

2

2012



Vedecký časopis pre potravinárstvo

Scientific Journal for Food Industry

číslo

www.potravinarstvo.com

Volume 6
Issue 2
April 2012

potravinarstvo 2 (6)
ISSN 1337-0960 (online)

Potravinárstvo

Vedecký časopis pre potravinárstvo

Šéfredaktor:

Ing. Peter Zajác, PhD.
SPU Nitra

Zástupca šéf redaktora:

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

Redaktori:

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

Predseda redakčnej rady:

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

Redakčná rada:

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

Potravinárstvo

Scientific Journal for Food Industry

Editor:

Peter Zajác
SUA Nitra

Deputy of Editor:

Jozef Golian
SUA Nitra

Sub-Editor:

Radoslav Židek,
Jozef Čapla,
Vladimír Vietoris
SUA Nitra

Chairman, Editorial Board:

Jozef Golian,
SUA Nitra

Editorial Board:

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

• **Potravinárstvo**® • **Ročník:** 6, č. 2/2012 • 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 v elektronickej forme • **Internetová stránka časopisu:** www.potravinarstvo.com • **Adresa redakcie:** Slivková 12, 951 01 Nitrianske Hrnčiarovce • **E-mail:** info@potravinarstvo.com • **Tel.:** +421908164361, +421904138562 • **Jazyková úprava:** Publikované články neprešli jazykovou úpravou • **Grafická úprava:** Flame-studio Nitra • **Tlač:** SPU Nitra • **Cena čísla:** nepredajné • **Distribuuje:** Združenie HACCP Consulting • **Náklad propagačnej tlačenej verzie:** 150 ks • **Miesto vydania:** Nitra • **Právne informácie a autorské práva:** Za obsah jednotlivých článkov zodpovedajú autori. Za obsah inzerátov zodpovedajú inzerenti • Časopis je indexovaný v databázach: UIUC OAI registry, OAIster, AGRIS FAO, DOAJ, Google Scholar a CrossRef • **Názov a skratka pomocou ktorých je časopis indexovaný v medzinárodných databázach:** *Potravinarstvo, Potr.*

Všetky práva vyhradené, © 2012 Potravinárstvo®
Evidenčné číslo Ministerstva kultúry SR: 3771/09



Katedra hygieny a bezpečnosti
potravín



THE EFFECT OF REDUCTION CONCENTRATIONS OF THE BROILER CHICKENS PER UNIT AREA ON THE FINAL LIVE WEIGHT AND PRODUCTION ECONOMICS

Mária Angelovičová, Martin Kliment, Eubica Mrázová, Jana Tkačová, Martin Král, Ebrahim Alfaig, Lubomír Lopašovský

ABSTRACT

The aim of the present study was a mathematical and statistical assessment for the effect of concentration of broiler chickens per unit area to the final live weight and production economics. Cobb 500 chickens were fattening for 42 days in a hall on deep litter. During the two experiments the chickens were divided to two groups according to concentration per unit area and it was about 30 and 25 kg/m². The experiments had been complied with recommended nutritional requirements for breeding and final fattening type of chickens Cobb500. The average final weight of broiler chickens in the first experiment were 2.14 and 2.17 kg for concentrations of 29.41 and 25.76 kg/m² respectively, and for the second experiment were 2.01 and 2.02 kg for concentrations of 29.33 and 23.90 kg/m² respectively. According to statistical analysis ($P \geq 0.05$), the average final live weight of broiler chickens was not affected by concentrations. The calculated production total live weight of broiler chickens across the halls were 48526.5, 48 394.5, 42504.0 and 39435.0 kg at a concentrations of 29.41, 29.33, 25.76 and 23.90 kg/m² respectively. By reducing the concentration of birds in the hall from 29.41 to 29.33 kg/m² and from 25.76 to 23.9 kg/m² the total production of broiler chickens was decreased by 6022.5 and 8959.5 kg live weight respectively. The concentration of birds per unit area of 25.76 and 23.90 kg/m² lead to lower the price of the product of broiler chickens by 4745.73 and 7060.09 € respectively, compared with the price for the product of the concentrations of 29.41 and 29.33 kg/m² respectively.

Keywords: broiler chicken, concentrations per unit area, final live weight, total production, price

ÚVOD

Brojlerové kurčatá sú finálnym výkrmovým typom kurčiat chovaných na produkciu kurčacieho mäsa. Ročne je v Európskej únii (EÚ-25) na tento účel vyprodukovaných okolo 5,9 mld. kurčiat. Všeobecne produkciu kuracieho mäsa predstavujú dve alebo tri spoločnosti, ktoré dodávajú na trh asi 90 % celosvetového počtu chovných kurčiat. Celkový počet brojlerových kurčiat vyprodukovaných vo svete v roku 2004 bol podľa Organizácie pre výživu a poľnohospodárstvo (FAO) takmer 47 mld., z tohto počtu bolo približne 19 % vyprodukovaných v USA, 15 % v Číne, 13 % v EÚ-25 a 11 %. Pokiaľ ide o mäso brojlerových kurčiat, v roku 2007 Európska únia (EÚ-27) vyprodukovala 8,3 mil. ton. V USA sa vyprodukovalo 16,2 mil. ton, čo zodpovedá takmer 8,9 mld. ks brojlerových kurčiat. Čína a Brazília vyprodukovala 11,4 a 10,3 mil. ton (FAO, 2010). Angelovičová a Angelovič (2011) vo svojej práci analyzujú welfare kurčiat určených na produkciu mäsa, štandardy a svetový obchod.

V marci 2000 prijala Európska komisia správu Vedeckého výboru pre zdravie zvierat a dobré životné podmienky zvierat o dobrých životných podmienkach kurčiat chovaných na produkciu mäsa (brojlerových kurčiat)". Smernica pre ochranu zvierat nadobudla účinnosť v roku 2007 a bola implementovaná vo vnútroštátnom práve krajín Európskej únie do 30. júna 2010. Rozsah pôsobnosti sa vzťahuje na brojlerové kurčatá. Nevzťahuje sa pre poľnohospodárske podniky s nižším počtom ako 500 ks kurčiat. Smernica obsahuje 3 základné predpisy. Stanovuje požiadavky na napájadlá, podstielku, vetranie a

vykurovanie, emisie, hluk, kvalitu a hygienu ovzdušia. Maximálna koncentrácia brojlerových kurčiat je 33 kg živej hmotnosti na m². Farmári, ktorí spĺňajú ďalšie opatrenia, môžu zvýšiť koncentráciu na 39 kg.m². Ďalšie zvýšenie na 42 kg.m² je možné, ak farmár spĺňa ďalšie podmienky dobrých životných podmienok a znižuje úhyn (Smernica Rady 2007/43/ES).

Hustota zástavu ovplyvňuje životné podmienky brojlerových kurčiat z hľadiska:

- neobmedzeného prístupu ku krmivu a vode (Leone a Estevez, 2008a),
- relatívnej vlhkosti, okolitej teploty a koncentrácie plynov (Meluzzi et al., 2008),
- veľkosti priestoru a jej vplyv na pohyb (Leone a Estevez, 2008b).

Z výsledkov početných výskumov vyplýva negatívny vplyv vysokej koncentrácie na finálnu živú hmotnosť brojlerových kurčiat (Cravener et al., 1992; Lewis et al., 1997; Mortara et al., 2002; Edriss et al., 2003; Mendes et al., 2004; Škrbič et al., 2007). S rastom brojlerových kurčiat sa vplyv na koncentráciu zintenzívňuje (Cravener et al., 1992; Edriss et al., 2003; Škrbič, 2007).

V nadväznosti na uvedené, cieľom predloženej práce bolo skúmanie a matematicko-štatistické vyhodnotenie vplyvu zníženia koncentrácie brojlerových kurčiat na finálnu živú hmotnosť a ekonomiku ich produkcie.

MATERIÁL A METÓDY

Objekt skúmania

Objektom skúmania boli kurčatá finálneho výkrmového typu Cobb 500, odlišná koncentrácia kurčiat na jednotku

Tabuľka 1 Schéma pokusov

Experiment	Skupina	Experimentálne stanovená koncentrácia brojlerových kurčiat na jednotku plochy (kg.m ⁻²)
1.	kontrolná	30
	pokusná	25
2.	kontrolná	30
	pokusná	25



Obrázok 1 Experimentálna krmná technológia (Foto: Angelovičová, 2012)

plochy, finálna živá hmotnosť vo veku kurčiat 42 dní, produkcia vyjadrená živou hmotnosťou a cena ich produkcie.

Pracovné postupy

Uskutočnili sme dva skupinové krmné experimenty na hydinarskej farme v prevádzkových podmienkach. Prvý experiment sme vykonali v septembri až októbri 2009 a druhý experiment v septembri až októbri 2010. Kurčatá boli ustajnené v hale na hlbokoj podstielke, ktorú tvorila dolná vrstva do výšky 8 cm z drevných pilín a horná vrstva vo výške 5 cm pomiaganá pšeničná slama. Rozmery haly boli 110 m dĺžka a 15 m šírka. Celková chovná plocha bola 1650 m².

V experimentoch boli použité bežne používané krmné zmesi sójovo-obilninového typu. Obsah živín a metabolizovateľnej energie bol vybilancovaný v krmných zmesiach v zmysle potreby brojlerových kurčiat (**Výnos z 31. januára 2002 č. 39/3/2002-100**). Použilo sa po 100 ks jednodňových brojlerových kurčiat v kontrolnej a pokusnej skupine. Skupiny sa vzájomne odlišovali koncentráciou brojlerových kurčiat na jednotku plochy, t. j. hustotou zástavu (tabuľka 1). V kontrolnej skupine sme stanovili predpokladanú koncentráciu brojlerových kurčiat na jednotku plochy 30,0 kg.m⁻² a v pokusnej skupine 25,0 kg.m⁻² (váženie na konci experimentu pomocou váh typu KERN ECE 20K20). Pri predpokladanej telesnej hmotnosti na konci experimentu 2,10 až 2,20 kg sme vypočítali rozmery boxu v 1. a 2. experimente v zmysle **Smernice Rady**

2007/43/ES pre kontrolnú skupinu 2,7 m dĺžku a 2,7 m šírku, t. j. 7,29 m² a pokusnú skupinu 2,9 m dĺžku a 2,9 m šírku, t. j. 8,41 m² (meranie pomocou meracieho pásma).

Štatistické metódy

Prvotné údaje získane v experimente sme štatisticky spracovali v programe SAS, verzia 8.2. Vypočítali sme aritmetický priemer, smerodajnú odchýlku, variačný koeficient a rozdiely ukazovateľov medzi skupinami sme vyhodnotili ANOVA t-testom.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

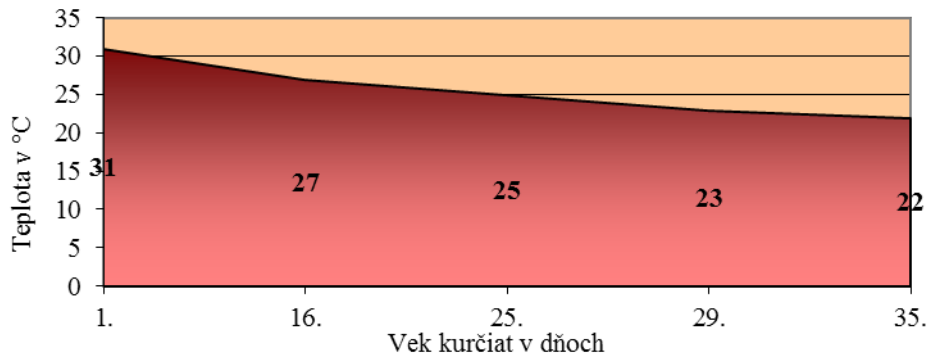
Prvý experiment

Teplota v hale počas experimentu

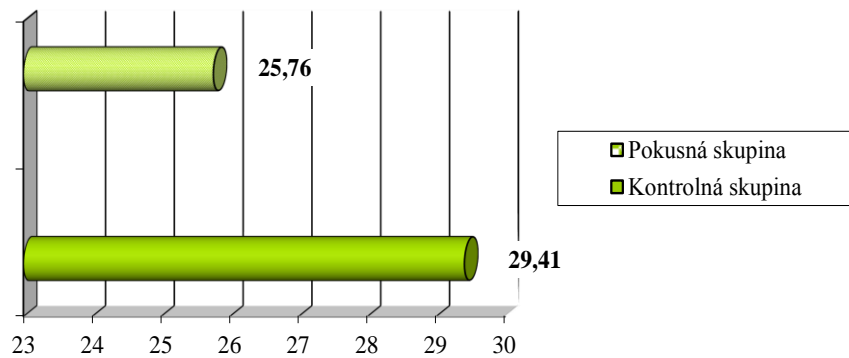
Počas prvého experimentu bola teplota v hale v prvý deň pri jednodňových kurčatách 31 °C. Na 16. deň veku kurčiat sa znížila teplota na 27 °C. Na 25. deň sa znížila teplota na 25 °C. Kurčatá vo veku 29 dní boli chované v hale pri teplote 23 °C. Do konca výkrmu sa im znížila teplota na 22 °C.

