov s potravinovou matricou, ale aj k vývoju nových funkčných potravín určených pre imunitne kompromitované skupiny obyvateľstva.

Tradičné fermentované cereálne potraviny sú pripravované z rôznych druhov cereálií a pseudocereálií a sú rozšírené po celom svete. Niektoré z nich sa využívajú iba ako farbivá, korenie, nápoje alebo ľahké jedlá (napr. raňajkové), iné slúžia ako základné potraviny. Mikrobiológia mnohých týchto produktov je zložitá a neznáma. Fermentácia väčšinou prebieha spontánne a zúčastňujú sa na nej zmiešané kultúry baktérií, kvasiniek a vláknitých húb, ktoré sa vyskytujú v životnom prostredí alebo tvoria mikroflóru príslušných cereálií a pseudocereálií (Minamiyama et al., 2003; Blandino et al., 2003).

Z baktérií sa na fermentácii cereálií a pseudocereálií najčastejšie podieľajú druhy rodov *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Micrococcus* a *Bacillus*. Najčastejšie vyskytujúce sa vláknité huby sú z rodov *Aspergillus*, *Paecilomyces*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Penicillium* a *Trichothecium*, z kvasiniek je to najmä rod *Saccharomyces* (Blandino et al., 2003).

V dôsledku rozmanitosti východiskových substrátov, vonkajších a vnútorných faktorov a zúčastnených mikroorganizmov existuje vo svete mnoho typov fermentovaných potravín a nápojov na báze cereálií a pseudocereálií. Môžeme ich rozdeliť na sedem kategórií:

- fermentované múky,
- palacinky,
- kvasy/knedle,
- koláče/sladkosti,
- husté kaše,
- riedke kaše,
- nápoje (Taylor, 2004).

Fermentované múky sú známe napr. v Namíbií. Pripravujú sa z prosa a celý proces zahŕňa kroky ako: mletie, namáčanie, fermentácia (pravdepodobne heterofermentatívnymi laktobacilmi), sušenie na slnku, mletie na múku a úplne dosušenie na slnku. Predáva sa buď ako konečný produkt, alebo slúži na výrobu ďalších produktov (nápoje, kaše, koláče a pod.) (Taylor, 2004).

"Injera" (obrázok 8) je kysnutá palacinka a predstavuje národné jedlo Etiópie. Pripravuje sa prevažne z ciroku, ale aj kukurice, prosa a jačmeňa. Proces výroby zahŕňa dve fermentácie. V prvom kroku sa do cesta pridá časť prechádzajúcej palacinky a nechá sa kysnúť 72 hodín. Časť cesta sa potom spojí s vodou a varí za účelom želatinizácie škrobu a na dve hodiny sa pridá späť k nafermentovanému cestu, pričom dochádza k tvorbe plynu a následne sa pečie. Z mikroorganizmov

zúčastňujúcich sa na fermentácii prevažujú kvasinky a niektoré vláknité huby (*Pullaria* sp., *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., *Rhodotorula* sp., *Hormodendrum* sp., *Candida* sp.) a množstvo nedefinovaných baktérií. Injera má vysokú nutričnú hodnotu a je bohatým zdrojom vápnika a železa (Taylor, 2004; Blandino et al., 2003).



Obrázok 8 Injera (Wikipedia, 2011b)

V Indii a na Srí Lanke sa konzumuje fermentovaný koláč "Idli" pripravovaný z ryže (obrázok 9). Jeho príprava je podobná výrobe injery. Idli je nízko kalorická potravina s vysokou nutričnou hodnotou. K BMK zodpovedným za fermentačný proces patria *Leuconostoc mesenteroides*, *Streptococcus faecalis*, *Lb. delbrueckii*, *Lb. fermenti*, *Lb. lactis* a *Pediococcus cerevisiae*, nevyhnutné pre proces kysnutia a tvorbu kyselín sú *L. mesenteroides* a *S. faecalis*. V „idli“ boli identifikované, *Torulopsis holmii*, *T. candida*, *Trichosporon pullulans* ako aj kvasinkovitá vláknitá huba *Geotrichum candidum* (Taylor, 2004; Teniola, Odunfa, 2001; Blandino et al., 2003).

Podobným výrobkom je "Dosa", smažený ľahko fermentovaný koláč (Taylor, 2004; Teniola, Odunfa, 2001).



Obrázok 9 Idli (Wikipedia, 2011c)

V Ghane sa pripravuje fermentovaná knedľa "Kenkey" z kukurice a je konzumovaná ako hlavné jedlo. Výroba zahŕňa dva fermentačné kroky, prvý počas namáčania kukurice, druhý pri tvorbe cesta. Na fermentácii sa podieľa široká škála BMK, najmä však *Lb. fermentum* and *Lb. reuteri*. Z kvasiniek a vláknitých húb sú zastúpené rody *Candida*, *Saccharomyces*, *Penicillium*, *Aspergillus* a *Fusarium* (Taylor, 2004; Blandino et al., 2003).

Častými fermentovanými jedlami afrických a ázijských krajín sú kaše. Pripravujú sa buď fermentáciou celých zŕn (husté kaše) alebo pomletých zŕn (riedke kaše). Medzi takéto produkty patria: "Ting" z ciroku, "Ogi" a "Akamu", pripravované z kukurice, prosa alebo ciroku (Taylor, 2004; Blandino et al., 2003).

Po celom svete je produkovaných niekoľko typov alkoholických (pivo z jačmeňa, "Sake" z ryže, "Bouya" z pšenice) aj nealkoholických ("Mahewu" z kukurice, "Boza" z pšenice, raže, prosa alebo kukurice)

fermentovaných nápojov. Sú vyrábané v domácich podmienkach, ale aj priemyselne, najmä v Južnej Afrike a Botswane (Taylor, 2004; Blandino et al., 2003).

V súčasnosti sa mnohé vedecké tímy zaoberajú problematikou cereálnych a pseudocereálnych fermentácií. Sleduje sa vhodnosť cereálnych a pseudocereálnych substrátov pre rast a rozmnožovanie BMK, vplyv vonkajších a vnútorných podmienok na priebeh fermentácie, vplyv prídavku rôznych aditív, vplyv na nutričnú a senzorickejšiu hodnotu a skladovateľnosť týchto produktov. Takýmto spôsobom vznikli v laboratórnych podmienkach rôzne výrobky, resp. polovýrobky z ovsu, amarantu, ciroku, jačmeňa a iných. Angelov et al. (2006) vyrobili v laboratórnych podmienkach funkčný nápoj z ovsu kombináciou probiotickej štartovacej kultúry *Lb. plantarum* B28 a celozrnného ovseného substrátu, ktorý si zachovával biologickú stabilitu 21 dní pri chladiarenských teplotách. V ovsených substrátoch dobre rastú aj *Lb. reuteri*, *Lb. acidophilus* a *B. bifidum* (Mårtenson et al., 2002).

Correia et al. (2010) uskutočnili fermentáciu ciroku komerčnými kultúrami (*Lb. plantarum*, *Lb. brevis*, *Lb. paracasei*, *Lb. fermentum*, *P. pentosaceus*, *S. thermophilus*) a zaznamenali zvýšenie stráviteľnosti proteínov v *in vitro* podmienkach.

Vplyv fermentácie a klíčenia na nutričné vlastnosti jačmeňa sledovali Arora et al. (2010) a zistili, že kombinácia týchto dvoch operácií vedie k zvýšeniu obsahu tiamínu, niacínu, lyzínu a rozpustnej vlákniny.

Vzhľadom na obsah prebiotík v cereáliách prirodzený vývoj smeruje k ich hodnoteniu ako nosiča probiotických baktérií a následná výroba cereálnych probiotických výrobkov (Blandino et al., 2003; Rivera-Espinoza, Gallardo-Navarro, 2010).

Medzi tradične fermentované nápoje, v ktorých bol dokumentovaný výskyt potenciálnych kultúr s probiotickými vlastnosťami patria: "Boza" (izolované boli kmene druhov *Lb. plantarum*, *Lb. acidophilus*, *Lb. fermentum*, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum*, *Lb. brevis*), "Mahewu" (*Lactococcus lactis* subsp. *lactis*), "Pozol" a "Togwa" (Blandino et al., 2003; Gadaga et al., 1999; Prado et al., 2008).

## ZÁVER

Úloha cereálií v ľudskej výžive je nespochybniteľná. K renesancii ich využitia vedie v súčasnosti niekoľko faktorov súvisiacich so zmenami spôsobu života v priemyselne vyspelých krajinách, ale aj samotné reakcie, ktoré tento spôsob života vyvoláva. U konzumentov prirodzene dochádza nielen k príklonu ku tradičným postupom pri príprave jedál, ale aj k renesancii samotných pseudocereálií. V tejto súvislosti sa otvára novým aplikáciám aj oblasť fermentácií rastlinných substrátov. Selekcija vhodných mikroorganizmov a substrátov by mohla viesť nielen k zvýšeniu senzorickej a nutričnej hodnoty, ale aj k eliminácii niektorých alergických alebo antinutričných vlastností niektorých zložiek. V neposlednom rade je možné hľadať tiež vhodné cereálne prebiotické potraviny, ako nosiče probiotických baktérií.

Inšpiráciu by sme mohli čerpať aj zo širokej škály fermentovaných obilninových výrobkov rozšírených najmä v tzv. krajinách tretieho sveta.

## LITERATÚRA

- ALVAREZ-JUBETE, L., ARENDT, E.K., GALLAGHER, E. 2010. Nutritive value of pseudocereals and their increasing use as functional gluten-free ingredients. In *Trends in Food Science & Technology*, vol. 21, 2010, no. 2, p. 106-113.
- ANDREASEN, M. F., KROON, P. A., WILLIAMSON, G., GARCIA-CONESA, M.T. 2001. Intestinal release and uptake of phenolic antioxidant diferulic acids. In *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 31, 2001, no. 3, p. 304-314.
- ANGELOV, A., GOTCHEVA, V., KUNCHEVA, R., HRISTOZOVA, T. 2006. Development of new oat-based probiotic drink. In *International Journal of Food Microbiology*, vol. 112, 2006, no. 1, p. 75-80.
- ARORA, S., JOOD, S., KHETARPAUL, N. 2010. Effect of germination and probiotic fermentation on nutrient composition of barley based food mixtures. In *Food Chemistry*, vol. 119, 2010, no. 2, p. 779-784.
- ARRANZ, S., CALIXTO, F. S. 2010. Analysis of polyphenols in cereals may be improved performing acidic hydrolysis: A study in wheat flour and wheat bran and cereals of the diet. In *Journal of Cereal Science*, vol. 51, 2010, no. 3, p. 313-318.
- BAÑUELOS, O., FERNÁNDEZ, L., CORRAL, J. M., VALDIVIESO-UGARTE, M., ADRIO, J. L., VELASCO, J. 2004. Metabolism of prebiotic products containing  $\beta(2-1)$  fructan mixtures by two *Lactobacillus* strains. *Anaerobe*, vol. 14, 2004, no. 3, p. 184-189.
- BEKES, F., WRIGLEY, C. 2004. Cereals/Protein Chemistry. In *Encyclopedia of Grain Science*. Elsevier Academic Press, Oxford, 2004, vol. 1, p. 254-262, ISBN: 0-12-765490-9.
- BIELECKA, M., BIEDRZYCKA, E., MAJKOWSKA, A. 2002. Selection of probiotics and prebiotics for synbiotics and confirmation of their in vivo effectiveness. *Food Research International*, vol. 35, 2002, no. 2-3, p.125-131.
- BLANDINO, A., AL-ASEERI, M. E., PANDIELLA, S. S., CANTERO, D., WEBB, C. 2003. Cereal-based fermented foods and beverages. In *Food Research International*, vol. 36, 2003, no. 6, p. 527-543.
- BONAFACCIA, G., MAROCCHINI, M., KREFT, I. 2003. Composition and technological properties of the flour and bran from common and tartary buckwheat. In *Food Chemistry*, vol. 80, 2003, no. 1, p. 9-15.
- BRINDZOVÁ, L., ČERTÍK, M., RAPTA, P., ZALIBERA, M., MIKULAJOVÁ, A., TAKÁCSOVÁ, M. 2008. Antioxidant Activity,  $\beta$ -Glucan and Lipid Contents of Oat Varieties. In *Czech Journal of Food Science*, vol. 26, 2008, no. 3, p. 163-173.
- BRINDZOVÁ, L., ZALIBERA, M., ŠIMON, P., ČERTÍK, M., TAKÁCSOVÁ, M., MIKULAJOVÁ, A., MIKUŠOVÁ, L., RAPTA, P. 2009. Screening of cereal varieties for antioxidant and radical scavenging properties applying various spectroscopic and thermoanalytical methods. In *International Journal of Food Science and Technology*, vol. 44, 2009, no. 4, p. 784-791.
- CAI, Y. Z., CORKE, H., LI, W. D. 2004. Buckwheat. In: *Encyclopedia of Grain Science*. Elsevier Academic Press, Oxford, vol. 1, 2004b, p. 120-128, ISBN: 0-12-765490-9.
- CAI, Y. Z., CORKE, H., WU, H. X. 2004. Amaranth. In: *Encyclopedia of Grain Science*. Elsevier Academic Press, Oxford, vol. 1, 2004a, p. 1-10, ISBN: 0-12-765490-9.
- CAPLICE, E., FITZGERALD, G. F. 1999. Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. In *International Journal of Food Microbiology*, vol. 50, 1999, no. 1-2, p. 131-149.
- CODA, R., RIZZELLO, C. G., GOBBETTI, M. 2010. Use of sourdough fermentation and pseudo-cereals and leguminous flours for the making of a functional bread enriched of  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA). In *International Journal of Food Microbiology*, vol. 137, 2010, no. 2-3, p. 236-245.
- CORREIA, I., NUNES, A., GUEDES, S., BARROS, A. S., DELGADILLO, I. 2010. Screening of lactic acid bacteria potentially useful for sorghum fermentation. In *Journal of Cereal Science*, vol. 52, 2010, no. 1, p. 9-15.
- CORSETTI, A., SETTANNI, L. 2007. Lactobacilli in sourdough fermentation. In *Food Research International*, vol. 40, 2007, no. 5, p. 539-558.
- CORSETTI, A., SETTANNI, L., VAN SINDEREN, D. 2004. Characterization of bacteriocin-like inhibitory substances (BLIS) from sourdough lactic acid bacteria and evaluation of their in vitro and in situ activity. *Journal of Applied Microbiology*, vol. 96, 2004, no. 3, p. 521-534.
- DAY, L. 2004. Lipid Chemistry. In: *Encyclopedia of Grain Science*. Elsevier Academic Press, Oxford, 2004, vol. 2, p. 157-165, ISBN: 0-12-765490-9.
- DE ANGELIS, M., DI CAGNO, R., GALLO, G., CURCI, M., SIRAGUSA, S., CRECCHIO, C., PARENTE, E., GOBBETTI, M. 2007. Molecular and functional characterization of *Lactobacillus sanfranciscensis* strains isolated from sourdoughs. In *International Journal of Food Microbiology*, vol. 114, 2007, no. 1, p. 69-82.
- DE ANGELIS, M., GALLO, G., CORBO, M. R., MCSWEENEY, P. L. H., FACCIA, M., GIOVINE, M. 2003. Phytase activity in sourdough lactic acid bacteria: purification and characterization of a phytase from *Lactobacillus sanfranciscensis* CBI. In *International Journal of Food Microbiology*, vol. 87, 2003, no. 3, p. 259-270.
- DE ANGELIS, M., RIZZELLO, C. G., FASANO, A., CLEMENTE, M. G., DE SIMONE, C., SILANO, M., DE VINCENZI, M., LOSITO, I., GOBBETTI, M. 2006. VSL#3 probiotic preparation has the capacity to hydrolyze gliadin polypeptides responsible for celiac sprue. *Biochimica and Biophysica Acta*, vol. 1762, 2006, no. 1, p. 80-93.
- DE SOUZA OLIVEIRA, R. P., RODRIGUES FLORENCE, A. C., PEREGO, P., DE OLIVEIRA, M. N., CONVERTI, A. 2010. Use of lactulose as prebiotic and its influence on the growth, acidification profile and viable counts of different probiotics in fermented skim milk. *International Journal of Food Microbiology*, In Press, Corrected Proof, Available online 13 November 2010.
- DE SOUZA OLIVEIRA, R. P., PEREGO, P., DE OLIVEIRA, M. N., CONVERTI, A. 2011. Effect of inulin as a prebiotic to improve growth and counts of a probiotic cocktail in fermented skim milk. *LWT - Food Science and Technology*, vol. 44, 2011, no. 2, p. 520-523.
- DE VUYST, L., VRANCKEN, G., RAVYTS, F., RIMAUX, T., WECKX, S. 2009. Biodiversity, ecological determinants, and metabolic exploitation of sourdough microbiota. In *Food Microbiology*, vol. 26, 2009, no. 7, p. 666 - 675.
- DORDEVIC', T. M., ŠILER-MARINKOVIC', S. S., DIMITRIJEVIC'-BRANKOVIC, S. I. 2010. Effect of fermentation on antioxidant properties of some cereals and pseudo cereals. In *Food Chemistry*, vol. 119, 2010, no. 3, p. 957-963.
- DREWNOWSKI, A., FULGONI, V. 2011. Comparing the Nutrient rich foods index with „Go“, „Slow“ and „Whoa“ foods. *Journal of the American Dietetic Association*, vol. 111, 2011, no. 2, p. 280-284.

- EL HAG, M. E., EL TINAY, A. H., YOUSIF, N. E. 2002. Effect of fermentation and dehulling on starch, total polyphenols, phytic acid content and in vitro protein digestibility of pearl millet. In *Food Chemistry*, vol. 77, 2002, no. 2, p. 193-196.
- FEBLES, C. I., ARIAS, A., HARDISSON, A., RODRÍGUEZ-ALVAREZ, C., SIERRA, A. 2002. Phytic Acid Level in Wheat Flours. In *Journal of Cereal Science*, vol. 36, 2002, no. 1, p. 19-23.
- FERENČÍK, M., ŠKÁRKA, B., NOVÁK, M., TURECKÝ, L. 2000. Biochémia. Slovak Academic Press s.r.o., 2000, 924p. ISBN: 80-88908-58-2.
- FLETCHER, R.J. 2004. Pseudocereals, overview. In *Encyclopedia of Grain Science*. Elsevier Academic Press, Oxford, 2004, vol. 2, p. 488-493, ISBN: 0-12-765490-9.
- GADAGA, T. H., MUTUKUMIRA, A. N., NARVHUS, J. A., FERESU, S. B. 1999. A review of traditional fermented foods and beverages of Zimbabwe. In *International Journal of Food Microbiology*, vol. 53, 1999, no. 1, p. 1-11.
- GARCÍA-ESTEPA, R. M., GUERRA-HERNÁNDEZ, E., GARCÍA-VILLANOVA, B. 1999. Phytic acid content in milled cereal products and breads. In *Food Research International*, vol. 32, 1999, no. 3, p. 217-221.
- GÁLOVÁ, Z., KEČKEŠOVÁ, M., KOPÁLOVÁ, Z., CHŇAPEK, M., POLÁČKOVÁ, A. 2011. Quality of cereals, pseudocereals and legume from the point of view gluten free diet. In *Potravinárstvo*, vol.5, special issue February 2011, p. 268-273.
- GÄNZLE, M. G., VERMEULEN, N., VOGEL, R. F. 2007. Carbohydrate, peptide and lipid metabolism of lactic acid bacteria in sourdough. In *Food Microbiology*, vol. 24, 2007, no. 2, p. 128-138.
- GOBBETTI, M., DE ANGELIS, M., CORSETTI, A., DI CAGNO, R. 2005. Biochemistry and physiology of sourdough lactic acid bacteria. *Trends in Food Science and Technology*, vol. 16, 2005, no. 1-3, p. 57-69.
- GÖRNER, F., VALÍK, L. 2004. *Aplikovaná mikrobiológia požívatin*. 1st ed.. Bratislava : MALÉ CENTRUM, 2004. 528p. ISBN: 80-967064-9-7.
- GULDFELDT, L. U., SØRENSEN, K. I., STRØMAN, P., BEHRNDT, H., WILLIAMS, D., JOHANSEN, E. 2001. Effect of starter cultures with a genetically modified peptidolytic or lytic system on Cheddar cheese ripening. In *International Dairy Journal*, vol. 11, 2001, no. 4-7, p. 373-382.
- HAMMES, W. P., BRANDT, M. J., FRANCIS, K. L., ROSENHEIM, J., SEITTER, F. H., VOGELMANN, S. A. 2005. Microbial ecology of cereal fermentations. In *Trends in Food Science and Technology*, vol. 16, 2005, no. 1-3, p. 4-11.
- HELLAND, M. H., WICKLUND, T., NARVHUS, J. A. 2004. Grow and metabolism of selected strains of probiotic bacteria in milk- and water-based cereals puddings. In *International Dairy Journal*, vol. 14, 2004, no. 11, p. 957-965.
- HOFFMANN, E. M., MUETZEL, S., BECKER, K. 2003. The fermentation of soybean meal by rumen microbes in vitro reveals different kinetic features for the inactivation and the degradation of trypsin inhibitor protein. In *Animal Feed Science and Technology*, vol. 106, 2003, no. 1-4, p. 189-197.
- HUGENHOLTZ, J. 1993. Citrate metabolism in lactic acid bacteria. In *FEMS Microbiology Reviews*, vol. 12, 1993, no. 1-3, p. 165-178.
- HUTKINS, R. W. 2006. *Microbiology and Technology of Fermented Foods*, Blackwell Publishing, Oxford, 2006, 473p. ISBN: 0-8138-0018-8.
- CHARALAMPOPOULOS, D., WANG, R., PANDIELLA, S. S., WEBB, C. 2002. Application of cereals and cereal components in functional foods: a review. In *International Journal of Food Microbiology*, vol. 79, 2002, no. 1-2, p. 131-141.
- CHIBBAR, R. N., GANESHAN, S., BÅGA, M., KHANDELWAL, R. L. 2004. Carbohydrate metabolism. In *Encyclopedia of Grain Science*. Elsevier Academic Press, Oxford, 2004, vol.1, p. 168-179, ISBN: 0-12-765490-9.
- KATINA, K., LIUKKONEN, K. H., KAUKOVIRTA-NORJA, A., ADLERCREUTZ, H., HEINONEN, S. M., LAMPI, A. M., PIHLAVA, J. M., POUTANEN, K. 2007. Fermentation-induced changes in the nutritional value of native or germinated rye. In *Journal of Cereal Science*, vol. 46, 2007, no. 3, p. 348-355.
- KONIETZNY, U., GREINER, R. 2003. Phytic acid/nutritional impact. In *Encyclopedia of Food Science and Nutrition*. Academic Press, 2003, vol. 8, p. 4555-4563. ISBN: 978-0-12-227055-0.
- KONINGS, W. N., KOK, J., KUIPERS, O. P., POOLMAN, B. 2000. Lactic acid bacteria: the bugs of the new millennium. In *Current Opinion in Microbiology*, vol. 3, 2000, no. 3, p. 276-282.
- KORUS, J., WITCZAK, M., ZIOBRO, R., JUSZCZAK, L. 2009. The impact of resistant starch on characteristics of gluten-free dough and bread. In *Food Hydrocolloids*, vol. 23, 2009, no. 3, p. 288-995.
- LEROY, F., DE VUYST, L. 2004. Lactic acid bacteria as starter cultures for the food fermentation industry. In *Trends in Food Science & Technology*, vol. 15, 2004, no. 4, p. 67-78.
- LI, H., CAO, Y. 2010. Lactic acid bacterial cell factories for gamma-aminobutyric acid. In *Amino Acids*, vol. 39, 2010, no. 5, p. 1107-1116.
- LIU, S. Q. 2003. Practical implications of lactate and pyruvate metabolism by lactic acid bacteria in food and beverage fermentations. In *International Journal of Food Microbiology*, vol. 83, 2003, no. 2, p. 115-131.
- LÖNNERDAL, B. 2002. Phytic acid-trace element (Zn, Cu, Mn) interactions. In *International Journal of Food Science and Technology*, vol. 37, 2002, no. 7, p. 749-758.
- MANNING, T. S., GIBSON, G. R. 2004. Prebiotics. In *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, vol. 18, 2004, no. 2, p. 287-298.
- MÅRTENSON, O., ÖSTE, R., HOLST, O. 2002. The effect of yogurth culture on the survival of probiotic bacteria in oat-based, non-dairy products. In *Food Research International*, vol. 35, 2002, no. 8, p. 775-784.
- MESSENS, W., DE VUYST, L. 2002. Inhibitory substances produced by Lactobacilli isolated from sourdoughs—a review. In *International Journal of Food Microbiology*, vol. 72, 2002, no. 1-2, p. 31-43.
- MICHALÍK, I., GÁLOVÁ, Z., URMINSKÁ, D., KNOBLOCHOVÁ, H. 2006. Bielkovinový komplex zrna obilnín a pseudoobilnín. In *Výživná a technologická kvalita rastlinných produktov a ich potravinárske využitie*. 1. vyd. Nitra : SPU, 2006. p. 68 – 101. ISBN 80-8069-780-9.
- MIKULAJOVÁ, A., TAKÁČSOVÁ, M., RAPTA, P., BRINDZOVÁ, L., ZALIBERA, M., NÉMETH, K. 2007. Total phenolic contents and antioxidant capacities of cereal and pseudocereal genotypes. In *Journal of Food and Nutrition Research*, vol. 46, 2007, no. 4, p. 150-157.
- MIKUŠOVÁ, L., BRINDZOVÁ, L., RAPTA, P., MOŠOVSKÁ, S., ZALIBERA, M. 2008. Determination of total phenols and antioxidant activity in pseudocereal extracts evaluated by spectroscopic methods. In *XXXIX. Symposium o*



- nových směrech výroby a hodnocení potravin, Skalský Dvůr, 26. - 28. 5. 2008, p. 9-10.
- MINAMIYAMA, Y., TAKEMURA, S., YOSHIKAWA, T., OKADA, S. 2003. Fermented grain products, production, properties and benefits to health. In *Pathophysiology*, vol. 9, 2003, no. 4, p. 221-227.
- MOŠOVSKÁ, S., BIROŠOVÁ, L., VALÍK, E., MIKUŠOVÁ, L. 2010. Antimicrobial activities of pseudocereal extracts and drug resistance. In *Proceedings of the 5th international congress flour-bread '09*, Grafika d.o.o., Osijek, 2010, p. 314-319, ISBN 978-953-7005-21-4.
- MURALIKRISHNA, G., NIRMALA, M. 2005. Cereal  $\alpha$ -amylases—an overview. In *Carbohydrate Polymers*, vol. 60, 2005, no. 2, p.163-173.
- NARIADENIE KOMISIE (ES) č. 41/2009 z 20. januára 2009 o zložení a označovaní potravín vhodných pre osoby trpiace neznášanlivosťou gluténu. L 16/4.
- NARVHUS, J. A., AXELSSON, L. 2003. Lactic acid bacteria. In *Encyclopedia of Food Science and Nutrition*. Academic Press, 2003, vol. 4, p. 3465-3472. ISBN: 978-0-12-227055-0.
- NAVRHUS, J. A., SØRHAUG, T. 2006. *Bakery and cereal products*. In *Food chemistry and food processing*, 1.ed. Oxford: BLACKWELL Publishing Ltd, 2006, p. 615-639. ISBN-13: 978-0-8138-0378-4.
- NIELSEN, P. K., BØNSAGER, B. C., FUKUDA, K., SVENSSON, B. 2004. Barley  $\alpha$ -amylase/subtilisin inhibitor: structure, biophysics and protein engineering. In *Biochimica and Biophysica Acta*, vol. 1696, 2004, no. 2, p. 157-164.
- OLLI, J.J., HJELMELAND, K., KROGDAHL, Å. 1994. Soybean trypsin inhibitors in diets for Atlantic salmon (*Salmo salar*, L): effects on nutrient digestibilities and trypsin in pyloric caeca homogenate and intestinal content. In *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, vol. 109, 1994, no. 4, p. 923-928.
- PALACIOS, M. C., HAROS, M., SANZ, Y., ROSELL, C. M. 2008. Selection of lactic acid bacteria with high phytate degrading activity for application in whole wheat breadmaking. In *LWT - Food Science and Technology*, vol. 41, 2008, no. 1, p. 82-92.
- PISULEWSKA, E., PISULEWSKI, P. M. 2000. Trypsin inhibitor activity of legume seeds (peas, chickling vetch, lentils, and soya beans) as affected by the technique of harvest. In *Animal Feed Science and Technology*, vol. 86, 2000, no. 3-4, p. 261-265.
- POUTANEN, K., FLANDER, L., KATINA, K. 2009. Sourdough and cereal fermentation in a nutritional perspective. In *Food Microbiology*, vol. 26, 2009, no. 7, p. 693-699.
- 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, no. 2, p. 111-123.
- REALE, A., MANNINA, L., TREMONTE, P., SOBOLEV, A. P., SUCCI, M., SORRENTINO, E., COPPOLA, R. 2004. Phytate degradation by lactic acid bacteria and yeasts during the wholemeal dough fermentation: a<sup>31</sup>P-NMR study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 52, 2004, no. 20, p. 6300-6305.
- REDDY, G., ALTAF, M. D., NAVEENA, B. J., VENKATESHWAR, M., VIJAY KUMAR, E. 2008. Amylolytic bacterial lactic acid fermentation — A review. In *Biotechnology Advances*, vol. 26, 2008, no. 1, p. 22-34.
- RIVERA-ESPINOZA, Y., GALLARDO-NAVARO, Y. 2010. Non-dairy probiotic products. In *Food Microbiology*, vol. 27, 2010, no. 1, p. 1-11.
- SERNA SALDIVAR, S. O., CABALLERO, B. 2003. Cereals/Dietary Importance. In *Encyclopedia of Food Science and Nutrition*. Academic Press, 2003, vol. 3, p. 1027-1033. ISBN: 978-0-12-227055-0.
- SCHAKEL, S. F., VAN HEEL, N., HARNACK, J. 2004. Appendix 1. In *Encyclopedia of Grain Science*. Elsevier Academic Press, Oxford, 2004, vol. 3, p. 431-449, ISBN: 0-12-765490-9.
- SCHNÜRER, J., MAGNUSSON, J. 2005. Antifungal lactic acid bacteria as biopreservatives. *Trends in Food Science and Technology*, vol. 16, 2005, no. 1-3, p. 70-78.
- SMITINONT, T., TANSAKUL, C., TANASUPAWAT, S., KEERATIPIBUL, S., NAVARINI, L., BOSCO, M., CESCUTTI, P. 1999. Exopolysaccharide-producing lactic acid bacteria strains from traditional thai fermented foods: isolation, identification and exopolysaccharide characterization. In *International Journal of Food Microbiology*, vol. 51, 1999, no. 2-3, p. 105-111.
- SU, P., HENRIKSSON, A., MITCHELL, H. 2007. Selected prebiotics support the growth of probiotic mono-cultures in vitro. *Anaerobe*, vol.13, 2007, no. 3-4, p. 134-139.
- SVANBERG, U., LORRI, W. 1997. Fermentation and nutrient availability. In *Food Control*, vol. 8, 1997, no. 5-6, p. 319-327.
- SWANSON, B. G. 2003. Tannins and polyphenols. In *Encyclopedia of Food Science and Nutrition*. Academic Press, 2003, vol. 9, p. 5729-5733. ISBN: 978-0-12-227055-0.
- TAYLOR, J. R. N. 2003. Fermented foods/Beverages from Sorghum and Millet. In *Encyclopedia of Food Science and Nutrition*. Academic Press, 2003, vol. 2, p. 2352-2359. ISBN: 978-0-12-227055-0.
- TAYLOR, J. R. N. 2004. Fermentation/Foods and Nonalcoholic Beverages. In *Encyclopedia of Grain Science*. Academic Oxford Press, vol. 1, 2004, p. 380-390. ISBN: 0-12-765490-9.
- TENIOLA, O. D., ODUNFA, S. A. 2001. The effects of processing methods on the levels of lysine, methionine and the general acceptability of ogi processed using starter cultures. In *International Journal of Food Microbiology*, vol. 63, 2001, no. 1-2, p. 1-9.
- THIELE, C., GÄNZLE, M. G., VOGEL, R. F. 2002. Contribution of sourdough lactobacilli, yeast, and cereal enzymes to the generation of amino acids in dough relevant for bread flavour. In *Cereal Chemistry*, vol. 79, 2002, no. 1, p. 45-51.
- TIEKING, M., GÄNZLE, M. G. 2005. Exopolysaccharides from cereal-associated lactobacilli. In *Trends in Food Science & Technology*, vol. 16, 2005, no. 1-3, p. 79-84.
- TOPPING, D. 2007. Cereal complex carbohydrates and their contribution to human health. In *Journal of Cereal Science*, vol. 46, 2007, no. 3, p. 220-229.
- TOWO, E., MATUSCHEK, E., SVANBERG, U. 2006. Fermentation and enzyme treatment of tannin sorghum gruels: effects on phenolic compounds, phytate and in vitro accessible iron. In *Food Chemistry*, vol. 94, 2006, no. 3, p. 369-376.
- TWOMEY, D., ROSS, R. P., RYAN, M., MEANEY, B., HILL, C. 2002. Lantibiotics produced by lactic acid bacteria: structure, function and applications. In *Antonie van Leeuwenhoek*, vol. 82, 2002, no. 1-4, p. 165-185.
- US DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES, NATIONAL HEART LUNG AND BLOOD INSTITUTE. We can! Go, Slow and Whoa foods. [online], [14.3.2008], [1.2.2011]. Retrieved from the web <<http://www.nhlbi.nih.gov/health/public/heart/obesity/wecan/downloads/gswtips.pdf>>.