Svetelný režim v hale počas experimentu

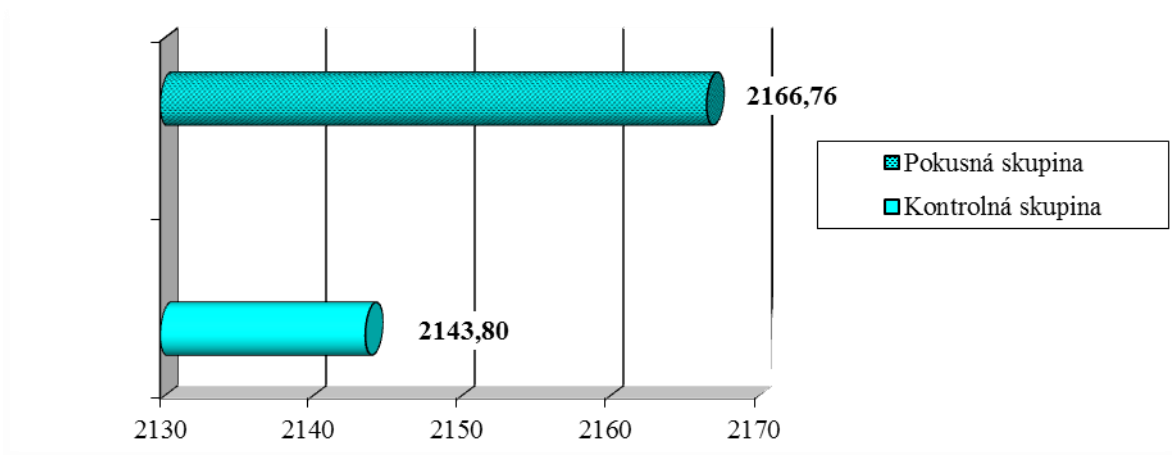
Prvých 7 dní bol svetelný režim v hale 24 hodín svetla. Na 7. – 9. deň sa brojlerovým kurčatám znížil svetelný režim z 24 hodín na 23,5 hodiny svetla. Na 10. až 11. deň sa brojlerovým kurčatám upravil svetelný režim na 23 hodín svetla. Na 12. až 13. deň sa brojlerovým kurčatám znížil svetelný režim na 21 hodín. Od 14. dňa do konca experimentu bol svetelný režim znížený na 20 hodín svetla.



Graf 1 Teplota v hale počas experimentu



Graf 2 Koncentrácia brojlerových kurčiat na jednotku plochy (kg.m⁻²)



Graf 3 Finálna živá hmotnosť brojlerových kurčiat na konci experimentu vo veku 42 dní (g)

Tabuľka 2 Matematicko-štatistické vyhodnotenie výsledkov finálnej živej hmotnosti brojlerových kurčiat

Skupina (n = 100)				t-test P _{0,05}
kontrolná		pokusná		
s (g)	v _k (%)	s (g)	v _k (%)	
213,09	9,94	171,25	7,90	1,81 ⁻

s – smerodajná odchýlka, v_k – variačný koeficient, ⁻ P>0,05 – štatisticky nepreukazný rozdiel

Skrmením krmnej zmesi HYD 01 podstielka bola hygienicky čistá, pomerne suchá. Po skrmení krmnej zmesi HYD 02 stelivový materiál bol mierne utlačený, ale dobre vsával vylučovaný trus brojlerových kurčiat. Po skrmení krmnej zmesi HYD 03 vo veku brojlerových kurčiat od 35. do 42. dňa bola podstielka utlačená chôdzou brojlerových kurčiat a nedostatočne vsávala vylučovaný trus. Z tohto dôvodu sme nastielali podstielku novou pomiaganou slamou, t. j. praktizovali sme doplnkové podstielanie.

Koncentrácia brojlerových kurčiat na jednotku plochy

Koncentrácia brojlerových kurčiat v pokusnej skupine bola 25,76 kg.m⁻². V kontrolnej skupine sa zaznamenala koncentrácia brojlerových kurčiat 29,41 kg.m⁻².

Finálna živá hmotnosť brojlerových kurčiat na konci experimentu

Finálna živá hmotnosť brojlerových kurčiat pri nižšej koncentrácii na jednotku plochy 25,76 kg.m⁻² bola 2166,76 kg.m⁻². Pri vyššej koncentrácii zvierat na jednotku plochy 29,41 kg.m⁻² bola finálna živá hmotnosť brojlerových kurčiat 2143,80 g. Rozdiel vo finálnej živej hmotnosti brojlerových kurčiat medzi skupinami 22,96 g bol štatisticky nepreukazný ($P > 0,05$). Výsledky matematicko-štatistického vyhodnotenia živej hmotnosti brojlerových kurčiat potvrdzujú, že nižšie kolísanie hodnôt živej hmotnosti brojlerových kurčiat bolo v skupine s nižšou koncentráciou brojlerových kurčiat na jednotku plochy v porovnaní s hodnotami živej hmotnosti brojlerových kurčiat pri vyššej koncentrácii zvierat na jednotku plochy. Potvrdzujú to výsledky smerodajnej odchýlky a variačného koeficienta ($s = 171,25$ g, resp. $v_k = 7,90$ % oproti $s = 213,09$ g, resp. $v_k = 9,94$ %).

Druhý experiment

Teplota v hale počas experimentu

Počas experimentu bola teplota v hale v prvý deň experimentu 32 °C. Na 16. deň veku brojlerových kurčiat sa znížila teplota na 26 °C. Na 25. deň sa znížila teplota na 24 °C. Brojlerové kurčatá vo veku 29 dní boli chované v hale pri teplote 23 °C. Do konca experimentu sa znížila teplota na 21 °C.

Svetelný režim v hale počas experimentu

Svetelný režim bol ako v prvom experimente.

Podstielka

Hygiena a konzistencia podstielky, ako aj opatrenia na riešenie nedostatkov počas experimentu bolo ako v prvom pokuse.

Koncentrácia brojlerových kurčiat na jednotku plochy

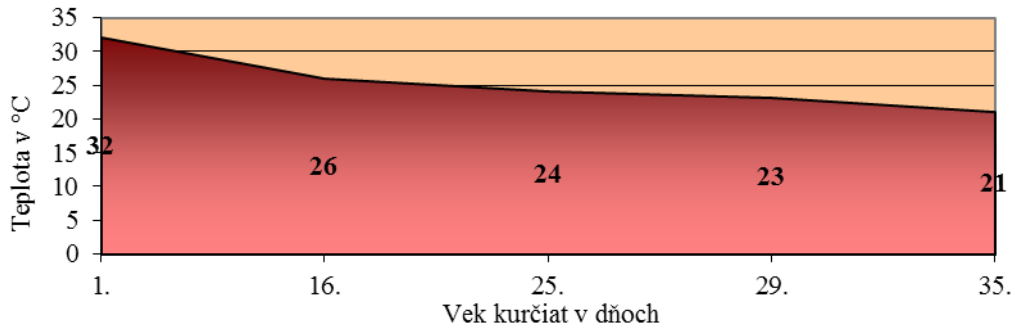
Koncentrácia brojlerových kurčiat bola v pokusnej skupine 23,90 kg.m⁻² a v kontrolnej skupine 29,33 kg.m⁻².

Finálna živá hmotnosť brojlerových kurčiat na konci experimentu

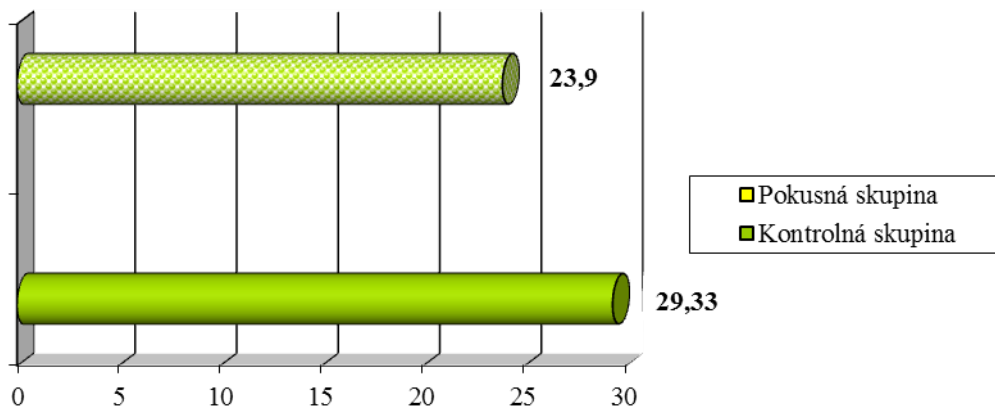
Priemerná finálna živá hmotnosť brojlerových kurčiat bola 2010,24 g pri nižšej koncentrácii na jednotku plochy 23,90 kg.m⁻². Pri vyššej koncentrácii na jednotku plochy 29,33 kg.m⁻² kurčatá dosiahli priemernú finálnu živú hmotnosť 2019,12 kg.m⁻². Rozdiel vo finálnej živej hmotnosti brojlerových kurčiat 8,88 g medzi skupinami nebol štatisticky preukazný ($P > 0,05$). Z výsledkov matematicko-štatistického vyhodnotenia finálnej živej hmotnosti vyplýva, že vyrovnanejšie hodnoty boli v skupine s nižšou koncentráciou brojlerových kurčiat na jednotku plochy. Potvrdzujú to výsledky smerodajnej odchýlky a variačného koeficienta ($s = 189,96$ g, resp. $v_k = 9,45$ % oproti $s = 254,97$ g, resp. $v_k = 11,93$ %).

Produkcia a ekonomické zhodnotenie produkcie brojlerových kurčiat z aspektu uplatňovania princípov welfare pri znížení koncentrácie zvierat na jednotku plochy

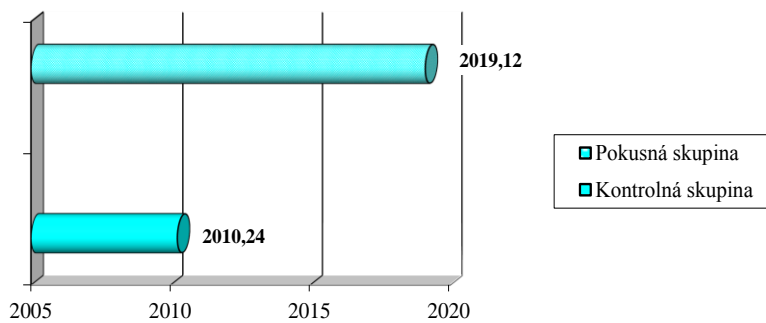
Celková produkcia brojlerových kurčiat v prvom a druhom experimente sledovaná v jednotlivých skupinách vyjadrená celkovou živou hmotnosťou bola pomerne vyrovnaná 214,38, resp. 216,68 kg alebo 201,02, resp. 201,91 kg pri koncentrácii 29,41, resp. 29,33 kg.m⁻² alebo 25,76, resp. 23,90 kg.m⁻². V prepočte produkcie brojlerových kurčiat v celej hale sa dosiahla celková živá hmotnosť 48 526,5, resp. 48 394,5 kg pri koncentrácii 29,41, resp. 29,33 kg.m⁻² a 42 504,0, resp. 39 435,0 kg pri koncentrácii 25,76, resp. 23,90 kg.m⁻². Pri znížení koncentrácie zvierat v hale z 29,41, resp. 29,33 kg.m⁻² na 25,76, resp. 23,90 kg.m⁻² sa znížila celková produkcia brojlerových kurčiat o 6 022,5 (12,41 %), resp. 8 959,5 kg živej hmotnosti (18,51%).