USDA. Using The Food Guide Pyramid: A Resource for Nutrition Educators. Dietary Guidelines for Americans. U.S. Department of Agriculture Food, Nutrition, and Consumer Services Center For Nutrition Policy and Promotion Fifth Edition, 2000. [online], [5.a], [28.1.2011]. Retrieved from the web:

<<http://www.health.gov/dietaryguidelines/dga2000/document/contents.htm>>.

VALENCIA-CHAMORRO, S. A. 2004. Quinoa. In *Encyclopedia of Grain Science*. Academic Oxford Press, vol. 3, 2004, p.1-8. ISBN: 0-12-765490-9.

VALENCIA-CHAMORRO, S. A. 2003. Quinoa. In *Encyclopedia of Food Science and Nutrition*. Academic Press, 2003, vol. 8, p. 4895-4902. ISBN: 978-0-12-227055-0.

VALERIO, F., DE BELLIS, P., LONIGRO, S. L., VISCONTI, A., LAVERNICOCCA, P. 2008. Use of *Lactobacillus plantarum* fermentation products in bread-making to prevent *Bacillus subtilis* ropy spoilage. In *International Journal of Food Microbiology*, vol. 122, 2008, no. 3, p. 328-332.

VALERIO, F., LAVERMICOCCA, P., PASCALE, M., VISCONTI, A. 2004. Production of phenyllactic acid by lactic acid bacteria: an approach to the selection of strains contributing to food quality and preservation. In *FEMS Microbiology Letters*, vol. 233, 2004, no. 2, p. 289-295.

VAN DER MEULEN, R., GROSU-TUDOR, S., MOZZI, F., VANINGELGEM, F., ZAMFIR, M., DE VALDEZ, G. F., DE VUYST, L. 2007. Screening of lactic acid bacteria isolates from dairy and cereal products for exopolysaccharide production and genes involved. In *International Journal of Food Microbiology*, vol. 118, 2007, no. 3, p. 250-258.

VÝNOS MP SR a MZ SR z 25.júla 2007 č. 16826/2007-10L, ktorým sa vydáva hlava PK SR upravujúca požiadavky na potraviny na osobitné výživové účely a na výživové doplnky.

VÝNOS MP SR a MZ SR z 15. marca 2004 č. 608/2/2004, ktorým sa vydáva hlava Potravinového kódexu Slovenskej republiky upravujúca požiadavky na potraviny na osobitné výživové účely a na výživové doplnky.

WIKIPEDIA. 2011a. Polyphenol. Wikipedia, free encyclopedia. [online], [február 2011], [cit. 10.2.2011]. Retrieved from the web: <<http://en.wikipedia.org/wiki/Polyphenol>>.

WIKIPEDIA. 2011b. Injera, Wikipedia, free encyclopedia. [online], [s.a.], [cit. 10.2.2011]. Retrieved from the web: <<http://en.wikipedia.org/wiki/Injera>>.

WIKIPEDIA. 2011c. Idli, Wikipedia, free encyclopedia. [online], [February 2011], [cit. 10.2.2011]. Retrieved from the web: <<http://en.wikipedia.org/wiki/Idli>>.

WOUTERS, J. T. M., AYAD, E. H. E., HUGENHOLTZ, J., SMIT, G. 2002. Microbes from raw milk for fermented dairy products. In *International Dairy Journal*, vol. 12, 2002, no. 2-3, p. 91-109.

WRIGLEY, C.: Cereals/Overview. In *Encyclopedia of Grain Science*. Elsevier Academic Press, Oxford, 2004, vol. 1, p. 187-201, ISBN: 0-12-765490-9.

ZOTTA, T., RICCIARDI, A., PARENTE, E. 2007. Enzymatic activities of lactic acid bacteria isolated from Cornetto di Matera sourdoughs. In *International Journal of Food Microbiology*, vol. 115, 2007, no. 2, p. 165-172.

#### Acknowledgments:

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

#### Contact address:

Monika Kocková, Department of Nutrition and Food Assesment, Faculty of Chemical and Food Technology, Slovak University of Technology, Radlinského 9, 812 37 Bratislava, Slovak Republic, E-mail: monika.kockova@stuba.sk

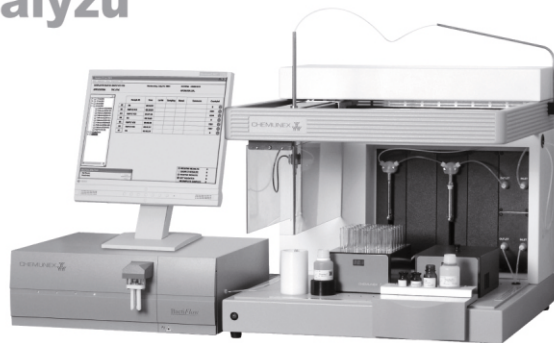
Lubomír Valík, Department of Nutrition and Food Assesment, Faculty of Chemical and Food Technology, Slovak University of Technology, Radlinského 9, 812 37 Bratislava, Slovak Republic, E-mail: lubomir.valik@stuba.sk

# Zkušenost a kvalita pro každou laboratoř

Firma O.K.SERVIS BioPro je poskytovatelem kompletního řešení v oblasti laboratorního vybavení. Mnohaleté zkušenosti v této oblasti, nepřetržitý vývoj, nejmodernější technologie, interně vyvinutá i vyráběná elektronika, flexibilita a hlavně spolehlivý zákaznický servis činí z našich produktů vysoký celosvětový standard. Mezi nejžádanější patří přístroje pro mikrobiologickou, chemickou, senzorickou analýzu, ale také detekční testy pro stanovení mykotoxinů či reziduí antibiotik v mléce.

## Přístroje pro mikrobiologickou analýzu

- Průtokové cytometry pro analýzu v reálném čase
- Mikroprocesorové ředičky vzorků a membránové pumpy
- Bioimpaktory k monitoringu čistoty vzduchu
- Automatické fluorescenční mikroskopy
- Spirálové očkovače a automatické odečítačky kolonií
- ATP analyzátoři mikrobiologické kvality potravin
- Mikrobiologické homogenizátory typu „stomacher“
- Automatické varny médií s rozplněním do misek, zkumavek, lahvíček
- Autoklávy, inkubátory, horkovzdušné sterilizátory, laminární boxy, atd.
- Luminometry pro rychlou kontrolu úrovně hygieny a sanitace, pasterace, provařenosti masa, atd.
- Spotřební materiál pro mikrobiologickou praxi



## Přístroje pro chemickou analýzu

- NIR spektroskopy k analýze obsahových složek v potravinách
- Analyzátoři pro stanovení obsahových složek v mléce a mléčných směsích
- Přístroje pro referenční analýzu tuku, proteinů, vlákniny
- Analyzátoři pro stanovení obsahu chloridů v potravinách
- Spektrofotometry
- Off-line i on-line refraktometry
- Laboratorní nábytek
- Další přístroje a spotřební materiál pro chemické analýzy

## Zařízení pro senzorickou analýzu

- Komplexní analýza textury u potravin, ve farmacii či kosmetice, vč. obalových materiálů
- Elektronický nos a elektronický jazyk
- Klimatické komory s volitelným nastavením teploty / vlhkosti / osvětlení / CO<sub>2</sub> atd.
- Analyzátoři pro stanovení obsahu zbytkových plynů při balení do ochranné atmosféry



## Diagnostika

- Detekční diagnostické testy pro stanovení reziduí antibiotik v mléce, mase, vejcích, medu...
- Detekční testy ke stanovení mykotoxinů
- Mikrobiologická média či ready média v lahvíčkách, zkumavkách či na miskách
- Diagnostický systém pro semikvantitativní analýzu antibiotik dle skupin, aflatoxinů, pesticidů, alkalické fosfatázy, atd.



® O.K. SERVIS  
**BioPro**  
s.r.o.  
[www.biopro.cz](http://www.biopro.cz)

**Bližší informace o kompletní nabídce:**

O.K. SERVIS BioPro, s.r.o., Bořetická 2668/1, 193 00 Praha 9  
Tel.: +420 281 091 460, +420 841 111 114, e-mail: [info@oks.cz](mailto:info@oks.cz), [www.biopro.cz](http://www.biopro.cz)

PROFICOM, s.r.o., Zámocká 30, 811 01 Bratislava, Slovenská republika  
Tel.: +421 0915 889 637, e-mail: [z.vacziova@rhinestone.cz](mailto:z.vacziova@rhinestone.cz), [www.rhinestone.cz](http://www.rhinestone.cz)

# Živná média AES CHEMUNEX pro mikrobiologii

Společnost O.K. SERVIS BioPro dodává živná média v následujících formách:

- práškové formy
- ready média v lahvičkách k přímému použití
- ready média na miskách či zkumavkách k přímému použití

Rádi zašleme nabídkové katalogy živných médií pro:

- klinickou mikrobiologii
- potravinářství
- farmacii
- kosmetiku
- environmentální oblast

Nízké ceny, rychlé dodání, vše s certifikátem kvality.



## Technologie spirálového očkování „Autoplate“

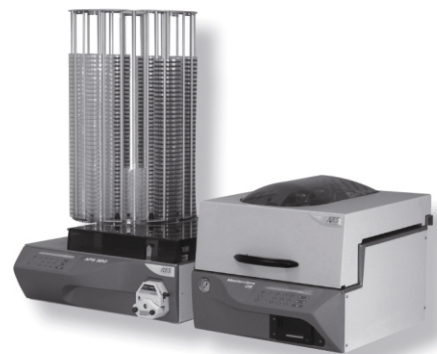


- Mikroprocesorový spirálový očkovač určený pro snadné počítání bakterií, vyhodnocení citlivosti antimikrobiálních testů či stanovení mutagenicity vzorků
- Optimalizace produktivity a výsledků v mikrobiologické laboratoři
- Eliminuje potřeby sériových ředění, šetří čas a finance
- Automatizace očkovacího procesu
- 3 – 4 ředění na jedné misce
- Citlivější než konvenční očkovací techniky
- Velmi dobrá opakovatelnost metody

## AES CHEMUNEX - Automatická příprava živných médií

### Autopreparátory s karuselovým plněním Petriho misek

- Sterilizace médií ve vnitřní nerezové nádobě autopreparátoru M09
- Perfektní standardizace média před rozplněním
- Možnost přidavku suplementů
- Karuselový rozplňovací systém APS 320
- Plnění misek ve sterilním prostředí
- Zabudovaná tiskárna pro průběžný záznam procesu



### Rozplňovací systémy pro zkumavky a lahvičky



- Využití peristaltické pumpy PM05 pro poloautomatické rozplnění
- Opakovaně sterilizovatelné rozplňovací hadičky s nerezovými koncovkami
- V kombinaci se souřadnicovou plničkou XY500 pro automatické plnění
- Přesný objem dávkovaného média s možností kalibrace
- Vhodné k rozplňování agarů, bujónů i tekutin
- Minimalizace kontaminačních rizik

® O.K. SERVIS  
**BioPro**  
s.r.o.  
[www.biopro.cz](http://www.biopro.cz)

**Bližší informace o kompletní nabídce:**

O.K. SERVIS BioPro, s.r.o., Bořetická 2668/1, 193 00 Praha 9  
Tel.: +420 281 091 460, +420 841 111 114, e-mail: [info@oks.cz](mailto:info@oks.cz), [www.biopro.cz](http://www.biopro.cz)

PROFICOM, s.r.o., Zámocká 30, 811 01 Bratislava, Slovenská republika  
Tel.: +421 0915 889 637, e-mail: [z.vacziova@rhinestone.cz](mailto:z.vacziova@rhinestone.cz), [www.rhinestone.cz](http://www.rhinestone.cz)

PERSISTENCE OF *L. MONOCYTOGENES* VERSUS ADHERENCE ON SOLID SURFACE

Janka Koreňová, Katarína Oravcová

## ABSTRACT

*Listeria monocytogenes* is an important food-borne pathogen that frequently persists in food-processing environments despite rigorous sanitation procedures. Specific phenotypes that have been linked to persistence have been previously investigated but no clear association has been demonstrated. In this study we characterised four persistent *L. monocytogenes* strains isolated from food factories in Austria, Czech Republic, Denmark and Ireland in comparison with four non-persistent counterparts. The *L. monocytogenes* isolates were analysed for the ability to form biofilm during exponential/stationary growth phase at different temperature at low nutrition stress and adhesion to polystyrene at high-salinity conditions. Persistent and non-persistent strains did not significantly differ in the ability to form biofilm or to adhere to polystyrene microtitre plate.

**Keywords:** biofilm, *Listeria monocytogenes*, persistence

## ÚVOD

*Listeria monocytogenes* je významný potravinový patogén spôsobujúci listeriózu, ochorenie s vysokou mierou mortality v rizikových skupinách obyvateľstva (Farber a Peterkin, 1991). Syry, ryby (losos), lahôdky obsahujúce mäso alebo vajcia a zelenina sú považované za najviac frekventované nosiče tohto patogénu (Lianou a Sofos 2007). Najmä v oblasti produkcie syra a mäsa *L. monocytogenes* najčastejšie kontaminuje výrobné zariadenia, kde je určité množstvo kmeňov schopných perzistovať napriek prísny sanitacným procedúram (Lundén et al., 2003). Perzistencia sa predpokladá v spojitosti s posilnenou adherenciou a s potenciálnou tvorbou biofilmu na plochách prichádzajúcich do priameho kontaktu s potravinou (Borucki et al., 2003; Moretro a Langsrud, 2004).

V tejto práci uvádzame výsledky analýzy ôsmich nezávislých izolátov *L. monocytogenes* zo štyroch európskych krajín. Výber reprezentujú štyri kmene perzistujúcich kontaminantov v potravinárskych výrobných v porovnaní so štyrmi kmeňmi, ktoré boli izolované z výroby, alebo z výrobkov len sporadicky a teda sa predpokladá, že sú neperzistentné. Všetky kmene boli hodnotené z hľadiska tvorby biofilmu a adherencie na pevný povrch v rôznych rastových fázach, teplotných podmienkach, a podmienkach zvýšenej koncentrácie soli za účelom identifikácie perzistujúcich kmeňov vzhľadom na fenotypové vlastnosti.

**Tab. 1** Použité kmene *L. monocytogenes* charakterizované podľa frekvencie izolácie (opísané vyššie)

Kmeň č.	Perzistentné				Neperzistentné				Kontrola
	1	2	3	4	5	6	7	8	
Krajina pôvodu a miesto izolácie	Výrobňa B (voda)	SYR	Udiareň 1	Výrobňa syra	Výrobňa B	SYR	Udiareň 2	SYR	LM EGD
	Rakúsko	Írsko	Dánsko	ČR	Rakúsko	Írsko	Dánsko	ČR	Kontrolný kmeň

## MATERIÁL A METÓDY

## Bakteriálne kmene

Boli použité štyri kmene *L. monocytogenes*, izolované v r. 1996 – 2007 opakovane (perzistentné), a štyri kmene *L. monocytogenes*, izolované v r. 1999 – 2008 sporadicky (neperzistentné), doplnené *L. monocytogenes* EGD, ako kontrolným kmeňom (Tab. 1). Kmene boli kultivované v tryptón-sójovom bujóne (TSB; Merck, Darmstadt, Germany) pri 37 °C, s trepaním pri 120 rpm, počas 18 -20 h – základná suspenzia.

## Tvorba biofilmu

Suspenzie buniek boli nanášané po 100 µl do jamiek 96-jamkovej mikrotitračnej doštičky z priehľadného polystyrénu (Sarstedt, Nemecko). Biofilm bol kvantifikovaný spektrofotometrickou metódou s kryštálovou violeťou v šiestich paralelných meraniach (Koreňová et al., 2009). Priemerné hodnoty boli vypočítané po vylúčení odľahlých výsledkov aplikáciou Q-testu (Dean a Dixon, 1951). Významnosť rozdielov v percentuálne vyjadrenej miere tvorby biofilmu medzi jednotlivými skupinami kmeňov bola stanovená porovnávacím testom podľa Tukeya (One-way ANOVA, GraphPad Prism 5.0, GraphPad Software, Inc., USA).

## Vplyv rôznej rastovej fázy buniek a teploty na tvorbu biofilmu

Zo základnej suspenzie boli pripravené dve suspenzie buniek v rôznej fáze rastu.

(A) Neskorá exponenciálna až skorá stacionárna fáza rastu bola pripravená po centrifugácii základnej suspenzie buniek pri 4000 rpm, 20 min, 20 °C, výmenou TSB média za čerstvé v objeme, aby sa dosiahla OD<sub>600</sub> 0,5 (3.10<sup>9</sup> - 5.10<sup>9</sup> KTJ.ml<sup>-1</sup>).

(B) Kultúry v skorej až strednej exponenciálnej fáze boli pripravené po centrifugácii základnej suspenzie buniek, výmenou TSB média za čerstvé v takom istom objeme. Po krátkej kultivácii (37 °C, 2 – 3 h) sa dosiahla OD<sub>600</sub> 0,1 – 0,2 (cca 5.10<sup>8</sup> - 1.10<sup>9</sup> KTJ.ml<sup>-1</sup>). Vplyv rôznej rastovej fázy buniek a teploty na tvorbu biofilmu bol sledovaný nanesením suspenzie (A) a (B) na mikrotitračnú doštičku, tvorba biofilmu prebiehala pri 20 °C, 37 °C a 40 °C počas 20 – 24 h.

## Vplyv limitovaného zdroja živín a teploty na tvorbu biofilmu

V suspenzii (B) bolo po centrifugácii vymenené médium za čerstvé 10 x zriedené médium TSB. 100 µl

suspenzie bolo nanášaných na mikrotitračné doštičky, tvorba biofilmu prebiehala pri 20 °C, 37 °C a 40 °C počas 20-24 h, resp. pri teplote 4 °C počas 5 dní.

**Vplyv zvýšenej koncentrácie NaCl na adhérenciu buniek**

Suspensia kmeňov bola pripravená kultiváciou pri 20 °C, počas 40 h v TSB a TSB + 10 % NaCl. Po centrifugácii za podmienok opísaných vyššie boli bunky premyté a nariadené v peptónovej vode na koncentráciu cca 10<sup>7</sup> KTJ.ml<sup>-1</sup> (OD<sub>600</sub> 0,025). 100µl suspenzie bolo nanášaných na mikrotitračné doštičky, adhérenca na polystyrén prebiehala pri 20 °C počas 4 h.

**VÝSLEDKY A DISKUSIA**

*Vplyv rôznej rastovej fázy buniek a teploty na tvorbu biofilmu*

Všetky kmene boli schopné tvoriť biofilm bez ohľadu na ich rastovú fázu. Tvorba celkového biofilmu varírovala u jednotlivých kmeňov za rôznych podmienok s odchýlkou ± 20 – 30 % bez ohľadu na charakter kmeňov z hľadiska perzistentnosti. Pri skúšaných teplotách 20 °C, 37 °C, 40 °C boli všetky kmene schopné tvoriť biofilm v rovnakom pomere ako pri referenčnej teplote 37°C. Najvyššia schopnosť tvorby biofilmu z perzistentných kmeňov bola pozorovaná u kmeňa 2 a 3, najnižšia u kmeňov 1 a 4. Kmeň č. 5 (neperzistentný) mal osobitné postavenie z hľadiska kvantity tvorby biofilmu, tvoril biofilm v rovnakej až väčšej miere, ako perzistentné kmene a pri všetkých testovaných teplotách (Tab. 2, 3).

Schopnosť tvoriť biofilm je považovaná za najpravdepodobnejšiu vlastnosť v súvislosti s perzistentným fenotypom *L. monocytogenes* v potravinárskych výrobách (Borucki et al., 2003;

Moretro a Langsrud, 2004). Hypotézu podporuje skutočnosť, že biofilmy sú značne rezistentné voči čisteniu a dezinfekcii (Lelieveld, 2006; Grinstead, 2009). Jedným z faktorov, ktoré ovplyvňujú schopnosť tvorby biofilmu u jednotlivých kmeňov, je rôzna fáza rastu buniek (Chavant et al., 2002; Rodrigues et al., 2009). Napriek týmto poznatkom, počiatkové experimenty porovnávania tvorby biofilmu perzistentných a neperzistentných kmeňov nepreukázali značný rozdiel medzi týmito skupinami, ani vzhľadom na ich rastovú fázu.

*Vplyv nízkej hladiny živín a teploty na tvorbu biofilmu*

Prírodné podmienky prostredia potravinárskych výrob poskytujú nepravidelný a obmedzený prísun živín pre mikroorganizmy na povrchoch, pre ktoré tento nutričný stres predstavuje významný vplyv na posilnenie adhérencie a tvorbu biofilmu (Djordjevic et al., 2002; Rodrigues et al., 2009). V našich experimentoch všetky skúšané kmene kultivované v limitných nutričných podmienkach tvorili biofilm pri testovaných teplotách 4 °C, 20 °C, 37 °C, 40 °C bez významných rozdielov vzhľadom na ich perzistenciu (Tab. 4).

*Vplyv zvýšenej koncentrácie NaCl na adhérenciu buniek*

Zvýšená adhézia buniek listérií na polystyrén vplyvom zvýšenej koncentrácie soli v prostredí bola popísaná ako dôsledok tvorby flagel (Kalmokoff et al., 2001; Caly et al., 2009). V prostredí so zvýšenou koncentráciou soli (TSB+10 % NaCl), za zaznamenala zvýšená adhérenca väčšiny skúšaných kmeňov. Zvýšenie adhérencie kmeňov nebolo v korelácii s ich perzistenciou (Tab. 5). Opäť, bunky kmeňa č. 5 prejavili silnejšiu adhérenciu, ako niektoré perzistentné kmene. Tento kmeň prejavil tiež zvýšenú schopnosť tvoriť biofilm za rôznych podmienok, ako bolo

**Tab. 2** Kvantita biofilmu (BF) kmeňov *L. monocytogenes* v neskoršej exponenciálnej až skorej stacionárnej fáze rastu vytvorenom pri teplote 20 °C a 37 °C, nameraná ako optická denzita pri 570 nm po farbení biofilmu s kryštálovou violeťou (OD<sub>CV</sub>), priemer zo šiestich paralelných meraní, SD – smerodajná odchýlka

20°C				37°C			
Kmeň č.	OD <sub>CV</sub>	± SD	% BF	Kmeň č.	OD <sub>CV</sub>	± SD	%BF
2	0,3328	0,0656	100	3	0,4023	0,2050	100
5	0,2320	0,0445	69,7	2	0,3358	0,0319	83,5
3	0,2258	0,0507	67,9	5	0,3263	0,0666	81,1
8	0,1916	0,0152	57,6	6	0,228	0,0227	56,7
6	0,1573	0,0273	47,3	1	0,2058	0,0443	51,2
4	0,1446	0,0481	43,5	8	0,1840	0,0479	45,7
1	0,1341	0,0144	40,3	4	0,1798	0,0155	44,7
7	0,1213	0,0190	36,5	7	0,1508	0,0302	37,5
9	0,1106	0,0428	33,2	9	0,0605	0,0206	15,0

**Tab. 3** Kvantita biofilmu kmeňov *L. monocytogenes* v skorej až strednej exponenciálnej fáze rastu vytvorenom pri teplote 20°C, 37°C a 40°C, nameraná po farbení biofilmu s kryštálovou violeťou

20 °C				37 °C				40 °C			
Kmeň	OD <sub>CV</sub>	± SD	% BF	Kmeň	OD <sub>CV</sub>	± SD	% BF	Kmeň	OD <sub>CV</sub>	± SD	% BF
2	0,190	0,088	100,0	3	0,236	0,058	100,0	5	0,168	0,036	100,0
1	0,170	0,089	89,3	5	0,230	0,049	97,7	8	0,161	0,076	95,8
5	0,129	0,019	67,9	2	0,191	0,017	80,9	2	0,120	0,036	71,4
3	0,124	0,062	65,3	6	0,171	0,049	72,5	3	0,115	0,039	68,7
6	0,091	0,022	47,9	1	0,170	0,031	72,3	9	0,111	0,039	66,1
4	0,066	0,031	34,9	9	0,168	0,073	71,3	1	0,086	0,034	51,5
7	0,054	0,023	28,2	8	0,153	0,062	64,8	4	0,073	0,018	43,8
9	0,049	0,019	25,6	4	0,138	0,011	58,7	6	0,072	0,014	43,1
8	0,030	0,010	16,0	7	0,094	0,035	39,8	7	0,067	0,022	40,2

**Tab. 4** Kvantita biofilmu kmeňov *L. monocytogenes* v podmienkach limitovaného zdroja živín vytvorenom pri teplote 4 °C, 20 °C, 37 °C a 40 °C, nameraná po farbení biofilmu s kryštálovou vioľou

4°C, 5 dní			20 °C, 20 h			37 °C, 20 h			40 °C, 20 h		
Kmeň č.	OD <sub>CV</sub>	% BF	Kmeň č.	OD <sub>CV</sub>	% BF	Kmeň č.	OD <sub>CV</sub>	% BF	Kmeň č.	OD <sub>CV</sub>	% BF
5	0,303	100,0	3	0,171	100,0	5	0,199	100,0	5	0,302	100,0
2	0,153	50,5	2	0,163	94,9	2	0,185	92,8	2	0,259	86,0
6	0,140	46,1	5	0,158	92,4	9	0,166	83,3	3	0,248	82,2
4	0,130	44,9	9	0,120	70,3	3	0,165	83,1	8	0,201	66,7
7	0,119	39,3	1	0,097	56,7	8	0,119	59,7	1	0,178	59,0
3	0,114	37,6	8	0,087	50,8	6	0,088	44,4	9	0,169	56,2
1	0,095	31,3	7	0,083	48,2	4	0,088	44,3	6	0,144	47,7
8	0,083	27,5	4	0,072	41,8	7	0,079	39,7	4	0,128	42,6
9	0,063	20,6	6	0,059	34,7	1	0,075	37,7	7	0,105	34,9

**Tab. 5** Adherencia (BF) buniek *L. monocytogenes* na polystyrén v podmienkach zvýšenej koncentrácie NaCl (TSB+10 %) pri teplote 20 °C počas 4 h, nameraná po farbení s kryštálovou vioľou

TSB				TSB+10%NaCl			
Kmeň č.	OD <sub>CV</sub>	± SD	% BF	Kmeň č.	OD <sub>CV</sub>	± SD	% BF
3	0,042	0,014	100,0	6	0,115	0,043	100,0
2	0,038	0,009	90,5	4	0,093	0,032	80,3
1	0,035	0,009	82,1	1	0,056	0,012	48,3
5	0,034	0,007	79,8	5	0,051	0,022	43,8
4	0,030	0,009	71,8	7	0,050	0,012	43,6
6	0,012	0,002	29,4	2	0,046	0,017	39,6
7	0,012	0,015	28,6	3	0,032	0,013	28,0
8	0,006	0,002	13,7	8	0,012	0,005	10,1
9	0,004	0,002	9,9	9	0,006	0,005	5,4

popísané vyššie.

Zo súhrnného zhodnotenia tvorby biofilmu a adherencie buniek testovaných kmeňov za všetkých podmienok (rastové fázy, teplota, TSB/TSB+10 % NaCl) a štatistického zhodnotenia vyplýva, že kmene 2 a 3 zo skupiny perzistentných kmeňov s mierou tvorby biofilmu a adherencie 80% – 81% sú významne odlišné od neperzistentných kmeňov ( $p < 0,01$ ), okrem kmeňa 5. Kmeň 5 má výnimočné postavenie, odlišuje sa od skupiny ostatných neperzistentných kmeňov 6, 7, 8 a kontrolného kmeňa 9 a od dvoch perzistentných kmeňov 1 a 4 ( $p < 0,01$ ). Miera tvorby biofilmu a adherencie kmeňa č. 5 a perzistentných kmeňov č. 2 a 3 bola v priemere 80 % až 88 %, tieto kmene sa najviac odlišovali od ostatných hodnotených kmeňov ( $p < 0,01$ ). Zo skupiny perzistentných kmeňov sa vyníma kmeň 4, spolu s neperzistentnými a kontrolným kmeňom dosiahli mieru tvorby biofilmu priemerne 38 – 50 % a tvoria skupinu významne odlišnú od ostatných kmeňov ( $p < 0,01$ ).

## ZÁVER

Z jednotlivých výsledkov testovania daného súboru kmeňov *L. monocytogenes* izolovaných z prostredia potravinárskych výrob a výrobkov nie sú jasné korelácie medzi mierou tvorby biofilmu a adherencie s perzistenciou kmeňov. Súhrnné zhodnotenie priemerných percentuálnych hodnôt tvorby biofilmu a adherencie buniek testovaných kmeňov zo všetkých meraní však zaraďuje všetky perzistentné kmene do hornej polovice poradia podľa miery tvorby biofilmu, opäť s výnimočným postavením kmeňa č. 5, ktorého

priemerná percentuálna tvorba biofilmu zo všetkých meraní bola najvyššia.

## LITERATÚRA

- BORUCKI, M. K., PEPPIN, J. D., WHITE, D., LOGE, F., and CALL, D. R. 2003. Variation in biofilm formation among strains of *Listeria monocytogenes*. In *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 69, 2003, p. 7336-7342.
- CALY, D., TAKILT, D., LEBRET, V. and TRESSE, O. 2009. Sodium chloride affects *Listeria monocytogenes* adhesion to polystyrene and stainless steel by regulating flagella expression. In *Lett. Appl. Microbiol.*, vol. 49, 2009, p. 751-756.
- CHAVANT, P., MARTINIE, B., MEYLHEUC, T., BELLON-FONTAINE, M. N., HEBRAUD, M. 2002. *Listeria monocytogenes* LO28: Surface physicochemical properties and ability to form biofilms at different temperatures and growth phases. In *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 68, 2002, p. 728-737.
- DEAN, R. B., DIXON, W. J. 1951. Simplified statistics for small numbers of observations. In *Anal. Chem.*, vol. 23, 1951, p. 636-638.
- DJORDJEVIC, D., WIEDMANN, M., McLANDSBOROUGH, L. A. 2002. Microtiter plate assay for assessment of *Listeria monocytogenes* biofilm formation. In *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 68, 2002, p. 2950-2958.
- FARBER, J. M., PETERKIN, P. I. 1991. *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. In *Microbiol. Rev.*, vol. 55, 1991, p. 476-511.
- GRINSTEAD, D. 2009. Cleaning and sanitation in food processing environments for the prevention of biofilm formation, and biofilm removal. In *Biofilms in the Food and Beverage Industries* ed. Fratamico, P. M., Annous B. A. and Gunther IV, N. W. pp. 331-358. Cambridge: Woodhead Publishing.

KALMOKOFF, M. L., AUSTIN, J. W., WAN, X. D., SANDERS, G., BANERJEE, S., FARBER, J. M. 2001. Adsorption, attachment and biofilm formation among isolates of *Listeria monocytogenes* using model conditions. In *J. Appl. Microbiol.*, vol. 91, 2001, p. 725-734.

KOREŇOVÁ, J., LOPAŠOVSKÁ, J., KUČHTA, T. 2009. Biofilm forming bacterial contaminants in small and medium-sized ewes' milk and meat processing enterprises in Slovakia. In *J. Food Nutr. Res.*, vol. 48, 2009, p. 115-120.

LELIEVELD, H. L. M. 2006. Sources of contamination. In *Hygiene in Food Processing* ed. Lelieveld, H. L. M, Mostert, M. A. and White, B, pp. 61-75. Cambridge: Woodhead Publishing.

LIANOU, A., SOFOS, J. N. 2007. A review of the incidence and transmission of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat products in retail and food service environments. In *J. Food Prot.*, vol. 70, 2007, p. 2172-2198.

LUNDÉN, J., AUTIO, T., KORKEALA, H. 2003. Persistent and nonpersistent *Listeria monocytogenes* contamination in meat and poultry processing plants. In *J. Food Prot.*, vol. 66, 2003, p. 2062-2069.

MORETRO, T., LANGSRUD, S. 2004. *Listeria monocytogenes*: biofilm formation and persistence in food-processing environments. In *Biofilms*, vol. 1, 2004, p. 107-121.

RODRIGUES, D. A., ALMEIDA, M. A., TEIXEIRA, P. A., OLIVEIRA, R. T. and AYEREDO, J. C. 2009. Effect of batch and fed-batch growth modes on biofilm formation by *Listeria monocytogenes* at different temperatures. In *Curr. Microbiol.*, vol. 59, 2009, p. 457-462.

**Acknowledgments:**

Práca bola podporovaná medzinárodným projektom BIOTRACER - Integrated Project within the European Union 6th Framework Programme under the European Research area of Food Quality and Safety. FP6-2006-FOOD-036272.

**Contact address:**

Ing. Janka Koreňová, Food research Institute in Bratislava, Department of Microbiology, Molecular Biology and Biotechnology, Priemyselná 4, P.O.Box 25, 824 75 Bratislava 26, Slovakia, Tel.: 02/50237156, E-mail: korenova@vup.sk

Ing. Katarína Oravcová, Food research Institute in Bratislava, Department of Microbiology, Molecular Biology and Biotechnology, Priemyselná 4, P.O.Box 25, 824 75 Bratislava 26, Slovakia, Tel.: 02/50237156, E-mail: oravcova@vup.sk



doi:10.5219/140

## DETECTION OF LASALOCID RESIDUES IN THE TISSUES OF BROILER CHICKENS BY A NEW SCREENING TEST TOTAL ANTIBIOTICS

Ivona Kožárová, Jana Šimková, Mária Mártonová, Ján Mačanga, Martin Levkut

### ABSTRACT

The aim of the present study was to evaluate the microbial growth inhibition test Total antibiotics with the test organism *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* for the screening of lasalocid residues in the tissues of broiler chickens after its oral administration in medicated feed. The residues were investigated throughout the 5-day withdrawal period (WP) and also on day 6 representing the first day following the WP. All broiler chicken tissues were positive for lasalocid. The breast muscle was positive (the presence of residues at/above the detection limit /LOD/ of method) up to day 1 of the WP, the thigh muscle, gizzard, heart, skin and fat up to day 3 of the WP and the liver and kidneys up to day 4 of the WP. When evaluating the dubious results (the presence of residues just below the LOD of method), the breast muscle was suspect positive up to day 3 of the WP and the gizzard, skin and fat up to day 4 of the WP. No positive or dubious results were detected on day 5 of the WP. The LOD of *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* for maduramycin was 500 µg.l<sup>-1</sup>.