Graf 4 Teplota v hale počas experimentu



Graf 5 Koncentrácia brojlerových kurčiat na jednotku plochy (kg.m⁻²)



Graf 6 Finálna živá hmotnosť brojlerových kurčiat na konci experimentu vo veku 42 dní (g)

Tabuľka 3 Matematicko-štatistické vyhodnotenie výsledkov finálnej živej hmotnosti brojlerových kurčiat

Skupina (n = 100)				t-test P _{0,05}
kontrolná		pokusná		
s (g)	v _k (%)	s (g)	v _k (%)	
254,97	11,93	189,96	9,45	1,87

s – smerodajná odchýlka, v_k – variačný koeficient, * P>0,05 – štatisticky nepreukazný rozdiel

Tabuľka 3 Produkcia brojlerových kurčiat pri rozličnej koncentrácii zvierat na jednotku plochy

Experiment	Skupina	Koncentrácia zvierat na jednotku plochy (kg.m ⁻²)	Živá hmotnosť \bar{x} (g.ks ⁻¹)	Produkcia mäsa v experimente (n = 100) (kg)	Produkcia mäsa v hale (kg)
I.	Kontrolná	29,41	2143,80	214,38	48 526,5
	Pokusná	25,76	2166,76	216,68	42 504,0
II.	Kontrolná	29,33	2010,24	201,02	48 394,5
	Pokusná	23,90	2019,12	201,91	39 435,0

Tabuľka 4 Ekonomické zhodnotenie produkcie brojlerových kurčiat pri rozličnej koncentrácii zvierat na jednotku plochy

Experiment	Skupina	Ekonomické zhodnotenie produkcie brojlerových kurčiat 1 ks pri 0,788* €·kg ⁻¹ živej hmotnosti (€)	Ekonomické zhodnotenie produkcie v experimente n = 100 (€)	Ekonomické zhodnotenie produkcie v hale (€)
I.	Kontrolná	1,69	168,93	38 238,88 (n = 22 635,7)
	Pokusná	1,71	170,74	33 493,15 (n = 19 616,4)
II.	Kontrolná	1,58	158	38 134,87 (n = 24 073,6)
	Pokusná	1,59	159	31 074,78 (n = 19 530,8)

* – *Situačná a výhľadová správa, 2011*

Pomerne veľký počet výskumných prác je zameraných na účinnosť hustoty osadenia v produkcii brojlerových kurčiat a primárnu motiváciu jeho ekonomického významu (Proudfoot et al., 1979; Shanawany, 1988), tiež faktor jatočnej kvality (Edriss et al., 2003; Yadgari et al., 2006; Škrbić et al., 2006, 2007, 2008a, 2008b, 2008c) a v ostatnom, ako faktor sociálneho správania (Weeks et al., 2000; Thomas et al., 2004; Škrbić et al., 2009). V našom prvom experimente bola dosiahnutá vyššia finálna živá hmotnosť brojlerových kurčiat oproti živej hmotnosti brojlerových kurčiat v druhom experimente, čo sa prejavilo vyššou cenou za kus 1,69 € pri koncentrácii zvierat na jednotku plochy 29,41 a 1,71 € pri koncentrácii zvierat na jednotku plochy 25,76 kg.m⁻². V druhom experimente cena jedného ks brojlerového kurčaťa bola 1,58 € pri koncentrácii zvierat na jednotku plochy 29,33 kg.m⁻² a 1,59 € pri koncentrácii zvierat 23,90 kg.m⁻². Výrazné rozdiely v cene sa zistili po prepočte na celkovú produkciu brojlerových kurčiat v celej hale v závislosti od koncentrácie zvierat na jednotku plochy. Pri koncentrácii zvierat 29,41, resp. 29,33 kg.m⁻² bola cena produkcie brojlerových kurčiat 38 238,88, resp. 38 134,87 € a pri koncentrácii zvierat na jednotku plochy 25,76, resp. 23,90 kg.m⁻² 33 493,15, resp. 31 074,78 71 €. Pri koncentrácii zvierat na jednotku plochy 25,76, resp. 23,90 kg.m⁻² bola nižšia cena za produkciu brojlerových kurčiat o 4 745,73, resp. 7 060,09 € oproti cene produkcie brojlerových kurčiat pri koncentrácii 29,41, resp. 29,33 kg.m⁻². Haščik et al. (2007) konštatujú, že jednou z možností zvýšenia rentability produkcie hydínového

mäsa je uplatňovanie nových trendov vo výžive hydiny. V konečnom dôsledku aplikácia probiotického kŕmneho doplnku vedie k zlepšeniu úžitkovosti a zvýšeniu miery zisku.

ZÁVER

Na základe výsledkov experimentov môžeme konštatovať, že pri znížení koncentrácie brojlerových kurčiat na jednotku plochy z 29,41 na 25,76 kg.m⁻², resp. 29,33 na 23,90 kg.m⁻² nebola štatisticky preukazne ovplyvnená ich finálna živá hmotnosť ($P \geq 0,05$). Priemerná finálna živá hmotnosť brojlerových kurčiat v prvom a druhom experimente bola pomerne vyrovnaná 2,14, resp. 2,17 kg alebo 2,01, resp. 2,02 kg pri koncentrácii 29,41, resp. 29,33 kg.m⁻² alebo 25,76, resp. 23,90 kg.m⁻². V prepočte produkcie brojlerových kurčiat v celej hale sa uvedeným znížením koncentrácie zvierat znížila produkcia o 12,41, resp. 18,51 %. Uvedené zníženie celkovej produkcie brojlerových kurčiat znamená zníženie ceny produkcie v hodnotenej hale pre výkrm 24 750 kurčiat o 4 745,73, resp. 7 060,09 €.

LITERATÚRA

- ANGELOVIČOVÁ, M., ANGELOVIČ, M. 2011. Broiler welfare, EU standards and world trade. In *Potravinarstvo*, vol. 5, 2011, special issue, p. 340-344.
- CRAVENER T. L., ROUSH W. B., MASHALY, M. M. 1992. Broiler production under varying population densities. In *Poult. Sci.*, vol. 71, 1992, p. 427-433.

- EDRISS, M. A., DAVOODVANDI, S., POURREZA, J. 2003. The Effect of stock density on the predication of performance and carcass traits in broiler chickens. In *Proceedings 26th European Symposium on the Quality of Poultry Meat*, September 2003., Saint-Brienc, France, 2003, p. 695-700.
- HASČÍK, P., ČUBOŇ, J., KAČÁNIOVÁ, M., UBREŽIOVÁ, I. 2007. Vplyv nových trendov vo výžive hydiny na ekonomiku výroby hydinového mäsa. In *Acta Oeconomica et Informatica*, vol. 1, 2007, p. 17-20.
- LEONE, E. H., ESTEVEZ, I. 2008a. Space use according to the distribution of resources and level of competition. In *Poult. Sci.*, vol. 87, 2008a, p. 3-13.
- LEONE, E. H., ESTEVEZ, I., 2008b. Use of space in the domestic fowl: separating the effects of enclosure size, group size and density. In *Anim. Behaviour*, vol. 76, 2008b, p. 1673-1682.
- LEWIS P. D., PERRY G. C., FARMER L. J., PATTERSON R. L. S. 1997. Responses of Two Genotypes of Chicken to the Diets and Stocking Densities Typical of UK and "Label Rouge" Production Systems: 1. Performance, Behaviour and Carcass Composition. In *Meat Sci.*, vol. 45, 1997, vol. 4, p. 501-516.
- MELUZZI, A., FABBRI, C., FOLEGATTI, E., SIRRI, F. 2008. Effect of less intensive rearing conditions on litter characteristics, growth performance, carcass injuries and meat quality of broilers. In *British Poult. Sci.*, vol. 49, 2008, p. 509-515.
- MENDES, A. A., GARCIA, R. G., IMEIDA, I. C. L. A., MOREIRA, J. 2004. Effect of stocking densities and season on performance, environmental and thermoregulatory parameters and carcass yield of broiler chickens. In *The 22nd World's Poultry Congress*. Istanbul, Turkey, June 8-13, 2004, p. 417.
- MORTARI, A. C., ROSA, A. P., ZANELLA, I., NETO, C. B., VISENTIN, P. R., BRITES, L. B. P. 2002. Performance of broilers reared in different population density, in winter, in South Brazil. In *Ciência Rural*, vol. 32, 2002, p. 3.
- PROUDFOOT, F. G., HULAN, H. W., 1979. The effect of four stocking densities on broiler carcass grade, the incidence of breast blisters and other performance traits. In *Poult. Sci.*, vol. 58, 1979, p. 791-795.
- SHANAWANY, M. M., 1988. Broiler performance under high stocking densities. In *British Poult. Sci.*, vol. 29, 1988, p. 29-43
- ŠKRBIĆ, Z., PAVLOVSKI, Z., LUKIĆ, M., 2006. Possibility of improvement of certain slaughter traits by reducing the density of housing of broiler chickens. In *World's Poult. Sci. J.*, vol. 62, 2006, p. 273.
- ŠKRBIĆ, Z., 2007. Efekti gustine naseljenosti i svetlosnog programa na proizvodne i klanične osobine brojlerskih pilića različitog genotipa: doktorska disertacija. Poljoprivredni fakultet, Beograd, 2007.
- ŠKRBIĆ, Z., PAVLOVSKI, Z., LUKIĆ, M., 2007. Body mass and dynamics of growth of broiler chickens of different genotype in improved rearing conditions. In *Biotechnol. Anim. Husbandry*, vol. 23, 2007c, no. 5-6, p. 347-357.
- ŠKRBIĆ, Z., PAVLOVSKI, Z., LUKIĆ, M., BLAGOJEVIĆ, M., 2008a. Carcass quality of broilers reared in lower stocking density and in conditions of discontinuous light program. In *1st Mediterranean Summit of WPSA Advances and Challenges in Poultry Science*. Porto Carras, Greece, 2008a, p.1028-1032.
- ŠKRBIĆ, Z., PAVLOVSKI, Z., LUKIĆ, M., 2008b. Efekat gustine naseljenosti na pojedine klanične osobine brojlera genotipa Cobb. In *Biotechnol. Anim. Husbandry*, vol. 24, 2008b, no. 1-2, p. 51-58.
- ŠKRBIĆ, Z., PAVLOVSKI, Z., LUKIĆ, M., BLAGOJEVIĆ, M., 2008c. Kvalitet trupa brojlera gajenih u manjoj gustini naseljenosti i u uslovima diskontinuiranog svetlosnog programa. In *Živinarstvo*, vol. 10, 2008c, p. 3-9.
- ŠKRBIĆ, Z., PAVLOVSKI, Z., LUKIĆ, M., PERIĆ, L., MILOŠEVIĆ, N., 2009. The Effect Of Stocking Density On Certain Broiler Welfare Parameters. In *Biotechnol. Anim. Husbandry*, vol. 25, 2009, no. 1-2, p. 11-21.
- THOMAS, D. G., RAVINDRAN, V., THOMAS, D. V., CAMDEN, B. J., COTTAM, Y. H., MOREL, P. C.H., COOK, C. J., 2004. Influence of stocking density on the performance, carcass characteristics and selected welfare indicators of broiler chickens. In *New Zealand Vet. J.*, vol. 52, 2004, p. 76-81.
- WEEKS, C. A., DANBURY, T. D., DAVIES, H. C., HUNT, P., KESTIN, S. C., 2000. The behaviour of broiler chickens and its modification by lameness. In *Appl. Anim. Behaviour Sci.*, vol. 67, 2000, p. 111-125.
- YADGARI, L., KINREICH, R., DRUYAN, S., CAHANER, A., 2006. The effects stocking density in hot conditions on growth, meat yield and meat quality of featherless and feathered broilers. In *World's Poult. Sci. J.*, vol. 62, 2006, p. 603.
- FAO, 2010. Poultry Meat & Eggs. Roma : Viale delle Terme di Caracalla, 2010.
- Situačná a výhľadová správa (hydina a vajcia). Bratislava : VÚEPP, vol. 19, 2011, 44 p. ISBN 978-80-8058-567-90.
- Smernica Rady 2007/43/ES z 28. júna 2007, ktorou sa stanovujú minimálne pravidlá ochrany kurčiat chovaných na produkciu mäsa. In *Úradný vestník L 182*, 12/07/2007, p. 0019-0028.
- Výnos z 31. januára 2002 č. 39/3/2002-100, ktorým sa mení a dopĺňa výnos Ministerstva pôdohospodárstva Slovenskej republiky zo 7. októbra 1997 č. 1497/3/1997-100, ktorým sa ustanovujú požiadavky na uvádzanie doplnkových látok do obehu, na ich zloženie, skúšanie a hodnotenie a bližšie požiadavky biologického overovania krmív (oznámenie č. 106/1998 Z. z.) v znení výnosu Ministerstva pôdohospodárstva Slovenskej republiky z 26. novembra 1999 č. 4156/1999-100 (oznámenie č. 357/1999 Z. z.).

Acknowledgments:

This work was supported by grant VEGA 1/0007/11.

Contact address:

prof. Ing. Mária Angelovičová, CSc., Slovak University of Agriculture, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Department of Food Hygiene and Safety, Tr. Andreja Hlinku 2, 949 76 Nitra, E-mail: maria.angelovicova@gmail.com,

Ing. Martin Kliment, Slovak University of Agriculture, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Department

of Food Hygiene and Safety, Tr. Andreja Hlinku 2, 949 76 Nitra, E-mail: martin.kliment@uniag.sk,

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

Ing. Jana Tkačová, Slovak University of Agriculture, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Department of Food Hygiene and Safety, Tr. Andreja Hlinku 2, 949 76 Nitra, E-mail: martin.kliment@uniag.sk,

Ing. Martin Král, Slovak University of Agriculture, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Department

of Food Hygiene and Safety, Tr. Andreja Hlinku 2, 949 76 Nitra, E-mail: martin.kral@uniag.sk,

MSc. Ebrahim Aleaig, Slovak University of Agriculture, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Department of Food Hygiene and Safety, Tr. Andreja Hlinku 2, 949 76 Nitra, E-mail: ebrahim.alfaig@uniag.sk,

MVDr. Ľubomír Lopašovský, PhD., Slovak University of Agriculture, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Department of Food Hygiene and Safety, Tr. Andreja Hlinku 2, 949 76 Nitra, E-mail:

lubomir.lopasovsky@uniag.sk

QUANTITATIVE AND STRUCTURAL CHANGES OF TESTIS AND SEMEN QUALITY PARAMETERS CHANGES CAUSED BY PERORAL ADMINISTRATION OF DIAZINON IN RATS

*Michal Cabaj, Róbert Toman, Mária Adamkovičová, Peter Massányi, Branislav Šiška,
Norbert Lukáč, Jozef Golian, Svätoslav Hluchý*

ABSTRACT

The aim of this study was to find the quantitative and structural changes in the rat testis and changes of semen quality after a diazinon administration. **METHODS:** Rats received diazinon (99% purity) in their drinking water (40 mg.l^{-1}) with free access. Age of rats at the beginning of the experiment was 30 days and experiment lasted for next 90 days. The histological samples were evaluated by histological and morphometric methods in light microscopy and the samples of semen were evaluated with CASA method. **RESULTS:** Disintegration of cellular associations in the seminiferous epithelium, germ cells evacuation into the tubule lumen and their necrosis were mostly observed. Rarely vacuolisation and cracks of epithelium and fibrotisation of interstitial tissue were noted. Morphometric methods have shown extension of epithelium ($P < 0,01$), reduction of tubule lumen ($P < 0,001$) and dilatation of blood vessels ($P < 0,001$). In CASA analysis elevation of all parameters were noted, with statistically significant increase of DSL, VSL, ALH. Dilatation of blood vessels will be probably one of the most significant finding in diazinon toxicity because changes in blood flow in the testis are the key factors of accurate physiological function of testis. The epithelium despite the serious disintegration of germ cells associations and release of these necrotised germ cells to the lumen was significantly extended. This fact indicates the self-reparation compensational function. The same tendency (stimulation effects) has been found in all analysed sperm parameters. It supports previous hypothesis. **CONCLUSIONS:** Diazinon in this design of experiment causes the disintegration of the germinal epithelium cells associations consequently leading to necrosis and release of these cells to the tubule lumen. Dilatation of blood vessels and unknown stimulation effect on sperm quality parameters are two other common effects of diazinon. We concluded that diazinon in our subchronic low dose test causes middle to moderate histological, morphometric and semen quality changes which were partially compensated with some unknown recovery mechanism. Otherwise, subcellular structures and their functions may be damaged which can lead to subfertility. Further investigation of diazinon is needed for verification of our hypothesis.

Keywords: diazinon, testis, histology, morphometry, sperm, rat

ÚVOD

Diazinon je pesticíd určený na reguláciu rozmanitého hmyzu patriaci do skupiny organofosforečných pesticídov používaných v poľnohospodárstve, veterinárnej medicíne a domácnostiach. Ak sa v danej oblasti používa, je vďaka rozmanitým spôsobom použitia v životnom prostredí všadeprítomný kontaminant, od stopových až po potenciálne toxické koncentrácie pre živé zložky ekosystému (Swan, 2006; Swan et al., 2003; Roelveld et al., 2008; Jurewicz et al., 2009; ATSDR, 2008). Ľahko preniká do vôd, pôdy a vo forme aerosólu môže byť roznášaný vetrom. Do organizmu preniká cez všetky známe cesty expozície. Je extrémne toxický pre ryby a vodné živočíchy, vtáky a včely, pre cicavce je stredne toxický (Inchem, 2012). Pri nedodržaní správnych ochranných lehôt, alebo dávok pri postrekoch plodín, či sádov, alebo pri manipulácii, či aplikácii, vzniká potenciálne riziko pre pracovníkov (Rastogi et al., 2009; Swan, 2006; Recio-Vega et al., 2008), ľudí žijúcich v aplikačnej oblasti (Swan et al., 2003; Swan, 2006; Roelveld et al., 2008; Jurewicz et al., 2009), alebo

konzumenta finálneho produktu (ATSDR, 2008; RASFF, 2012). Rýchlym výstražným systémom pre potraviny a krmivá (Rapid Alert System for Food and Feed) boli v posledných desiatich rokoch raz až niekoľkokrát ročne zachytávané na obchodný trh určené dodávky ovocia, zeleniny a poľných plodín kontaminované diazinonom z rozmanitých krajín sveta (RASFF, 2012). Diazinon ako látka s vysokým toxickým potenciálom vplyva cieľovo na mnohé orgánové systémy (ATSDR, 2008; Yehia et al., 2007; Wecker et al., 1985; Kashanian et al., 2008; Maxwell a Dutta, 2005; Alahyary et al., 2008; Oostingh et al., 2009; Kojima et al., 1993) najznámejšie sú jeho neurotoxické účinky (Roegge er et al., 2008; Rush et al., 2010; Slotkin a Seidler, 2007; Slotkin a Seidler, 2009). Jedným z ďalších cieľových systémov, na ktorý vplyva, je aj samčí reprodukčný systém (Abd el-Aziz, Shalab, Abd El-Khalik, 1994; Swan, 2006; Swan et al., 2003; Piña-Guzmán, Solís-Heredia, Quintanilla-Vega, 2005; Okamura et al., 2009; Sarabia, Maurer, Bustos-Obregón, 2009a,b; Recio-Vega et al., 2008). Cieľom experimentu bolo simulovať perorálnu subchronickú

expozíciu diazinonom a popísať a vyhodnotiť prípadné histologické a morfometrické zmeny semenníka a parametre pohyblivosti spermií potkana, ako časť extrapoláčného toxikologického modelu – odhadu toxikologického rizika u človeka na základe účinkov zaznamenaných pri skúmaní na zvieratách.

MATERIÁL A METÓDY

20 samcov potkanov línie Wistar bolo náhodne rozdelených do dvoch skupín po 10 nasledovne: kontrolná skupina a skupina s opakovaným perorálnym podávaním diazinonu. Vek zvierat v oboch skupinách pri začiatku experimentu bol 30 dní. Samcom experimentálnej skupiny sa podával diazinon (Sigma-Aldrich, USA; 99% čistota) v pitnej vode, v koncentrácii 40 mg.l⁻¹ počas 90 dní. Na konci experimentu boli samci oboch skupín anestetizovaní (parami éteru) a humánne usmrtení. Po usmrtení sa vykonala anatomická pitva a odobrali sa vzorky semenníkov, ktoré sa fixovali v modifikovanom Davidsonovom roztoku (Latendresse et al., 2002). Zvieratá boli umiestnené individuálne v plastových nádobách na podstielke z drevených hoblín. V priestoroch pokusného zariadenia sa dodržiavali základné nároky na životné podmienky (teplota 20 – 22 °C, vlhkosť 55 ± 10 %, 12 hodinový svetelný režim) a neobmedzený prístup k vode a krmivu (M3, Máchal, Česká republika) podľa nariadenia vlády SR č. 289/2003 Z.z.. Experimenty sa vykonávali v schválenom pokusnom zariadení SK PC 50004 SPU v Nitre.

Histologické a morfometrické hodnotenie

Vzorky semenníka sa farbili hematoxylin-eozínom a skúmali sa v svetelnom mikroskope Nikon Eclipse E600. Hodnotenie mikrofotografií bolo uskutočnené komputerizovaným systémom vyhodnocovania pomocou PC morfometrického software M.I.S. Quick Photo a mikroskopom Olympus AX 70. Vzorky semenníkov na histologických preparátoch sa ďalej vyhodnotili kvantitatívnymi morfometrickými metódami modifikovanými podľa **Uhrína a Kulíšeka (1980)**. V semenníku sa hodnotil absolútny objem štruktúry semenníka (μm³) pre: semenotvorný epitel, lúmen semenotvorných kanálikov, prázdne miesta v semenotvornom epiteli, intersticiálne tkanivo, krvné cievy; ďalej sa hodnotil priemer (μm) a plocha semenotvorného kanálika (μm²). Porovnávaná bola tiež priemerná hmotnosť semenníka (g).

Hodnotenie parametrov kvality ejakulátu

Prisemenník bol odobratý pri anatomickej pitve, ihneď po usmrtení zvierat. Z prisemenníka bola odobratá vzorka ejakulátu. Vzorky boli nariadené fyziologickým roztokom (20 μl) neustále udržiavané pri teplote 37 °C. Vzorka bola umiestnená na 10 μm hlbokú Maklerovu komôrku (Sefi-Medical Instruments, Israel) a následne bolo hodnotených minimálne 8 reprezentatívnych zorných polí. Vo vzorkách ejakulátu získaného z prisemenníka sa systémom CASA SpermVision (Minitüb, Tiefenbach, Germany) za pomoci mikroskopu Olympus BX 51 (Olympus, Japan) hodnotili nasledovné parametre spermií:

- % pohyblivých spermií
- % progresívne pohyblivých spermií

- DAP - distance average path; priemerná dráhová vzdialenosť (μm)
- DCL - distance curved line; línia zaoblenej vzdialenosti
- DSL - distance straight line; línia priamej vzdialenosti
- VAP - velocity average path; priemerná dráhová rýchlosť (μm/s)
- VCL - velocity curved line; rýchlosť v zaoblenej línii
- VSL - velocity straight line; rýchlosť v priamej línii
- STR - straightness; priamosť pohybu (VSL/VAP)
- LIN - linearita (VSL/VCL)
- WOB - wobble; kmitanie (VAP/VCL)
- ALH - amplitude of lateral head displacement; amplitúda laterálneho premiestnenia hlavičky (μm.s⁻¹)
- BCF - beat cross frequency; frekvencie krížneho úderu (Hz)

Štatistické hodnotenie

Výsledky boli uvedené ako priemer±štandardná odchýlka (x±SD). Na štatistické hodnotenie výsledkov bola použitá jednocestná analýza rozptylu (ANOVA) s hladinou preukaznosti α=0,05 v software Statgraphics Centurion XV.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Na mikrofotografiách rezov semenníkov samcov kontrolnej skupiny (Obrázok 1) bol pozorovaný normálny tvar a štruktúra tkanív semenníka. Priestor medzi jednotlivými kruhovitými až oválnymi semenotvornými kanálikmi vyplňalo kondenzované intersticiálne tkanivo. Vonkajší okraj obvodu kanálikov lemovala tesne prisadnutá bazálna membrána. Smerom do lúmenu na ňu v nepravidelných vrstvách nasadali deliace sa štádiá spermatogénnych buniek, medzi ktorými sa črtali Sertolihov bunky s charakteristickými bunkovými jadrami. Na apikálnych vrcholoch Sertolihov buniek boli v závislosti od fázy spermatogénneho cyklu uchytené spermatidy a spermie. Lúmen kanálikov vyplňali masy uvoľnených spermií. V intersticiálnom tkanive boli viditeľné najmä v okolí drobných krvných ciev zhľuky Leydigových buniek a občas i vláknitá štruktúra tkaniva. Hmotnosť semenníka, priemer a plochu semenotvorného kanálika zobrazuje tabuľka 1; absolútny objem štruktúr semenníka tabuľka 2 a parametre kvality ejakulátu tabuľka 3. Po perorálnom subchronickom podávaní diazinonu (40 mg.l⁻¹ počas 90 dní) nepreukazne poklesla hmotnosť a plocha semenníka a vzrástol priemer kanálika. **Toman et al. (2011)** po jednorazovom intraperitoneálnom podaní zaznamenali naopak preukazný vzostup hmotnosti semenníka a pokles priemeru kanálika, čo poukazuje na rozdielne pôsobenie v závislosti od dávky a spôsobu podávania. Najčastejšie histopatologické zmeny boli hromadné poškodenia spojení buniek epitelu a následné odumieranie a uvoľňovanie týchto más buniek zo semenotvorného epitelu do lúmenu (Obrázok 2a), čím sa preukazne znižoval priemer lúmenu (Tabuľka 2). Poškodenie spojení a odumieranie buniek by mohlo súvisieť s potenciálom diazinonu pre indukciu oxidačného stresu s následnými účinkami na tkanivá (**Sarabia, Maurer, Bustos-Obregón, 2009b; Shah a Iqbal, 2010; Giordano et al., 2007**). Preukazný nárast zastúpenia epitelu, napriek jeho poškodzovaniu (odumieranie

Tabuľka 1 Hmotnosť semenníka; priemer a plocha semenotvorného kanálika

Skupina	Hmotnosť semenníka (g)	Plocha kanálika (μm^2)	Priemer kanálika (μm)
	$x \pm SD$		
Kontrola	1,45±0,25	376,61±63,07	240,09±19,69
Diazinon	1,39±0,22	335,26±54,00	254,23±19,61

x -priemer, SD -štandardná odchýľka

Tabuľka 2 Absolútny objem štruktúr semenníka (μm^3)

Skupina	Semenotvorný epitel	Prázdne miesta v epiteli	Lúmen kanálika	Intersticiálne tkanivo	Krvné cievy
	$x \pm SD$				
Kontrola	90,41±4,04	0,53±1,03	32,90±4,22	15,24±2,83	0,41±0,37
Diazinon	100,02±6,83**	1,27±1,23	14,12±5,07***	16,43±4,70	1,45±0,52***

x -priemer, SD -štandardná odchýľka; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$