**Keywords:** lasalocid, residues, tissues of broiler chickens, screening, total antibiotics

### ÚVOD

Živé zvieratá a živočíšne produkty týchto zvierat sa vyšetrujú na prítomnosť rezíduí antibiotík a sulfónamidov v prvej fáze screeningu rezíduí použitím mikrobiálnych inhibičných testov. Cieľom týchto mikrobiologických metód je čo najskôr poskytnúť výsledok o prítomnosti alebo neprítomnosti látky vo vyšetrovaných maticiach na príslušnej úrovni (Kožárová et al., 2009a; Pikkemaat, 2009; Pikkemaat et al., 2009; Cháfer-Pericás et al., 2010; Gaudin et al., 2010).

Total antibiotics je nový mikrobiálny inhibičný test vyvinutý firmou Euroclone S.p.A. (Taliansko) na stanovenie rezíduí antibiotík v mäse a v mlieku potravinových zvierat. Vzhľadom na jeho jednoduchosť, širokospektrálnosť a krátky čas stanovenia je tento kvalitatívny screeningový test vhodný nielen na použitie v laboratóriách schválených na úradnú kontrolu prítomnosti rezíduí, ale aj v celom potravinovom reťazci.

Princípom testu Total antibiotics je inhibícia rastu testovacieho kmeňa *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* v agarovom médiu prítomnou farmakologicky účinnou látkou. Ak je vyšetovaná vzorka prostá rezíduí antibiotík, výsledkom testu je zmena farby agarového média (indikátora) z modrofialovej na žltú v dôsledku aktívneho metabolizmu testovacieho kmeňa, produkcie kyselín a poklesu hodnoty pH. Ak je vyšetovaná vzorka pozitívna na prítomnosť rezíduí antibiotík, rast testovacieho kmeňa je inhibovaný a farba agarového média (indikátora) zostáva modrofialová.

Total antibiotics je vyrábaný v dvoch formách, ako kit obsahujúci 96 testovacích skúmaviek (ampuliek, 96 analýz), a ako kit obsahujúci tri mikrotitračné platničky s ôsmymi jamkami usporiadanými v jednom rade (288 analýz). Každá súprava testu obsahuje extrakčný roztok určený na vyšetovanie vzoriek mäsa potravinových zvierat.

Firma Euroclone v súčasnosti ponúka na trh aj ďalší mikrobiálny inhibičný test, Kalidos TB (skúmavky) a MP (mikrotitračné platničky), ktorý bol od 1. 1. 2010 zaradený do zoznamu úradných metód laboratórnej diagnostiky

potravín a krmív ako metóda CH 12.21 (2009) určená na stanovenie rezíduí inhibičných látok v mlieku.

*Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* je testovací kmeň mnohých mikrobiálnych inhibičných testov (Premi<sup>®</sup> Test, Delvotest<sup>®</sup> SP-NT, mikrobiologická metóda s *Geobacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* C 953, screeningový test na stanovenie rezíduí antibiotík s použitím piatich bakteriálnych kmeňov /STAR/, atď.), vykazujúci citlivosť na viaceré antibiotiká (beta-laktámy, cefalosporíny, makrolidy, aminoglykozidy, tetracyklíny, chinolóny, amfenikoly, polypeptidy) a sulfónamidy. Fenomén citlivosti testovacieho kmeňa *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* na široké spektrum látok s farmakologickou účinnosťou bol podnetom pre smerovanie našich experimentálnych štúdií zameraných na prehodnocovanie citlivosti testovacieho kmeňa aj na ďalšiu významnú skupinu látok antibiotickej povahy používanú v chovoch zvierat produkujúcich potraviny – kokcidiostatiká a potencionálny screening rezíduí týchto látok v živočíšnych produktoch hydiny (Kožárová et al., 2002; Kožárová et al., 2008; Kožárová et al., 2009b; Kožárová et al., 2010).

Lasalocid je polyéterové ionofórové kokcidiostatikum schválené nariadením Európskeho parlamentu a Rady (ES) č. 1831/2003 ako krmna doplnková látka určená na prevenciu kokcidiózy. Kokcidióza je jedno z ekonomicky najzávažnejších ochorení, ktoré postihuje predovšetkým kurčatá a mladú hydinu, u ktorých hynutie môže často presiahnuť až 80 % (Goldová et al., 2000; Goldová et al., 2001; Goldová, 2002). Ako kokcidiostatikum sa povoľuje nariadením Komisie (ES) č. 1455/2004 pre kurčatá a nariadením Komisie (EÚ) č. 874/2010 pre morky v dávke 75 – 125 mg účinnej látky na 1 kg krmiva s ochrannou lehotou minimálne 5 dní pred zabitím. Na ochranu verejného zdravia sa nariadením Komisie (EÚ) č. 37/2010 stanovuje pre lasalocid maximálny limit rezíduí (MRL) v cieľových tkanivách hydiny nasledovne: 20 µg.kg<sup>-1</sup> svalovina, 100 µg.kg<sup>-1</sup> koža a tuk, 100 µg.kg<sup>-1</sup> pečeň, 50 µg.kg<sup>-1</sup> obličky a 150 µg.kg<sup>-1</sup> vajcia.

Prezentovaná práca sa zaoberá stanovením rezíduí lasalocidu v tkanivách brojlerových kurčiat po jeho experimentálnom podávaní v krmive použitím nového screeningového testu Total antibiotics. K stanoveniu detekčnej citlivosti testovacieho kmeňa *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* (detekčného limitu /LOD/ metódy) na lasalocid bol použitý štandard lasalocidu.

## MATERIÁL A METÓDY

### Experimentálne zvieratá

V experimente bolo použitých 80 brojlerových kurčiat (hybrid Ross 308, Animex Grupa Surowcowa Sp. z o.o., Bialystok, PL), ktoré boli náhodne rozdelené do experimentálnej a kontrolnej skupiny s počtom zvierat 40 ks v každej skupine. Zvieratá mali voľný prístup k vode a krmivu. Postup kŕmenia brojlerových kurčiat bol nasledovný: a) experimentálnej skupine zvierat bola od 1. do 18. dňa veku podávaná kŕmna zmes HYD 01 štartérová, od 19. do 35. dňa veku kŕmna zmes HYD 02 rastová, a od 36. do 42. dňa veku (ochranná lehota) kŕmna zmes HYD 03 finálna. Kŕmne zmesi boli zakúpené od spoločnosti TAJBA, a.s., α SK 100133 (Čaňa, SK). Kokcidiostatiká boli do kŕmnych zmesí zapracované nasledovne: HYD 01 – Robenidín hydrochlorid (Cycostat 66 G /6,6 % premix/, Alparma BVBA, Belgicko) v dávke 33 mg účinnej látky.kg<sup>-1</sup> krmiva a HYD 02 – Lasalocid A sodný (Avatec 150 G /15 % premix/, Alparma BVBA, Belgicko/ v dávke 100 mg účinnej látky.kg<sup>-1</sup> krmiva; b) postup kŕmenia zvierat v kontrolnej skupine bol zhodný s postupom kŕmenia zvierat v experimentálnej skupine. Zvieratám však neboli podávané kokcidiostatiká z dôvodu získania negatívnych vzoriek. Počas stanovenej ochrannej lehoty boli zvieratá v počte 2 ks/deň z každej skupiny postupne zabíjané a tkanivá (prsna svalovina, stehenná svalovina, žalúdok, pečeň, srdce, obličky, koža, tuk) boli oddelené a skladované pri teplote -20 °C do analýzy. Experiment bol schválený ŠVPS SR (č. r. 1859/09-221/3) a vykonávaný v schválenom pokusnom zariadení UVLF v Košiciach (Ústav patologickej anatómie /SK P 52004/).

### Total antibiotics (postup skúšania a vyhodnotenie výsledkov)

Vzorky tkanív boli pred vyšetrením rozmrazené a najemno nakrájané skalpelom. K 2,5 g vzorky naváženej do skúmavky sa pridalo 10 ml pracovného extrakčného roztoku pripraveného zriedením koncentrovaného extrakčného roztoku so sterilnou destilovanou vodou v pomere 1:10 (v/v). Obsah skúmavky sa dôkladne premiešal a vzorka sa nechala stáť pri izbovej teplote približne 12 – 16 hodín (cez noc). Na stanovenie rezíduí bola použitá vrchná vrstva (čirý supernatant). 200 µl vzorky sa napipetovalo do skúmavky s agarovým médiom a skúmavka sa dôkladne uzatvorila pomocou plastového viečka, ktoré sa následne prepichlo ihlou. Skúmavky sa nechali inkubovať v termobloku pri teplote 65 ± 2 °C 3 hodiny. Po troch hodinách inkubácie sa hodnotila farba agarového média. Výsledky boli vyhodnotené nasledovne: pri negatívnej vzorke a kontrole dochádza k zmene farby agarového média z fialovej na žltú, pri pozitívnej vzorke farba agarového média ostáva nezmenená (fialová). Test sa považuje za ukončený pri zmene farby negatívnej

kontroly. Ako negatívna kontrola boli použité tkanivá zvierat z kontrolnej skupiny. Nástroje a pomôcky použité na vyšetrenie vzoriek boli sterilné.

### Stanovenie LOD metódy pre lasalocid

Zásobný roztok lasalocidu s koncentráciou 500 µg.ml<sup>-1</sup> bol pripravený zriedením 5 mg štandardu lasalocidu (Sigma L1021, USA) v 10 ml metanolu p.a. čistoty (Merck, Nemecko). Pracovné roztoky lasalocidu boli pripravené ďalším riedením zásobného roztoku sterilnou destilovanou vodou na finálnu koncentráciu 10 µg.l<sup>-1</sup>. Zásobný roztok a pracovné roztoky lasalocidu boli uchovávané v chladničke pri teplote +4 °C.

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

Výsledky stanovenia rezíduí lasalocidu v tkanivách brojlerových kurčiat po jeho experimentálnom podávaní v krmive použitím screeningového testu Total antibiotics sú prezentované v tabuľke 1. Vzorky tkanív boli vyšetrované na prítomnosť rezíduí lasalocidu nielen počas stanovenej 5-dňovej ochrannej lehoty, ale aj v posledný deň podávania lasalocidu v krmive (0-tý deň) a v prvý deň po ukončení stanovenej 5-dňovej ochrannej lehoty (6-ty deň).

**Tabuľka 1** Pozitívne a negatívne výsledky stanovené pri vyšetrovaní tkanív brojlerových kurčiat použitím testu Total antibiotics po experimentálnom podávaní lasalocidu v krmive

Matrica	Deň ochrannej lehoty							Kontrola
	0	1	2	3	4	5	6	
Stehno	+	+	±	+	-	-	-	-
Prsia	+	±	±	±	-	-	-	-
Žalúdok	+	+	±	+	±	-	-	-
Pečeň	+	+	±	+	+	-	-	-
Srdce	+	+	+	+	-	-	-	-
Obličky	+	+	±	+	+	-	-	-
Koža	+	+	±	+	±	-	-	-
Tuk	+	+	±	+	±	-	-	-

+

 pozitívny výsledok, ± dubiózny výsledok, - negatívny výsledok

Total antibiotics detegoval prítomnosť rezíduí lasalocidu vo všetkých vyšetrovaných matriciach brojlerových kurčiat. Fialové zafarbenie agarového média bolo výsledkom inhibície rastu testovacieho kmeňa *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* podávanou farmakologicky účinnou látkou. Všetky možné farebné odtiene od žltej po fialovú, pri ktorých nevieme jednoznačne rozhodnúť, či výsledok testu je pozitívny alebo negatívny, sú spôsobené obmedzením rastu testovacieho kmeňa prítomnosťou inhibičných faktorov vo vzorkách, akými sú antibiotiká, tesne pod LOD metódy. Tieto vzorky by mali byť jednoznačne považované za suspektné (dubiózne).

Prsna svalovina bola pozitívna (prítomnosť rezíduí lasalocidu na/nad LOD metódy) do 1. dňa ochrannej lehoty, stehenná svalovina, žalúdok, srdce, koža a tuk do

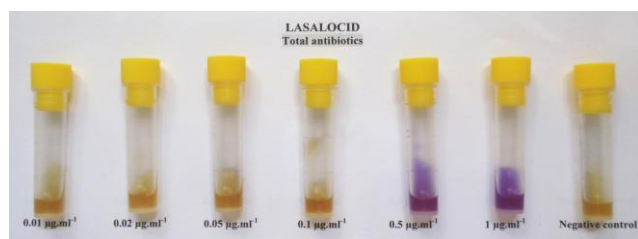
3. dňa ochrannej lehoty a pečeň a obličky do 4. dňa ochrannej lehoty. Pri hodnotení výsledku testu na základe dubióznych výsledkov (prítomnosť rezíduí lasalocidu tesne pod LOD metódy), môžeme považovať prsnú svalovinu za potencionálne pozitívnu do 3. dňa ochrannej lehoty a žalúdok, kožu a tuk až do 4. dňa ochrannej lehoty. Na piaty deň ochrannej lehoty neboli už detegované žiadne pozitívne ani dubiózne výsledky. Uvedené výsledky poukazujú na dostatočnosť 5-dňovej ochrannej lehoty stanovenej pre lasalocid, ktorá je potrebná na zabezpečenie, že tkanivá a živočíšne produkty zvierat neobsahujú reziduá v množstvách prekračujúcich MRL. Vzorky tkanív brojlerových kurčiat z kontrolnej skupiny boli negatívne na prítomnosť rezíduí lasalocidu.

LOD metódy je najmenšie množstvo analytu, ktoré inhibuje rast testovacieho kmeňa prezentovaný zachovaním farby agarového média. LOD metódy pre lasalocid bol stanovovaný použitím štandardu lasalocidu testovaného v reziduálnych koncentráciách 10 - 1000 µg.l<sup>-1</sup>. Detekčná citlivosť testovacieho kmeňa *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* screeningového testu Total antibiotics na lasalocid je prezentovaná v tabuľke 2.

**Tabuľka 2** LOD screeningového testu Total antibiotics pre lasalocid

Total Antibiotics	Koncentrácia (µg.l <sup>-1</sup> )				
	10	50	100	500	1000
	-	-	-	+	+

LOD metódy pre lasalocid bol detegovaný na úrovni 500 µg.l<sup>-1</sup> (obr. 1). Vzhľadom na MRL stanovený pre lasalocid v tkanivách a živočíšnych produktoch hydiny nariadením Komisie (EÚ) č. 37/2010 od 20 – 150 µg.kg<sup>-1</sup> môžeme konštatovať, že citlivosť testovacieho kmeňa *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* na lasalocid nie je na požadovanej úrovni. Inhibícia rastu testovacieho kmeňa však bola jednoznačne potvrdená. Dubiózne výsledky naznačujú možnú prítomnosť rezíduí lasalocidu v tkanivách brojlerových kurčiat aj v koncentráciách nižších ako je LOD metódy.



**Obrázok 1** LOD screeningového testu Total antibiotics pre lasalocid

## ZÁVER

Mikrobiálny inhibičný test je vhodný na stanovenie rezíduí antibiotík, ak deteguje reziduá príslušných látok v koncentráciách ich stanovených MRL. Total antibiotics vyvinutý firmou Euroclone S.p.A. (Taliansko) deklaruje citlivosť testovacieho kmeňa *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* na mnohé významné antibiotiká používané vo veterinárnej medicíne a jeho využitie pre screening rezíduí týchto látok v mäse a v mlieku

potravinových zvierat na požadovanej úrovni. Uvedený screeningový test bol použitý aj na stanovenie rezíduí lasalocidu v tkanivách brojlerových kurčiat po jeho experimentálnom podávaní v krmive. LOD metódy pre lasalocid (500 µg.l<sup>-1</sup>) bol síce nad úrovňou MRL stanoveného pre lasalocid v tkanivách a živočíšnych produktoch hydiny (20 – 150 µg.kg<sup>-1</sup>), ale pozitívne (dubiózne) výsledky detegované až do 4. dňa ochrannej lehoty potvrdzujú riziko prítomnosti rezíduí lasalocidu v tkanivách brojlerových kurčiat a možné ovplyvnenie zdravia obyvateľstva. Každý pozitívny výsledok však musí byť jednoznačne potvrdený príslušnou konfirmačnou metódou.

## LITERATÚRA

CH 12.21. 2009. Stanovenie rezíduí inhibičných látok v mlieku metódou Kalidos TB, MP. In *Zoznam úradných metód laboratórnej diagnostiky potravín a krmív*. Vestník Ministerstva pôdohospodárstva Slovenskej republiky, vol. 41, 2009, no. 25, p. 6-10.

CHÁFER-PERICÁS C, MAQUIEIRA Á, PUCHADES R. 2010. Fast screening methods to detect antibiotic residues in food samples. In *Trends in Analytical Chemistry*, vol. 29, 2010, no. 9, p. 1038-1049.

GAUDIN, V., HEDOU, C., RAULT, A., VERDON, E. 2010. Validation of a Five Plate Test, the STAR protocol, for the screening of antibiotic residues in muscle from different animal species according to European Decision 2002/657/EC. In *Food Additives and Contaminants A*, vol. 27, 2010, no. 7, p. 935-952.

GOLDOVÁ, M. 2002. Kokcidióza hydiny. In *Slovenský veterinársky časopis*, 2002, no. 6, p. 30-32.

GOLDOVÁ, M., PISTL, J., LETKOVÁ, V., CSIZSMÁROVÁ, G., REVAJOVÁ, V., LOÓSZOVÁ, A., LEVKUT, M. 2000. Cellular immunological responses of pheasant during endogenous development of *Eimeria colchici*. In *Parasitology International*, vol. 49, 2000, p. 47-154.

GOLDOVÁ, M., REVAJOVÁ, V., PISTL, J., LETKOVÁ, V., LEVKUT, M., WAGSHAL, E., CSIZSMÁROVÁ, G., LOÓSZOVÁ, A. 2001. *Eimeria colchici* and immunocompetent cells in specific and non-specific hosts. In *Acta Parasitologica*, vol. 46, 2001, no. 1, p. 39-44.

KOŽÁROVÁ, I., JANOŠOVÁ, J., MÁTÉ, D., TKÁČIKOVÁ, S. 2009a. Evaluation of different microbial inhibition tests for the detection of sulphamethazine residues in the edible tissues of rabbits. In *Food Additives and Contaminants A*, vol. 26, 2009, no. 7, p. 978-987.

KOŽÁROVÁ, I., MAČANGA, J., GOLDOVÁ, M., MAJOR, P., KORÉNEKOVÁ, B. 2009b. Komparatívna štúdia stanovenia prítomnosti rezíduí vybraných kokcidiostatík v tkanivách kurčiat a bažantov. In *Potravinárstvo*, vol. 3, 2009, no. 2, p. 40-44.

KOŽÁROVÁ, I., MAČANGA, J., ŠIMKOVÁ, J., MAĎAROVÁ, M., SÝKOROVÁ GOFFOVÁ, Z., LEVKUT, M. ml., MAJOR, P. 2010. Stanovenie prítomnosti rezíduí lasalocidu v tkanivách brojlerových kurčiat. In *Proceeding Book of X International Scientific Conference on Risk Factors of Food Chain*, 13 – 14 September, 2010, Nitra. Nitra : Slovak University of Agriculture, 2010, p. 196–201. ISBN 978-80-552-0436-9.

KOŽÁROVÁ, I., MÁTÉ, D., CABADAJ, R., RÓŽAŇSKA, H., HUSSEIN, K., LACIAKOVÁ, A. 2002. An evaluation of the microbiological diffusion methods as a tool for screening

monensin residues in the tissues of broiler chickens. In *Folia Veterinaria*, vol. 46, 2002, no. 1, p. 27-33.

KOŽÁROVÁ, I., SÝKOROVÁ GOFFOVÁ Z., MÁTÉ, D. 2008. Detection of maduramycin residues in the tissues of broiler chicken by using the Premi<sup>®</sup>Test and the STAR. In *Slovak Journal of Animal Science*, vol. 41, 2008, p. 206.

NARIADENIE (ES) č. 1831/2003 EURÓPSKEHO PARLAMENTU A RADY z 22. septembra 2003 o doplnkových látkach určených na používanie vo výžive zvierat. In *Úradný vestník Európskej únie L 268*, 18. 10. 2003, p. 29-43.

NARIADENIE KOMISIE (ES) č. 1455/2004 zo 16. augusta 2004 o povolení doplnkovej látky do krmív „Avatec 15 %“ patriacej do skupiny kokcidostatiká a iné liečivé látky na desať rokov. In *Úradný vestník Európskej únie L 269*, 17. 8. 2004, p. 14-16.

NARIADENIE KOMISIE (EÚ) č. 37/2010 z 22. decembra 2009 o farmakologicky účinných látkach a ich klasifikácii, pokiaľ ide o maximálne limity rezíduí v potravinách živočíšneho pôvodu. In *Úradný vestník Európskej únie L 15*, 20. 1. 2010, p. 1-72.

NARIADENIE KOMISIE (EÚ) č. 874/2010 z 5. októbra 2010 o povolení sodnej soli lasalocidu A ako kŕmnej doplnkovej látky pre morky vo veku do 16 týždňov, ktorým sa mení a dopĺňa nariadenie (ES) č. 2430/1999. In *Úradný vestník Európskej únie L 263*, 6. 10. 2010, p. 1-3.

PIKKEMAAT, M. G., 2009: Microbial screening methods for detection of antibiotic residues in slaughter animals. In *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, vol. 395, 2009, no. 4, p. 893-905.

PIKKEMAAT, M. G., RAPALLINI, M. L. B. A., OOSTRA-VAN DIJK, S., ELFERINK A. J. W. 2009. Comparison of three microbial screening methods for

antibiotics using routine monitoring samples. In *Analytica Chimica Acta*, vol. 637, 2009, no. 1-2, p. 298-304.

### Acknowledgements:

This study was supported by VEGA grant 1/0658/09.

### Contact address:

doc. MVDr. Ivona Kožárová, PhD., Department of Food Hygiene and Technology, Institute of Food Hygiene and Technology, University of Veterinary Medicine and Pharmacy in Košice, Komenského 73, 041 81 Košice, Slovakia, E-mail: kozarova@uvm.sk

MVDr. Jana Šimková, PhD., Department of Chemistry, Biochemistry and Biophysics, Institute of Biochemistry, University of Veterinary Medicine and Pharmacy in Košice, Komenského 73, 041 81 Košice, Slovakia, E-mail: simkova@uvm.sk

MVDr. Mária Mártonová, PhD., Department of Chemistry, Biochemistry and Biophysics, Institute of Biochemistry, University of Veterinary Medicine and Pharmacy in Košice, Komenského 73, 041 81 Košice, Slovakia, E-mail: martonova@uvm.sk

MVDr. Ján Mačanga, Department of Food Hygiene and Technology, Institute of Food Hygiene and Technology, University of Veterinary Medicine and Pharmacy in Košice, Komenského 73, 041 81 Košice, Slovakia, E-mail: jan.macanga@gmail.com

MVDr. Martin Levkut, Department of Pathological Anatomy and Pathological Physiology, Institute of Pathological Physiology, University of Veterinary Medicine and Pharmacy in Košice, Komenského 73, 041 81 Košice, Slovakia, E-mail: levkutm@uvm.sk

## STALING OF BAKERY PRODUCTS

Michal Magala, Zlatica Kohajdová, Jolana Karovičová

### ABSTRACT

The aim of this work was to write down a review article about various aspects connected with staling of bakery products. Shelf life is directly associated with the staling process, which depends on the composition of bakery products and important are storage conditions as well. In the article are described particular components (starch, nonstarch polysaccharides, water) and how they affect the staling process. Generally during staling of bakery products occur processes related with starch retrogradation, moisture redistribution from the crumb to the crust and other interactions between components. Staling process could be delayed by using various bakery improvers like enzymes, hydrocolloids, emulgators and other compounds. Also useful is the application of suitable packaging techniques.

**Keywords:** bakery products, staling, starch retrogradation, moisture redistribution, bakery improvers

### ÚVOD

Starnutie chleba je zodpovedné za významné ekonomické straty pre pekárenské výroby aj pre spotrebiteľov (Giménes et al., 2007).

Starnutím pečiva sa z mäkkej, ľahko stlačiteľnej, pružnej a nedrobivej striedky stáva tvrdá, ťažko stlačiteľná a drobivá. Kôrka, ktorá je po upečení chrumkavá, tvrdá a lesklá sa stáva mäkkou, pružnou a zvrásnenou. Okrem toho sa stráca aj charakteristická príjemná vôňa čerstvého pečiva (Hampl et al., 1981). Podľa Vestníka Ministerstva pôdohospodárstva Slovenskej republiky je starnutie chleba a pečiva definované ako proces, pri ktorom počas skladovania, ďalšej manipulácie a uvádzania do obehu prebiehajú zmeny v kvalite striedky a kôrky v dôsledku retrogradácie škrobu a migrácie vlhkosti zo striedky do kôrky (Vestník Ministerstva pôdohospodárstva Slovenskej republiky, 2002).

### MECHANIZMUS STARNUTIA

V tabuľke 1 sú uvedené zmeny základných zložiek (škrob, lepek, tuky) medzi čerstvým a starnúcim chlebom.

V procese starnutia podstupuje škrob významné zmeny. Rýchlosť retrogradácie závisí od teploty prostredia, vlhkosti (obsahu vody v škrobovom maze) a od druhu škrobu a spôsobuje zmenu viskozity. Prítomnosť solí alebo cukrov stupeň retrogradácie znižuje a vplyv jednotlivých cukrov závisí napr. na ich koncentrácii. Retrogradácia je potlačovaná aj v prítomnosti tukov tvorbou inkluzných zlúčenín s amylózou (Velíšek, 2002).

Neškrobové polysacharidy pšeničnej múky tvoria arabinoxylány, arabinogalaktány a pentózany (Gray a

Bemiller, 2003). Prídavok 0,5 – 2,0 % pentózanov rozpustných vo vode zväčší objemu bochníka a výrazne zníži rozsah starnutia. Mechanizmus ich pôsobenia nespočíva v ovplyvňovaní retrogradácie škrobu, ale v ich schopnosti naviazať veľké množstvo vody. Tento zmäkčujúci účinok pozitívne vplýva na vlastnosti striedky, pričom striedka zostáva mäkká počas dlhšieho časového obdobia (Chinachoti a Vodovotz, 2001).

Migrácia vlhkosti zapríčiňuje najmä vysychanie striedky, súvisiace s vyrovnávaním vlhkosti medzi striedkou a kôrkou. Chladnutím čerstvo upečeného chleba sa v bochníku vytvára gradient vlhkosti. Presun vlhkosti zo striedky do kôrky spôsobujú rozdiely medzi parciálnymi tlakmi pár v kôrke a vo vnútri bochníka. Obsah vlhkosti v centre bochníka sa znižuje, zatiaľ čo vo vonkajších častiach narastá (Chinachoti a Vodovotz, 2001). Podľa Fesasa et al. (1998) možno predpokladať, že rozsah starnutia úzko súvisí s obsahom vlhkosti, nakoľko spozoroval pomalšie starnutie chlebov s vyšším obsahom vlhkosti.

Pekárske technologické a zlepšujúce prípravky sú potravinárske aditíva určené k vyrovnávaniu meniacich sa technologických vlastností surovín, zjednodušujú a uľahčujú technológiu výroby a zvyšujú kvalitu. Tieto prípravky môžu mať rôzne vlastnosti a vplyvy ako sú: zlepšenie spracovateľských vlastností cesta a kvality hotových výrobkov, urýchlenie kysnutia, zvýšenie kvasnej stability a tolerancie cesta, optimalizácia kyslosti cesta, ovplyvnenie farby kôrky a striedky a nárast množstva vody v ceste a jej lepšie viazanie (Szemes a Mainitz, 1999).

Tab. 1 Fyzikálno-chemický stav základných zložiek v čerstvom a starnúcom chlebe (Gray a Bemiller, 2003)

	ŠKROB	LEPOK	TUKY
ČERSTVÝ CHLEB	Škrobové zrná aj neporušené, aj zmazované a zdeformované, vznik interakcií škrob-škrob medzi jednotlivými zrnami, čiastočná strata dvojzávitnicovej štruktúry amylopektínu.	Denaturovaný, zosieťovaný, možný vznik fibrilárnych štruktúr medzi lepkom a škrobom počas pečenia.	Niektoré molekuly tukov sú komplexne viazané s amylózou (vo vnútri aj vonku zrn), iné voľné.
STARNÚCI CHLEB	Amylopektín retrogradovaný vnútri zmazovaných zrn, iné molekuly amylopektínu vonku zo zrn, amylóza retrogradovaná ako aj komplexne viazaná s tukmi.	Lepková sieť uvoľňuje vodu, ktorú následne viaže škrob a nastáva kryštalizácia amylopektínu.	Nezmenené od čerstvo upečeného chleba.

Spôsoby pre zvýšenie trvanlivosti pekárenských produktov zahŕňajú použitie rôznych enzýmov, hydrokoloidov a emulgátorov (Haros et al., 2002).

### ENZÝMY

Podľa Selinheima et al. (2006), je jednou z možností predĺženia trvanlivosti pekárenských výrobkov a zníženia miery starnutia chleba aplikácia enzýmových prípravkov.

V komerčnom pekárstve sa najbežnejšie používajú  $\alpha$ -amylázy a proteázy. (Selinheimo et al., 2006). Pridavok amyláz zvyšuje množstvo fermentovateľných a redukujúcich cukrov v múke a ceste, čo podporuje fermentáciu kvasiniek a vznik produktov Maillardových reakcií zintenzívňujúcich vôňu a farbu kôrky (Goesaert et al., 2009).

V pekárstve existujú tri zdroje  $\alpha$ -amyláz: bakteriálne, plesňové a sladové. Z týchto zdrojov majú pozitívne účinky na starnutie pekárenských výrobkov iba plesňové a bakteriálne. Tieto dva typy enzýmov sa líšia v tepelnej stabilite. Bakteriálne  $\alpha$ -amylázy majú síce výraznejší účinok proti starnutiu, ale sú vysoko tepelne stabilné a ich pokračujúca aktivita počas pečenia má za následok chlieb s nedokonalou štruktúrou a lepivou striedkou. Plesňové  $\alpha$ -amylázy sú menej tepelne stabilné a sú inaktivované na začiatku pečenia. Výsledkom je chlieb s väčším objemom a dobrou štruktúrou striedky, ale ich účinnosť pri spomaľovaní starnutia je nižšia (Randez-Gil et al., 1995).

Dextríny s rôznym stupňom polymerizácie vznikajú pôsobením  $\alpha$ -amyláz degradáciou molekúl amylopektínu a v chlebe zotrávajú aj po vypečení. Miyazaki et al. (2004) zakomponovaním 2,5 % nízko molekulárnych dextrínov s hodnotami dextrózového ekvivalentu DE 19, 25 a 40 zistili značné spomalenie retrogradácie na rozdiel od vysoko molekulárnych dextrínov DE 8 a 11. Účinok pôsobenia dextrínov súvisí s narúšaním vzniku vodíkových väzieb medzi škrobom a bielkovinami (Gerrard et al., 1997, Miyazaki et al., 2004).

Okrem amylolytických enzýmov sa aplikujú aj enzýmy rozkladajúce neškrobové polysacharidy, avšak ich účinky na predĺženie trvanlivosti sú nejasné. Xylanázy hydrolyzujú pentózy prítomné v pšeničnej múke a urýchľujú proces pečenia napomáhaním k rozkladu polysacharidov v ceste (Giménez et al., 2007).

Endo-1,4- $\beta$ -xylanáza náhodne atakuje hlavný reťazec arabinoxylánu, čo spôsobuje zníženie stupňa polymerizácie a výrazne vplyva na štruktúru a funkčnosť arabinoxylánu. Vo vhodných dávkach (1 %) xylanázy zlepšujú spracovateľnosť a stabilitu cesta, štruktúru striedky, zvyšujú objem bochníka a predlžujú trvanlivosť. Hydrolytickým pôsobením xylanáz sa uvoľňujú voľné cukry - pentózy, ktoré využívajú mikroorganizmy pri fermentačnom procese. Naviac endoxylanázy uvoľňujú zdraviu prospešné xylooligosacharidy, ktoré pozitívne vplyvajú na žalúdočnú a črevnú mikroflóru (Shah et al., 2006).

Pridavok proteolytických enzýmov má za následok dosiahnutie počiatočnej mäkkosti striedky, zvýšenie aktivity kvasiniek a endogénnych enzýmov múky, zlepšenie chute a vône a predĺženie trvanlivosti pôsobením na hlavné funkčné biopolyméry múky (Collar et al., 2005).

Transglutamináza mikrobiálneho pôvodu, proteín-glutamín  $\gamma$ -glutamyltrans-feráza katalyzuje reakcie

prenosu acylov predstavujúce kovalentné zosieťovanie proteínov, peptidov a primárnych aminor, deamináciu glutamínových zvyškov a začlenenie aminor do iných štruktúr. Reakcie katalyzované týmto druhom enzýmov upravujú funkčné vlastnosti pekárenských výrobkov prostredníctvom spájania a polymerizácie proteínov pomocou disulfidických väzieb vytváraných pri miesení cesta, čím vzniká proteínová sieť s viskoelastickými vlastnosťami potrebnými pri výrobe chleba (Collar et al., 2005).