Tabuľka 3 Parametre kvality ejakulátu

Parameter	Kontrola	Diazinon
	$x \pm SD$	
Koncentrácia	0,17±0,12	0,64±0,77
% Pohyblivosť	29,66±15,88	39,87±18,85
% Progresívna pohyblivosť	13,82±10,46	20,00±14,54
DAP	21,01±4,58	24,55±3,57
DCL	33,78±8,22	37,54±5,41
DSL	16,32±2,89	19,43±3,37*
VAP	53,39±12,65	62,44±9,34
VCL	84,87±21,58	95,01±14,48
VSL	41,42±7,85	49,16±8,52*
STR	0,79±0,05	0,79±0,04
LIN	0,52±0,08	0,53±0,04
WOB	0,65±0,08	0,66±0,03
ALH	5,49±1,13	6,76±1,06*
BCF	17,90±1,75	17,95±2,73

x – priemer; SD – štandardná odchýľka; * $P < 0,05$

a uvoľňovanie buniek), by mohol byť kompenzačným reparačným mechanizmom diazinonom poškodeného epitelu. Medzi histopatologické zmeny s nižším výskytom patrili vznik trhlín v epiteli a odlupovanie sa bazálnej membrány i s niekoľkými bunkami epitelu (Obrázok 2b), čo rovnako svedčí o poškodení bunkových spojení. Zriedkavý bol výskyt prázdnych miest v epiteli – vakuolizácia (Obrázok 2a), ktorý sa v morfometrickom hodnotení neprejavil preukazne. V interstíciu bola veľmi zriedkavo pozorovaná fibrotizácia a jeho zastúpenie korešpondovalo s výsledkami kontroly. Naopak, **Toman et al. (2011)** zaznamenali po jednorazovom intraperitoneálnom podaní diazinonu edém a preukazný

nárast zastúpenia interstícia, čo môže súvisieť s intenzívnejšou akútnou stresovou reakciou pri danom experimente. Významným morfometrickým nálezom bol preukazný nárast objemového zastúpenia - dilatácie ciev, ako komponentov krvnenia všetkých štruktúr semenníka a zásobením organizmu testosterónom a inými androgénmi. Naše nálezy korešpondujú s nálezmi **Kojima et al. (1993)**, ktorý zaznamenali hypotenzívny-dilatačný účinok diazinonu na izolovanú aortu potkana cholinergným účinkom diazinonu na hladkosvalové bunky aorty. Rovnako, **Cabaj et al. (2010)** zaznamenali dilatáciu krvných ciev po intraperitoneálnom podaní diazinonu. Naš nález ukazuje, že dilatčný účinok diazinonu sa prejavuje

aj na iných krvných cievach i v *in vivo* experimentoch aj po subchronickom podávaní nízkych dávok. Nami pozorované zmeny (dilatácia ciev) by mohli súvisieť s produkciou testosterónu a iných androgénov. Zmeny v koncentráciách testosterónu po podaní diazinonu sú nejednoznačné a často rozporuplné (Okamura, et al., 2009; Alahyary, et al., 2008; Abd el-Aziz, Shalab, Abd el-Khalik, 1994; Sarabia, Maurer, Bustos-Obregón, 2009b; El-Hoda, Zidan, 2009).

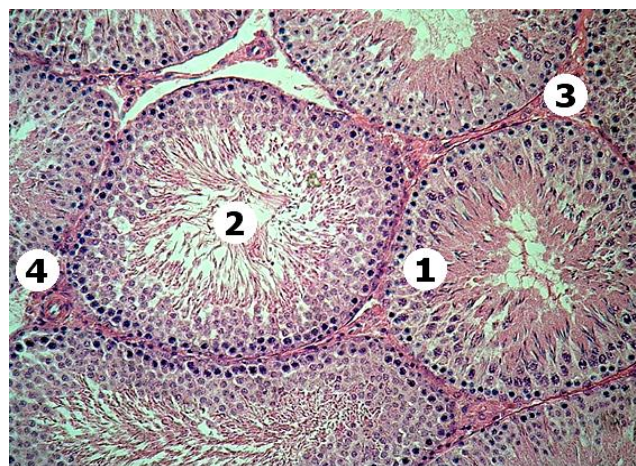
V hodnotení parametrov kvality ejakulátu došlo vo všetkých hodnotených parametroch experimentálnej skupiny k ich nárastu, z toho pri parametroch DSL, VSL a ALH boli tieto zmeny preukazné (Tabuľka 3). Sú dokázané súvislosti medzi výskytom diazinonu v prostredí a zníženou kvalitou ejakulátu mužov (Swan, 2006; Recio-Vega et al., 2008). Spermatotoxické účinky diazinonu u potkanov by mohli byť spôsobené histologickým poškodením hlavy prisemenníka a zalomené bičíky, cytoplazmatické

kvapôčky a redukovaná pohyblivosť spermíí sú označované ako relevantné markery spermatotoxicity diazinonu (Okamura et al., 2009). Údaje iných autorov naznačujú, že spermie v poslednom kroku zretia sú cieľovým miestom pôsobenia diazinonu (Piña-Guzmán, Solís-Heredia, Quintanilla-Vega, 2005). Salazar-Arredondo et al. (2008) zaznamenali poškodenia chromatinu a DNA u spermíí človeka, Piña-Guzmán, Solís-Heredia, Quintanilla-Vega (2005) poškodenie DNA u neskorých spermatíd a poškodenie chromatinu spermíí u potkanov; Sarabia, Maurer, Bustos-Obregón (2009a) poškodenia chromatinu a DNA spermíí u myši. Priame zníženie plodnosti zníženou schopnosťou koncepcie u samcov potkanov potvrdili Abd el-Aziz, Shalab, Abd el-Khalik (1994). Zmeny najmä v parametroch DSL, VSL a ALH, ktoré sme zaznamenali v našom experimente naznačujú možné poškodenie stredového-mitochondriálneho úseku spermíí, ktoré je miestom produkcie energie, alebo na poškodenie pohybového aparátu spermíí, ktorý je zodpovedný za ideálny pohyb spermie; hypoteticky je možné prípadné

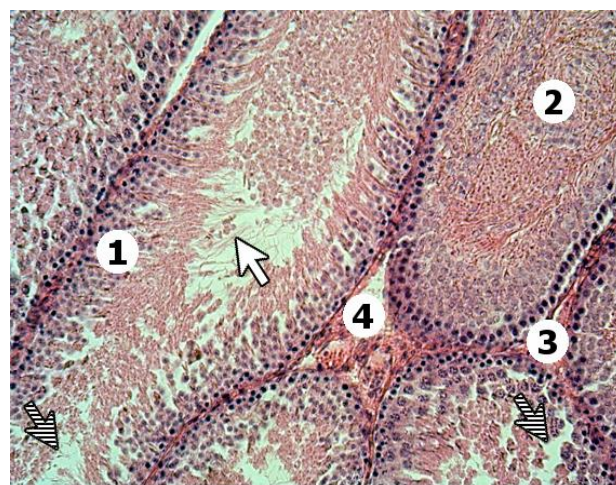
vylepšenie pohybových funkcií spermíí počas priebehu spermatogenézy alebo počas zretia v prisemenníku, ako kompenzačná odpoveď na stimulačný podnet ich mierneho dlhodobého poškodzovania nízkou dávkou diazinonu. Okamura et al. (2009) nezaznamenali po subchronickom teste s diazinonom na potkanoch zmeny v koncentrácii AMP, ADP, ATP, ani v pomere ATP/ADP. V našom experimente použitá dávka bola jednou z najnižších spomedzi citovaných údajov. Je preto možné, že sme zachytili hraničnú dávku, ktorá ešte nespôsobovala CASA analýzou zaznamenateľné známky toxického pôsobenia na spermíách.

ZÁVER

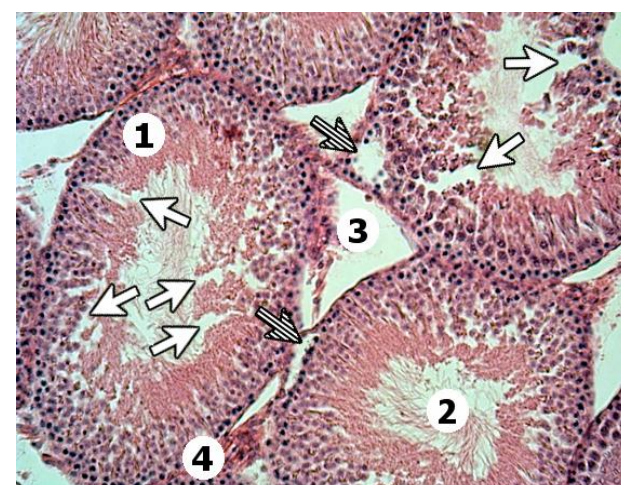
Diazinon v našom experimente spôsoboval dezintegráciu bunkových spojení zárodočného epitelu, čo následne vedie k odumieraniu a uvoľňovaniu zárodočných buniek do lúmenu semenotvorného kanálíka. Dilatácia krvných ciev a neznámy stimulačný účinok na kvalitu parametrov ejakulátu sú dva ďalšie hlavné popísané nálezy účinkov diazinonu. Diazinon



Obrázok 1: Semenník potkana kontrolnej skupiny (200x, HE). 1-semenotvorný epitel, 2-lúmen kanálíka so spermiami, 3-intersticiálne tkanivo, 4-krvná cieva



Obrázok 2a: Semenník potkana po p.o. podaní diazinonu (200x, HE). 1-semenotvorný epitel, 2-odumreté evakuované bunky epitelu v lúmene kanálíka, 3-intersticiálne tkanivo, 4-krvná cieva, šípka-bunky epitelu uvoľňujúce sa do lúmenu kanálíka, pružkovaná šípka-prázdne miesta v epiteli



Obrázok 2b: Semenník potkana po p.o. podaní diazinonu (200x, HE). 1-semenotvorný epitel, 2-lúmen kanálíka so spermiami, 3-intersticiálne tkanivo, 4-krvná cieva, biela šípka-poškodenie bunkových spojení-trhliny v epiteli, pružkovaná šípka-odlupovanie sa epitelu od bazálnej membrány

v subchronickom teste s nízkou dávkou spôsobuje stredné závažné až nízke histologické a morfometrické poškodenia a spôsobuje zmeny v parametroch kvality ejakulátu. Tieto poškodenia a zmeny sú čiastočne kompenzované neznámym regeneračným mechanizmom. Napriek našim zisteniam sú možné štrukturálne či funkčné poškodenia na subcelulárnej úrovni, ktoré môžu viesť k poklesu plodnosti. Na overenie našich hypotéz sú potrebné ďalšie výskumy.

LITERATÚRA

ABD EL-AZIZ, A. M. I., SAHLAB, A. M., ABD EL-KHALIKA, A. M. 1994. Influence of diazinon and deltamethrin on reproductive organs and fertility of male rats. In *Dtsch. Tierarztl. Wochenschr.*, vol. 101, 1994, no. 6, p. 230-232.

ALAHYARY, P., POOR, M. I., AZERBAIJANI F. F., NEJATI, V. 2008. The potential toxicity of diazinon on physiological factors in male rat. In *Pak. J. Biol. Sci.*, vol. 11, 2008, no. 1, p. 127-130.

ATSDR - Agency for Toxic Substances and Disease Registry, 2008. *Toxicological profile for diazinon*. U. S. Department of health and human services, 2008. 298 p.

CABAJ, M., TOMAN, R., ADAMKOVIČOVÁ, M., MASSÁNYI, P., ŠIŠKA, B., LUKÁČ, N., GOLIAN, J. 2010. Structural changes in the rat testis caused by diazinon and selenium. In *Potravinárstvo*, vol. 4, 2010, no. 2, p. 8-16.

EL-HODA, N., ZIDAN, A. 2009. Evaluation of the reproductive toxicity of chlorpyrifos methyl, diazinon and profenofos pesticides in male rat. In *Int. J. of Pharm.*, vol. 5, 2009, no. 1, p. 51-57.

GIORDANO, G., AFSHARINEJAD, Z., GUIZZETTI, M., VITALONE, A., KAVANAGH, T. J., COSTA, L. G. 2007. Organophosphorus insecticides chlorpyrifos and diazinon and oxidative stress in neuronal cells in a genetic model of glutathione deficiency. In *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, vol. 219, 2007, no. 2-3, p. 181-189.

INCHEM – International programe for chemical safety, 2012. Available online: <http://www.inchem.org/documents/pds/pds/pest45_e.htm>.

JUREWICZ, J., HANKE, W., RADWAN, M., BONDE, J. P. 2009. Environmental factors and semen quality. In *Int. J. Occup. Med. Environ. Health.*, vol. 22, 2009, no. 4, p. 305-329.

LATENDRESSE, J. R., WARBRITTON, A. R., JONASSEN, H., CREAMY, D. M. 2002. Fixation of testes and eyes using a modified Davidson's fluid: comparison with Bouin's fluid and conventional Davidson's fluid. In *Toxicol. Pathol.*, vol. 30, 2002, no. 4, p. 524-533.

KASHANIAN, S., GHOLIVAND, M. B., AHMADI, F., RAVAN, H. 2008. Interaction of diazinon with DNA and the protective role of selenium in DNA damage. In *DNA Cell Biol.*, vol.27, 2008, no. 6, p. 325-332.

KOJIMA, T., TSUDA, S., SHIRASU, Y. 1993. Inhibitory effect of fenthion and diazinon on the contraction of rat aorta, and its contribution to lethality. In *J. Vet. Med. Sci.*, vol. 55, 1993, no. 3, p. 383-385.

MAXWELL, L. B., DUTTA, H. M. 2005. Diazinon-induced endocrine disruption in bluegill sunfish, *Lepomis macrochirus*. In *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, vol. 60, 2005, no. 1, p. 21-27.

OKAMURA, A., KAMIJIMA, M., OHTANI, K., YAMANOSHITA, O., NAKAMURA, D., ITO, Y., MIYATA, M., UEYAMA, J., SUZUKI, T., IMAI, R., TAKAGI, K., NAKAJIMA, T. 2009. Broken sperm,

cytoplasmic droplets and reduced sperm motility are principal markers of decreased sperm quality due to organophosphorus pesticides in rats. In *J. Occup. Health.*, vol. 51, 2009, no. 6, p. 478-487.

OOSTINGH, G. J., WICHMANN, G., SCHMITTNER, M., LEHMANN, I., DUSCHL, A. 2009. The cytotoxic effects of the organophosphates chlorpyrifos and diazinon differ from their immunomodulating effects. In *J. Immunotoxicol.*, vol. 6, 2009, no. 2, p. 136-145.

PIÑA-GUZMÁN, B., SOLÍS-HEREDIA, M. J., QUINTANILLA-VEGA, B. 2005. Diazinon alters sperm chromatin structure in mice by phosphorylating nuclear protamines. In *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, vol. 202, 2005, no. 2, p. 189-198.

RASFF, 2012. Available online: <<https://webgate.ec.europa.eu/rasff-window/portal/#>>.

RASTOGI, S. K., SATYANARAYAN, P. V. V., RAVISHANKAR, D., TRIPATHI, S. 2009. A study on oxidative stress and antioxidant status of agricultural workers exposed to organophosphorus insecticides during spraying. In *Indian J. Occup. Environ. Med.*, vol. 13, 2009, no. 3, p. 131-134.

RECIO-VEGA R., OCAMPO-GÓMEZ G., BORJA-ABURTO V.H., MORAN-MARTÍNEZ J., CEBRIAN-GARCIA M. E. 2008. Organophosphorus pesticide exposure decreases sperm quality: association between sperm parameters and urinary pesticide levels. In *J. Appl. Toxicol.*, vol. 28, 2008, no. 5, p. 674-680.

ROEGGE, C. S., TIMOFEEVA, O. A., SEIDLER, F. J., SLOTKIN, T. A., LEVIN, E. D. 2008. Developmental Diazinon Neurotoxicity in Rats: Later Effects on Emotional Response. In *Brain Res. Bull.*, vol. 75, 2008, no. 1, p. 166-172.

ROELEVELD, N., BREVELD, R. 2008. The impact of pesticides on male fertility. In *Curr Opin. Obstet Gynecol.*, vol. 20, 2008, no. 3, p. 229-233.

RUSH, T., LIU, X. Q., HJELMHAUG, J., LOBNER, D., 2010. Mechanisms of chlorpyrifos and diazinon induced neurotoxicity in cortical culture. In *Neuroscience*, vol. 166, 2010, no. 3, p. 899-906.

SALAZAR-ARREDONDO, E., DE JESÚS SOLÍS-HEREDIA, M., ROJAS-GARCÍA, E., HERNÁNDEZ-OCHOA, I., QUINTANILLA-VEGA, B. 2008. Sperm chromatin alteration and DNA damage by methyl-parathion, chlorpyrifos and diazinon and their oxon metabolites in human spermatozoa. In *Reprod. Toxicol.*, vol. 25, 2008, no. 4, p. 455-460.

SARABIA, L., MAURER, I., BUSTOS-OBREGÓN, E., 2009a. Melatonin prevents damage elicited by the organophosphorous pesticide diazinon on mouse sperm DNA. In *Ecotoxicol. Environ. Safety*, vol. 72, 2009a, no. 2, p. 663-668.

SARABIA, L., MAURER, I., BUSTOS-OBREGÓN, E., 2009b. Melatonin prevents damage elicited by the organophosphorous pesticide diazinon on the mouse testis. In *Ecotoxicol. Environ. Safety*, vol. 72, 2009b, no. 3, p. 938-942.

SHAH, M. D., IQBAL, M., 2010. Diazinon induced oxidative stress and renal dysfunction in rats. In *Food and Chemical Toxicology*, vol. 48, 2010, no. 12, p. 3345-3353.

SLOTKIN, T. A., SEIDLER, F. J., 2007. Comparative developmental neurotoxicity of organophosphates in vivo: transcriptional responses of pathways for brain cell development, cell signaling, cytotoxicity and neurotransmitter systems. In *Brain Res. Bull.*, vol. 72, 2007, no. 4-6, p. 232-274.

SLOTKIN, T. A., SEIDLER, F. J., 2009. Oxidative and excitatory mechanisms of developmental neurotoxicity: transcriptional profiles for chlorpyrifos, diazinon, dieldrin, and divalent nickel in PC12 cells. In *Environ. Health Perspect.*, vol. 117, 2009, no. 4, p. 587-596.

SWAN, S. H., 2006. Semen quality in fertile US men in relation to geographical area and pesticide exposure. In *Int. J. Androl.*, 2006, vol. 29, no. 1, p. 62-68.

SWAN, S. H., KRUSE, R. L., LIU, F., BARR D. B., DROBNIS, E. Z., REDMON, J. B., WANG, C., BRAZIL, C., OVERSTREET, J. W. 2003. Semen quality in relation to biomarkers of pesticide exposure. In *Environ. Health Perspect.*, vol. 111, 2003, no.12, p. 1478-1484.

TOMAN, R. ADAMKOVIČOVÁ, M., HLUCHÝ, S., CABAJ, M., GOLIAN, J. 2011. Quantitative analysis of the rat testes after an acute cadmium and diazinon administration. In *Animal Science and Biotechnologies*, vol. 44, 2011, no. 2, p. 188-191.

UHRÍN, V., KULÍŠEK, V., 1980. Využitie morfoloických metód pre stanovenie hrúbky svalových vlákien. In *Živočíšna výroba*, vol. 53, 1980, no. 12, p. 935-942.

WECKER, L., MRAK, R. E., DETTBARN, W. D. 1985. Evidence of necrosis in human intercostal muscle following inhalation of an organophosphate insecticide. In *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.*, vol. 6, 1985, no. 2, p. 171-175.

YEHIA, M. A., EL-BANNA, S. G., OKAB, A. B. 2007. Diazinon toxicity affects histophysiological and biochemical parameters in rabbits. In *Exp. Toxicol. Pathol.*, vol. 59, 2007, no. 3-4, 215-225.

Acknowledgments: This work was supported by grant VEGA 1/0532/11.

Contact address:

Michal Cabaj, Slovak University of Agriculture in Nitra, Faculty of Agrobiology and Food Resources, Department of Veterinary Disciplines, Tr. A. Hlinku 2, 94976 Nitra, Slovakia, Tel.: +421376414503, E-mail: xcabaj@is.uniag.sk

Róbert Toman, Slovak University of Agriculture in Nitra, Faculty of Agrobiology and Food Resources, Department of Veterinary Disciplines, Tr. A. Hlinku 2, 94976 Nitra, Slovakia, Tel.: +421376414479, E-mail: robert.toman@uniag.sk

Mária Adamkovičová, Slovak University of Agriculture in Nitra, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Department of Animal Physiology, Tr. A. Hlinku 2, 94976 Nitra, Slovakia, Tel.: +421376414466, E-mail: maria.adamkovicova@uniag.sk

Peter Massányi, Slovak University of Agriculture in Nitra, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Department of Animal Physiology, Tr. A. Hlinku 2, 94976 Nitra, Slovakia, Tel.: +421376414284, E-mail: peter.massanyi@uniag.sk

Branislav Šiška, Slovak University of Agriculture in Nitra, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Department of Food Hygiene and Safety, Tr. A. Hlinku 2, 94976 Nitra, Slovakia, E-mail: branislav.siska@gmail.com

Norbert Lukáč, Slovak University of Agriculture in Nitra, Faculty of Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Department of Animal Physiology, Tr. A. Hlinku 2, 94976 Nitra, Slovakia, Tel.: +421376414349, E-mail: norbert.lukac@uniag.sk

Jozef Golian, Slovak University of Agriculture in Nitra, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Department of Food Hygiene and Safety, Tr. A. Hlinku 2, 94976 Nitra, Slovakia, Tel.: +421376414325, E-mail: jozef.golian@uniag.sk

Svätoslav Hluchý, Slovak University of Agriculture in Nitra, Faculty of Agrobiology and Food Resources, Department of Veterinary Disciplines, Tr. A. Hlinku 2, 94976 Nitra, Slovakia, Tel.: +421376414469, E-mail: svatoslav.hluchy@uniag.sk

ENTEROCOCCI AND THEIR ABILITY TO FORM A BIOFILM

Margita Čanigová, Viera Ducková, Miroslav Kročko, Jana Račková, Jana Bezeková

ABSTRACT

Number of enterococci determined in raw milk cistern samples was in range of 2.95 to 4.18 log CFU.ml⁻¹ and raw milk samples obtained from storage tanks contained enterococci count in the range of 3.04 to 4.51 log CFU.ml⁻¹. Results of microbiological quality evaluation showed, that count of enterococci increased during cold storage of raw milk. Portion of enterococci from the total microflora of raw milk taken from cistern samples was 0.44 %, otherwise in raw milk samples taken from storage tanks portion of enterococci decreased to 0.38 %. Among enterococci isolates *E. faecalis* was the predominant species in tested samples of raw milk from both cistern – 58.1 % and storage tank – 71.7 %. The following species were identified *E. faecium*, *E. group III.*, *E. mundtii*, *E. casseliflavus*. It was found that 38 % *E. faecalis* isolates were able to form a biofilm.

Keywords: enterococci, identification, biofilm

ÚVOD

Enterokoky sa prirodzene vyskytujú v potravinách živočíšneho i rastlinného pôvodu. Vysoký obsah enterokokov v mlieku a mliečnych výrobkoch v súčasnosti indikuje predovšetkým nedodržanie hygienických podmienok buď pri získavaní mlieka alebo pri výrobe mliečnych výrobkov. Enterokokom sa pripisujú mnohé pozitívne vlastnosti, ktoré ich radia medzi užitočnú mikroflóru. Tvoria významnú časť mikroflóry používanej pri výrobe niektorých druhov syrov, uplatňujú sa predovšetkým na tvorbe arómy pri ich zrení (**Foulquie Moreno et al., 2006; Tuncer, 2009; Serio et al., 2010**). **Ducková et al. (2009)** uvádzajú napr. v bryndzi priemerné počty enterokokov 6,12 log KTJ.g⁻¹. Enterokoky patria tiež medzi uznávané probiotické mikroorganizmy schopné produkovať bakteriocíny. **Nes et al. (2007)** zisťovali produkciu bakteriocínov enterokokmi, pričom u druhov *E. faecalis*, *E. faecium* a *E. mundtii* dokázali produkciu viacerých bakteriocínov. Na druhej strane sú enterokoky fakultatívne patogénnymi mikroorganizmami (**Biendo et al., 2010**) a sú tiež schopné produkovať biogénne amíny (**Standarová et al., 2009**). V posledných rokoch sa sleduje aj ich rezistencia na antibiotiká a schopnosť tvoriť biofilm (**Tendolkar et al., 2004; Cítak et al., 2006**).

Rozšírenie a stupeň tvorby biofilmu enterokokmi je rôzny. **Mohamed et al. (2004)** vo svojej štúdiu zistili tvorbu biofilmu u 93 % klinických a fekálnych izolátov enterokokov. **Metzger (2008)** sledoval schopnosť tvorby biofilmu u enterokokov pochádzajúcich z maštalného prostredia. Celkovo odobral 177 izolátov, pričom schopnosť tvorby biofilmu sa sledovala u druhov *E. faecium*, *E. casseliflavus* a u *E. faecalis*. Všetky tieto druhy vykazovali schopnosť tvorby biofilmu. Produkcia biofilmu bola odlišná medzi jednotlivými druhmi enterokokov, ale bola podobná v závislosti od ich pôvodu. *E. faecalis* tvoril biofilm vo väčšej miere ako *E. faecium* alebo *E. casseliflavus*. Tieto výsledky korešpondujú aj s výsledkami iných autorov (**Tendolkar et al., 2004; Di Rosa et al., 2006**), ktorí tvorbu biofilmu druhom

E. faecalis porovnávali s inými druhmi enterokokov. **Necidová et al. (2009)** izolovali enterokoky z bazénových a cisternových vzoriek mlieka, zo sterov odobratých na farme a mliekarni a tiež z finálnych mliečnych výrobkov. Z odobratých izolátov *E. faecalis* bolo 85 kmeňov (28 %) pozitívnych – tvoriacich biofilm a 218 (72 %) kmeňov bolo negatívnych – netvoriacich biofilm. Z celkového počtu izolátov *E. faecium* bolo 7 (33 %) kmeňov pozitívnych a 14 (67 %) kmeňov negatívnych na tvorbu biofilmu.