V súčasnosti je výskum v oblasti enzýmov zameraný na aplikáciu lipolytických enzýmov do pekárenských výrobkov. Používajú sa hlavne fosfolipázy ako náhrady alebo prídavky namiesto tradičných emulgátorov. Lipázy hydrolyzujú estery triacylglycerolov za vzniku mono- alebo diacylglycerolov, glycerolu a voľných mastných kyselín. Pochádzajú z plesňových alebo bakteriálnych zdrojov a svojim pôsobením zapríčiňujú zvýšenie stability cesta a objemu chleba, zlepšujú štruktúru striedky a predlžujú trvanlivosť výrobku (Kirk et al., 2002, Moayedallaie et al., 2010).

### HYDROKOLOIDY

Hydrokoloidy sú pridávané do pekárenských výrobkov s cieľom zadržať vlhkosť, čím sa predĺži trvanlivosť výrobku. Ďalej sú schopné stabilizovať pekárenské produkty počas cyklu: zmrazovanie – rozmrazovanie a napomáhajú tak minimalizovať negatívne účinky vznikajúce pri zmrazovaní a uskladňovaní produktov na báze škrobu (Bárceñas et al., 2004).

Účinok hydrokoloidov vyplýva z dvoch protikladných javov: prvý je zvýšenie tvrdosti ako následok poklesu napučievania škrobových granúl a vylúhovania amylozy; a druhý jav spôsobuje oslabenie štruktúry škrobu v dôsledku inhibície spájania reťazcov amylozy, aj keď dopad každého javu závisí od druhu použitého hydrokoloidu (Kohajdová a Karovičová, 2009).

Aplikácia hydrokoloidov v malých množstvách (<1 hmotn. % v múke) má za následok zvýšenú schopnosť viazať vodu vo výrobku, zvýšenie objemu bochníka ako aj pokles tvrdosti a zníženie rozsahu retrogradácie škrobu (Collar et al., 1999).

Vlastnosti hydrokoloidov vo veľkej miere ovplyvňuje pôvod a chemickú štruktúru. Adíciou metylových a hydroxypropylových skupín na molekulu celulózy vzniká hydroxypropylmetylcelulóza (HPMC). Tento hydrokoloid sa prednostne viaže na škrob. Obmedzuje priebeh retrogradácie amylopektínu, čím sa predlžuje trvanlivosť výrobku. Okrem toho HPMC zlepšuje kvalitatívne parametre (väčší objem, mäkkšia štruktúra striedky, nižšie straty vlhkosti pri skladovaní). Iný derivát celulózy, karboxymetylcelulóza (CMC) preferuje interakcie s lepokom. Roztoky CMC sú stabilné a vysoko viskózne. Zahriatím pri pečení však viskozita klesá. CMC má vysokú schopnosť absorpcie vody a zlepšuje suspendáciu a rovnomerné rozdelenie pridávaných zložiek vo výrobku (Guarda et al., 2004, Kohajdová a Karovičová, 2009).

Xantánová guma produkuje baktéria *Xanthomonas campestris*. Chemickú štruktúru xantánu možno popísať

ako molekuly glukózy spojené  $\beta$ -1,4-glykozidovou väzbou s vetvením na treťom atóme uhlíka molekuly glukózy, pričom vetvy obsahujú manopyranózové jednotky. Nízke koncentrácie xantánovej gummy (0,1-0,4 %) poskytujú stabilitu počas skladovania výrobkov a má taktiež schopnosť viazať vodu. Zamedzuje vzniku hrudiek počas hnetenia a zlepšuje aj homogenitu cesta (Collar et al., 1999, Kohajdová a Karovičová, 2009).

V potravinárskom priemysle je guarová guma používaná ako zahusťovadlo a stabilizátor rôznych druhov potravín, obvyčajne v množstvách < 1 hmotnostné %. Získava sa zo semien strukovinej rastliny *Cyamopsis tetragonolobus*. Po chemickej stránke je guarová guma galaktomanán, ktorého hlavný reťazec pozostáva z  $\beta$ -D-manopyranózových jednotiek spojených 1,4-glykozidovou väzbou a vetvením na pozícií 6 s  $\alpha$ -D-galaktózou. V pekárenských výrobkoch guarová guma spomaľuje starnutie prostredníctvom zmäkčujúceho účinku spôsobeného inhibíciou retrogradácie amylopektínu, pretože sa prednostne viaže na škrob (Kohajdová a Karovičová, 2009).

Algináty sa získavajú z hnedých rias (*Macrocystis pyrifera*, *Ascophyllum nodosum* a *Laminaria hyperborea*) a základná jednotka kyselina alginová sa skladá z troch častí polymérneho reťazca: jedna časť pozostáva výlučne z dielov kyseliny D-manurónovej, druhá z kyseliny L-gulurónovej a tretia v meniacom sa pomere zvyškov kyseliny D-manurónovej a L-gulurónovej. Použitie alginátov v množstvách 0,5 – 1,5 % dodáva pekárskym krémom stabilitu počas cyklu zmrazovanie/rozmrázovanie, znižuje syneréziu, predlžuje trvanlivosť výrobkov a umožňuje zadržať vlhkosť v chlebe a zákusoch počas uskladňovania (Kohajdová a Karovičová, 2009).

Karagénany sú extrakty z červených rias. Je to lineárny polysacharid a základnú štruktúrnú jednotku tvorí len D-galaktopyranóza (neobsahuje L-galaktózu). Sú čiastočne sulfónované a podľa stupňa esterifikácie sa delia na frakcie jota, kappa a lambda. Karagénany sa vyznačujú schopnosťou reagovať s lepkovými proteínmi a vytvárať gély znášajúce vysoké teploty pri pečení a nízke teploty zmrazovania bez zmeny štruktúry s stratou vody. Do pekárenských výrobkov sa aplikuje najmä kappa-karagénan zvyšujúci objem a predlžujúci trvanlivosť výrobkov (Kohajdová et al., 2008).

Tragakantová guma sa získava z kmeňa ázijských stromov druhu *Astragalus* a základná jednotka chemickej štruktúry pozostáva z  $\beta$ -D-xylopyranózy,  $\beta$ -L-arabino-furanózy,  $\alpha$ -D-galaktopyranurónovej kyseliny, metyl  $\alpha$ -D-galaktopyranuronátu,  $\beta$ -D-galaktopyranózy a  $\alpha$ -L-fukopyranózy. Táto guma stabilizuje náplne a polevy s obsahom ovocia a ovocných pretlakov a poskytuje im lesklý a priesvitný vzhľad, krémovú chuť a dobrú trvanlivosť. Maximálne povolené množstvo je do pekárenských výrobkov 0,2 % (Kohajdová a Karovičová, 2009).

Účinným prostriedkom spomaľovania starnutia je použitie 0,1–0,9 hmotnostných % karbovej gummy. Získava sa z indického stromu *Sterculia urens*. Hlavný reťazec tvorí  $\alpha$ -D-galakturónová kyselina a  $\alpha$ -L-ramnózové zvyšky, postranné reťazce tvorí väzbou

1,2 pripojená  $\beta$ -D-galaktóza alebo väzbou 1,3 pripojená kyselina  $\beta$ -D-glukurónová. Vyznačuje sa jedinečnými vlastnosťami ako vysoká napučiacia schopnosť, schopnosť zadržiavať vodu a vysoká viskozita. (Kohajdová a Karovičová, 2009).

Gelanová guma je pre potravinárske aplikácie zaujímavá vďaka svojim fyzikálnym vlastnostiam ako vysoká viskozita, odolnosť voči vysokým teplotám, kyselinám a pôsobeniu enzýmov. Gelanová guma tiež vytvára povlaky a filmy, ktoré znižujú absorpciu oleja vytváraním účinnej bariéry (Kohajdová a Karovičová, 2009).

### EMULGÁTORY

V pekárskej výrobe sa využívajú emulgátory kvôli nasledovným technologickým vlastnostiam: zlepšenie charakteristik cesta a to kvasnej tolerancie a stability cesta, zlepšenie kvality striedky, vyššia schopnosť zadržať plyny v ceste a následné zväčšenie objemu, predĺženie trvanlivosti a emulgácia tukov. Pri predlžovaní trvanlivosti účinne pôsobia najmä lecitín a monoacylglyceroly (Stampfli a Nersten, 1995).

Bolo dokázané, že emulgátory zabraňujú tvrdnutiu striedky, ktoré sa spája so starnutím. Ich účinok pri spomaľovaní starnutia vyplýva z interakcií so škrobom, spomaľovaním procesu retrogradácie, zabraňovaním presunu vlhkosti medzi lepkom a škrobom a chráni tým škrob pred prijímaním vody. Pokles množstva nasiaknutej vody škrobom vytvára viac vody dostupnej pre hydratáciu lepku, čo sa považuje za príspevok k spomaľovaniu starnutia (Kohajdová et al., 2009).

Acylglyceroly, veľmi dôležité deriváty lipidov, patria k neiónovým povrchovo aktívnym látkam a používajú sa v emulziách typu voda v oleji (W/O) (Szelağ a Zwierzykowski, 1999).

Monoacylglyceroly ovplyvňujú trvanlivosť tým, že vytvárajú komplexné zlúčeniny s amylozou, ktoré sú nerozpustné vo vode a z toho dôvodu komplexne viazaná amyloza nepodstupuje retrogradáciu a neprispieva tak ku procesu starnutia (Stampfli a Nersten, 1995, Szemes a Mainitz, 1999).

Stearyl-2-mliečnan sodný (SSL) je aniónový emulgátor zlepšujúci toleranciu a odolnosť cesta pri miešení, zväčšuje objem výrobku, pozitívne vplyva na tokové vlastnosti spojené s významným oneskorením tvrdnutia chleba. Táto látka môže znížiť účinky na reologické vlastnosti v dôsledku skladovania v mraze, ale nie je účinná pri spomaľovaní času kysnutia (Kohajdová et al., 2009).

Diacetylvinné estery monoacylglycerolu (DATEM) sú aniónové emulgátory typu O/W, ktoré sa zvyčajne používajú do 0,3 % hmotnosti múky. Pôsobenie DATEM ako činidla zmäkčujúceho striedku je úzko späté s interakciami so škrobom, predovšetkým s lineárnymi molekulami amylozy ako aj s amylopektínom. Tvorba týchto komplexov potláča starnutie chleba a to zabraňovaním retrogradácie amylozy a amylopektínu a aj znižovaním  $\beta$ -typu amylozového jadra, ktoré môže napomáhať retrogradácií amylopektínu (Kohajdová et al., 2009).

Pridavok lecitínu (6g/kg múky) zlepšuje fermentačný proces kvasiniek v ceste, zväčšuje objem bochníka o 25 %, robí štruktúru striedky kompaktnejšiu a starnutie spomaľujú hydrolyzované lecitíny. Lecitíny s vyšším zastúpením nasýtených mastných kyselín sú účinnejšie ako lecitíny s vyšším podielom nenasýtených mastných kyselín. Funkčné vlastnosti ovplyvňuje prítomnosť iných zložiek lecitínov ako sú ceramidy, glykolipidy a gangliozidy (Helmerich a Koehler, 2005).

### INÉ SPÔSOBY PREDĹŽENIA TRVANLIVOSTI

Stály problém obmedzujúci trvanlivosť je plesňová kontaminácia, ktorá predstavuje straty 1-5 % v závislosti od obdobia, druhu výrobku a spôsobu výroby. Hoci sú čerstvé pekárenské výrobky bez spór a vegetatívnych foriem plesní, nastáva ihneď po vypečení kontaminácia spórami zo vzduchu, povrchu náradia, zariadenia a použitím surových prísad ako polevy, orechy, korenie a cukor (Smith et al., 2004).

Mikrobiálne kazenie pekárenských výrobkov prevažne spôsobuje kontaminácia plesňami a kvasinkami, občas sa však pri premnožení termorezistentných spórotvorných baktérií *Bacillus subtilis* vyskytne aj nitkovitosť chleba. Plesňovú kontamináciu spôsobujú rody *Penicillium* (90 – 100 %), vyskytujú sa aj rody *Cladosporium* a *Aspergillus*. Sušienky patria k pekárenským výrobkom s nízkou hodnotou aktivity vody a kontamináciu spôsobujú rody plesní *Eurotium* sp., *Aspergillus* sp. a *Wallemia sebi*. Kontaminácia kvasinkami sa najobvyklejšie vyskytuje na krájanom a ryžovom chlebe, pričom prevládajú druhy *Endomyces fibuliger* a *Hyphopichia burtonii* (Suhr a Nielsen, 2004).

Častá je tvorba mykotoxínov pri plesnivení chleba. Na chlebe sa z producentov mykotoxínov najčastejšie vyskytujú *Aspergillus flavus* (aflatoxíny), *Aspergillus ochraceus* (ochratoxín A), *Penicillium expansum* (patulín) a *Aspergillus versicolor* (sterigmatocystín). Aflatoxíny sa najčastejšie dokazujú na splensnivenom pšeničnom a pšeničnoražnom chlebe (Görner a Valík, 2004).

V pekárstve sa k potlačeniu rastu mikroorganizmov a k predĺženiu trvanlivosti používajú aj chemické konzervačné látky, konkrétne slabé organické kyseliny ako kyselina benzoová, propiónová, sorbová a ich vápenaté, draselné a sodné soli. Antimikrobiálnu aktivitu vykazujú len nedisociované molekuly týchto kyselín. Najúčinnejšie sú v pekárskych produktoch s relatívne nízkou hodnotou pH (4,5 – 5,5) a hodnotami aktivity vody v rozmedzí 0,80 – 0,85. Používajú sa v koncentračných zastúpeniach 0,03 až 0,3 (Guynot et al., 2005).

K potlačeniu rastu plesní možno taktiež použiť etanol (5-12 hmotn. %). Etanol zabraňuje rozvoju mycélia pri raste plesní. Aplikuje sa priamo do produktu alebo sa používa enkapsulovaný etanol známy pod trhovým názvom Ethicap® (Dantigny et al., 2005).

V súčasnosti sa do popredia dostávajú alternatívne metódy na báze biokonzervácie s využitím baktérií mliečneho kysnutia. Tieto baktérie (*Lactobacillus* sp., *Pediococcus* sp.) produkujú svojim metabolizmom rôzne biologicky aktívne molekuly ako organické kyseliny (kyselina mliečna, octová, propiónová), mastné kyseliny,

peroxid vodíka a bakteriocíny, ktoré inhibujú rozvoj nežiaducej mikroflóry. Výhodné je nahradiť 50 % z množstva použitých chemických konzervačných látok baktériami mliečneho kysnutia (Gerez et al., 2009).

Balenie je posledným technologickým krokom pri výrobe pekárenských produktov. Konvenčné postupy balenia využívajú atmosférický vzduch a osvedčené obalové materiály. Avšak novodobé postupy využívajú modifikovanú atmosféru u zloženú z CO<sub>2</sub> resp. N<sub>2</sub> a špeciálne materiály umožňujúce permeabilitu inertných plynov (Kotsianis et al., 2002).

Balenie chleba do obalov s modifikovanou atmosférou MAP (z angl. modified atmosphere packaging) je zaužívané v súvislosti s predĺžovaním mikrobiologickej trvanlivosti. Z toho dôvodu je na vzostupe potreba uchovávaní chleba v baleniach s modifikovanou atmosférou zloženou z CO<sub>2</sub> samotného, alebo zo zmesi CO<sub>2</sub> a N<sub>2</sub> (Rasmussen a Hansen, 2001).

Zvýšená koncentrácia CO<sub>2</sub> v baleniach (70 – 100 %) môže vytvoriť mierne vákuum, ktoré stláča produkt a zapríčiňuje nepríjemnú kyslú chuť. Preto najvhodnejšia koncentrácia CO<sub>2</sub> v baleniach je okolo 60 % a výhodné je zakomponovanie draselnej soli kyseliny sorbovej v čo najnižších množstvách v závislosti na hodnotách pH a aktivity vody v produkte (Guynot et al., 2004).

Podľa Smitha et al. (2004) je MAP s použitím CO<sub>2</sub> účinnejšie pri nižších teplotách skladovania a k inhibícii väčšiny aeróbných spórotvorných mikroorganizmov je potrebná minimálna koncentrácia 20-30 % CO<sub>2</sub> (v/v), zatiaľ čo k predĺženiu trvanlivosti je vhodné použiť približne 60 % CO<sub>2</sub>. Výrobky sa prednostne balia po úplnom vychladnutí, pretože zabalením teplého výrobku dochádza ku kondenzácii vlhkosti v obale a na povrchu výrobku, čím sa vytvárajú vhodné podmienky pre rast plesní (Smith et al., 2004).

### ZÁVER

Čerstvé pekárenské výrobky strácajú za normálnych podmienok skladovania svoje pôvodné štruktúrne a organoleptické vlastnosti. V dôsledku retrogradácie škrobu, presunu vlhkosti zo striedky do kôrky ako aj ďalšími interakciami medzi jednotlivými komponentmi produkt tvrdne, stáva sa drobivým a stráca senzoricky príjemnú chuť a vôňu čerstvého výrobku. S cieľom predĺženia trvanlivosti a zlepšenia niektorých kvalitatívnych parametrov sa k základným receptúram výrobkov pridávajú pekárske zlepšujúce prostriedky ako enzýmy, hydrokoloidy, emulgátory a i.. Pre zaistenie mikrobiologickej bezpečnosti a dlhšie zachovanie čerstvosti výrobku sa často používa balenie finálnych výrobkov s využitím MAP technológie. Pre zvyšujúce nároky konzumentov na kvalitu, trvanlivosť a zdravotnú bezpečnosť pekárenských výrobkov sa výskumy v tejto oblasti posúvajú stále ďalej a poskytujú nové možnosti a riešenia tejto problematiky.

### LITERATÚRA

BÁRCENAS, M. E., BENEDITO, C., ROSELL, C. M., 2004. Use of hydrocolloids as bread improvers in interrupted



- baking process with frozen storage. In *Food Hydrocolloids*, vol. 18, 2004, no. 5, p. 769-774.
- COLLAR, C., ANDREU, P., MARTÍNEZ, J.C., ARMERO, E., 1999. Optimization of hydrocolloid addition to improve wheat bread dough functionality: a response surface methodology study. In *Food Hydrocolloids*, vol. 13, 1999, no.6, p. 467-475.
- COLLAR, C., BOLLAÍN, C., ANGIOLONI, A., 2005. Significance of microbial transglutaminase on the sensory, mechanical and crumb grain pattern of enzyme supplemented fresh pan breads. In *Journal of Food Engineering*, vol. 70, 2005, no. 4, p. 479-488.
- CHINACHOTI, P., VODOVOTZ, Y., 2001. *Bread staling*, CRC Press, Boca Raton 2000, 177 p., ISBN 0849387906.
- DANTIGNY, P., GUILMART, A., RADOI, F., BENSOUSSAN, M., ZWIETERING, M., 2005. Modelling the effect of ethanol on growth rate of food spoilage moulds. In *International Journal of Food Microbiology*, vol. 98, 2005, no. 3, p. 261-269
- FESSAS, D., SCHIRALDI, A., 1998. Texture and staling of wheat bread crumb: Effects of water extractable proteins and pentosans. In *Thermochimica Acta*, vol. 323, 1998, no. 1-2, p. 17-26.
- GEREZ, C. L., TORINO, M. I., ROLLÁN, G., FONT DE VALDEZ, G., 2009. Prevention of bread mould spoilage by using lactic acid bacteria with antifungal properties. In *Food Control*, vol. 20, 2009, no. 2, p. 144-148
- GERRARD, J. A., EVERY, D., SUTTIN, K. H., GILPIN, M. J., 1997. The role of maltodextrins in the staling of bread. In *Journal of Cereal Science*, vol. 26, 1997, no. 2, p. 201-209.
- GIMÉNEZ, A., VARELA, P., SALVADOR, A., ARES, G., FISZMAN, S., GARITTA, L., 2007. Shelf life estimation of brown pan bread: A consumer approach. In *Food Quality and Preference*, vol. 18, 2007, no. 2, p. 196-204.
- GOESAERT, H., SLADE, L., LEVINE, H., DELCOUR, J. A., 2009. Amylases and bread firming – an integrated view. In *Journal of Cereal Science*, vol. 50, 2009, no. 3, p. 345-352.
- GÖRNER, F., VALÍK, E., 2004. *Aplikovaná mikrobiológia požívatin*. Malé centrum, Bratislava 2004, 528 p., ISBN 80-967064-9-7.
- GRAY, J. A., BEMILLER, J. N., 2003. Bread staling: Molecular basis and control. In *Comprehensive Reviews in Food and Science and Food Safety*, vol. 2, 2003, no. 1, p. 1-21.
- GUARDA, A., ROSELL, C. M., BENEDITO, C., GALOTTO, M. J., 2004. Different hydrocolloids as bread improvers and antistaling agents. In *Food Hydrocolloids*, vol. 18, 2004, no. 2, p. 241-247.
- GUYNOT, M. E., MARÍN, S., SANCHIS, V., RAMOS, A. J., 2004. An attempt to minimize potassium sorbate concentration in sponge cakes by modified atmosphere packaging combination to prevent fungal spoilage. In *Food Microbiology*, vol. 21, 2004, no. 4, p. 449-457.
- GUYNOT, M. E., RAMOS, A. J., SANCHIS, V., MARÍN, S., 2005. Study of benzoate, propionate, and sorbate salts as mould spoilage inhibitors on intermediate moisture bakery products of low pH (4.5-5.5). In *International Journal of Food Microbiology*, vol. 101, 2005, no. 2, p.161-168.
- HAMPL, J., HOLÝ, Č., HAVEL, F., KADLEC, F., PŘÍHODOVÁ, J., 1981. *Jakost pekárenských a cukrárenských výrobků*, SNTL, Praha, 1981, 232 p., ISBN 04-818-81.
- HAROS, M., ROSELL, C. M., BENEDITO, C., 2002. Effect of different carbohydrates on fresh bread texture and bread Staling. In *European Food Research Technology*, vol. 215, 2002, p.425-430.
- HELMERICH, G., KOEHLER, P., 2005. Functional properties of individual classes of phospholipids in breadmaking. In *Journal of Cereal Science*, vol. 42, 2005, no. 2, p. 233-241.
- KIRK, O., BORCHERT, T. V., FUGLS, C. C., 2002. Industrial enzyme applications. In *Current Opinion in Biotechnology*, vol. 13, 2002, no. 4, p. 345-351.
- KOHAJDOVÁ, Z., KAROVIČOVÁ, J., 2009. Application of hydrokoloids as baking improvers. In *Chemical papers*, vol. 63, 2009, no. 1, p. 26-38.
- KOHAJDOVÁ, Z., KAROVIČOVÁ, J., GAJDOŠOVÁ, Ž., 2008. Význam hydrokoloidov v pekárstve. In *Potravinárstvo*, vol. 3, 2008, p. 9-18.
- KOHAJDOVÁ, Z., KAROVIČOVÁ, J., SCHMIDT, Š., 2009. Significance of emulsifiers and hydrocolloids in bakery industry. In *Acta Chimica Slovaca*, vol. 2, 2009, no. 1, p. 46-61.
- KOTSIANIS, I. S., GIANNOU, V., TZIA, C., 2002. Production and packing of bakery products using MAP technology. In *Trends in Food Science & Technology*, vol. 13, 2002, no. 9-10, p. 319-324.
- MIYAZAKI, M., MAEDA, T., MORITA, N., 2004. Effect of various dextrin substitutions for wheat flour on dough properties and bread qualities. In *Food Research International*, vol. 37, 2004, no. 1, p. 59-65.
- MOAYEDALLAIE, S., MIRZAEI, M., PATERSON, J., 2010. Bread improvers: Comparison of a range of lipases with a traditional emulsifier. In *Food Chemistry*, vol. 122, 2005, no. 3, p. 495-499.
- RANDEZ-GIL, F., PRIETO, J. A., MURCIA, A., SANZ, P., 1995. Construction of baker's yeast strains that secrete *Aspergillus oryzae* alpha-amylase and their use in bread making. In *Journal of Cereal Science*, vol. 21, 1995, no. 2, p. 185-193.
- RASMUSSEN, P. H., HANSEN, Å., 2001. Staling of wheat bread stored in modified atmosphere. In *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*, vol. 34, 2001, no. 7, p. 487-491.
- SELINHEIMO, E., KRUUS, K., BUCHERT, J., HOPIA, A., AUTIO, K., 2006. Effects of laccase, xylanase and their combination on the rheological properties of wheat doughs. In *Journal of Cereal Science*, vol. 43, 2006, no. 2, p. 152-159.
- SHAH, A. R., SHAH, R. K., MADAMWAR, D., 2006. Improvement of the quality of whole wheat bread by supplementation of xylanase from *Aspergillus foetidus*. In *Bioresource Technology*, vol. 97, 2006, no. 16, p. 2047-2053.
- SMITH, J. P., DAIFAS, D. P., EL-KHOURY, W., KOUKOUTSIS, J., EL-KHOURY, A., 2004. Shelf life and safety concerns of bakery products – A review. In *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, vol 44, 2004, p. 19-55.

STAMPFLI, L., NERSTEN, B., 1995. Emulsifiers in bread making. In *Food Chemistry*, vol. 52, 1995, no. 4, p. 353-360.

SUHR, K. I., NIELSEN, P. V., 2004. Effect of weak acid preservatives on growth of bakery product spoilage fungi at different water activities and pH values. In *International Journal of Food Microbiology*, vol. 95, 2004, no. 1, p. 67-78.

SZELAĞ, H., ZWIERZYKOWSKI, W., 1999. The behaviour of modified monoacylglycerol emulsifiers in emulsion systems. In *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, vol. 155, 1999, no. 2-3, p. 349-357.

SZEMES, V., MAINITZ, R., 1999. *Technológia pekárskej výroby*. Gominy, Pezinok 1999, 159 p., ISBN 80-7169-372-3.

VELÍŠEK, J., 2002. *Chemie potravin I.*, OSSIS, Tábor 2002, 343 p., ISBN 80-86659-02-3.

Výnos Ministerstva pôdohospodárstva Slovenskej republiky a Ministerstva zdravotníctva Slovenskej republiky zo 6. mája 2002 č. 1035/1/2002 – 100, ktorým sa vydáva hlava Potravinového kódexu Slovenskej republiky upravujúca jedlé obilie a výrobky z obilia. Vestník Ministerstva

pôdohospodárstva Slovenskej republiky, 34, 2002, čiastka 12, p. 40-66.

### **Acknowledgments:**

This work was supported by grant VEGA no. 1/0570/08.

### **Contact address:**

Ing. Michal Magala, Institute of Biotechnology and Food Technology, Department of Food Technology, Faculty of Chemical and Food Technology, Slovak University of Technology, Radlinského 9, 812 37 Bratislava, Slovakia, E-mail: michal.magala@stuba.sk

doc. Ing. Jolana Karovičová, PhD., Institute of Biotechnology and Food Technology, Department of Food Technology, Faculty of Chemical and Food Technology, Slovak University of Technology, Radlinského 9, 812 37 Bratislava, Slovakia, E-mail: jolana.karovicova@stuba.sk

Ing. Zlatica Kohajdová, PhD., Institute of Biotechnology and Food Technology, Department of Food Technology, Faculty of Chemical and Food Technology, Slovak University of Technology, Radlinského 9, 812 37 Bratislava, Slovakia, E-mail: zlatica.kohajdova@stuba.sk

doi: 10.5219/128

## NUTRIGENOMICS ANALYZE OF EXPRESSION OF EXTRACELLULAR LEPTIN RECEPTOR BY THE FOLLOWING ESSENTIAL OIL MONITORING AT THE AVIAN MODELS

**Lubica Mrázová, Radoslav Židek, Mária Angelovičová, Jana Tkáčová, Martin Kliment, Martin Král, Pavol Bajzík****ABSTRACT**

Leptin gene was identified in 1994 by positional cloning. His mutation is considered extreme obesity surface phenotype and infertility in *ob/ob* mice. Most of the research, which followed the discovery of this hormone, focused on the role of leptin in regulating body weight, in order to clarify the pathophysiology of obesity. Many research results show that leptin is not only important in regulating food intake and energy balance, but also performs functions such as metabolic and neuroendocrine hormone. Using herbs and essential oils depends on their antimicrobial activity. Most plants have favorable multifunctional properties, which are the specific content of bioactive components. Some authors characterize phytoactive substance such as natural substances plant origin, which leave no residues in animal products and is not necessary to keep the trade period before slaughter animals. Analyses suggest that the structural function of the receptor exists as a dimer constructively in the plasma membrane. Each receptor dimer pair is reversibly bound to one molecule of leptin. When bound, signaling pathways are responsible for beginning the activation receptor associated Janus kinase 2 (JAK2) and tyrosine phosphorylation of two key residues in the intracellular part of receptor.

**Keywords:** leptin receptor, gene expression, bird, hormone, essential oil

**ÚVOD**

Biotechnológie z hľadiska živočíšnej výroby sú orientované na využívanie živých organizmov a ich častí pre vysoko intenzívnu a opakovateľnú výrobu potravín alebo modifikáciu produktov živočíchov na špecifické použitie. Poznatky o lokalizácii a efektoch špecifických génov, ktoré v uplynulých rokoch progresívne narastali, majú význam z hľadiska kvality produkcie, resp. ďalších úžitkových charakteristík hospodárskych zvierat. Väčšina vlastností vrátane ekonomicky významných, ako je napr. produkcia mäsa a mlieka, je kódovaná viacerými génmi. Preto finálny efekt môže byť rozdielny podľa identity individuálneho špecifického génu. Dôležitá je analýza úžitkovosti u rodičov a potomkov a ich vzájomné vzťahy. Chov brojlerových kurčiat umožnil intenzívnejšie ukladanie svalovej hmoty uplatnením výsledkov stratégie genetického výberu (Havenstein et al., 2003b).

Havenstein et al. (2003b) uvádza, že produkcia kurčacieho mäsa má dôležitú úlohu z hľadiska vysokej potenciálnej produkcie v relatívne krátkom období, ale i z hľadiska vysokej dietetickej hodnoty. Vysoká potenciálna produkcia daná krátkym generačným intervalom a pomerne krátkym obdobím výkrmu brojlerových kurčiat, vysoká intenzita rastu spolu s vynikajúcimi dietetickými vlastnosťami kurčacieho mäsa predurčuje tento druh mäsa ako potravinu budúcnosti.

Aj tisícročné tradície a skúsenosti v humánom liečiteľstve poukazujú na skutočnosť, že najprirodzenejšie riešenie problematiky udržania zdravia zvierat a potravinovej bezpečnosti, je vo využívaní biologicky účinných látok rastlín. Drdák et al. (1996) uvádza, že obsahovým látkam rastlín, ako sú alkaloidy, triesloviny a silice je určená osobitná pozornosť. Použitie rastlinných silíc ako jednej z možných alternatív za kŕmne antibiotiká, ktoré kladne ovplyvnili produkciu brojlerových kurčiat potvrdili vo svojich experimentoch,

Demeterová (2004), Mudroňová et al. (2005), Angelovičová et al. (2005), Angelovičová et al. (2006) a iní.

Podľa Opletela (1998) môžu mať rastovo-stimulačné účinky aj prírodné esenciálne oleje z korenín a aromatických bylín, ako aj rastlinné extrakty obsahujúce účinné zložky. Docie a Bikle (2003) uvádzajú, že rastlinné extrakty podobne ako antibiotiká, pozitívne ovplyvňujú príjem krmiva, prírastky telesnej hmotnosti, utilizáciu živín a zlepšujú mikrobiálnu fermentáciu v čreve. Bikler (2006) poukazuje aj na skutočnosť, že použitie fytogénnych aditív stimuluje fyziologické procesy tráviacej sústavy a zlepšuje jej odolnosť voči kolonizácii patogénnou mikroflórou

Použitie bylín a esenciálnych olejov závisí od ich antimikrobiálnej aktivity. Väčšina rastlín má priaznivé multifunkčné vlastnosti, ktoré sú dané špecifickým obsahom bioaktívnych zložiek. Kamel a McKay (2003) charakterizujú fytogénne substancie ako prírodné látky rastlinného pôvodu, ktoré nezanechávajú reziduá v živočíšnych produktoch a nie je nutné dodržiavať ochrannú dobu pred jatočným zabíjaním zvierat.

Biotechnológie z hľadiska živočíšnej výroby sú orientované na využívanie živých organizmov a ich častí pre vysoko intenzívnu a opakovateľnú výrobu potravín alebo modifikáciu produktov živočíchov na špecifické použitie. Poznatky o lokalizácii a efektoch špecifických génov, ktoré v uplynulých rokoch progresívne narastali, majú význam z hľadiska kvality produkcie, resp. ďalších úžitkových charakteristík hospodárskych zvierat. Väčšina vlastností vrátane ekonomicky významných, ako je napr. produkcia mäsa a vajec, je kódovaná viacerými génmi. Preto finálny efekt môže byť rozdielny podľa identity individuálneho špecifického génu. Dôležitá je analýza úžitkovosti u rodičov a potomkov a ich vzájomné vzťahy (Bulla, 2003).

Rozdiely medzi jednotlivcami v zisku energie po nadmernom prijímaní potravy nepochybne ovplyvňuje

genotyp. Obezita následkom prejedania je jednoznačne následok exogénneho faktora.

Za fyziologických podmienok tukové tkanivo predstavuje asi 1% z hmotnosti tela. Tento stav je udržiavaný prísnymi regulačnými mechanizmami. Nadmerný príjem potravy je signálom pre mozog, znižuje sa chuť do jedla a zvyšuje sa utilizácia energie. Tento mechanizmus pôsobí ako pomalý dlhodobý feedbackový mechanizmus (**Dridi et al., 2000**).

Bez ohľadu na to, o ktorý mechanizmus regulácie ide, je isté, že bod citlivosti systému (set point) a jeho nastavená hladina určujú telesnú hmotnosť. Genetické (segregačné) experimenty ukázali, že obezita je regulovaná niekoľkými hlavnými génmi. Pokiaľ o centrálnom riadení chuti do jedla a príjmu potravy boli dôkazy, periférny článok feedbackového mechanizmu bol neznámy. Leptínový gén bol identifikovaný v roku 1994 pomocou pozičného klonovania (**Zhang et al., 1994**).

Jeho mutáza sa pokladá za podklad fenotypu extrémnej obezity a neplodnosti. Väčšina výskumu, ktorý nasledoval

po objavení tohto hormónu, sa zamerával na úlohu leptínu v regulácii telesnej hmotnosti, s cieľom objasnenia patofyziológie obezity. Mnoho výsledkov výskumu poukazuje na to, že leptín nie je dôležitý len v regulácii príjmu potravy a energetickej rovnováhy, ale plní tiež funkciu ako metabolický a neuroendokrinný hormón. (**Dridi et al., 2000**).

Bola vyklonovaná a sekvenovaná kuracia leptínová cDNA, ktorá je viac ako na 90 % identická s murínovým leptínom a viac ako na 80 % identická s väčšinou iných známych leptínových sekvencií. Navyše cDNA leptínu morky bola taktiež vyklonovaná a sekvenovaná a ukazuje veľmi vysokú podobnosť so sekvenciami kuracieho leptínu. Kurací leptín má 145 aminokyselín v porovnaní so 146 aminokyselinami u cicavčích druhov (**Taouis et al., 1998; Ashwell et al., 1999**).

Ďalšia unikátna štruktúrna črta kuracieho leptínu je, že v porovnaní s cicavčím leptínom obsahuje nepárový cytozín v pozícii 3' originálnej cDNA (bez signálneho peptidu) (**Dridi et al., 2000**).

Leptínové receptory patria do triedy I cytokínovej receptorovej rodiny. Hoci bolo nájdených šesť izoform leptínového receptora, doteraz sú známe iba dve, čo je dávané do súvislosti s intracelulárnou signalizáciou. Najdlhšia izoforma (ObRb) plnú spôsobilosť signalizácie (**Eisenberg et al., 2004**).

Analýzy naznačujú, že štruktúrna funkcia receptora existuje konštruktívne ako DIMER v plazmatickej membráne. Každý receptor dimérového páru sa reverzibilne viaže k jednej molekule leptínu. Pri viazaní, signálne dráhy sú zodpovedné za začiatok aktivácie receptorov spojených Janus kinázou 2 (JAK2) a fosforylácie tyrozínu dvoch kľúčových zvyškov na intracelulárnu časť receptora (**Bahrenberg et al., 2002**).

Osobitný význam pre narastanie účinku leptínu je naviazanie molekúl leptínu na jeho najdlhšie izoformy receptora aktivovanými radom intracelulárných signálov po JAK2 aktivácii, ktoré boli spojené s celým radom biologických akcií rôznych tkanív. Expresie dvoch najdlhších izoform leptínového receptora (ObRa a ObRb) sa zdajú byť prítomné vo všetkých cicavčích

tkanivách, aj keď ObRb je najviac exprimovaný iba v hypotalame (**Hekerman et al., 2005**).

Celková strata funkcie mutácií v izoforme leptínového receptora ObRb sa zdá byť vzácna v ľudskej populácii, ale polymorfizmy v oblasti génu, ktoré kódujú extracelulárne domény receptora nie sú nezvyčajné, a sú spojené s priberaním telesnej hmotnosti a adipocytmi (**Banks et al., 2000**).

Cieľom tejto práce bolo detegovať expresiu extracelulárneho leptínového receptora na základe analýzy cDNA u finálneho výkrmového typu brojlerových kurčiat COBB 500.

Ďalším cieľom bolo zamerať sa na rozloženie tkanivovej expresie receptora pre leptín vo vybraných orgánoch brojlerových kurčiat.

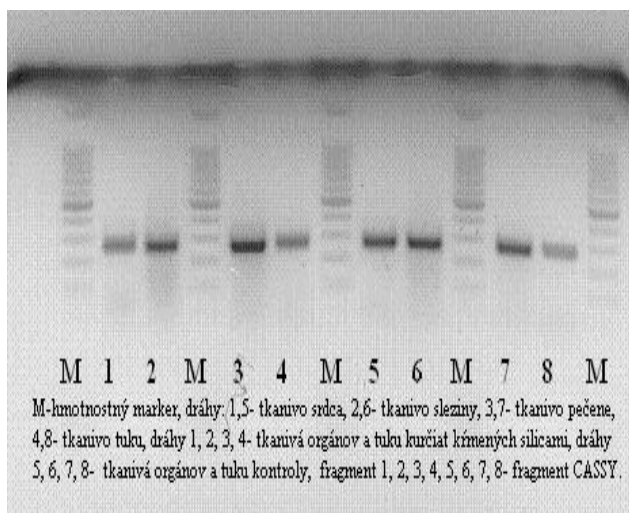
## MATERIÁL A METÓDY

Analýzy sme vykonali na vzorkách, ktoré sme získali zo skupinového experimentu s brojlerovými kurčatami. Tento experiment bol situovaný na farme s halou určenou pre chov 24 000 kusov brojlerových kurčiat určených na produkciu mäsa. Na detekciu leptínového receptora sme použili vzorky tkanív a tuku brojlerových kurčiat COBB 500. Kurčatá boli chované v hale na hlbokej podstielke s dodržaným odporúčaným svetelným režimom. V experimente bola použitá vlastná technológia kŕmenia a napájania. Pokusná skupina bola zložená zo 100 kusov brojlerových kurčiat, z ktorých sme vybrali 5 kusov rovnakej telesnej hmotnosti. Tieto brojlerové kurčatá boli použité ako reprezentatívne vzorky, z ktorých sme použili vnútorné orgány a tuk na analýzy. RNA sme vyizolovali z rozdrvených častí tkanív srdca, sleziny, pečene a extracelulárneho tuku pomocou SV Total RNA Isolation System Trial Size kit. RNA bola prepísaná reverznou transkripciou pomocou jedнокrokového - cDNA syntetizačného kitu (Amersham) s náhodnými hexamérmí ako primermi. Reakčná zmes pre PCR obsahovala cDNA, 1,80 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,25 mM dNTPs mix. Boli použité primery, ktorými sme analyzovali identifikáciu extracelulárneho receptora 0,20 pmol.μl<sup>-1</sup> CASSY- F marker 5'-GTC CAC GAG ATT CAT CCC AG-3' a 0,20 pmol.μl<sup>-1</sup> CASSY - R marker 5'-CCT GAG ATG CAG AGA TGC TC-3' (**Cassy et al., 2004**). Ďalej boli použité primery pre pozitívnu kontrolu kvality izolovanej RNA a priebehu reverznej transkripcie pre glycerinaldehyd-3-fosfátát dehydrogenázu (GAPDH) GAPDH-F marker 5'-GTGTTATCATCTCAGCTCCCT CAG a marker GAPDH-R 5'AAAGGTGGAAGAATGG CTGTACC (**Liu et al., 2006**). Ďalšími zložkami boli 0,80 U GoTaq HotStar Polymeráza doplnené bidestilovanou vodou do objemu 30 μl. Zmes obsahovala tmivý roztok GoTaq green pufor 5x (Promega, Madison USA) a amplifikácia prebehla v termálnom cykléri (PTC-150 MiniCycler™, Research, Watertown USA). Postup PCR reakcie bol nasledovný: PCR cyklus začínal predenaturáciou pri teplote 94 °C po dobu 4 minút. Následne bolo zopakovaných 30 cyklov obsahujúcich denaturáciu pri teplote 94 °C po dobu 40 sekúnd a predĺžovanie pri teplote 72 °C po dobu 1 minúty. Finálne predĺžovanie fragmentov prebiehalo pri teplote 72 °C po dobu 7 minút.



**Obrázok 1** Výkrmový typ brojlerových kurčiat COBB500, Foto: Mrázová (2011)

## VÝSLEDKY A DISKUSIA



**Obrázok 2** Expresia leptínového receptora v orgánoch a tuku výkrmového typu kurčiat COBB500

Zámerom nášho experimentu bolo optimalizovať metodiku na sledovanie expresie extracelulárneho leptínového receptora na aviarnom modele. Použili sme vzorky orgánov kurčiat a tuku ktoré boli kŕmené silicami a taktiež vzorky orgánov a tuku od kurčiat z kontrolnej skupiny. V priebehu experimentu sa nám úspešne podarilo vyizolovať RNA zo srdca, sleziny, pečene a vnútrotelového tuku. Získaná celková RNA po reverznej transkripcii na cDNA predstavovala templát ktorý sme použili na identifikáciu zvoleného leptínového receptora. Ako vyplýva z obrázku 2, vo všetkých analyzovaných orgánoch sa nám podarilo vyizolovať celkovú RNA, ktorá pri následnej reverznej transkripcii a PCR reakcii s použitím primérových párov CASSY-F a CASSY-R umožnili vznik fragmentov 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 a 8. Ako naznačuje dráha číslo 4, najmenší obsah izolovanej RNA bol dosiahnutý vo vnútrotelovom tuku, ktorý sme získali z kurčiat kŕmených silicami, a dráha číslo 8, ktorý sme získali od kurčiat ktoré sme zobrali z kontrolnej skupiny. M-predstavujú markéry na identifikáciu extracelulárneho leptínového receptora. V našom experimente sme použili hmotnostný marker o veľkosti 100 bp. Zaujímavé výsledky ponúka dráha číslo 4, ktorá by mala poukazovať na prítomnosť leptínového receptora vo vnútro telovom tuku. V tejto

dráhe sa nachádzal fragment, ktorý svojou dĺžkou nezodpovedal očakávanej dĺžke fragmentu ohraničeného navrhnutými primérami (CASSY-F a CASSY-R – 273bp), ale bol kratší ako kontrolný fragment GAPDH s dĺžkou 533bp. Z uvedeného vyplýva, že použitím primérov a postupov popísaných v metodike práce je možné pozorovať expresiu extracelulárneho leptínového receptora u hybridu COBB 500. V tkanive srdca, sleziny a pečene je pozorovaný leptínový receptor exprimovaný v očakávaných množstvách. V tkanive vnútro telového tuku sa RNA javí ako skrátená, čo by mohlo byť zapríčinené alternatívnym zostrohom molekuly (splicing). Keďže finálny výkrmový typ brojlerových kurčiat hybrid COBB 500 je dlhodobou šľachtený so zameraním na znižovanie obsahu vnútro telového tuku a zvyšovanie objemu prsnej svaloviny, budeme sa tejto problematike venovať viac.

## ZÁVER

V našom experimente sa nám úspešne podarilo vyizolovať celkovú RNA z tkanív orgánov ako srdce, slezina, pečene, a vnútro telový tuk. V tkanivách srdca, sleziny, pečene pri pomerne vysokej koncentrácii celkovej cDNA vo vzorke sa dĺžka fragmentu extracelulárneho leptínového receptora nachádza v očakávaných množstvách. Vo vnútro telovom tuku na prítomnosť leptínového receptora poukázal fragment, ktorý svojou dĺžkou nezodpovedal očakávanej dĺžke fragmentu ohraničeného navrhnutými primérami. Ďalej sme zistili, že použitím primeru a popísaných postupov je možné pozorovať expresiu extracelulárneho leptínového receptora u výkrmového typu brojlerových kurčiat COBB 500. V tkanive vnútro telového tuku sa RNA našla v skrátenej forme. Tejto problematike sa budeme naďalej venovať.

## LITERATÚRA

- ANGELOVIČOVÁ, M., MELLEN, M., ANGELOVIČ, M. 2005. Použitie pamajoránovej silice ako náhrady za antibiotikum vo výžive výkrmových kurčiat. In Dni výživy. SPU : Nitra, 2005, p. 1-5. ISBN 80-8069-530- X.
- ANGELOVIČOVÁ, M., MELLEN, M., ANGELOVIČ, M. 2005. Uplatnenie biotechnologického postupu náhrady kŕmneho antibiotika premixom škoricovej silice vo výžive výkrmových kurčiat. In Biotechnológie 2006. JU: České Budejovice, 2006, p. 134-136. ISBN 8085-645-53-X.
- ASHWELL, C. M., CZERWINSKI, S. M., BROCHT, D. M., 1999. Hormonal regulation of leptin expression in broiler chickens. In *Am. J. Physiol.*, vol. 8., 1999, no. 5, p. 226-232.
- BAHRENBERG, G., BERMAN, I., BARTHEL, A., HEKERMANN, P., HEINRICH, P. C., JOOST, H. G., BECKER, W. 2002. Identification of the critical sequence elements in the cytoplasmic domain of leptin receptor isoforms required for Janus kinase/signal transducer and activator of transcription activation by receptor heterodimers. In *Mol. Endocrinol.*, vol. 16., 2002, no. 12, p. 859-72.
- BANKS, S., DAVIS, M., BATES, S. H., MYERS, M. G. Jr. 2000. Activation of downstream signals by the long form of the leptin receptor. In *J. Biol. Chem.*, vol. 275, 2000, no. 46, p. 14563-14572.
- BULLA, J. 2003. Research and Perspectives of the Modern Biotechnologies. In *Animal Husbandry. Život. Prostr.*, vol. 37, 2003, no. 2, p. 14-16.
- CASSY, S., METAYER, S., CROCHET, S., RIDEAU, N., COLLIN, A., TESSERAUD, S. 2004. Leptin receptor in the chicken ovary: potential involvement in ovarian dysfunction of

ad libitum-fed broiler breeder hens. In *Reproductive Biology and Endocrinology*, vol. 2, 2005, no. 72, p. 178-186.

DEMETEROVÁ, M. 2004. Súčasný trendy vo výžive hydiny. In *Slovenský veterinársky časopis*, vol. 29, 2004, no. 5, p. 38-40.

DRDÁK, M., STUDENICKÝ, J., MÓROVÁ, E., KAROVIČOVÁ, J. 1996. Základy potravinárskych technológií. Bratislava, MC, 1996, p. 512.

DRIDI, S., RAVER, N., GUSSAKOVSKY, E. E., DEROUET, M., PICARD, M., GERTLER, A., TAOUIS, M. 2000. Biological activities of recombinant chicken leptin C4S analog compared with unmodified leptins. In *Am. J. Physiol.*, vol. 279, 2000, no. 1, p. 116-123.

EISENBERG, A., BIENER, E., CHARLIER, M., KRISHAN, R. V., DJIANE, J., HERMAN, B., GERTLER, A. 2004. Transactivation of erb B2 by short and long isoforms of leptin receptors. In *FEBS Lett.*, vol. 565, 2004, no. 5, p. 139-142.

HEKERMAN, P., ZEIDLER, J., BAMBERG-LEMPER, S., KNOBELSPIES, H., LAVENS, D., TAVEMIER, J., JOOST, H. G., BECKER, W. 2005. Pleiotropy of leptin receptor signalling is defined by distinct roles of the intracellular tyrosines. In *J. Febs. J.*, vol. 272, 2005, no. 8, p. 109-119.

KAMEL, C., MCKAY, R. 2003. Plant extracts enhance performance in broilers under Clostridium perfringens challenge. In *J. Anim. Sci.*, vol. 81, 2003, no. 1, p. 103.

LIU, X., DUNN, J. C., SHARP, P. J., BOSWELL, T. 2006. Molecular cloning and tissue distribution of a short form chicken leptin receptor mRNA. In *Domestic Anim. Endocrinology*, vol. 32, 2007, p. 155-166.

MUDROŇOVÁ, D., NEMCOVÁ, R., GANCARČÍKOVÁ, S., JONECOVÁ, Z., BOMBA, A. 2005. Alternatíva antibiotík v odchove mláďat HZ. In *Slovenský chov*, vol. 11, 2005, no. 1, p. 33-35.

OPLETAL, L. 2006. Performing nature – aplikovaná príroda. In *Slovenský chov*, vol. 11, 2006, no. 6, p. 44.

TAOUIS, M., CHEN, J.W., DAVIAUD, C. 1998. Cloning the chicken leptin gene. In *Gene*, vol. 65, 1998, no. 2, p. 239-242.

ZHANG, Y., PROENCA, R., MAFFEI, M., BARONE, M., LEOPOLD, L., FRIEDMAN, J. M. 1994. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. In *Nature*, vol. 372, 1994, no. 13, p. 425-432.

#### Acknowledgments:

This work was supported by Scientific Grant Agency No financial support VEGA 1/0007/11.

#### Contact address:

Ing. Ľubica Mrázová, Slovak University of Agriculture, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Department of Food Hygiene and Safety, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovakia, E-mail: lubica.mrazova@uniag.sk

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

prof. Ing. Mária Angelovičová, CSc., Slovak University of Agriculture, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Department of Food Hygiene and Safety, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovakia, e-mail: maria.angelovicova@uniag.sk

Ing. Jana Tkáčová, Slovak University of Agriculture, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Department of Food Hygiene and Safety, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovakia, E-mail: tkacova.j@centrum.sk

Ing. Martin Kliment, Slovak University of Agriculture, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Department of Food Hygiene and Safety, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovakia, E-mail: mkmartinkliment@gmail.com

Ing. Martin Král, Slovak University of Agriculture, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Department of Food Hygiene and Safety, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovakia, E-mail: martinxkral@gmail.com

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

## COMPOSITION OF THE ATHLETES DIET

*Beáta Pramuková, Denisa Čokášová, Rastislav Salaj***ABSTRACT**

Sports nutrition is a constantly evolving field with many of research papers published annually. However, designing the most suitable sports diet is very difficult. It must be given to the type of training, its duration and intensity, the age and sex of the athlete and also for overall health. The aim of this article is to summarize knowledges about sports nutrition, especially intake of carbohydrates, proteins, fats and dietary supplements and their influence on the performance and recovery of the athlete.

**Keywords:** sports nutrition, energy intake, carbohydrate, protein, fat, dietary supplement

**ÚVOD**

Zostaviť vhodný jedálniček pre športovca s dostatočným množstvom sacharidov, proteínov a tukov, ako aj s vhodne zvolenými doplnkami výživy, nie je jednoduché. Popri type tréningu (vytrvalostný alebo silový) treba zohľadniť nielen jeho trvanie a intenzitu, ale taktiež aj pohlavie a vek jednotlivca, ako i rôzne biochemické a fyziologické faktory a rozličné podmienky (chlad, teplo, predtréningová strava) (Broad, Cox, 2008). Výkon a regenerácia športovca sú ovplyvnené aj správnym načasovaním príjmu potravy a doplnkov výživy (Kerksick et al., 2008).

V súčasnosti už máme dostatočné znalosti z oblasti športovej výživy, ale aj napriek tomu sa nedá zostaviť univerzálna diéta, ktorá by slúžila všetkým. Niekedy to môže viesť k zmätku a z neho vyplývajúceho nesprávne zvoleného jedálnička.

Pri zostavovaní vhodnej diéty je nutné mať na zreteli vytýčený cieľ športovca (zlepšenie vytrvalosti, zväčšenie svalovej hmoty, zvýšenie silovej výkonnosti, chudnutie), na základe ktorého sa musia vhodne zvoliť zdroje makroživín a správne načasovanie ich príjmu. Nezanedbateľný vplyv na dosiahnutie cieľa športovca majú aj niektoré doplnky výživy. Pomocou správnej stravy a doplnkov si môžu zlepšiť fyziologickú adaptáciu na tréning, ochrániť svoj imunitný systém a celkové zdravie (Broad, Cox, 2008).

Cieľom tejto práce je poskytnúť prehľad o súčasných poznatkoch z oblasti športovej výživy so zameraním sa na potrebný denný príjem makroživín pri pravidelnom tréningu a súťažnom športe. Taktiež nesmie chýbať aj prehľad doplnkov výživy so zameraním sa na konkrétne ciele športovca.

**NUTNÝ ENERGETICKÝ PRÍJEM ŠPORTOVCOV**

Prvým aspektom optimalizácie tréningu a výkonnosti prostredníctvom výživy je zabezpečiť dostatočné množstvo kalórií ako náhradu za vydanú energiu športovca. Zložky energetického výdaja môžeme zdeliť do troch kategórií (Broad, Cox, 2008):

- 1) rýchlosť metabolizmu,
- 2) termický efekt prijatej potravy
- 3) energia vydaná v normálnych denných aktivitách a cvičením

Ľudia cvičiaci kondične 30–40 minút 3-krát do týždňa majú dennú potrebu živín zhodnú s necvičiacimi jedincami (35 kcal/kg/deň) (Kreider et al., 2010). Avšak športovci so stredne intenzívnym tréningom (2-3 hodiny denne 5-6-krát do týždňa) alebo s vysoko intenzívnym tréningom (3-6 hodín denne v 1-2 tréningových jednotkách 5-6-krát

do týždňa) potrebujú prijať 50-80 kcal/kg/deň (Kreider et al., 2010, Sundgot-Borgen, Torstveit, 2010). Kalorický príjem športovcov s vysokou hmotnosťou (napr. 100-150 kg) je často oveľa vyšší.

Energeticky chudobná diéta počas náročných tréningov vedie často k úbytku hmotnosti (vrátane straty svalovej hmoty), rôznym chorobám, psychickým a fyzickým symptómom spojeným s pretrénovaním a k zníženiu výkonnosti (Kreider et al., 2010). Mnohé štúdie poukazujú na ideálny príjem potravy športovca zvyčajne v 5-9 porciách za deň (Burke et al., 2003). Na doplnenie energetického príjmu, hlavne počas ťažkých tréningov, sa odporúča konzumovať energetické tyčinky a vysokokalorické sacharidovo-proteínové nápoje (Brown et al., 2004).

**MNOŽSTVO A ZDROJE SACHARIDOV VO VÝŽIVE ŠPORTOVCOV**

Pre optimalizáciu tréningu a výkonnosti prostredníctvom výživy je potrebné zabezpečiť, aby športovci konzumovali primerané množstvo makroživín – sacharidov, proteínov a tukov. Kondiční cvičenci konzumujúci bežnú stravu by mali mať zastúpenie makroživín v strave v pomere 45-55% sacharidov (3-5 g/kg/deň), 10-15% proteínov (0,8-1 g/kg/deň) a 25-35% tukov (0,5-1,5 g/kg/deň) (Kreider et al., 2010). Športovci so stredne veľkým až veľkým objemom tréningov ale potrebujú prijať najmä väčšie množstvo sacharidov a proteínov. Jedinci s tréningovými jednotkami v trvaní 2-3 hodín 5-6-krát týždenne potrebujú prijať na 1 kg hmotnosti 5-8 g/deň sacharidov. Avšak u trénujúcich viac než 3 hodiny denne a aj u dvojfázových tréningov je ich potreba zvýšená, a to na 8-10 g/kg/deň (Kerksick et al., 2008, Kreider et al., 2010). Niektoré štúdie poukazujú aj na možnosť ich vyššieho príjmu (Broad, Cox, 2008, Tarnopolsky, 2008).

Hlavným zdrojom sacharidov pre športovca by mali byť potraviny, ktoré obsahujú prevažne tzv. „pomalé sacharidy“. Tie majú nízky až stredne vysoký glykemický index a sú trávené pomalšie. Zdrojmi takých sú najmä celozrnné výrobky, strukoviny, zelenina a ovocie. Približne 1-2 hodiny pred tréningom sa odporúča skonzumovať stravu bohatú na sacharidy s nízkym glykemickým indexom (Kreider et al., 2010, Tarnopolsky, 2008). Avšak športovci by nemali so svojej stravy vylúčiť ani jednoduché sacharidy, ktoré majú vysoký glykemický index a trávia sa a vstrebávajú rýchlejšie. Je ich vhodné prijať ihneď po prebudení a do dvoch hodín po tréningu, nakoľko sú dôležité pre rýchlejšiu obnovu vyčerpaných glykogénových zásob po

nočnom hladovaní a náročnom cvičení (Kreider et al., 2007). Prijímajú sa hlavne vo forme potréninových sacharidových alebo proteínovo-sacharidových nápojoch, v pečive z bielej múky napríklad s džemom alebo medom a z ryže.

### MNOŽSTVO A ZDROJE PROTEÍNOV VO VÝŽIVE ŠPORTOVCOV

Výskumy z poslednej dekády poukazujú na zvýšenie potreby proteínov u intenzívne cvičiacich jedincov za účelom udržania si optimálnej proteínovej bilancie. Nedostatok proteínov v diéte vedie k negatívnej dusíkovej bilancii, čím sa zvyšuje katabolizmus proteínov (aj svalových) a spomaľuje sa potréninová regenerácia. Tým dochádza k úbytku svalovej hmoty a veľmi často i k pretrénovaniu (Kreider et al., 2010).

Aby sa zabezpečila vyvážená alebo pozitívna dusíková bilancia, je potrebné prijať dostatočné množstvo proteínov (Tipton, 2008, Lowery, Forsythe, 2006). Pravidelne cvičiaci jedinci, tak ako i vrcholoví športovci, majú nutnú dennú potrebu v rozmedzí 1,5-2 g/kg hmotnosti (Kreider et al., 2010). Siloví športovci a najmä kulturisti prijímajú mnohokrát i vyššie množstvá proteínov (3-4 g/kg/deň) za účelom zachovania si určitého denného energetického príjmu, napríklad počas nízkosacharidovej diéty (Tipton, 2008, Phillips, 2004). Príjem vyššieho množstva nie je nutný, nakoľko nedochádza k ich zužitkovaniu a zbytočne sa zaťažuje tráviaci systém a obličky.

Druh proteínu ale určuje účinnosť zabudovania sa aminokyselín do svalových myofibril. Treba dbať hlavne o to, aby sa konzumovali proteíny s vysokou biologickou využiteľnosťou. Najlepšími zdrojmi takých sú chudé mäso (kuracie, morčacie, hovädzie a ryby), vaječné bielka a mlieko (srvátka a kazeín). Zdroje proteínov vysokej biologickej hodnoty nájdeme i medzi doplnkami výživy, akými sú proteínové nápoje na báze srvátky, kolostra, kazeínu, mliečnych a vaječných proteínov (Kreider et al., 2010, Hulmi, Lockwood, Stout, 2010). Rastlinné zdroje, akými sú napríklad sója a sójové výrobky, podľa zistení z viacerých štúdií majú nižšiu biologickú využiteľnosť než proteíny živočíšneho pôvodu (Morifuji et al., 2010, Manninen, 2009).

Proteíny je ideálne prijímať každé 2,5-3 hodiny po 30-40 g v jednej dávke a 6-8 porciách za deň. Vhodné je striedať samotné potravinové zdroje s proteínovými nápojmi a to hlavne u tých jedincov, ktorí nie sú schopní prijať z normálnej stravy ich dostatočné množstvo (Kreider et al., 2010).

Pre športovcov s účelom nabrat' alebo si udržať svalovú hmotu, je veľmi vhodné ich prijímať vo forme potréninového nápoja (či už samotného proteínového alebo sacharidovo-proteínového), ktorých hlavným zdrojom by mala byť srvátka. Najnovšie údaje potvrdzujú, že po tréningu sú najvhodnejšie tzv. hydrolyzáty srvátky, ktoré obsahujú veľmi krátke oligopeptidové reťazce zložené z 2-3 aminokyselinových jednotiek (di- a tripeptidy) (Paddon-Jones et al., 2008). Pred spánkom je naopak ideálne prijímať kazeínové nápoje (alebo zjesť tvaroh či cottage cheese), aby telo malo počas spánku dostatok živín z pomaly sa vstrebávajúcej bielkoviny (Hulmi et al., 2009, Petróczy et al., 2007).

### MNOŽSTVO A ZDROJE TUKOV VO VÝŽIVE ŠPORTOVCOV

Odporúčaný príjem tukov pre športovcov je taký istý, alebo len mierne zvýšený, než pre necvičiacich jedincov (Broad, Cox, 2008, Kreider et al., 2010). Dôležité je prijímať esenciálne mastné kyseliny a to najmä polynenasýtené. Ich hodnotnými zdrojmi sú tzv. „tučné“ ryby (losos, makrela, tuniak), niektoré semiačka a orechy (ľanové, tekvicové semiačka, vlašské orechy) a oleje (ľanový, sójový, olivový) (Varga, 2008).

Športovci, ktorí si chcú udržať vyššiu hladinu testosterónu v krvi hlavne za účelom budovania si svalovej hmoty a sily, by sa nemali vyhýbať ani strave s vyšším obsahom tukov (maximálne však do 50% ich energetického príjmu). Avšak u tých, ktorí sa snažia redukovať hladinu telesného tuku, by denný príjem nemal prekročiť hranicu 0,5-1 g/kg/deň (Broad, Cox, 2008, Kreider et al., 2010).

Príjem najmä tzv. „zdravých“ tukov je ale veľmi dôležitý pre správne fyziologické fungovanie každého organizmu, preto by sa im ani aktívni jedinci nemali vyhýbať.

### ÚLOHA DOPLNKOV VÝŽIVY U ŠPORTOVCOV

Doplnky výživy sú definované ako produkty prijímané ústami, ktoré obsahujú dietetické zložky, ktorými môžu byť vitamíny a minerálne látky, látky rastlinného pôvodu, aminokyseliny a iné látky (napríklad enzýmy, tkanivá z orgánov a žliaz, metabolity). Doplnkami výživy môžu byť aj extrakty alebo koncentráty z rastlín a rôznych potravinových surovín. Predávajú sa vo forme tabliet, kapsúl, tekutín, gélov, prášku a tyčiniek. Nie sú to však lieky ani náhrada pestrej stravy (Kreider et al., 2010). Ich úloha je, ako to už ich názov napovedá, len doplnková a majú napomáhať športovcom v pokrývaní ich energetických potrieb, pri zvyšovaní ich výkonnosti a dosahovaní požadovaných výsledkov (napríklad pri naberaní svalovej hmoty, chudnutí, atď.) (Petróczy et al., 2007).

Doplnky výživy sa zvyčajne zadeľujú do troch kategórií, pričom nie sú striktne ohraničené a jednotlivé suplementy sa môžu medzi nimi prelínať.

Sú to doplnky výživy (Kreider et al., 2010):

- 1) *podporujúce rast svalovej hmoty,*
- 2) *podporujúce chudnutie a spaľovanie tukov,*
- 3) *zvyšujúce výkonnosť a vytrvalosť*

Avšak nie všetky komerčne dostupné prípravky sú aj dokázateľne účinné.

#### Doplnky výživy podporujúce rast svalovej hmoty

Do tejto kategórie patrí množstvo komerčných prípravkov. Výsledky vedeckých výskumov však ako najúčinnější popisujú prášky a nápoje typu tzv. „weight gainers“, ktoré obsahujú vyšší podiel sacharidov než proteínov (70-90% : 10-30%) (Kreider et al., 2010). Pri raste svalovej hmoty má veľký význam aj suplementácia kreatínom (monohydrát, etyl-ester, kre-alkalyn) (Tarnopolsky, 2008), proteínmi (vo forme práškov alebo hotových nápojov) (Kreider et al., 2010), esenciálnymi aminokyselinami a aminokyselinami s rozvetveným reťazcom – tzv. BCAA (branched-chain amino acids) (Hulmi et al., 2009, Petróczy et al., 2007, Stoppini, 2009). U začínajúcich cvičencov sa dosiahli dobré



výsledky aj pri užívaní HMB ( $\beta$ -hydroxy  $\beta$ -metylbutyrát) (Holecek, 2009, Zanchi et al., 2010).

Vo fáze naberania svalovej hmoty dáva mnoho športovcov prednosť „weight gainerom“. Tie by sa mali užiť do 30 minút po tréningu. Nadbytok kalórií v množstve 500-1000 kcal za deň len napomôže priberaniu. Zvýši sa ale aj telesný tuk, nakoľko nie je možné nabrat' samotnú čistú svalovú hmotu (Kreider et al., 2010).

Proteínové nápoje je najvhodnejšie prijímať ráno na lačno (hlavne srvátkový, ktorý sa rýchlejšie vstrebáva), do 30 minút po tréningu (najlepšie srvátkový hydrolyzát) a pred spaním (nápoje s prevahou kazeínu) (Petróczi et al., 2007).

Najúčinnejšia suplementácia kreatínu je 5 g 30 minút pred tréningom a 5 g po tréningu (Tarnopolsky, 2008, Vieillevoye et al., 2010). Pred a po tréningu sa odporúča prijať aj esenciálne aminokyseliny (3-6 g) (Lavalli, Toulson, 2010), BCAA (5-10 g) (Kreider et al., 2010) a HMB (1,5-3 g) (Kreider et al., 2010, Holecek, 2009, Zanchi et al., 2010).

#### Doplňky výživy podporujúce chudnutie a spaľovanie tukov

Mnoho jedincov za účelom chudnutia a znižovania podielu telesného tuku podstupuje drastické diéty a užíva „záračné“ tabletky na chudnutie. Avšak nájdu sa i športovci, ktorí nemajú z tejto oblasti dostatočné vedomosti. Hoci cvičenie a rozumná diéta sú tou najlepšou cestou k znižovaniu hmotnosti a spaľovaniu tukov, športovci pre dosiahnutie lepších výsledkov siahajú aj po rozličných doplnkoch výživy.

Najúčinnejšími prípravkami z tejto skupiny sú náhrady stravy s vyšším obsahom proteínov a vlákniny a súčasne s nižším podielom sacharidov a tukov (Kreider et al., 2010). Termogenézu podporujú kofeín (Petróczi et al., 2007) a extrakt zo zeleného čaju (Kreider et al., 2010). Kofeín sa prijíma buď vo forme nápoja (káva), alebo sa užívajú kofeínové tabletky. Tie by sa mali užiť 30 minút pred tréningom v množstve odpovedajúcom 300 mg kofeínu (Paddon-Jones et al., 2008). Extrakt zo zeleného čaju sa zvyčajne prijíma v dvoch denných dávkach po 1500 mg.