Z pohľadu rozšírenia biofilm-tvoriacich enterokokov možno na základe ich výsledkov konštatovať, že najviac boli enterokoky tvoriace biofilm rozšírené na farmách a pochádzali predovšetkým z bazénových a cisternových vzoriek mlieka. Poznatkov o tvorbe biofilmov enterokokmi izolovanými z prostredia mliekarenských závodov je pomerne málo. Väčšina štúdií tvorby biofilmov bola doposiaľ zameraná na klinické izoláty enterokokov.

Cieľom našej štúdie bolo zistiť prítomnosť enterokokov v cisternových vzorkách mlieka a vo vzorkách mlieka zo zásobných tankov. Získané izoláty enterokokov identifikovať a zistiť u náhodne vybraných izolátov schopnosť produkovať biofilm.

MATERIÁL A METÓDY

Počet enterokokov (CPE) sa stanovoval vo vzorkách mlieka (n = 50). Enterokoky sa stanovili pri teplote 37 ± 1 °C na živnom médiu Slanetz-Bartley (HiMedia, India) po dobu kultivácie 48 ± 2 hod (**STN 56 0100, 1970**).

Suspektné kolónie enterokokov izolované zo vzoriek mlieka sa preočkovali čiarovaním na selektívne médium so žľou a eskulínom (BEA agar) (HiMedia, India) a inkubovali sa pri teplote 37 ± 1 °C po dobu 24 ± 2 hod. Po potvrdení izolátov k rodu *Enterococcus* na základe morfológických znakov (makroskopické a mikroskopické) a biochemických skúšok (produkcia katalázy a PYRA test) sa vykonala druhová identifikácia komerčným EN-COCCUS testom (Pliva-Lachema, Česká republika).

Na simuláciu tvorby biofilmov u náhodne vybraných kmeňov enterokokov sa použila metóda, ktorú modifikovala **Koreňová et al. (2008)**. Enterokoky sa naočkovali do tryptón-sójového bujónu (TSB), živného bujónu (ŽB) a MRS bujónu (keďže jedným zo základných faktorov pre tvorbu biofilmu je substrát) a inkubovali sa pri teplote 37 ± 1 °C po dobu 20 – 24 hod. Táto kultúra (NK) sa odstredila pri 4000 ot.min⁻¹ počas 20 min. Supernatant sa zliat a bunky v skúmavke sa doplnili čerstvým bujónom v množstve 1 – 3 ml tak, aby optická densita dosiahla hodnotu 0,4 – 0,5 (čo zodpovedá asi 10⁸ KTJ.ml⁻¹). Z taktó získanej kultúry (ČK) sa naočkovalo 100 µl do mikrotitračnej doštičky. Kultúra sa zabezpečila proti odpareniu a kultivovala pri teplote 37 ± 1 °C počas 18 – 20 hod. Po kultivácii sa zmerala optická densita pri vlnovej dĺžke 630 nm. Na kvantifikáciu tvorby biofilmu sa použila metóda farbenia s kryštálovou violetou modifikovaná podľa **Koreňovej et al. (2008)**.

Princípom tejto metódy je zafarbenie buniek po premytí na tuhom povrchu kryštálovou violetou. Sledované druhy enterokokov sú schopné tvorby biofilmu, ak optická densita zostávajúcich buniek dosiahne po odčítaní hodnoty

VÝSLEDKY A DISKUSIA

O priemerných počtoch enterokokov v mlieku z cisternových vzoriek a zo zásobných tankov informuje tabuľka 1.

Počty enterokokov počas uskladnenia mlieka pred jeho základným ošetrením stúpli ($P > 0,05$), avšak ich podiel na

celkovej mikroflóre klesol z pôvodných 0,44 % na 0,38 % v dôsledku zvýšeného nárastu počtov psychrotrofných mikroorganizmov na celkovej mikroflóre.

K vysvetleniu týchto zmien by mohlo prispieť zistenie **Panfilí et al. (2008)**. Z výsledkov týchto autorov vyplýva, že počty enterokokov v mlieku počas skladovania pri teplote do 10 °C sú pomerne konštantné.

Z pôvodne vytypovaných 182 kolónii vyrastených na Slanetz-Bartley agare vyrástlo po preočkovaní čiarovaním na BEA agare a vytvorilo typické kolónie len 96 izolátov, čo predstavuje 52,7 %. Toto zistenie len potvrdzuje závery iných autorov, že médium Slanetz-Bartley umožňuje okrem enterokokov sledovaných v mlieku a mliečnych výrobkoch rast aj iným rodom príbuzných mikroorganizmov (**Weiss et al., 2005; Kročko et al., 2007**).

Ako vyplýva z tabuľky 2, najčastejšie izolovaným druhom enterokokov z mlieka bol druh *E. faecalis*. Tento druh enterokoka sa podľa viacerých autorov (**Teixeira et al., 2007; Gomes et al., 2008; Necidová et al., 2009; Trivedi et al., 2011**) najčastejšie izoluje z mlieka a mliekarenských zariadení.

Tvorba biofilmu v mliekarenských závodoch je spájaná predovšetkým s vlhkými povrchmi, na ktorých sa hromadia mikroorganizmy. Účinnosť sanitácie v mliekarenskom podniku môže byť negatívne ovplyvnená prítomnosťou enterokokov, keďže jedným z hlavných virulentných faktorov enterokokov je ich schopnosť tvorby biofilmu (**Tendolkar et al., 2004**). Príklad hodnotenia

Tab. 1 Počty enterokokov (CPE) v cisternových vzorkách surového kravského mlieka (n = 25) a vo vzorkách mlieka zo zásobných tankov (n = 25)

Ukazovateľ	CPE [KTJ.ml ⁻¹]	CPE [KTJ.ml ⁻¹]
\bar{x}	8,25.10 ³	9,16.10 ³
x_g	6,71.10 ³	7,33.10 ³
min	9,00.10 ²	1,10.10 ³
max	1,50.10 ⁴	3,20.10 ⁴
s_x	4,37.10 ³	6,49.10 ³

Tab. 2 Druhové zastúpenie enterokokov v surovom mlieku z cisternových vzoriek a vzoriek zo zásobných tankov

Druh rodu <i>Enterococcus</i>	Cisternové vzorky		% z celkového počtu izolátov (n = 96)	Vzorky zo zásob. tankov		% z celkového počtu izolátov (n = 96)
	počet	%		počet	%	
<i>E. faecalis</i>	25	58,1	26,0	38	71,7	39,6
<i>E. faecium</i>	7	16,3	7,3	0	0	0
<i>E. group III.</i>	5	11,6	5,2	15	28,3	15,6
<i>E. mundtii</i>	4	9,3	4,2	0	0	0
<i>E. casseliflavus</i>	2	4,7	2,1	0	0	0
SPOLU	43	100	44,8	53	100	55,2

Tab. 3 Tvorba biofilmu – *E. faecalis* kmeň č. 48

Typ bujónu	Optická densita pri $\lambda = 630 \text{ nm}$				
	NK		NK		NK
	<i>E. faecalis</i> kmeň č. 48		<i>E. faecalis</i> kmeň č. 48		<i>E. faecalis</i> kmeň č. 48
TSB	0,408	TSB	0,408	TSB	0,408
ŽB č. 2	0,319	ŽB č. 2	0,319	ŽB č. 2	0,319
MRS	0,298	MRS	0,298	MRS	0,298

Tab. 4 Schopnosť izolovaných enterokokov tvoriť biofilm

Druh	Positívne druhy	Negatívne druhy
<i>E. faecalis</i>	5 (38 %)	8 (62 %)
<i>E. faecium</i>	1 (33 %)	2 (67 %)
<i>E. group III.</i>	0	2 (100 %)

tvorby biofilmu enterokokom izolovaným z mlieka je uvedený v tabuľke 3. Vzhľadom k tomu, že optická densita buniek tohto kmeňa nedosiahla hodnotu $> 0,1$, bol tento kmeň vyhodnotený ako neschopný tvoriť biofilm.

V našej štúdií sa tvorba biofilmu hodnotila u 18 náhodne vybraných a identifikovaných kmeňov enterokokov – tabuľka 4. Ako najvhodnejšie médium pre tvorbu biofilmu sa zistil TSB (tabuľka 3), ktorý sa však svojím zložením líši od zloženia mlieka.

Ako vyplýva z tabuľky 4 izolované enterokoky mali pomerne slabú schopnosť vytvárať biofilmy na povrchu plastu, z ktorého sú vyrobené mikrotitračné doštičky použité pri testovaní biofilmov. To ale nevylučuje schopnosť enterokokov tvoriť biofilmy, aj vzhľadom na médium použité v pokusoch, napr. na iných povrchoch. Vyššia schopnosť sa zaznamenala u kmeňov druhu *E. faecalis*. Veľmi podobnú schopnosť enterokokov tvoriť biofilmy dokázali napr. aj **Necidová et al. (2009)**, **Barbosa et al. (2010)**. Samozrejme tvorba biofilmov je ovplyvňovaná mnohými faktormi ako napr. povrch, substrát, podmienky, za ktorých sa mikroorganizmy rozmnožia jú a pod. Zanedbanie sanitácie povrchov mliekarenských strojov môže významne prispieť k tvorbe biofilmov, čím sa vytvárajú zdroje pre kontamináciu mlieka a mliečnych výrobkov mikroorganizmami.

ZÁVER

Enterokoky patria k bežnej mikroflóre surového mlieka a ich počty sa pred tepelným ošetrením mlieka štatisticky nevýznamne zvyšovali. Dominantným druhom enterokokov, ktorý sa v mlieku vyskytoval je *E. faecalis*. Výsledky náhodne testovaných kmeňov enterokokov na schopnosť tvoriť biofilm jasne dokazujú, že enterokoky takúto schopnosť majú. Predchádzať tvorbe biofilmov je možné dôsledným dodržiavaním pravidiel sanitácie a hygieny, či už v podmienkach fariem alebo v mliekarenských podnikoch.

LITERATÚRA

BARBOSA, J., GIBBS, P. A., TEIXEIRA, P. 2010. Virulence factors among enterococci isolated from traditional fermented meat products produced in the North of Portugal. In *Food Control.*, vol. 21, 2010, no. 5, p. 651-656.

BIENDO, M., ADJIDE, C., CASTELAIN, S., BELMEKKI, M., ROUSSEAU, F., SLAMA, M., GANRY, O., SCHMIT, J. L., EB, F. 2010. Molecular Characterization of Glycopeptide-Resistant Enterococci from Hospitals of the Picardy Region (France). In *International Journal of Microbiology.* vol. 2010, no. 1, p. 1-8.

CITAK, S., GUNDOGAN, N., MEND, A. 2006. Occurrence, isolation and antibiotic resistance of *Enterococcus* species isolated from raw milk samples in Turkey. In *Milchwissenschaft.*, vol. 61, 2006, no. 2, p. 150-152.

DI ROSA, R., CRET, R., VENDITTI, M., D'AMELIO, R., ARCIOLA, C., MONTANARO, L., BALDASSARRI, L. 2006. Relationship between biofilm formation, the enterococcal surface protein and gelatinase in clinical isolates of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*. In *FEMS Microbiology Letters.* vol. 256, 2006, no. 1, p. 145-150.

DUCKOVÁ, V., ČANIGOVÁ, M., KROČKO, M. 2009. *Enterococcus* species isolated from sheep milk and Slovak Bryndza cheese and their antibiotic susceptibility. In *Milchwissenschaft.*, vol. 64, 2009, no. 1, p. 70-74.

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

GOMES, B. C., ESTEVES, C. T., PALAZZO, I. C. V., FELIS, G. E., SECHI, L. A., FRANCO, B. D. G. M., DE MARTINIS, E. C. P. 2008. Prevalence and characterization of *Enterococcus* spp. isolated from Brazilian foods. In *Food Microbiology.*, vol 25, 2008, no. 5, p. 668-675.

KOREŇOVÁ, J., LOPAŠOVSKÁ, J., KUČHTA, T. 2008. Comparison of three microtitre plate-based methods for quantification of biofilm formation ability of bacteria contaminating food technologies. In *Journal of Food and Nutrition Research.*, vol. 47, 2008, no. 2, p. 100-104.

KROČKO, M., ČANIGOVÁ, M., DUCKOVÁ, V. 2007. Porovnanie selektívnych kultivačných médií pre stanovenie počtu enterokokov. In *Laboralim 2007: zborník prednáškových a posterových príspevkov zo XVI. Medzinárodnej konferencie o analytických metódach v potravinárstve v súlade s harmonizáciou legislatívy EÚ v dňoch 7. a 8. februára 2007 v Banskej Bystrici.* Bratislava: Slovenská technická univerzita. 2007, ISBN 80-227-2222-7, p. 295-299.