Niektoré štúdie poukazujú aj na pozitívny vplyv konjugovanej kyseliny linolovej (CLA) pri chudnutí a v neposlednom rade aj na stravu bohatú na vlákniny (Kreider et al., 2010).

#### Doplňky výživy zvyšujúce výkonnosť a vytrvalosť

Na zvýšenie výkonnosti a vytrvalosti športovca sa taktiež užíva množstvo produktov. Medzi účinné doplnky patria športové nápoje s ideálnym množstvom sacharidov a minerálnych látok (Kerksick et al., 2008), už vyššie spomenutý keratín (Kreider et al., 2010, Tarnopolsky, 2008), kofeín (Petróczi et al., 2007), esenciálne aminokyseliny (Paddon-Jones et al., 2008, Lavalli, Toulson, 2010) a BCAA. Novšie výskumy potvrdzujú aj pozitívny účinok  $\beta$ -alanínu (Kreider et al., 2010) na výkonnosť športovca. Potvrdila sa aj lepšia regenerácia a adaptácia na tréning po prijatí nápoja so sacharidmi a proteínmi, než po samotnom sacharidovom alebo proteínovom nápoji. Po ich prijatí bezprostredne po tréningu dochádza k lepšej glykogénovej obnove a proteínovej syntéze (Vieillevoye et al., 2010).

Ťažko trénujúci športovci by samozrejme nemali zabúdať ani na zvýšený príjem vitamínov a minerálnych látok.

#### ZÁVER

Ako zo samotného článku vyplýva, zostaviť univerzálny diétny plán pre športovcov je nie náročné, ale je to dokonca nemožné. Základnými kameňmi zvyšovania výkonnosti a/alebo adaptácie na tréning sú udržanie si energetickej rovnováhy a dostatočnej výživy, primeraný tréning, vhodné načasovanie príjmu živín a doplnkov výživy a dostatočný oddych. Správne zvolenými doplnkami výživy sa môže zlepšiť energetická dostupnosť počas tréningu (napr. rôzne športové nápoje, sacharidy, kreatín, kofeín,  $\beta$ -alanín, atď.) a/alebo podporiť regeneráciu (sacharidy, proteíny, esenciálne aminokyseliny, atď.).

Téma športovej výživy je veľmi obsiahla a podrobnejší prehľad by zabral nemálo strán. Cieľom tohto článku bolo poukázať na potrebu zvýšeného príjmu makroživín u športujúcich jedincov a načrtnúť prehľad najúčinnejších doplnkov výživy.

#### LITERATÚRA

- BROAD, E. M., COX, G. R. 2008. What is the optimal composition of an athlete's diet? In *Eur. J. Sport Sci.*, vol. 8, 2008, no. 2, p. 57-65.
- BROWN, E. C., DISILVESTRO, R. A., BABAKNIA, A., DEVOR, S. T. 2004. Soy versus whey protein bars: Effects on exercise training impact on lean body mass and antioxidant status. In *Nutr. J.*, no. 3, 2004, p. 22-26.
- BURKE, L. M., SLATER, G., BROAD, E. M., HAULKA, J., MODULON, S., HOPKINS, W. G. 2003. Eating patterns and meal frequency of elite Australian athletes. In *Internat. J. Sport Nutr. Exerc. Metab.*, no. 13, 2003, p. 01-19.
- ELEY, H. L., RUSSELL, S. T., BAXTER, J. H., MUKERJI, P., TISDALE, M. J. 2007. Signaling pathways initiated by beta-hydroxy-beta-methylbutyrate to attenuate the depression of protein synthesis in skeletal muscle in response to cachectic stimuli. In *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, vol. 4, 2007, no. 293, p. 923-931.
- FUJITA, S., DREYER, H. C., DRUMMOND, M. J., GLYNN, E. L., VOLPI, E., RASMUSSEN, B. B. 2009. Essential amino acid and carbohydrate ingestion before resistance exercise does not enhance postexercise muscle protein synthesis. In *J. Appl. Physiol.*, no. 106, 2009, p. 1730-1739.
- HOLECEK, M., MUTHNY, T., KOVARIK, M., SISPERA, L. 2009. Effect of beta-hydroxy-beta-methylbutyrate (HMB) on protein metabolism in whole body and in selected tissues. In *Food Chem. Toxicol.*, 2009, no. 47, 2009, p. 255-259.
- HULMI, J. J., KOVANEN, V., SELÄNNE, H., KRAEMER, W. J., HÄKKINEN, K., MERO, A. A. 2009. Acute and long-term effects of resistance exercise with or without protein ingestion on muscle hypertrophy and gene expression. In *Amino Acids*, no. 37, 2009, p. 297-308.
- HULMI, J. J., LOCKWOOD, CH. M., STOUT, J. R. 2010. Effect of protein/essential amino acids and resistance training on skeletal muscle hypertrophy: A case for whey protein. In *Nutr. Metab.*, vol. 7, 2010, no. 51.
- KERKSICK, CH., HARVEY, T., STOUT, J., CAMPBELL, B., WILBORN, C., KREIDER, R., KALMAN, D., ZIEGENFUSS, T., LOPEZ, H., LANDIS, J., IVY, J. L., ANTONIO J. 2008. International Society of Sports Nutrition position stand: Nutrient timing. In *J. Internat. Soc. Sports Nutr.*, 2008, no. 5, 2008, p. 17-28.

- KREIDER, R. B. 1991. Physiological considerations of ultraendurance performance. In *Int. J. Sport Nutr.*, vol. 1, 1991, no. 1, p. 03-27.
- KREIDER, R. B., EARNEST, C. P., LUNDBERG, J., RASMUSSEN, CH., GREENWOOD, M., COWAN, P., ALMADA, A. L. 2007. Effects of ingesting protein with various forms of carbohydrate following resistance-exercise on substrate availability and markers of anabolism, catabolism, and immunity. In *J. Int. Soc. Sports Nutr.*, no. 4, 2007, p. 18-28.
- KREIDER, R. B., WILBORN, C. D., TAYLOR, L., CAMPBELL, B., ALMADA, A. L., COLLINS, R., COOKE, M., EARNEST, C. P., GREENWOOD, M., KALMAN, D. S., KERKSICK, CH. M., KLEINER, S. M., LEUTHOLTZ, B., LOPEZ, H., LOWERY, L. M., MENDEL, R., SMITH, A., SPANO, M., WILDMAN, R., WILLOUGHBY, D. S., ZIEGENFUSS, T. N., ANTONIO, J. 2010. ISSN exercise & sport nutrition review: research & recommendations. In *J. Internat. Soc. Sports Nutr.*, no. 7, 2010, p. 07-49.
- LAVALLI GOSTON, J., TOULSON DAVISSON CORREIA, M. I. 2010. Intake of nutritional supplements among people exercising in gyms and influencing factors. In *Nutrition*, no. 26, 2010, p. 604-611.
- LAYMAN, D. K. 2004. Protein quantity and quality at levels above the RDA improves adult weight loss. In *J. Am. Coll. Nutr.*, no. 23, 2004, p. 631-636.
- LAYMAN, D. K., EVANS, E., BAUM, J. I., SEYLER, J., ERICKSON, D. J., BOILEAU, R. A. 2005. Dietary protein and exercise have additive effects on body composition during weight loss in adult women. In *J. Nutr.*, no. 135, 2005, p. 1903-1910.
- LOWERY, L., FORSYTHE, C. E. 2006. Protein and overtraining: potential applications for free-living athletes. In *J. Internat. Soc. Sports Nutr.*, 2006, vol. 3, 2006, no. 1, p. 42-50.
- MANNINEN, A. H. 2009. Protein hydrolysates in sports nutrition. In *Nutr. Metab.*, no. 6, 2009, p. 38-42.
- MOORE, D. R., ROBINSON, M. J., FRY, J. L., TANG J. E., GLOVER, E. I., WILKINSON, S. B., PRIOR, T., TARNOPOLSKY, M. A., PHILLIPS, S. M. 2009. Ingested protein dose response of muscle and albumin protein synthesis after resistance exercise in young men. In *Am. J. Clin. Nutr.*, no. 89, 2009, p. 161-168.
- MORIFUJI, M., ISHIZAKA, M. I., BABA, S., FUKUDA, K., MATSUMOTO, H., KOGA, J., KANEGAE, M., HIGUCHI, M. 2010. Comparison of different sources and degrees of hydrolysis of dietary protein: Effect on plasma amino acids, dipeptides, and insulin responses in human subjects. In *J. Agric. Food Chem.*, vol. 15, 2010, no. 58, p. 8788-8797.
- NUNES, E. A., KUCZERA, D., BRITO, G. A., BONATTO, S. J., YAMAZAKI, R. K., TANHOFFER, R. A., MUND, R. C., KRYCZYK, M., FERNANDES, L. C. 2008. Beta-hydroxy-beta-methylbutyrate supplementation reduces tumor growth and tumor cell proliferation ex vivo and prevents cachexia in Walker 256 tumor-bearing rats by modifying nuclear factor -kappaB expression. In *Nutr. Res.*, vol. 7, 2008, no. 28, p. 487-493.
- PADDON-JONES, D., WESTMAN, E., MATTES, R. D., WOLFE, R. R., ASTRUP, A., WESTERTERP-PLANTENGA, M. 2008. Protein, weight management, and satiety. In *Am. J. Clin. Nutr.*, no. 87, 2008, p. 1558-1561.
- PETRÓCZI, A., NAUGHTON, D. P., MAZANOV, J., HOLLOWAY, A., BINGHAM, J. 2007. Performance enhancement with supplements: incongruence between rationale and practice. In *J. Int. Soc. Sports Nutr.*, no. 4, 2007, p. 19-26.
- PHILLIPS, S. M. 2004. Protein requirements and supplementation in strength sports. In *Nutrition*, no. 20, 2004, p. 689-695.
- STOPPANI, J., SCHEETT, T., PENA, J., RUDOLPH, CH., CHARLEBOIS, D. 2009. Consuming a supplement containing branched-chain amino acids during a resistance-training program increases lean mass, muscle strength and fat loss. In *J. Int. Soc Sports Nutr.*, vol. 6, 2009, no. 1, p. 01-02.
- SUNDGOT-BORGEN, J., TORSTVEIT, M. K. 2010. Aspects of disordered eating continuum in elite high-intensity sports. In *Scand. J. Med. Sci. Sports.*, vol. 20, 2010, no. 2, p. 112-121.
- TARNOPOLSKY, M. A. 2008. Building muscle: nutrition to maximize bulk and strength adaptations to resistance exercise training. In *Eur. J. Sport Sci.*, vol. 8, 2008, no. 2, p. 67-76.
- TIPTON, K. D. 2008. Protein for adaptations to exercise training. In *Eur. J. Sport Sci.*, vol. 8, 2008, no. 2, p. 107-118.
- VARGA, Z. 2008. Az omega-3 többszörösen telítetlen zsírsavak az atherosclerosis megelőzésében. In *Orv. Hetil.*, vol. 149, 2008, no. 14, p. 627-637.
- VIEILLEVOYE, S., POORTMANS, J. R., DUCHATEAU, J., CARPENTIER, A. 2010. Effects of a combined essential amino acids/carbohydrate supplementation on muscle mass, architecture and maximal strength following heavy-load training. In *Eur. J. Appl. Physiol.*, vol. 3, 2010, no. 110, p. 479-488.
- WILLOUGHBY, D. S., STOUT, J. R., WILBORN, C. D. 2007. Effects of resistance training and protein plus amino acid supplementation on muscle anabolism, mass and strength. In *Amino Acids*, no. 32, 2007, p. 467-477.
- ZANCHI, N. E., GERLINGER-ROMERO, F., GUIMARÃES-FERREIRA, L., DE SIQUEIRA FILHO, M. A., FELITTI, V., SANTOS LIRA, F., SEELAENDER, M., LANCHETA Jr., A. H. 2010. HMB supplementation: clinical and athletic performance-related effects and mechanisms of action. In *Amino Acids*, 2010, in press.

**Contact address:**

RNDr. Beáta Pramuková, Institute of the Experimental Medicine, Faculty of Medicine UPJŠ, Trieda SNP 1, 040 11 Košice, Slovakia, Tel.: +421944131553, E-mail: beata.pramukova@gmail.com

MVDr. Denisa Čokášová, Institute of the Experimental Medicine, Faculty of Medicine UPJŠ, Trieda SNP 1, 04011, Košice, Tel.: +421904964 416, E-mail: DCokasova@azet.sk

Mgr. Rastislav Salaj, Institute of the Experimental Medicine, Faculty of Medicine UPJŠ, Trieda SNP 1, 04011, Košice, Tel.: +421902308113, E-mail: rastislav.salaj@upjs.sk

**OFFICIAL CONTROLS OF FOODSTUFFS – CONTAMINATION OF CEREALS BY MYCOTOXINS OF THE GENUS FUSARIUM AND OCHRATOXIN A.***Jaroslav Remža, Jozef Bireš, Mária Matúšová, Magdaléna Lacko-Bartošová***ABSTRACT**

One of the most dangerous food contaminants are mycotoxins – secondary metabolites of toxinogenic fibre fungi considered the main plant pathogens. A variety of *Fusarium* fungi, which are common soil fungi, produce a number of different mycotoxins of the class of trichothecenes (T-2 toxin, HT-2 toxin, deoxynivalenol (DON) and nivalenol and some other toxins (zearalenone and fumonisins)). The *Fusarium* fungi are commonly found on cereals grown in the temperate regions of Europe. In this work contamination of Slovak grain by toxins with focus on the genus *Fusarium* was monitored. The results of monitoring pointed at relative low contamination of Slovak grain by toxins the genus *Fusarium* from harvest 2008, which is documented by maximum as well as by average measuring data in comparison with valid legislation. Average measuring data of deoxynivalenol in year 2008 were in barley 48,8  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ , in oats 90  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ , in wheat 70  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ , in rye 65,5  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ , in maize 75,9  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ . Average measuring data of zearalenon in year 2008 were in barley 0,8  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ , in oats 9,1  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ , in wheat 7,1  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ , in rye 3,2  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ , in maize 13,9  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ . Average measuring data of T2 toxin in year 2008 were in barley 3,38  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ , in oats 22,9  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ , in wheat 15  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ , in rye 2,9  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ , in maize 13,9  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ . In year 2009 when presence of nivalenol in 79 samples was evaluated, detected levels varied from 5 to 1025  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ , in case of those samples also deoxynivalenol was evaluated, detected levels varied from 25 to 965  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ . The results pointed at higher contamination.

In year 2010 when presence of nivalenol in 96 samples was evaluated, detected levels varied from 5 to 48  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ , in case of those samples also deoxynivalenol was evaluated, detected levels varied from 5 to 2438  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ . In this year the results pointed at the highest contamination over the past three years. Average measuring data of deoxynivalenol in wheat in year 2009 were 241  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ . Average measuring data of deoxynivalenol in wheat in year 2010 were 552  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ .

**Keywords:** mycotoxins, *Fusarium*, deoxynivalenol, nivalenol

**ÚVOD**

V súčasnosti sa predpokladá, že v prírode sa vyskytuje približne 5 000 rôznych druhov mykotoxínov. Patria k sekundárnym metabolitom toxinogénnych húb, ktoré sa radia k hlavným rastlinným patogénom (Betina, 1990) a prostredníctvom rastlinných produktov sa dostávajú do potravinového reťazca. V poslednom období výsledky ukazujú, že mykotoxíny *Fusarium* sú značne rozšírené v potravinovom reťazci v Spoločenstve.

Hlavnými zdrojmi príjmu toxínov *Fusarium* v strave sú výrobky z obilnín, najmä pšenica a kukurica. Druhy húb rodu *Fusarium* infikujú zrno pred zberom úrody. Rôzne huby *Fusarium*, ktoré sa bežne vyskytujú v pôde, môžu produkovať množstvo rôznych mykotoxínov triedy trichotecény, ako deoxynivalenol (DON), nivalenol (NIV), toxíny T-2 a HT-2 a niektoré iné toxíny ako zearalenón a fumonizíny B1 a B2.

Huby *Fusarium* sa bežne nachádzajú na obilninách pestovaných v miernych pásmach Ameriky, Európy a Ázie. Niekoľko húb produkujúcich toxín *Fusarium* dokáže produkovať dva alebo viacero z týchto toxínov na rôznom stupni. Účinky mykotoxínov na biologické organizmy sú rôzne. V prípade fumonizínov nie je známa žiadna akútna toxicita, ale je tu predpoklad na ich karcinogénne účinky (FAO, Rim, 2001). Na druhej strane zearalenón je silným estrogénom a rozširuje paletu známych endokrinných disruptorov. Tiež sa predpokladá, že akútna toxicita tohto mykotoxínu je zanedbateľná.

Trichotecény predstavujú veľmi veľkú skupinu (cca 180) podobných zlúčenín. Ich hlavnými producentmi sú huby rodov *Fusarium*, *Myrothecium*, *Trichoderma*, *Trichothecium*, *Cephalosporium*, *Verticimonosporium* a *Stachybotrys* (Wiedenborner, 2001). Parazitujú hlavne

na cereáliách. Trichotecény boli identifikované v produktoch z cereálnych výrobkov. Na základe podobnosti v chemickej štruktúre sa členia do viacerých skupín, z ktorých najdôležitejšie sú prvé dve skupiny A a B. Do skupiny typu A zaraďujeme T-2 toxín, HT-2 toxín, diacetoxyscirpenol. Trichotecény typu A sú známe vysokou toxicitou. Do skupiny typu B patria napríklad nivalenol a deoxynivalenol. Trichotecény skupiny typu B sú výrazne menej toxické ako trichotecény skupiny typu A. Trichotecény sú relatívne nestabilné, pôsobením UV žiarenia rýchlo degradujú (Wiedenborner, 2001).

Zearalenon je produktom húb rodu *Fusarium*, predovšetkým *Fusarium graminearum*, ktoré parazitujú na cereáliách (Betina, 1990). Najčastejšie sa nachádza v kukurici ale bol detegovaný aj v pšenici a sladovníckom jačmeni. Zearalenol (a-Zearalenol a b-Zearalenol) je *in vivo* metabolit zearalenonu (Ouanes-Benothmen, et al., 2008). Sú známe aj niektoré viazané formy zearalenonu a zearalenolu („maskované mykotoxíny“), ich účinky na organizmus hospodárskych zvierat nie sú ešte dostatočne preskúmané. Zearalenon a jeho metabolity majú silné estrogénne vlastnosti (Wiedenborner, 2001). Kŕmením hospodárskych zvierat kontaminovaným cereálnym krmivom dochádza k chorobám reprodukčného systému. Veľmi citlivé sú predovšetkým ošípané. Pre znížovanie kontaminácie cereálií počas skladovania je dôležité aby vlhkosť bola menej ako 14 % (Ouanes-Benothmen, et al., 2008). K samotnej kontaminácii dochádza na poli ale rastu húb sa dá zabrániť dôslednou kontrolou podmienok skladovania. V suchom prostredí už nedochádza k rastu húb a tak je možné zabrániť ich prechodu z infikovaných zŕn aj na nekontaminované zrná.

Fumonizíny (fumonizín B1 (FB1), fumonizín B2 (FB2), fumonizín B3 (FB3)) sú mykotoxíny produkované toxínogénnymi hubami rodu *Fusarium* (Betina, 1990). Z celého rodu *Fusarium* len tri druhy jedincov produkujú fumonizíny v zaujímavých množstvách – *Fusarium verticillioides*, *Fusarium moniliforme* a *Fusarium proliferatum* (FAO, Rím, 2001). *Fusarium verticillioides* a *Fusarium proliferatum* patria k najbežnejším a najčastejšie sa vyskytujúcim hubám kontaminujúcim predovšetkým kukuricu.

Z výsledkov možno konštatovať, že v EU z 3863 vzoriek určených na stanovenie fumonizínu B1 bolo 46 % kontaminovaných a z 1010 vzoriek určených na stanovenie fumonizínu B2 bolo 42% kontaminovaných. Pomerne vysoká bola kontaminácia vzoriek pšenice (79%) fumonizínom B1. V prípade kukurice to bolo 66 % vzoriek (fumonizín B1) a 51 % vzoriek (fumonizín B2) (Brusel, 2003).

### MATERIÁL A METODIKA

Vzorky boli odobierané v sledovanom období v zmysle zákona NR SR č.152/95 Z. z. o potravinách v znení neskorších predpisov v rámci úradných kontrol potravín u prevádzkovateľov potravinárskych podnikov. Jednalo sa o vzorky odobraté orgánmi štátnej veterinárnej a potravinovej správy u prvotných producentov, výrobcov a v baliarňach obilnín, resp. v obchodnej sieti pričom boli analyzované na prítomnosť ochratoxínu A (OTA) a fuzáriových toxínov.

Všetky vzorky boli odobraté v zmysle nariadenie komisie (ES) č. 401/2006 z 23. februára 2006, ktorým sa stanovujú metódy odberu vzoriek a analytické metódy na úradnú kontrolu hodnôt mykotoxínov v potravinách.

Deoxynivalenol sa stanovoval metódou HPLC/UV, GC/TOF, stanovenie zearalenonu bolo vykonané metódou HPLC/FLD, GC/TOF, stanovenie T-2 a H-T2 toxínu metódou HPLC/MS/MS, GC/TOF, stanovenie fumonizínov B1+B2 metódou HPLC/FLD a stanovenie ochratoxínu A (OTA) metódou HPLC/FLD.

Najvyššie prípustné množstvá (NPM) fuzáriových toxínov v obilí a vo výrobkoch z obilia sú upravené Nariadením komisie č.1881/2006/ES v znení neskorších predpisov.

### VÝSLEDKY A DISKUSIA

#### Vyhodnotenie monitoringu toxínov rodu *Fusarium* v obilí slovenského pôvodu - úroda z roku 2008

Európska Komisia vo svojom Nariadení č.1126/2007/ES, ktoré mení a dopĺňa Nariadenie Komisie č.1881/2006, upravujúce maximálne množstvá niektorých kontaminantov v potravinách, upravila maximálne hodnoty toxínov rodu *Fusarium* v obilí a vo výrobkoch z obilia. V spomenutom nariadení sú ustanovené limity u obilia, vrátane kukurice pre deoxynivalenol (DEO), zearalenon (ZEA) a fumonizíny B1 a B2 (FB1 a FB2). Pre T-2 a HT-2 toxín z dôvodu nedostatku potrebných informácií limit stanovený nebol. Európska Komisia vyzvala v roku 2008 všetky členské štáty na monitorovanie situácie v tejto oblasti a vytvorenie spoločnej databázy, ktorá by reprezentovala reálnu situáciu stupňa kontaminácie obilia uvedenými toxínmi. Na základe uvedeného Štátna veterinárna a potravinová správa SR pristúpila k širšiemu monitorovaniu kontaminácie slovenského obilia toxínmi

rodu *Fusarium* z úrody roku 2008. Za účelom splnenia cieľov tohto monitoringu boli odobraté vzorky pšenice, raži, ovsu, jačmeňa a kukurice priamo u pestovateľov. Výsledky stanovení toxínov rodu *Fusarium* vo vzorkách uvedených druhoch obilia dokumentujú výsledky monitoringu. Z výsledkov je zrejmé, že u žiadnej zo vzoriek neboli prekročené už stanovené najvyššie prípustné množstvá (limity). Výsledky monitoringu ukazujú na relatívne nízku kontamináciu slovenského obilia z úrody roku 2008 toxínmi rodu *Fusarium* čo dokumentujú aj niektoré maximálne ako aj priemerné namerané hodnoty uvedené nižšie – v porovnaní s platnou legislatívou.

#### Vyhodnotenie monitoringu nivalenolu v obilí slovenského pôvodu - úroda z roku 2009

Nivalenol je jeden z druhov mykotoxínov, ktoré produkujú plesne rodu *Fusarium*. Tento mykotoxín v rámci harmonizovanej legislatívy Spoločenstva doposiaľ nemá stanovený platný limit. Na základe vedeckých poznatkov sa predpokladá jeho súbežný výskyt s deoxynivalenolom (DON) v obilí (najmä u ovsu) a to zrejme aj v podobných množstvách. Z uvedených dôvodov európska Komisia zvažuje o prípadnom stanovení samostatného limitu pre tento mykotoxín. Európska Komisia nemá doposiaľ k dispozícii dostatočnú databázu o nameraných hodnotách nivalenolu v obilí. Na základe uvedeného sa uskutočnil screeningový monitoring výskytu tohto kontaminantu v obilí slovenského pôvodu – pšenica, jačmeň, ovos, tritikale). Výsledky stanovení nivalenolu vo vzorkách uvedených druhoch obilia dokumentujú výsledky uvedeného monitoringu (celkovo bolo analyzovaných 79 vzoriek). Z výsledkov je zrejmé, že vzorky ovsu vykazujú vysokú hodnotu nivalenolu (okrem 1 vzorky nahého ovsu). Analýzami sa potvrdila teória o významných nálezocho nivalenolu práve u tohto druhu obilia. Nálezy nivalenolu sú tiež významné v jačmeni a v niektorých vzorkách pšenice. Na zistený výskyt kontaminácie nivalenolom však vplývajú viaceré environmentálne faktory. Z výsledkov je zrejmé, že v roku 2010 sa jednalo o vyššie namerané hodnoty deoxynivalenolu v porovnaní s rokom 2009. Jedná sa o výsledky v rámci výkonu úradných kontrol v sledovanom období, nie sú tu zahrnuté výsledky monitoringu.

#### Výsledky odberu vzoriek v rámci úradných kontrol

V roku 2008 bolo odobratých 166 vzoriek, všetky v sledovaných znakoch vyhovelí požiadavkám platnej legislatívy a boli v súlade s nariadením komisie (ES) č.1881/2006 z 19. decembra 2006, ktorým sa ustanovujú maximálne hodnoty obsahu niektorých kontaminantov v potravinách v znení neskorších predpisov. V roku 2009 bolo celkovo odobratých 178 vzoriek, v sledovaných znakoch nevyhovela požiadavkám platnej legislatívy 1 vzorka pšenice potravinárskej, odroda Pegassos pre prekročenie maximálnej hodnoty obsahu deoxynivalenolu. V roku 2010 bolo celkovo odobratých 200 vzoriek, v sledovaných znakoch nevyhoveli požiadavkám platnej legislatívy 2 vzorky. Vzorka potravinárskej pšenice (tvrdá), odroda Pentadur pre prekročenie maximálnej hodnoty obsahu deoxynivalenolu a pšeničná múka celozrnná špeciál pre prekročenie maximálnej hodnoty obsahu deoxynivalenolu.

## potravinárstvo

**Tab. 1** Jačmeň – prítomnosť fuzáriových toxínov v roku 2008 vyjadrená v  $\mu\text{g.kg}^{-1}$

Analyt	Počet analýz	Limit	Minimálna hodnota	Maximálna hodnota	Priemerná hodnota	Stredná hodnota
deoxynivalenol	38	1250	<20	576	48,8	<20
zearalenon	38	100	<10	30	0,8	<10
T2+HT2 toxín	8	-	<75	<75	<75	<75
T2 toxín	30	-	<15	58,93	3,38	<15

**Tab. 2** Pšenica – prítomnosť fuzáriových toxínov v roku 2008 vyjadrená v  $\mu\text{g.kg}^{-1}$

Analyt	Počet analýz	Limit	Minimálna hodnota	Maximálna hodnota	Priemerná hodnota	Stredná hodnota
deoxynivalenol	44	1250	<20	578	70	<20
zearalenon	38	100	<10	90	7,1	<10
T2+HT2 toxín	8	-	<75	<75	<75	<75
T2 toxín	36	-	<15	<15	<15	<15

**Tab. 3** Kukurica – prítomnosť fuzáriových toxínov v roku 2008 vyjadrená v  $\mu\text{g.kg}^{-1}$

Analyt	Počet analýz	Limit	Minimálna hodnota	Maximálna hodnota	Priemerná hodnota	Stredná hodnota
deoxynivalenol	24	1750	<20	560	75,9	<20
zearalenon	24	350	<10	120	13,9	<10
fumonizíny B1+B2	24	4000	<41	1207,4	187,6	69,2

**Tab. 4** Výsledky stanovení nivalenolu a deoxynivalenolu (monitoring 2009) - prítomnosť vyjadrená v  $\mu\text{g.kg}^{-1}$

vzorka	počet odobratých vzoriek	nivalenol		DON	
		max.	min.	max.	min.
pšenica	44	149,5	<5	539	<25
raž	7	102	<5	267	<25
jačmeň	19	586	<5	965	<25
ovos	4	1025	40	151	34
tritikale	5	141	<5	59	<25

**Tab. 5** Porovnanie stanovení v rokoch 2009-2010 - prítomnosť vyjadrená v  $\mu\text{g.kg}^{-1}$

vzorka	počet odobratých vzoriek	DON 2009		počet odobratých vzoriek	DON 2010	
		max.	min.		max.	min.
pšenica	44	539	<25	107	2438	<20
raž	7	267	<25	10	289	<100
jačmeň	19	965	<25	11	1243	<20
ovos	4	151	34	3	<20	<5
tritikale	5	59	<25	0	-	-

**Tab. 6** Porovnanie stanovení v rokoch 2009-2010 (úradné kontroly potravín) - prítomnosť vyjadrená v  $\mu\text{g.kg}^{-1}$

Pšenica – úroda 2009	Počet vykonaných analýz	Minimálna hodnota	Maximálna hodnota	Priemerná hodnota
ochratoxín A	21	<1	<1	<1
deoxynivalenol	70	<20	2220	241,03
nivalenol	0	-	-	-
zearalenon	70	<1	22	5,94
T2 toxín	20	16,6	<75	16,6
T2+HT2 toxín	17	<75	<75	<75

**Tab. 6** Pokračovanie

Pšenica – úroda 2010	Počet vykonaných analýz	Mínimálna hodnota	Maximálna hodnota	Priemerná hodnota
ochratoxín A	14	<0,05	<0,2	0,1
deoxynivalenol	77	<20	2438,22	552,25
nivalenol	13	<5	<5	<5
zearalenon	69	<1	288	39,08
T2 toxín	49	<1	78,1	36,26
T2+HT2 toxín	49	<1	65	17,63

## ZÁVER

Monitorovaniu kontaminácie slovenského obilia toxínmi a sledovanie maximálnych množstiev niektorých kontaminantov v potravinách je neoddeliteľnou súčasťou úradnej kontroly potravín v Slovenskej republike. Táto činnosť sa vykonáva prostredníctvom systematických úradných kontrol a na základe analýzy rizika. Náročnosť požiadaviek sa z roka na rok zvyšuje, čo do počtu odobratých vzoriek, ako aj dodržaním legislatívnych požiadaviek, pokiaľ sa jedná o metódy odberu vzoriek a analytické metódy na úradnú kontrolu hodnôt mykotoxínov v potravinách. S cieľom vysokej úrovne ochrany ľudského života a zdravia sa tejto činnosti bude aj naďalej venovať osobitná pozornosť.

Na základe výsledkov Štátnej veterinárnej a potravinovej správy SR je možné konštatovať, že bolo kontaminovaných v prípade nivalenolu 47% analyzovaných vzoriek a u deoxinivalenolu 77% vzoriek v roku 2009. Pokiaľ sa jedná o vyhodnotenie v roku 2010 je to v prípade deoxinivalenolu 84,5% kontaminovaných vzoriek obilnín (169 vzoriek z 200 analyzovaných).

Napriek skutočnosti, že najvyššie prípustné množstvá, ktoré stanovuje nariadenie komisie (ES) č.1881/2006 z 19. decembra 2006, ktorým sa ustanovujú maximálne hodnoty obsahu niektorých kontaminantov v potravinách v znení neskorších predpisov boli prekročené iba u jednej vzorky v roku 2009 a u dvoch vzoriek v roku 2010, jedná sa o vysoké množstvo pozitívnych nálezov v tejto komodite.

Namerané hodnoty fuzáriových toxínov u odobratých vzoriek počas monitoringov, ako aj v priebehu úradných kontrol poukazujú na vyššie namerané hodnoty v roku 2010 v porovnaní s rokom 2009, rozdielne hodnoty boli zistené aj v závislosti od pestovateľskej oblasti. Všeobecne sa jedná o vyššie množstvo kontaminovaných vzoriek u nás v porovnaní s priemerom v EU. Preto je veľmi dôležité pokračovať v sledovaní kontaminácie obilnín a v analýzach v rámci odobratých vzoriek v oblasti úradných kontrol potravín za účelom ochrany spotrebiteľa. V súvislosti s infekciou *Fusarium* a tvorbou mykotoxínov bolo už identifikovaných viacero rizikových faktorov v rámci prevencie a znižovania kontaminácie, je potrebné

sa venovať aj tejto otázke v rámci pestovania, zberu, spracovania a skladovania, ale aj v rámci výkonu a zamerania úradných kontrol potravín v SR.

## LITERATÚRA

BETINA, V. 1990. *Mykotoxíny chémia – biológia – ekológia*. Bratislava : Alfa, 1990, 285 s. ISBN 80-05-00631-4.

FAO. 2001. Safety evaluation of certain mycotoxins in Food. FAO Food and Nutrition Paper No. 74, Rome, Italy.

WIEDENBORN, M. 2001. Encyclopedia od Food Mycotoxins. Berlin : Springer-Verlag Berlin and Heidelberg GmbH & Co. K, 2001. 312 p. ISBN 9783540675563.

OUANES-BENOTHMEN, Z., EL-GOLLI, E., ABID-ESSEFI, S., BACHA, H. Cytotoxicity effects induced by Zearalenone metabolites, alfa Zearalenol and beta Zearalenol. On cultured Vero Cells. In *Toxicology*, vol. 252, 2008, p.72-77.

EU EC DG Health and Consumer Protection. 2003. Reports on tasks for scientific cooperation. Task 3.2.10 „Collection of occurrence data of *Fusarium* toxins in food and assessment of dietary intake by the population of EU member states.“. Brussels, April 2003.

*Commission Regulation (EC) No 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs (OJ L 364, 20.12.2006, p. 5–24).*

## Contact address:

Jaroslav Remža, Department of foodstuffs non-animal origin, State Veterinary and Food Administration of Slovak Republic, Botanická 17, 842 13 Bratislava, Slovak Republic, E-mail: remza@svssr.sk.

Jozef Bireš, State Veterinary and Food Administration of Slovak Republic, Botanická 17, 842 13 Bratislava, Slovak Republic, E-mail: bires@svssr.sk

Mária Matúšová, State Veterinary and Food Administration of Slovak Republic, Botanická 17, 842 13 Bratislava, Slovak Republic, E-mail: matusova@svssr.sk

Magdaléna Lacko-Bartošová, Slovak University of Agriculture, Faculty of Agrobiolgy and Food Resources, Department of Sustainable Agriculture and Herbology, Nitra, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra. E-mail: magdalena.lacko-bartosova@uniag.sk

## STUDIES OF CHOSEN TOXIC ELEMENTS CONCENTRATION IN MULTIFLOWER BEE HONEY

*Adam Roman, Ewa Popiela*

### ABSTRACT

The aim of the study was to determine the bioaccumulation level of chosen toxic elements (Zn, Cu, Pb, As and Cd) in multiflower honey collected from Brzeg area. Biological material (honey) was mineralized using the microwave technique at an elevated pressure in the microprocessor station of pressure in the type Mars 5. Quantitative analysis of elements (As, Cd, Cu, Pb and Zn) was performed by plasma spectrometry method using a Varian ICP-AES apparatus. The presence of toxic elements was determined in examined biological materials. The elements followed the following decreasing order with respect to their content of honey: Zn>Cu>Pb>As>Cd. The average concentrations of studied elements observed in multiflower honey were as follows: 6.24 mg.kg<sup>-1</sup> of zinc, 2.75 mg.kg<sup>-1</sup> of copper, 0.53, 0.071, 0.042 mg.kg<sup>-1</sup> of lead, arsenic and cadmium, respectively. Lead was the most problematic in bee honey because its average content exceeded the maximum acceptable concentration. Additionally, this metal concentration was 60% higher in studied samples than allowable standard of lead content.

**Keywords:** honey, heavy metals, arsenic, cadmium, copper, lead, zinc, accumulation

### INTRODUCTION

Among many pollutants accumulating in the environment, there are elements of toxic properties like a cadmium, copper, lead, zinc and arsenic. These heavy metals may cause vascular diseases, kidney or bones damages, irregular functioning of human and animal reproductive system. They can easily penetrate to the cell membranes and internal organs as well as cause denaturation of proteins in the blood or mucous membranes and penetrate to the tissues. The most toxic elements are lead, cadmium and arsenic. In the nature they often occur in higher concentration than the allowable maximum concentrations and may contribute to the formation of tumors in human organism (**Kabata-Pendias and Pendias 1999**).

Honey bees (*Apis mellifera* L.) are 100% dependent on the flowering plants which provide them with nectar and pollen. The pollutants occurring within area where bees are working can be accumulated in honey bees organism and also in the raw material collected by bees (**Roman 2009 and 2010**).

Honey is a natural product produced by bee workers from the nectar or honeydew, without any human interference. It consists 80% of dry weight, which is dominated by (98-99% of dry weight) carbohydrates (mainly glucose and fructose). The remaining part consists 0.2-3.0% of protein and 0.25-1.0% of minerals. Raw material for honey production is obtained by honey bees from the external environment, therefore, it also contains pollutants characteristic for the relevant environment (Roman 1997). However, bee workers partly purify raw material from some part of heavy metals during processing. (**Jabłoński et al. 1995, Roman and Demeńczuk 2003**).

The aim of the study was to determine the accumulation degree of chosen toxic elements (As, Cd, Cu, Pb and Zn) in multi-flower honey collected from bee colonies located in Brzeg area.

### MATERIAL AND METHODS

The research material for the investigation comprised samples of multi-flower honey that came from stationary

apiaries situated in Brzeg area (Opole province, Poland). Material was collected from May to August 2009. The study contained 10 apiaries, honey was collected from 3 bee colonies in each apiary (n=3x10=30). Each individual sample weighted about 100 g.

The samples were homogenized by mixing and about 1000 mg (±0,1 mg) of material from each sample was weighted and diluted with 20 ml concentrated, spectrally pure, nitric acid solution. Next, samples were mineralized using the microwave technique at an elevated pressure in the chip-type Mars 5.

Quantitative analysis of elements studied (arsenic, cadmium, copper, lead, and zinc) were conducted using Varian ICP-AES plasma spectrometer with mass detection and CETAC-5000 AT ultrasonic nebulizer. All analysis were conducted in Analytical Laboratory of Wrocław University of Environmental and Life Science (Poland).

The results of the study were elaborated statistically by ANOVA. The mean concentrations of elements, standard deviations and correlations between elements were calculated. Level of significance was taken as P < 0.01 or P < 0.05.

### RESULTS AND DISCUSSION

The multi-flower honey used in the study showed low levels of zinc. Its average value was 6.24 mg.kg<sup>-1</sup>. The content of this metal in all honey samples was below the permissible standards for honey, i.e. <15.00 mg.kg<sup>-1</sup> and ranged from 1.13 to 13.92 mg.kg<sup>-1</sup> (Table 1). Comparable level of zinc (mean amounted 3.14 mg.kg<sup>-1</sup>) accumulation in honey was noted by **Conti (2000)**. **Przybyłowski and Wilczyńska (2001)** demonstrated slightly higher content of zinc in honey where average ranged 7.76 mg.kg<sup>-1</sup>. Very similar results were noted by **Tuzen et al. (2007) and Yazgan et al. (2006)**. **Caroli et al. (2000)** found in their study of honey very low (0.405 mg.kg<sup>-1</sup>) level of zinc concentration. However, although zinc is one of the heavy metals it fulfills important physiological function in human organisms (**Kabata-Pendias and Pendias 1999**). Therefore this is a reason why this element is called "bio-element" and its small quantity in food products should be included.

**Table 1** Concentration of chosen elements in bee honey (N=30)

No. of sample	Chemical Elements (in mg·kg <sup>-1</sup> )				
	As	Cd	Cu	Pb	Zn
Min.	0,005	0,001	1,03	0,11	1,13
Max.	0,204	0,110	7,72	1,12	13,92
Average	<b>0.071 Aa</b>	<b>0.042 Ab</b>	<b>2.75 B</b>	<b>0.53 C</b>	<b>6.24 D</b>
SD	0.055	0.032	1.56	0.31	3.02
Variation coefficient (%)	76.7	77.6	56.8	58.6	48.4
NDS	0.20	0.10	10.00	0.40	15.00

NDS – maximum acceptable concentration according to Polish Standards PN-88/A-77626 „Bee honey”

Similarly, copper is considered a heavy metal but it participates in humans and animals physiological functions and belongs to bio-elements (Kabata-Pendias and Pendias 1999). The present study demonstrated that the average accumulation of copper in the honey amounted to 2.75 mg·kg<sup>-1</sup>. Even the maximum content of that metal was below the acceptable standards (10.00 mg·kg<sup>-1</sup>) and recorded on 7.72 mg·kg<sup>-1</sup> level (Table 1). Comparable amounts of copper in honey were shown by Yazgan et al. (2006), by Tuzen et al. (2007) and by Fernández-Torres et al. (2005). Slightly lower (0.696 mg·kg<sup>-1</sup>) copper concentration in multiflower honey was obtained by Stankovska et al. (2008). Significant lower copper content in honey was noted by Forte et al. (2001), Sodr  et al. (2007) and Conti (2000). Only Roman (1997) demonstrated a higher concentration of Cu up to 6.178 mg·kg<sup>-1</sup> on average in honey from the copper industry region.

Another heavy metal which was found in high concentration in bee honey was lead. The average level was 0.53 mg·kg<sup>-1</sup>. This value is much higher than the permissible standard for honey which average 0.40 mg·kg<sup>-1</sup> (Table 1). Additionally, this metal concentration was 60% higher in studied samples than allowable standard of lead content. Therefore, lead should be considered as the most burdensome toxic pollution of the bee honey. Two time larger concentration of lead, which amounted an average of 1.097 mgPb·kg<sup>-1</sup>, was observed by Roman (1997) in honeys from the region of Głog w, and by Sodr  et al. (2007) - 0.863 mg·kg<sup>-1</sup>. On the other hand, Jones (1987) showed in British honeys low levels of lead accumulation ranged from 0.002 to 0.20 mg·kg<sup>-1</sup>. Very low content of this metal in honeys from Rome suburbs was also found by Conti and Botr  (2001) and also by Przybyłowski and Wilczyńska (2001).

Arsenic is an element which has a strong toxic properties. It doesn't fulfill any physiological function in humans organism. Therefore, its presence in the products which can't be utilised by the digestive system is

completely undesirable. The average content of this element in honey was below the maximum allowable standards (NDS) and amounted to 0.071 mg·kg<sup>-1</sup> (Table 1). Only in one sample concentrations of arsenic exceeded the limits (0.20 mg·kg<sup>-1</sup>). In British honey samples significant wide range of arsenic content as the coefficient of variation, i.e 76.7% was observed. Significantly lower concentration of this element in honey, i.e 0.00318 mg·kg<sup>-1</sup> and 0.00599 mg·kg<sup>-1</sup> was obtained by Caroli et al. (2000) and by Forte et al. (2001), respectively. Roman (1997) in his earlier studies showed that an average concentration of arsenic in honey derived from the cement industry region was to 0.156 mg·kg<sup>-1</sup>. In turn, the level of As in honey from the copper industry area was to 0.368 mg·kg<sup>-1</sup>.

Cadmium, similar like lead and arsenic, is an undesirable element in human and animal organisms. It doesn't fulfill any physiological functions because it shows strong toxic properties (Kabata-Pendias and Pendias 1999). The average level of cadmium in present research was demonstrated as a 0.042 mg·kg<sup>-1</sup> (Table 1). Of all honey samples 10% has exceeded the allowable limits (0.10 mg·kg<sup>-1</sup>) of this element. Tuzen et al. (2007) as well as Przybyłowski and Wilczyńska (2001) found significant lower cadmium content, i.e 0.0179 and 0.015 mg·kg<sup>-1</sup>, respectively. Very low concentrations of this heavy metal in honey were obtained by Caroli et al. (2000), Yazgan et al. (2006), Conti and Botr  (2001) and Forte et al. (2001). Only Jones' (1987) study demonstrated a very high concentration of Cd in honey (0.30 mg·kg<sup>-1</sup>).

The study was demonstrated that the most problematic toxic element in bee honey was lead. Only in this case the mean concentration was much higher than the acceptable limits. The elements followed the following decreasing order with respect to their content of honey: Zn>Cu>Pb>As>Cd. No significant correlation between the concentration of particular elements in bee honey was observed (Table 2). However, Fr as et al. (2008) found such a correlation between cadmium and zinc as well as cadmium and lead content in honey harvested in Tenerife.

**Table 2** The values of correlation coefficient (r) between concentration of each element in honey (n=150)

Elements	Cd	Cu	Pb	Zn	As
Cd	-	-0.094	-0.282	0.027	-0.058
Cu	-0.094	-	0.006	-0.081	-0.308
Pb	-0.282	0.006	-	-0.135	0.075
Zn	0.027	-0.081	-0.135	-	0.071
As	-0.058	-0.308	0.075	0.071	-

A. B. C. D - differences between the elements assessed highly significant on a level of p<0.01, a. b - differences between the elements assessed significant on a level of p<0.05



## CONCLUSIONS

In multiflower honey the sequence of examined elements concentration level was the same: Zn > Cu > Pb > As > Cd.

The most problematic element in bee honey was lead. Its average concentration was 60% higher in studied samples than allowable standard of lead content.

In all honey samples copper and zinc weren't exceed the maximum permissible concentration for these heavy metals.

## REFERENCES

CAROLI, S., FORTE, G., ALESSANDRELLI, M., CRESTI, R., SPAGNOLI, M., D'ILIO, S., PAUWELS, J., KRAMER, G. N. 2000. A pilot study for the production of a certified reference material for trace elements in honey. In *Microchemical Journal*, vol. 67, 2000, p. 227-233.

CONTI, M. E. 2000. Lazio region (Central Italy) honeys: A survey of mineral content and typical quality parameters. In *Food Control*, vol. 11, 2000, no. 6, p. 459-463.

CONTI, M. E., BOTRÈ, F. 2001. Honeybees and their products as potential bioindicators of heavy metals contamination. In *Environmental Monitoring and Assessment*, vol. 69, 2001, p. 267-282.

FERNÁNDEZ-TORRES, R., PÉREZ-BERNAL, J. L., BELLO-LÓPEZ, M. A., CALLEJÓN-MOCHÓN, M., JIMÉNEZ-SÁNCHEZ, J. C., GUIRAÚM-PÉREZ, A. 2005. Mineral content and botanical origin of Spanish honeys.

In *Talanta*, vol. 65, 2005, no. 3, p. 686-691.

FORTE, G., D'ILIO, S., CAROLI, S. 2001. Honey as a candidate reference material for trace elements. In *Journal of AOAC International*, vol. 84, 2001, no. 6, p. 1972-1975.

FRÍAS, I., RUBIO, C., GONZÁLEZ-IGLESIAS, T., GUTIÉRREZ, J., GONZÁLEZ-WELLER, D., HARDISSON, A. 2008. Metals in fresh honeys from Tenerife Island, Spain. In *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, vol. 80, 2008, no. 1, p. 30-33.

JABŁOŃSKI, B., KOŁTOWSKI, Z., MARCINKOWSKI, J., RYBAK-CHMIELEWSKA, H., SZCZĘSNA, T., WARAKOMSKA, Z. 1995. Contamination of nectar, honey and pollen collected from roadside plants. In *Pszczelnicze Zeszyty Naukowe*, vol. 2, p. 129-144.

JONES, K. C. 1987. Honey as an indicator of heavy metal contamination. In *Water, Air, and Soil Pollution*, vol. 33, 1987, p. 179-189.

KABATA-PENDIAS, A., PENDIAS, H. 1999. *Biogeochemia pierwiastków śladowych*. PWN, Warszawa, p. 74-288.

PN-88/A-77626 Miód pszczeli, 1988. Dz.U. nr 8, position 19.

PRZYBYŁOWSKI, P., WILCZYŃSKA, A. 2001. Honey as an environmental marker. In *Food Chemistry*, vol. 74, 2001, p. 289-291.

ROMAN, A. 1997. Bees and their products as pollution bioindicator in the copper (LGOM) and lime-cement (Opole) industry areas. In *Zeszyty Naukowe Akademii Rolniczej we Wrocławiu*. Seria: Zootechnika., vol. 323, p. 175-193.

ROMAN, A., 2009. Concentration of Chosen Trace Elements of Toxic Properties in Bee Pollen Loads. In *Polish J. of Environ. Stud.*, vol. 18, 2009, no. 2, p. 265-272.

ROMAN, A., 2010. Level of Copper, Selenium, Lead, and Cadmium in Forager Bees. In *Polish J. of Environ. Stud.*, vol. 19, 2010, no. 3, p. 663-669.

ROMAN, A., DEMEŃCZUK, D. 2003. Reduction of trace element contents in honey material being processed into honey by the honey bee. In *Zeszyty Naukowe Akademii Rolniczej w Krakowie*. Seria: Ogródnictwo., vol. 25, 2003, p. 19-30.

SODRÉ, G. D. S., MARCHINI, L. C., ZUCCHI, O. L. A. D., NASCIMENTO, FILHO, V. F., OTSUK, I. P., MORETI, A. C. D. C. C. 2007. Determination of chemical elements in africanized *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) honey samples from the State of Piauí, Brazil. In *Química Nova*, vol. 30, 2007, p. 920-924.

STANKOVSKA, E., STAFILOV, T., ŠAJN, R. 2008. Monitoring of trace elements in honey from the Republic of Macedonia by atomic absorption spectrometry. In *Environmental Monitoring and Assessment*, vol. 142, 2008, no. 1-3, p. 117-126.

TUZEN, M., SILICI, S., MENDIL, D., SOYLAK, M. 2007. Trace element levels in honeys from different regions of Turkey. In *Food Chemistry*, vol. 103, 2007, p. 325-330.

YAZGAN, S., HORN, H., ISENGARD, H. D., 2006. Honey as bio indicator by screening the heavy metal content of the environment. In *Deutsche Lebensmittel-Rundschau*, vol. 102, 2006, p. 192-194.

## Contact address:

Adam Roman, dr. hab. ing., Wrocław University of Environmental and Life Science, Department of Environment Hygiene and Animal Welfare, Chełmońskiego 38C, 51-630 Wrocław, Poland, E-mail: adam.roman@up.wroc.pl

Ewa Popiela, Wrocław University of Environmental and Life Science, Department of Environment Hygiene and Animal Welfare, Chełmońskiego 38C, 51-630 Wrocław, Poland, E-mail: ewa.popiela@up.wroc.pl

## EVA GREEN REAL-TIME PCR USED TO DETECT CELERY AS AN ALLERGEN IN FOOD.

Ondrej Škultéty, Jurčáková Andrea

### ABSTRACT

EvaGreen® Real-Time PCR method has been used for celery (*Apium graveolens*) allergen detection. A primer designed in mannitol dehydrogenase gene region has been used for specific celery identification in sample. The results show possibility to create calibration curve using artificially adulterated samples. An increasing variability between parallel calibration of celery samples has been observed from 0.1 % to 100%. The detection limit has been set to value 0.1% in celery representing 1000 ppm. Fluorescent signal has been presented even in samples with lower percentage addition of celery but these samples have been excluded according to unspecific melting curve.

**Keywords:** apium graveolens; food analysis; detection limit; polymerase chain reaction

### ÚVOD

Potravinové alergény sa stávajú čoraz viac a viac sledované medzinárodným potravinovým obchodom a orgánmi pre bezpečnosť potravín. To poskytuje spotrebiteľovi informácie, ako sa vyhnúť zdravotnému riziku spôsobenému potenciálnym alergénom v potravine (Hupfer et al., 2007). Potravinová alergia je definovaná ako "hypersenzitivita zapríčinená imunologickými mechanizmami" (Johansson et al., 2001). Alergia na potraviny ovplyvňuje asi 3% až 4% dospeljej populácie (Sampson, 2004). Výsledok celého procesu je okamžitá alergická reakcia sprevádzaná procesom, ktorý môže mať za následok lokálne príznaky v mieste kontaktu, napr. v ústnej dutine. Môže vzniknúť aj žalúdočno-črevná precitlivosť s nevoľnosťou, zvracaním alebo hnačkou, povrchové príznaky ako žihľavka a ekzém, dýchacie príznaky, systémové anafylaxie s kardiovaskulárnymi a žalúdočno-črevnými príznakmi ktoré niekedy vedú k šoku (Isacsson et al., 2000). Aj keď väčšina potravinových alergénov spôsobuje mierne reakcie, v niektorých prípadoch môžu spôsobiť ohrozenie života. Vylúčenie potraviny je momentálne jediná dostupná liečba (Sampson, 2003). Aktuálne metódy používané k detegovaniu alergénov v potravinách sú hlavne ELISA, PCR a Real-time PCR (Van Hengel, 2007; Bošiak, Židek a Golian, 2009; Bajzik et al., 2010; Revák, Židek a Golian, 2010; Zelenáková et al., 2010). Real-time PCR je založená na meraní fluorescenčného signálu, ktorý sa zväčšuje počas amplifikácie PCR produktu. Esovité krivky získané z hodnoty fluorescencie v danom počte cyklov je používaná na kvantifikáciu cieľovej DNA vo vzorke. Kvantifikácia je založená na prahovom cykle, teda cykle, v ktorom môžeme rozoznať fosforeskujúci signál od šumu pozadia. Real-time PCR metóda umožňuje zistenie alergénnej zložky v potravine na úrovni 10 mg.kg<sup>-1</sup> a nižšej (Stephan et al., 2004; Hird et al., 2003).

### MATERIÁL A METÓDY

#### Príprava vzoriek

Príprava vzorky zo zakúpenej hlúzy zeleru spočívala v umytí hlúzy, ošúpaní, nastrúhaní jadra hlúzy a následným sušením pri teplote 60 °C 12 hodín. Po vysušení sme jednotlivé kúsky rozomleli mixérom na jemný prášok a zhomogenizovali 10 minút pri 10 000 otáčkach za minútu v homogenizátore (Ovidomix). Na prípravu rôznych koncentrácií sme použili hladkú

múku. Podobným spôsobom pripravovali vzorky aj autori Hupfer et al. (2007).

Pafundo et al. (2009) pri príprave vzoriek riedili samotnú DNA, čo je v porovnaní s našou metódou síce jednoduchšie, ale pri zostavovaní kalibračnej krivky sú v tomto prípade skreslené výsledky. Zelerový prášok s múkou sme miešali desiatkovým systémom riedenia nasledovne: 0,5g vzorky zeleru na 4,5g hladkej múky. Vzorky sme vážili na analytických váhach s presnosťou na 3 desatinné miesta. Po navážení sa vzorky dokonale premiešali za pomoci Vortexu (Biosan) približne 1 minútu. Takýmto spôsobom sme pripravili 9 riedení od 100% kontrolnej vzorky (vzorka čistého zelerového prášku) až po vzorku s obsahom zeleru 0,000001%. Všetky hodnoty sú uvedené v tabuľke č.1.

Tabuľka 1 Navážka vzoriek a identifikácie detekčného limitu

Poradie vzorky	Obsah zeleru vo vzorke [%]	PCR
vzorka 1	100	+
vzorka 2	10	+
vzorka 3	1	+
vzorka 4	0,1	+
vzorka 5	0,01	-
vzorka 6	0,001	-
vzorka 7	0,0001	-
vzorka 8	0,00001	-
vzorka 9	0,000001	-
Neg. kontrola	0	-

#### Extrakcia DNA

Extrakciu DNA zo vzoriek sme robili za pomoci komerčného kitu určeného na gonomicnú purifikáciu DNA z potravín NucleoSpin®Food (Macherey-Nagel, Suisse) podľa priloženého protokolu.

#### Primery

Na detekciu prítomnosti zeleru vo vzorke sme použili primery na detekciu manitol dehydrogenázy (GenBank, Accession No. AF067082). Primery sme použili od autorov (Dovičovičová et al., 2004). Autori navrhli primery celF 5'-CAGCCTGTTTCCCGTACGAGAT -3' a celR 5' -TGCCAAATAAAGATTCGAGATTGT -3'. Primery boli navrhnuté a otestované programom Primer Express software (Applied Biosystem) s teoretickou teplotou topenia 60 °C. Primery boli otestované s nehomologickými DNA sekvenciami iných rastlín použitím softvéru Blast 2.1

(National Center for Biotechnology Information, Bethesda, Md., USA), (Jurčáková et al., 2011).

**PCR reakcia:**

**EvaGreen Real-Time PCR**

Reakčná zmes na jednu vzorku pre PCR v celkovom objeme 20µl bola pripravená z 10µl Fast EvaGreen® qPCR Master Mix (Biotium), 6µl bidestilovanej vody, 2µl templátovej DNA a primermi celF a celR po 1µl, tak, ako to stanovuje výrobca v užívateľskom manuáli.

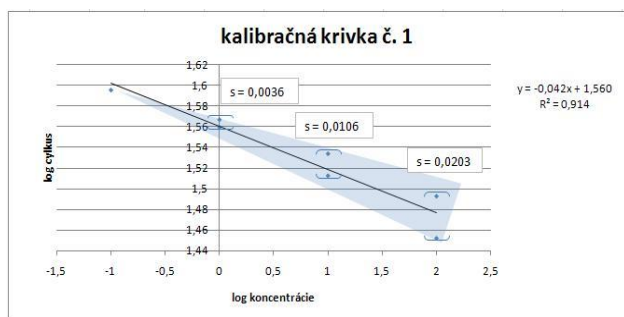
**Tabuľka 2** Zloženie mastermixu pre vzorku

Komponenty PCR reakcie	Koncentrácia zásobného roztoku	Koncentrácia použitého roztoku
Fast EvaGreen® qPCR Master Mix	2x	1x
celF	10 pmol/µl	0,50 pmol/µl
celR	10 pmol/µl	0,50 pmol/µl
DNA	-	2

PCR reakcia bola zahájená počiatočnou denaturáciou prebiehajúcou pri teplote 95 °C po dobu 5 minút a následne v 40 cykloch tieto 3 kroky: denaturácia pri 94 °C po dobu 30 sekúnd, annealing pri 59 °C po dobu 30 sekúnd, polymerizácia pri 72 °C po dobu 1 minúty, po ktorej nasledovalo meranie fluorescencie. V ďalšom kroku nasledovala konečná polymerizácia pri 72 °C, po dobu 8 minút, po ktorej prebiehal melting pri teplote 95 °C s následným ochladením na 65 °C s výdržou 15 sekúnd. Real-Time PCR prebiehala v prístroji LightCycler 1,5 (Roche). Analýza vzoriek bola vykonaná v programe LightCycler Software 4.05 pomocou procedúry „Absolute Quantification“ a „Tm Calling“. Získané dáta boli spracované do tabuliek v programe EXCEL 2007.

**VÝSLEDKY A DISKUSIA**

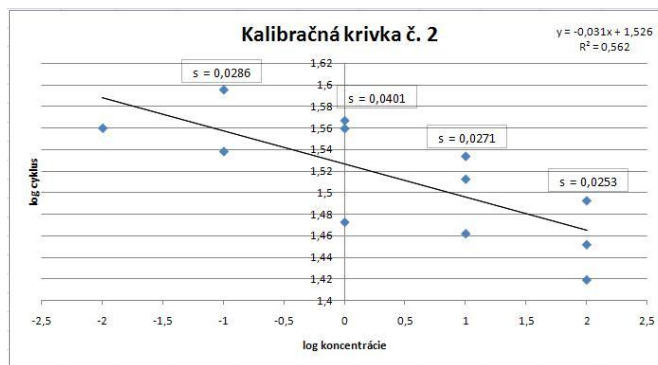
Vzorky zámerné kontaminované prímiesou zeleru boli paralelne testované za účelom vyhodnotenia variability kalibračnej krivky v rámci jednej PCR reakcie.



**Obrázok 1** kalibračná krivka paralelných kalibračných vzoriek zeleru v jednom PCR mixe

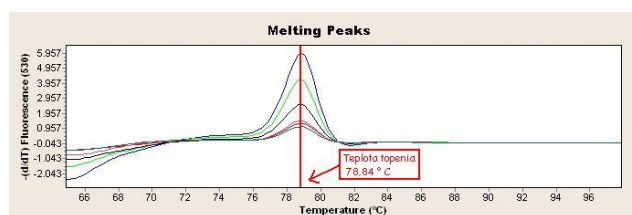
Na osi x sú logaritmované hodnoty koncentrácie zeleru vo vzorke a na osi y je logaritmus cyklu v ktorom vzorka prekročila nešpecifické pozadie. Na základe koncentrácie PCR produktu v jednotlivých cykloch sme zostavili

kalibračnú krivku, ktorej smerodajné odchýlky sa znižujú od 100% čistej kontrolnej vzorky smerom k riedenej 0,1% vzorke zeleru. Z toho vyplýva, že keď stanovujeme v detekčnom limite (do 0,1%) vzorku, najmenšia odchýlka bude pri najviac riedenej vzorke a naopak najväčšia je pri 100% čistej kontrolnej vzorke zeleru. Dochádza však ku kalibračnej chybe pri paralelných vzorkách v rámci rovnakého PCR mixu. Napriek tejto variabilite kalibračných vzoriek je determinačný koeficient vysoký, z čoho vyplýva, že regresná rovnica je vhodná na predpovedanie hodnoty y s koeficientom determinácie 0,914.



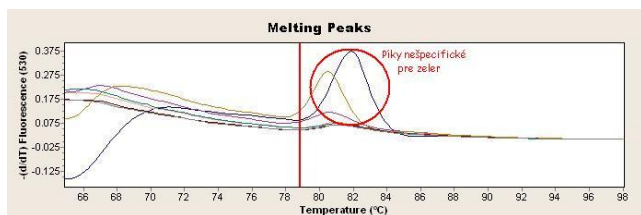
**Obrázok 2** Kalibračná krivka detekcie zeleru pri opakovaných vzorkách v rôznych PCR mixoch

Veľká variabilita, ktorú môžeme sledovať na obrázku 2 spôsobuje, že pri opakovaných vzorkách sa síce dá vytvoriť kalibračná krivka, avšak má malú spoľahlivosť. Smerodajné odchýlky sú rozdielne, najvyššia je však pri hodnote 0, čiže pri 1% koncentrácií zeleru vo vzorke. Pri hodnote 2, čiže vzorke s koncentráciou zeleru 100% je smerodajná odchýlka najnižšia. Determinačný koeficient dosahuje hodnotu 0,5627, čiže spoľahlivosť interpolácie výsledkov je 74,9 % a daná regresná rovnica sa nedá používať paušálne, teda vždy musíme pri detekcii použiť aspoň jednu kalibračnú vzorku, aby sme mohli určiť tvar kalibračnej krivky, z ktorej si potom môžeme zostaviť regresnú rovnicu, na základe ktorej budeme predpovedať hodnoty y.



**Obrázok 3** Krivky topenia PCR produktov

Na tomto obrázku vidíme krivky topenia fragmentu špecifického pre zeler. Na osi x je teplota a na osi y derivácia fluorescencie. Teplota topenia je 78,84 °C. Wu et al. (2010) uvádzajú teplotu topenia špecifického zelerového fragmentu 67,8 °C pri využití SYBR® Green Real-Time PCR s použitím iných primerov. Intenzita fluorescencie je najvyššia pri vzorke so 100% obsahom zeleru a postupne klesá pri vzorkách s nižším obsahom zeleru vo vzorke. Na základe intenzity fluorescencie by sa mohol zeler vo vzorke kvantifikovať, tak ako to vo svojich prácach uvádzajú autori Pafundo et al. (2009) a (Wu et al., 2010), avšak táto metóda je len orientačná a na základe nej nemôžeme stanoviť presný obsah zeleru vo vzorke.



Obrázok 4 Krivky topenia PCR produktov

Na obrázku 4 pozorujeme nešpecifické pozadie u vzoriek s nízkou koncentráciou DNA zeleru (0,01 a nižšej), ktorých teplota topenia sa výrazne líši od teploty špecifickej pre zeler a tým pádom nevieme touto metódou identifikovať vzorky s koncentráciou zeleru nižšou ako 0,1%. **Dovičovičová et al. (2004)** vo svojej práci, zameranej na dôkaz zeleru za pomoci PCR s vizualizáciou na gély, uvádzajú rovnaký detekčný limit s použitím rovnakých primerov. **Wu et al. (2010)** sa zameriavali na SYBR® Green Real-Time PCR s použitím iných primerov ako my a ich detekčný limit pri surovom zeleri bol 0,001% a pri tepelne ošetrených vzorkách 0,01%. **Hupfer et al. (2007)** použili na stanovenie detekčného limitu Taqman™ sondu a dokázali identifikovať zeler vo vzorke s koncentráciou 0,001%.

## ZÁVER

Alergické reakcie na potraviny vyplývajú z nárastu imunitných odpovedí na glykoproteínové zložky prítomné v potravinách a predstavujú častý zdravotný problém. Zeler je uznaný ako jeden z hlavných potravinových alergénov, ktoré môžu byť prítomné v potravine a z uvedeného dôvodu musí byť jeho prítomnosť označená. Na to, aby mohla byť zložka potravín kvantifikovaná, je potrebné zostrojiť kalibračnú krivku. Pre získanie kalibračnej krivky boli použité vzorky s rôznym podielom zelerového prášku vo vzorke. Môžeme konštatovať, že primerový pár špecifický pre prítomnosť zeleru navrhnutý autormi **Dovičovičová et al. (2004)**, je schopný korektne detegovať prítomnosť prímеси zeleru len do koncentrácie 0,01 %. Pri nižšom zastúpení zeleru vo vzorke primerový pár nešpecificky reaguje a vytvára produkty, ktoré by u náhodnej vzorky nebolo možné jasne definovať.

## LITERATÚRA

BAJZÍK, P., GOLIAN, J., ŽIDEK, R., ČAPLA, J., BELEJ, Ľ., ONDREJKA, M., MRÁZOVÁ, Ľ., MARŠÁLKOVÁ, L. 2010. Methods for fish species identification in food products. In *Potravinárstvo*, vol. 4, 2010, no. 2, p. 1-5.

BOŠIAK, M., ŽIDEK, R., GOLIAN, J. 2009. Soy quantification on food products by real-time polymerase chain reaction. In *Potravinárstvo*, vol. 3, 2009, no. 1, p. 3-5.

DOVIČOVIČOVÁ, Ľ., OLEXOVÁ, L., PANGALLO, D., SIEKEL, P., KUČHTA, T. 2004. Polymerase chain reaction (PCR) for detection of celery (*Apium graveolens*) in food. In *Eur Food Res Technol*, vol. 218, 2004, p. 493-495

HIRD, H., LLOYD, J., GOODIER, R., BROWN, J., REECE, P. 2003. Detection of peanut using real-time polymerase chain reaction. In *Eur Food Res Technol*, vol. 217, 2003, p. 265-268

HUPFER, Ch., WAIBLINGER, H. U., BUSCH, U. 2007. Development and validation of a real-time PCR detection method for celery in food. In *Eur. Food Res. Technol.*, vol. 225, 2007, p. 329-335

ISACSSON, J., CAO H., OHLSSON, L., NORDGREN, S., SVANVIK, N., WESTMAN, G., KUBISTA, M., SJÖBACK, R., SEHLSTEDT, U. 2000. Rapid and specific detection of PCR products using light-up probes. In *Molecular and Cellular Probes*, vol. 14, 2000, p. 321-328

JOHANSSON, S., HOURIHANE, J., BOUSQUET, J., BRUIJNZEEL-KOOMEN, C., DREBORG, S., HAAHTELA, T., KOWALSKI, M., MYGIND, N., RING, J., VAN CAUWENBERGE, P., VAN HAGE-HAMSTEN, M., WÜTHRICH, B. 2001. A revised nomenclature for allergy. In *Allergy*, vol. 56, 2001, p. 813-824

JURČÁKOVÁ, A., REVÁK, O., ŠKULTÉTY, O. 2011. Molecular – genetics methods for the determination of celery (*Apium Graveolens*) as an allergen in food. In *Potravinárstvo*, vol. 5, 2011, mimoriadne číslo, p. 134-136

PAFUNDO, S., GULLI, M., NELSON, M. 2009. SYBR®GreenER™ Real-Time PCR to detect almond in traces in processed food, In *Food Chemistry*, vol. 116, 2009, p. 811-815

REVÁK, O., ŽIDEK, R., GOLIAN, J. 2010. Lupina biela ako nová hrozba pre alergikov a jej stanovenie pomocou optimalizovanej PCR reakcie. In *Food Hygiene and Technology 40th Lenfeld s and Hokls Days*, Brno, s. 155-158 ISBN 978-80-7305-121-1

SAMPSON, H. A. 2003. Anaphylaxis and emergency treatment. In *Pediatrics*, vol. 111, 2003, p.1601-1608

SAMPSON, H. A. 2004. Update on food allergy. In *J Allergy Clin Immunol*, vol. 113, 2004, p.805-819

STEPHAN, O. – VIETHS, S. 2004. Development of a real-time PCR and a sandwich ELISA for detection of potentially allergenic trace amounts of peanut (*Arachis hypogaea*) in processed foods. In *J Agric Food Chem*, vol. 52, 2004, p. 3754-3760

VAN HENGEL, A. J. 2007. Food allergen detection methods and the challenge to protect food-allergic consumers. In *Anal Bioanal Chem*, vol. 389, 2007, p.111-118

WU, Y., CHEN, Y., WANG, B., GAO, Y., BAI, L., WANG, H. 2010. SYBR Green Real-Time PCR used to detect celery in food. In *Journal of AOAC International*, vol. 93, 2010, no. 5, p. 1530-1536

ZELEŇÁKOVÁ, L., ŽIDEK R., ČANIGOVÁ, M., POULOV, J., GALLICOVÁ, T. 2010. Evaluation of Elisa method to detection of cow-lactoglobulin in sheep milk and sheep milk products. In *Potravinárstvo*, vol. 4, 2010, no. 4, p. 80-84

## Acknowledgments:

This work was supported by grant KEGA 3/7255/09 and VEGA 1/0619/10.

## Contact address:

Ondrej Škultéty, Student, Slovak University of Agriculture, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Department of Food Hygiene and Safety, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovakia E-mail: orey7th@gmail.com

Ing. Andrea Jurčáková. Slovak University of Agriculture, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Department of Food Hygiene and Safety, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovakia, E-mail: andrea.jurcakova@gmail.com

## NUTRIGENOMIC ANALYSIS OF C677T MUTATION OF MTHFR GENE IN SLOVAK POPULATION.

Radoslav Židek, Jozef Golian, Jozef Bulla

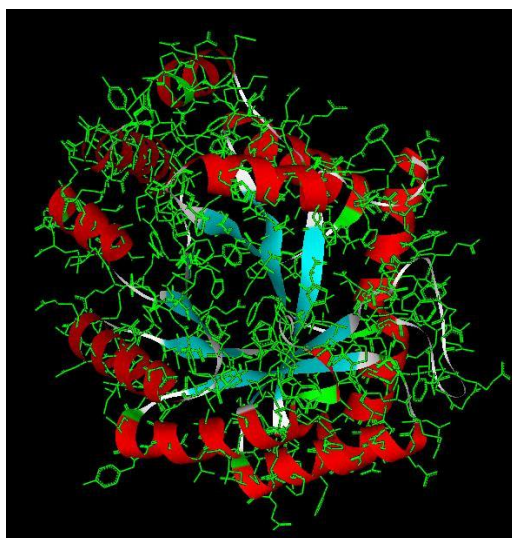
### ABSTRACT

Total of 124 individuals originated from Slovak Republic has been nutrigenomically analysed. Analysis was focused to mutation C677T of MTHFR gene detection and analysis of mutant genotypes frequency. Observed frequency of allele 677C was 0.6998 and allelic frequency of mutant variant 677T was 0.3992. Genotype frequency of mutant heterozygotes with 71% activity of MTHFR enzyme was 0,391 and mutant homozygotes with 33% MTHFR enzyme activity was 0.153. Result shows 64% of Slovak has decreased activity of enzyme MTHFR, and 14.3% of Slovak has predisposition to cancer, cardio vascular diseases, loss of fertility and many others complications according to improper nutrition, low folic acid and B12 vitamin intake.

**Keywords:** MTHFR, nutrigenetics, C677T

### ÚVOD

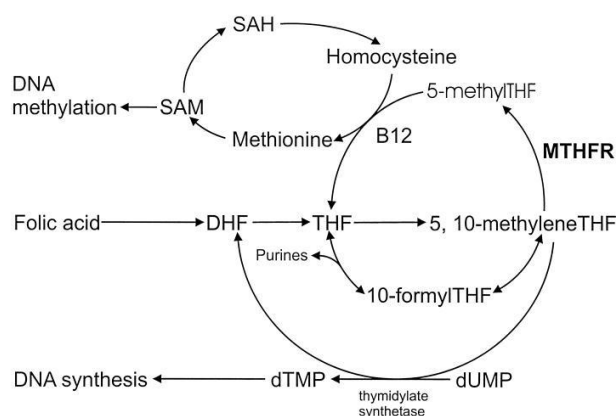
Nutrigenomika je pomerne nový vedný odbor študujúci vzťahy medzi genómom, stravou a zdravím jedinca. Jedným z postupov je nutrigenetická analýza zameraná na štúdium vzťahov jednotlivých foriem génov a ich vplyvu na zdravie pri rôznych spôsoboch stravovania.



**Obrázok 1** Počítačová simulácia proteínovej štruktúry enzýmu MTHFR (Rao et al., 2010)

Najznámejším génom s jasným a dokázaným vzťahom k spôsobu stravovania je gén kódujúci enzým 5,10 metyléntetrahydrofolát reduktáza nazývaný aj MTHFR (Obrázok 1). Prvá informácia o tomto enzýme bola publikovaná začiatkom deväťdesiatych rokov, kedy bol pozorovaný vzťah medzi MTHFR a zvýšenou hladinou homocysteínu v moči (Harpey et al., 1981). Gén kódujúci tento enzým bol sekvenovaný na základe primerov odvodených od proteínového poradia enzýmu pozorovaného u ošipaných, pričom bol okamžite pozorovaný polymorfizmus (Goyette et al., 1994). V súčasnosti je na stránkach NCBI evidovaných 33 jednobodových mutácií, z ktorých niektoré dokážu zmeniť aktivitu enzýmu. Najznámejšou z detegovaných mutácií je zámena cytozínu za tymín na pozícii 677 evidovaná pod číslom rs1801133. Od prvého publikovania a asociácie tejto mutácie s termolabilitou enzýmu MTHFR (Frosst et al., 1995) bol analyzovaný jej vzťah k mnohým

komplikačiam s plodnosťou a ochoreniam ako je leukémia (Skibola et al., 1999; Kamel et al., 2007; Sood et al., 2010), rakovina hrubého čreva (Ma et al., 1997; Levine et al., 2010; WU et al., 2010), schizofrénia (Roffman et al., 2007; Roffman et al., 2008) a mnohým iným. Mutácia spôsobuje u heterozygotov (CT) pokles aktivity enzýmu MTHFR na 71% a u jedincov s oboma mutovanými alelami (TT) pokles aktivity na úroveň 33% oproti nemutovanému genotypu (CC) (Saffroy et al., 2008). Znížená aktivita enzýmu znižuje úspešnosť spracovania kyseliny listovej z potravy. U jedincov s mutáciou (TT) sa pri nedostatočnom príjme kyseliny listovej a vitamínu B12 naruší okrem syntézy DNA aj proces tvorby metionínu a s tým súvisiaca metylácia DNA (Obrázok 2). Proces syntézy DNA je nevyhnutý pri delení bunky a opravných mechanizmoch a jeho narušenie vedie k destabilizácii DNA a následnému riziku chromozómových aberácií (Saffroy et al., 2004). Nedostatočná metylácia spôsobená nedostatkom kyseliny listovej a zníženou aktivitou MTHFR môže viesť k nesprávnej proliferácii buniek a poškodeniu opravných mechanizmov a apoptózy (Jones, 2001; Friedrich et al., 2004).



**Obrázok 2** Spracovanie kyseliny listovej a funkcia MTHFR (Skibola et al., 1999)

Cieľom predkladanej práce je nutrigenomická analýza alelových variant génu kódujúceho enzým MTHFR na Slovensku, s následným výpočtom alelových a genotypových frekvencií.

## MATERIÁL A METÓDY

Do nutrigenomickej analýzy bolo zaradených 124 dobrovoľníkov pochádzajúcich z rôznych regiónov Slovenska vo veku od 16 do 72 rokov. Za účelom genetickej analýzy bol pripravený hrubý bunkový lyzát odobratý z bukálnej sliznice, ktorý bol použitý v objeme 2 µl do PCR reakcie. Samotná PCR reakcia prebiehala v objeme 30 µl s použitím nasledovaných finálnych koncentrácií jednotlivých zložiek: 1x GoTaq® pufor, 1,5 nmol. µl<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub>, 0,2 nmol. µl<sup>-1</sup> dNTPs, 0,5 pmol. µl<sup>-1</sup> primerov (Skibola et al., 1999) a 0,5 jednotiek GoTaq® Hotstart polymerázy. Reakcia prebehla v cykléri MJ Mini s úvodnou denaturáciou pri 94°C po dobu 5 minút. Následných 40 cyklov prebiehalo s 30 sekundovou denaturáciou pri 94°C, nasadením primerov pri 62°C po dobu 30 sekúnd a elongačným krokom pri teplote 72°C po dobu 30 sekúnd. Finálne predĺžovanie úsekov DNA prebehlo pri teplote 71°C po dobu 7 minút. Z celkovej reakcie bolo odobratých 10 µl PCR produktov, ktoré boli nanosené na gél za účelom preukázania špecifickej amplifikácie génu MTHFR. Po úspešnom monitoringu bolo 10 µl PCR produktov štiepených pomocou reštrikčnej endonukleázy FastDigest® *HinfI*. Získaný produkt bol elektroforeticky separovaný na 2% agarózovom géle pri napätí 150 V po dobu 45 minút. Získané genotypy boli štatisticky analyzované programom PowerMarker 3.25.

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

Analýzou PCR produktov 124 vzoriek ľudskej DNA sa nám podarilo detegovať PCR produkt o dĺžke 198 bp. Po použití reštrikčného enzýmu *HinfI* sa PCR produkt v prípade heterozygotného usporiadania alel rozdelil na dve frakcie o veľkosti 198 a 175 bp. Ak v sledovanom géne nebola prítomná mutácia, enzým *HinfI* nebol schopný nájsť väzobné miesto a teda nebol schopný rozdeliť PCR produkt na dve frakcie. V prípade mutovaného homozygota bola pozorovaná len jedna frakcia s veľkosťou 175 bp. Vzorka Slovenskej populácie vykazovala frekvenciu nemutovanej alely 677C s hodnotou 0,6008 a alely 677T 0,3992 (Tabuľka 1). Na

základe alelových frekvencií sa v populácii sformovali genotypové kombinácie.

**Tabuľka 1** Alelová frekvencia foriem mutácie na pozícii 677 génu MTHFR

Alela	Počet pozorovaní	Frekvencia (smer. odchýlka)
677C	149	0,6008 (0,0307)
677T	99	0,3992 (0,0307)

**Tabuľka 2** Genotypová mutácie na pozícii 677 génu MTHFR

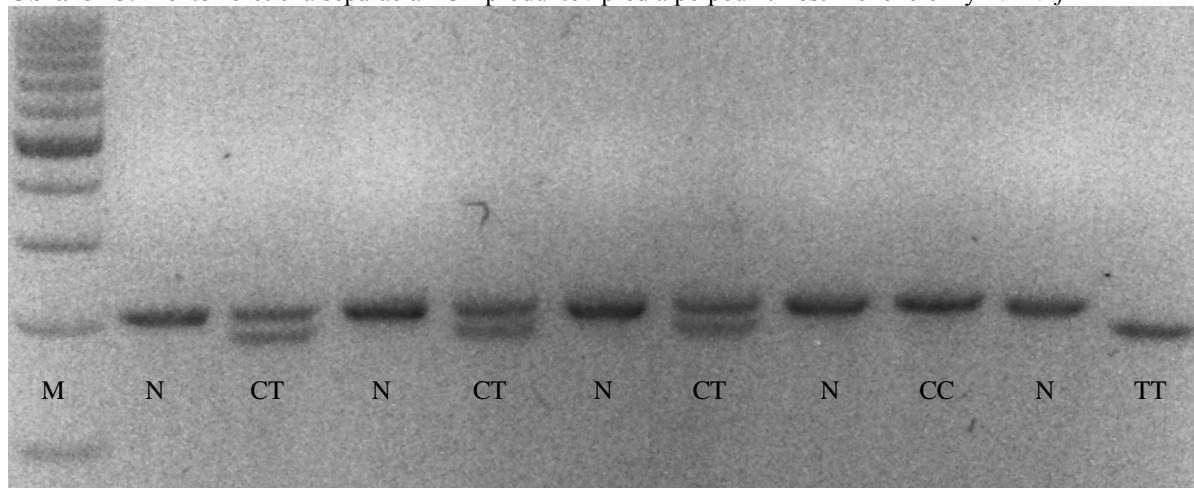
Genotyp	Počet pozorovaní	Frekvencia (smer. odchýlka)
677CC	44	0.354 (0,03)
677CT	61	0.491 (0,03)
677TT	19	0.153 (0,03)

Zastúpenie nemutovaných homozygotov v Slovenskej populácii je 35,4%, heterozygotov 49,1% a jedincov nesúcich po oboch rodičoch mutovanú alelu pre enzým MTHFR je 15,3%. Naše výsledky sú vyššie ako v Kanadskej populácii v ktorej sa frekvencia výskytu genotypov 677TT pohybovala s frekvenciou 10% (Weisberg et al., 1998). Nižšiu frekvenciu výskytu môžeme pozorovať aj v Kaukazskej populácii, kde 11,04 % jedincov prezentuje tento genotyp (Almawi et al., 2004). Naše výsledky boli rovnako vyššie ako v Ukrajinskej populácii, kde frekvencia genotypov 677TT nepresiahla hodnotu 7,5% (Tatarsky, Kucherenko, and Livshits, 2010). Slovenská populácia má podobné percento výskytu genotypu 677TT ako Čínska populácia, ktorá bola ako kontrola zapojená do prieskumu rakoviny žalúdka (Shen et al., 2001).

## ZÁVER

Zistené výsledky poskytujú alarmujúci fakt, že 64% Slovenskej populácie zaradenej do pozorovania má zníženú aktivitu enzýmu MTHFR na úroveň 71% a približne 15% Slovenskej populácie dokáže

**Obrázok 3.** Elektroforetická separácia PCR produktov pred a po použití reštrikčného enzýmu *HinfI*



M = molekulárny marker 100 bp, N = neštiepený PCR product, CT= heterozygot, CC= nemutovaný homozygot, TT= mutovaný homozygot

metabolizovať kyselinu listovú len s 33% aktivitou enzýmu MTHFR. Znížený príjem kyseliny listovej spôsobený nízkym príjmom čerstvej zeleniny, ovocia a potravín obsahujúcich živé bakteriálne kultúry môže u 64% Slovenskej populácie viesť k zvýšeniu rizika kardiovaskulárnych ochorení, rakoviny, zníženiu plodnosti a k ďalším ochoreniam súvisiacim s MTHFR a zníženým príjmom kyseliny listovej.

## LITERATÚRA

ALMAWI, W. Y., FINAN, R. R., TAMIM, H., DACCACHE, J. L., IRANI-HAKIME, N. 2004. Differences in the frequency of the C677T mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene among the Lebanese population. In *American Journal of Hematology*, vol. 76, 2004, no. 1, p. 85-7.

FRIEDRICH, M. G., WEISENBERGER, D. J., CHENG, J. C., CHANDRASOMA, S., SIEGMUND, K. D., GONZALGO, M. L., TOMA, M. I., HULAND, H., YOO, C., TSAI, Y. C., NICHOLS, P. W., BOCHNER, B. H., JONES, P. A., LIANG, G. 2004. Detection of methylated apoptosis-associated genes in urine sediments of bladder cancer patients. In *Clinical Cancer Research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, vol. 10, 2004, no. 22, p. 7457-65.

FROSST, P., BLOM, H. J., MILOS, R., GOYETTE, P., SHEPPARD, C. A., MATTHEWS, R. G., BOERS, G. J., DEN HEIJER, M., KLUIJTMANS, L. A., VAN DEN HEUVEL, L. P. 1995. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. In *Nature Genetics*, vol. 10, 1995, no. 1, p. 111-3.

GOYETTE, P., SUMNER, J. S., MILOS, R., DUNCAN, A. M., ROSENBLATT, D. S., MATTHEWS, R. G., ROZEN, R. 1994. Human methylenetetrahydrofolate reductase: isolation of cDNA, mapping and mutation identification. In *Nature Genetics*, vol. 7, 1994, no. 2, p. 195-200.

HARPEY, J. P., ROSENBLATT, D. S., COOPER, B. A., LE MOËL, G., ROY, C., LAFOURCADE, J. 1981. Homocystinuria caused by 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase deficiency: a case in an infant responding to methionine, folinic acid, pyridoxine, and vitamin B12 therapy. In *The Journal of Pediatrics*, vol. 98, 1981, no. 2, p. 275-8.

JONES, P. A. 2001. Cancer. Death and methylation. In *Nature*, vol. 409, 2001, no. 6817, p. 141, 143-4.

KAMEL, A. M., MOUSSA, H. S., EBID, G. T., BU, R. R., BHATIA, K. G. 2007. Synergistic effect of methyltetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T and A1298C polymorphism as risk modifiers of pediatric acute lymphoblastic leukemia. In *Journal of the Egyptian National Cancer Institute*, vol. 19, 2007, no. 2, p. 96-105.

LEVINE, A. J., FIGUEIREDO, J. C., LEE, W., CONTI, D. V., KENNEDY, K., DUGGAN, D. J., POYNTER, J. N., CAMPBELL, P. T., NEWCOMB, P., MARTINEZ, M. E., HOPPER, J. L., LE MARCHAND, L., BARON, J. A., LIMBURG, P. J., ULRICH, C. M., HAILE, R. W. 2010. A candidate gene study of folate-associated one carbon metabolism genes and colorectal cancer risk. In *Cancer*

*epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, vol. 19, 2010, no. 7, p. 1812-21.

MA, J., STAMPFER, M. J., GIOVANNUCCI, E., ARTIGAS, C., HUNTER, D. J., FUCHS, C., WILLETT, W. C., SELHUB, J., HENNEKENS, C. H., ROZEN, R. 1997. Methylenetetrahydrofolate Reductase Polymorphism, Dietary Interactions, and Risk of Colorectal Cancer. In *Cancer Res.*, vol. 57, 1997, no. 6, p. 1098-1102.

RAO, D. M., NAYARISSERI, A., YADAV, M., KS, S., PATEL, D. 2010. Comparative modeling of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) enzyme and its mutational assessment: in silico approach. In *International Journal of Bioinformatics Research*, vol. 2, 2010, no. 1, p. 5-9.

ROFFMAN, J. L., WEISS, A. P., DECKERSBACH, T., FREUDENREICH, O., HENDERSON, D. C., PURCELL, S., WONG, D. H., HALSTED, C. H., GOFF, D. C. 2007. Effects of the methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T polymorphism on executive function in schizophrenia. In *Schizophrenia Research*, vol. 92, 2007, no. 1-3, p. 181-8.

ROFFMAN, J. L., WEISS, A. P., PURCELL, S., CAFFALETTE, C. A., FREUDENREICH, O., HENDERSON, D. C., BOTTIGLIERI, T., WONG, D. H., HALSTED, C. H., GOFF, D. C. 2008. Contribution of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) polymorphisms to negative symptoms in schizophrenia. In *Biological Psychiatry*, vol. 63, 2008, no. 1, p. 42-8.

SAFFROY, R., BENYAMINA, A., PHAM, P., MARILL, C., KARILA, L., REFFAS, M., DEBUIRE, B., REYNAUD, M., LEMOINE, A. 2008. Protective effect against alcohol dependence of the thermolabile variant of MTHFR. In *Drug and Alcohol Dependence*, vol. 96, 2008, no. 1-2, p. 30-6.

SAFFROY, R., PHAM, P., CHIAPPINI, F., GROSS-GOUPIL, M., CASTERA, L., AZOULAY, D., BARRIER, A., SAMUEL, D., DEBUIRE, B., LEMOINE, A. 2004. The MTHFR 677C > T polymorphism is associated with an increased risk of hepatocellular carcinoma in patients with alcoholic cirrhosis. In *Carcinogenesis*, vol. 25, 2004, no. 8, p. 1443-8.

SHEN, H., XU, Y., ZHENG, Y., QIAN, Y., YU, R., QIN, Y., WANG, X., SPITZ, M. R., WEI, Q. 2001. Polymorphisms of 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase and risk of gastric cancer in a Chinese population: a case-control study. In *International Journal of Cancer. Journal International du Cancer*, vol. 95, 2001, no. 5, p. 332-6.

SKIBOLA, C. F., SMITH, M. T., KANE, E., ROMAN, E., ROLLINSON, S., CARTWRIGHT, R. A., MORGAN, G. 1999. Polymorphisms in the methylenetetrahydrofolate reductase gene are associated with susceptibility to acute leukemia in adults. In *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 96, 1999, no. 22, p. 12810-5.

SOOD, S., DAS, R., TREHAN, A., AHLUWALIA, J., SACHDEVA, M. U., VARMA, N., BANSAL, D., MARWAHA, R. K. 2010. Methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphisms: association with risk for

pediatric acute lymphoblastic leukemia in north Indians. In *Leukemia & lymphoma*, vol. 51, 2010, no. 5, p. 928-32.

TATARSKYY, P., KUCHERENKO, A., LIVSHITS, L. 2010. Allelic polymorphism of F2, F5 and MTHFR genes in population of Ukraine. In *Šitologĭa i genetika*, vol. 44, 2010, no. 3, p. 3-8.

WEISBERG, I., TRAN, P., CHRISTENSEN, B., SIBANI, S., ROZEN, R. 1998. A second genetic polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) associated with decreased enzyme activity. In *Molecular Genetics and Metabolism*, vol. 64, 1998, no. 3, p. 169-72.

WU, H.-C., CHANG, C.-H., TSAI, R.-Y., LIN, C.-H., WANG, R.-F., TSAI, C.-W., CHEN, K.-B., YAO, C.-H., CHIU, C.-F., BAU, D.-T., LIN, C.-C. 2010. Significant Association of Methylenetetrahydrofolate Reductase Single Nucleotide Polymorphisms with Prostate Cancer Susceptibility in Taiwan. In *Anticancer Res*, vol. 30, 2010, no. 9, p. 3573-3577.

### Acknowledgments:

This work was supported by grant KEGA 3/7255/09 and VEGA 1/0619/10.

### Contact address:

Ing. Radoslav Źidek, PhD. Slovak University of Agriculture, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Department of Food Hygiene and Safety, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovakia, E-mail: radoslav.zidek@uniag.sk

doc. Ing. Jozef Golian, Dr. Slovak University of Agriculture, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Department of Food Hygiene and Safety, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovakia, E-mail: jozef.golian@af.uniag.sk

prof. Ing. Jozef Bulla, DrSc. Slovak University of Agriculture, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Department of Animal Physiology, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovakia, E-mail: jozef.bulla@uniag.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*	doc. Ing. Jozef Golian, Dr.	doc. Ing. Jozef Golian, Dr. Ing. Lucia Zeleňáková, PhD. Ing. Simona Kunová, PhD. Ing. Matúš Ondrejka
Legislatíva a kontrola potravín*	doc. Ing. Jozef Golian, Dr.	doc. Ing. Jozef Golian, Dr. Ing. Jozef Čapla, PhD. Ing. Pavol Bajzík
Bezpečnosť potravín*	doc. Ing. Jozef Golian, Dr.	doc. 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. Ing. Kamil Močár
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. Daniela Liptaiová Ing. Martin Kliment
Správna hygienická prax v potravinárstve*	Ing. Jozef Čapla, PhD.	Ing. Jozef Čapla, PhD. Ing. Peter Zajác, PhD.
Hygiena distribúcie a predaja potravín	Ing. Peter Zajác, PhD.	Ing. Peter Zajác, PhD. Ing. Ľubomír Belej
Verejné zdravie a produkcia potravín	doc. Ing. Jozef Golian, Dr.	Ing. Martina Fikselová, PhD. Ing. Alica Bobková, PhD.
Epidemiológia a alergie z potravín	MVDr. Ľubomír Lopašovský, PhD.	MVDr. Ľubomír Lopašovský, PhD. Ing. Martina Fikselová, PhD. Ing. Alica Bobková, PhD.
Riziká pri produkcii potravín*	prof. Ing. Mária Angelovičová, CSc.	prof. Ing. Mária Angelovičová, CSc. Ing. Kamil Močár Ing. Dávid Štofan
Akreditácia a certifikácia v potravinárstve	Ing. Peter Zajác, PhD.	Ing. Peter Zajác, PhD. Ing. Jozef Čapla, 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	doc. Ing. Jozef Golian, Dr.	doc. 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.



# Školenia pre potravínárske 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

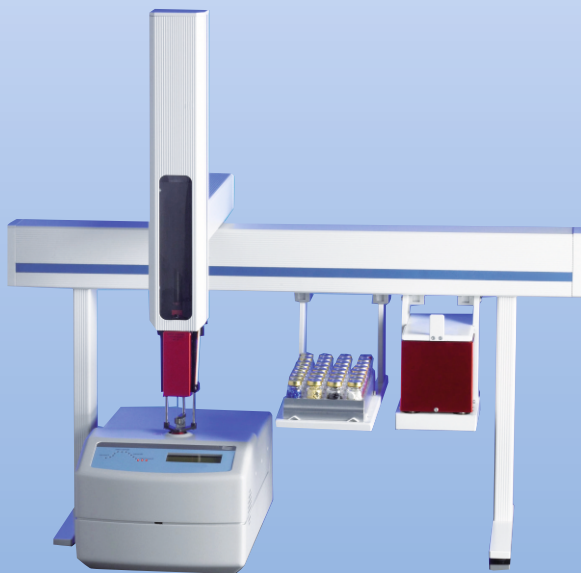
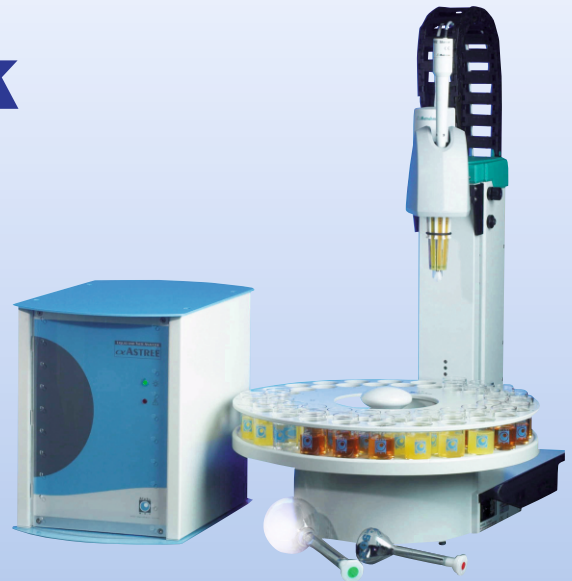
**HACCP Consulting**  
**0908164361, 0904138562**  
**[www.haccp.szm.sk](http://www.haccp.szm.sk)**

<b>MORPHOLOGY AND SENSORY EVALUATION OF TRADITIONAL PRODUCTS FROM DIFFERENT LANDRACES OF PUMPKIN (<i>CUCURBITA SPP.</i>)</b>	
<i>Ján Brindza, Vladimír Vietoris, Lucia Kucelová, Maria Fil, Radovan Ostrovský, Eva Gondová</i> .....	1-8
<b>EFFECT OF SODIUM PHOSPHATES ON SELECTED FOOD GRADE BACTERIA</b>	
<i>Leona Buňková, Eva Lorencová, Dora Jurčová, František Buňka, Stanislav Kráčmar</i> .....	9-12
<b>MICROBIAL BIOFILMS PRODUCED BY PSEUDOMONAS FLUORESCENS ON SOLID SURFACES</b>	
<i>Jozef Čapla, Peter Zajác, Jozef Golian, Pavol Bajzík, Lucia Zeleňáková, Vladimír Vietoris, Dagmar Kozelová</i> .....	13-16
<b>CHEMICAL STRUCTURE OF EUROPEAN BISON MUSCULUS LONGISSIMUS DORSI AT DIFFERENT STAGES OF AGE</b>	
<i>Peter Haščik, Miroslav Müller, Adriana Pavelková, Miroslava Kačániová, Juraj Čuboň, Emília Benczová, Marta Habánová, Michal Mihok, Jozef Garlík</i> .....	17-21
<b>DIETARY FIBER: DEFINITION, SOURCES AND EXTRACTION</b>	
<i>Michaela Jurasová, Zlatica Kohajdová, Jolana Karovičová</i> .....	22-26
<b>POTENTIAL OF CEREALS AND PSEUDOCEREALS FOR LACTIC ACID FERMENTATIONS</b>	
<i>Monika Kocková, Ľubomír Valík</i> .....	27-40
<b>PERSISTENCE OF <i>L. MONOCYTOGENES</i> VERSUS ADHERENCE ON SOLID SURFACE</b>	
<i>Janka Koreňová, Katarína Oravcová</i> .....	41-44
<b>DETECTION OF LASALOCID RESIDUES IN THE TISSUES OF BROILER CHICKENS BY A NEW SCREENING TEST TOTAL ANTIBIOTICS</b>	
<i>Ivona Kožárová, Jana Šimková, Mária Mártonová, Ján Mačanga, Martin Levkut ml.</i> .....	45-48
<b>STALING OF BAKERY PRODUCTS</b>	
<i>Michal Magala, Zlatica Kohajdová, Jolana Karovičová</i> .....	49-54
<b>NUTRIGENOMICS ANALYZE OF EXPRESSION OF EXTRACELLULAR LEPTIN RECEPTOR BY THE FOLLOWING ESSENTIAL OIL MONITORING AT THE AVIAN MODELS</b>	
<i>Ľubica Mrázová, Radoslav Židek, Mária Angelovičová, Jana Tkáčová, Martin Kliment, Martin Kráľ, Pavol Bajzík</i> .....	55-58
<b>COMPOSITION OF THE ATHLETES DIET</b>	
<i>Beáta Pramuková, Denisa Čokášová, Rastislav Salaj</i> .....	59-62
<b>OFFICIAL CONTROLS OF FOODSTUFFS – CONTAMINATION OF CEREALS BY MYCOTOXINS OF THE GENUS FUSARIUM AND OCHRATOXIN A.</b>	
<i>Jaroslav Remža, Jozef Bireš, Mária Matúšová, Magdaléna Lacko-Bartošová</i> .....	63-66
<b>STUDIES OF CHOSEN TOXIC ELEMENTS CONCENTRATION IN MULTIFLOWER BEE HONEY</b>	
<i>Adam Roman, Ewa Popiela</i> .....	67-69
<b>EVA GREEN REAL-TIME PCR USED TO DETECT CELERY AS AN ALLERGEN IN FOOD</b>	
<i>Ondrej Škultéty, Andrea Jurčáková</i> .....	70-72
<b>NUTRIGENOMIC ANALYSIS OF C677T MUTATION OF MTHFR GENE IN SLOVAK POPULATION</b>	
<i>Radoslav Židek, Jozef Golian, Jozef Bulla</i> .....	73-76

# Moderní metody senzorické analýzy

## Elektronický jazyk

- Objektivní hodnocení chuti
- Identifikace pomocí elektrochemických senzorů
- Citlivější než lidský jazyk
- Výsledky během 2 minut
- Použití: potravinářský průmysl a farmacie



## Elektronický nos

- Vůně – klíčový parametr výrobků
- Přesná a objektivní analýza
- Využívá různých detekčních metod
- Vyhodnocení analýzy během několika minut

## Analýza textury

- Sofistikované analyzátoři s měřením v kompresi a tenzi
- Hodnocení konzistence, viskozity, tvrdosti, roztíratelnosti, křehkosti...
- Široké spektrum měřících sond a nástavců
- Uživatelsky přívětivý software
- Použití: potraviny, farmacie, kosmetika, obaly a další průmyslové oblasti



r n ol a ro a i senzorickou la orato

® O.K. SERVIS  
**BioPro**  
s.r.o.  
[www.biopro.cz](http://www.biopro.cz)

li í in ormace o kom letní na ídce  
O.K. SERVIS BioPro, s.r.o., Bořetická 2668/1, Praha 9  
Tel.: +420 281 091 460, 841 111 114, E-mail: [info@oks.cz](mailto:info@oks.cz)