- METZGER, S. 2008. Biofilm formation by *Enterococcus* species of bovine mammary gland and environmental origins. In: *The Knowledge bank at OSU*, The Ohio State University: Department of Animal Sciences Honors Theses, 2008, p 11.
- MOHAMED, J. A., HUANG, W., NALLAPAREDDY, S. R., TENG, F., MURRAY, B. E. 2004. Influence of origin of isolates, especially endocarditis isolates, and various genes on biofilm formation by *Enterococcus faecalis*. In *Infection and Immunity.*, vol. 72, 2004, no. 6, p. 3658-3663.
- NECIDOVÁ, L., JANŠTOVÁ, B., KARPIŠKOVÁ, S., CUPÁKOVÁ, S., DUŠKOVÁ, M., KARPIŠKOVÁ, R. 2009. Importance of *Enterococcus* spp. for forming a biofilm. In *Czech Journal of Food Science*, vol. 27, 2009, no. 2, p. 354-356.
- NES, I. F., DIEP, D. B., HOLO, H. 2007. Bacteriocin Diversity in *Streptococcus* and *Enterococcus*. In *Journal of Bacteriology.*, vol. 189, 2007, no. 4, p. 1189-1198.
- PANFILI, G., FRATIANNI, A., DI CRISCIO, T., GAMMARELLO, D., SORRENTINO, E. 2008. Influence of microorganisms on retinol isomerization in milk. In *Journal of Dairy Research.*, vol. 75, 2008, no. 1, p. 37-43.
- SERIO, A., CHAVES-LÓPEZ, C., PAPARELLA, A. SUZZI, G. 2010. Evaluation of metabolic activities of enterococci isolated from Pecorino Abruzzese cheese. In *International Dairy Journal.*, vol. 20, 2010, no. 7, p. 459-464.
- STN 56 0100: 1970. Mikrobiologické skúšanie potravín, predmetov bežnej spotreby a prostredia potravinárskych prevádzok. Bratislava: ÚNMS, 1970. 239 s.*
- STANDAROVÁ, E., BORKOVCOVÁ, I., DUŠKOVÁ, M., PRIDALOVÁ, H., DRAČKOVÁ, M., VORLOVÁ, L. 2009. Effect of Some Factors on the Biogenic Amines and Polyamines Content in Blue-Veined Cheese Niva. In *Czech Journal of Food Science* vol. 27, 2009, special issue, p. 410-413.
- TENDOLKAR, P. M., BAGHDAYAN, A. S., GILMORE, M. S., SHANKAR, N. 2004. Enterococcal surface protein, Esp, enhances biofilm formation by *Enterococcus faecalis*. In *Infection and Immunity.*, vol. 72, 2004, no. 10, p. 6032-6039.
- TEIXEIRA, L. M., CARVALHO, M. S., FACKLAM, R. R. 2007. *Enterococcus*. In *Manual of Clinical Microbiology*, 9th ed., Murray, P. R., Baron, E. J., Jorgensen, J. H., Landry, M. L., Tenover, M. C. (eds), ASM Press: Washington D.C. 2007, chap. 30. p. 698-715.
- TRIVEDI, K., CUPÁKOVÁ, S., KARPIŠKOVÁ, R. 2011. Virulence factors and antibiotic resistance in enterococci isolated from food-stuffs. In *Veterinarni Medicina.*, vol. 56, 2011, no. 7, p. 352-357.
- TUNCER, Y. 2009. Some technological properties of phenotypically identified enterococci strains isolated from Turkish tulum cheese. In *African Journal of Biotechnology.*, vol. 8, 2009, no. 24, p. 7008-7016.
- WEISS, A., DOMIG, K. J., KNEIFEL, W. 2005. Selective media for enumeration of probiotic enterococci. In *Food technology and biotechnology*, vol. 43, 2005, no. 2, p. 147-155.

Acknowledgments:

This work was supported by grant VEGA 1/0410/09.

Contact address:

doc. Ing. Margita Čanigová, CSc., Slovak University of Agriculture in Nitra, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Department of Evaluation and Processing of Animal Products, Trieda A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovakia, E-mail: Margita.Canigova@uniag.sk

Ing. Viera Ducková, PhD., Slovak University of Agriculture in Nitra, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Department of Evaluation and Processing of Animal Products, Trieda A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovakia, E-mail: viera.duckova@uniag.sk

Ing. Miroslav Kročko, PhD., Slovak University of Agriculture in Nitra, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Department of Evaluation and Processing of Animal Products, Trieda A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovakia, E-mail: mirokrocko@yahoo.com

Ing. Jana Račková, Slovak University of Agriculture in Nitra, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Department of Evaluation and Processing of Animal Products, Trieda A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovakia, E-mail: rackova@levmilk.sk

Ing. Jana Bezeková, Slovak University of Agriculture in Nitra, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Department of Evaluation and Processing of Animal Products, Trieda A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovakia, E-mail: j.bezekova@gmail.com

IDENTIFICATION OF OENOLOGICAL TANNINS EXTRACTED FROM OAK WOOD

Jana Návojská, Silvia Wendelin, Reinhard Eder, Helena Frančáková

ABSTRACT

Our study is dealing with the determination of the origin of oenological tannins using the modified OIV procedure. The method is based on HPLC analyses of proanthocyanidol content (catechin, epicatechin, epigallocatechin, epicatechin-3-O-gallate and epigallocatechin-3-O-gallate) after thioacidolysis - thiolytic cleavage of the flavonol intermonomer linkages in proanthocyanidols under heat in an acid medium. The purpose of the study was to differentiate oenological tannins gained from Quebracho cortex and tannins extracted from oak wood. As the results show, both groups of tannins do not produce any flavan-3-ols after thioacidolysis, but they show specific peaks, which enable determination of their origin.

Keywords: oenological tannin, thioacidolysis, oak wood, Quebracho, HPLC

INTRODUCTION

Oenological tannins are presented as a group of food additives that are extracted from different vegetable materials and are used in winemaking practises (Vivas, 1997).

They are used to facilitate the clarification of wines and musts. The main use of oenological tannins is to eliminate unstable proteins and modify some organoleptic properties in wines (colour stabilisation in red wines, astringency and bitterness) (Lurton et al., 2002). They are used to ensure wine palate balance and complexity. International organization of Vine and Wine (OIV) approved the use of oenological tannins as fining agents for white wines. However, oenological tannins also serve other applications (Bautista-Ortín et al., 2007). They can be used to inhibit laccase in Botrytis-infected grapes (Obreque-Sliér et al., 2009).

Tannins are primarily derived from the seeds and skin of the fruit during winemaking. As a result, wines made with little or no skin contact such as white and sparkling wines have low tannin levels, while red wines that are made with periods of skin contact ranging from a few days to several weeks can have quite variable tannin concentrations (Harbertson et al., 2008).

In chemical terms, tannins are relatively bulky phenol molecules, produced by the polymerization of elementary molecules with phenolic functions (Ribéreau-Gayon et al., 2006). The chemical composition of tannins changes notably with its botanical origin and the nature of the tissues (Vivas et al., 2004). They consist of polyphenolic fractions belonging to different chemical classes of tannins, namely condensed tannins which are composed of flavan-3-ol monomer subunits, such as catechin, epicatechin and their gallates, prepared from grapes (seeds and skins) and quebracho wood; and hydrolysable tannins, such as gallotannins consisting of a central glucose molecule substituted with gallic acid fraction, from exotic wood and ellagic tannins, as gallic acid dimers, prepared from oak and chestnut materials (Vivas, 1997; Haslam,

1998). Traditional source of hydrolysable tannins is the oak barrels where the wine is kept during the ageing process. Some tannin preparations are relatively pure extracts from single species, while others are mixtures from several species and may include both hydrolysable and condensed tannins (Obreque-Sliér et al., 2009).

Different chemical composition of tannins leads to differences in their chemical and biological activity, what requires the analytical characterisation of the oenological tannins (Laghi et al., 2010). A wide spectrum of oenological tannins is now available on the market, classified mainly according to the oenological properties. However, the tannins' chemical nature is not always clearly defined, and it is not always possible to know their botanical origin (Obradovic et al., 2005). From an economical and technological point of view, it is important to know the differences among commercial tannins and to verify the information presented by suppliers (Obreque-Sliér et al., 2009). In this study our point of view is identification and distinction between Quebracho and Oak wood tannins.

MATERIAL A METHODOLOGY

Tannin samples

Firstly, tannin extractions from different oak chips (Quercus robur, Quercus robur/petraea, Quercus alba) and Quebracho bark (Aspidosperma quebracho blanco) were prepared. 0,1 g of oak chips or quebracho was introduced into 10 ml methanol. After 24 hours, solutions were filtered and analysed using thioacidolysis and HPLC. Thereafter 21 preparations of oenological tannins from five suppliers available at Austrian market were analysed and their chromatograms were compared with chromatograms of oak wood- and quebracho extracts.

Chemicals

For our analyses we used: HPLC grade methanol (J.T.Baker, Deventer, Netherlands), distilled water, MilliQ water (device from TKA, Germany), formic acid (Merck, Darmstadt, Germany), toluene - α -thiol (CAS 100-53-8)

99 % (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), hydrochloric acid (12M) 37 % (Merck); standards: (+)-catechin, (-)-epicatechin (Sigma-Aldrich, USA), (-)-epigallocatechin, (-)-epicatechin gallate (Extrasynthese, Genay, France), epigallocatechin gallate (Roth, Karlsruhe, Germany), gallic acid and ellagic acid (Sigma-Aldrich, USA); tannin-methanol solutions with concentration 1 g.l⁻¹, 10mg tannin was introduced in 10 ml methanol.

Thioacidolysis

Thioacidolysis of tannin preparations was performed according to modified O.I.V. (2010) differentiations method for proanthocyanidin tannins by HPLC.

Thioacidolysis is a selective acidic depolymerisation method using a thiol as a nucleophilic agent for gaining monomeric composition and discrimination of polymeric proanthocyanidins. Condensed tannin is heated with toluene- α -thiol (benzyl mercaptan), which releases the terminal unit as a flavan-3-ol, while the extension units are released as toluene- α -thiol derivatives (Rigaud et al., 1991; Matthews et al., 1997; Pash et al., 2001). 1 ml tannin-methanol solution and 1 ml thioacidolysis reagent (470 μ l toluene- α -thiol introduced into hydrochloric acid solution - 140 μ l 12M HCl in 10 ml methanol) were mixed together in a hydrolysis tube. The mixture was stirred and heated at 60 °C for 10 minutes. The tube was then cooled with air. After cooling 1 ml distilled water was added. Mixture was then analysed by HPLC.

HPLC analysis

The samples after thioacidolysis were analysed on HP system series II 1090 AminoQuant with DAD (Hewlett Packard, USA). Separation was performed by column LiChrospher 100, RP-18, 250 x 4 mm, 5 μ m (Merck, Darmstadt, Germany), what was changed in comparison with original O.I.V. (2010) method. Mobile phase we used was also changed; instead of phosphoric acid we used 1% formic acid in MilliQ water as solution A and 1% formic acid in methanol as solution B. Separation was led by 40 °C in 55 minutes by following modified gradient: concentration of B solution started at 5 %, then it was led from 5 % to 10 % in 14 minutes, from 10 % to 30 % in 20 minutes, from 30 % to 90 % in 6 minutes, then 10 minutes at 90 %, finally in 5 minutes returned back to 5 %, post run time was running 15 minutes. Flow rate was constant and the same as in original method: 1 ml/min. Samples were measured by wavelength 280 nm and injection volume 20 μ l.

RESULTS AND DISCUSSION

Before analyses of commercial tannin preparations, standard solutions of catechin, epicatechin, epigallocatechin, epicatechin gallate and epigallo-catechin-

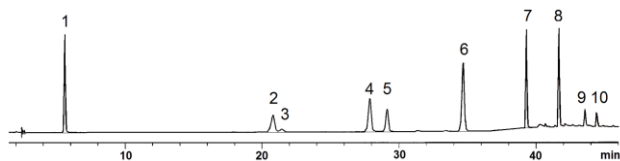


Fig. 1 Standard solution after thioacidolysis: 1-gallic acid, 2-catechin, 3-epigallocatechin, 4-epigallocatechin gallate, 5-epicatechin, 6-epicatechin gallate, 7-ellagic acid, 8 and 10 benzyl-thioether compounds, 9-reagent residue.

3-gallate, gallic acid and ellagic acid were analysed. Except of standards, two more peaks (Figure 1) appeared on chromatogram as benzyl-thioether compounds and reagent residue, after thioacidolysis.

We could not identify each peak on samples' chromatograms, whereas we used HPLC system without Mass Spectrometry. In spite of this disadvantage we could recognize the origin of tannin preparations according to presence or absence of single peaks and overall features of chromatogram. Some peaks are namely specific only for definite botanical origin. Therefore the calibration of standards was not required.

According to Vivas et al. (2004), tannins obtained from quebracho do not contain any flavan-3-ols as it is by grape tannins.

According to our results tannin samples acquired from quebracho bark offered typical chromatogram (Figure 2), without any proanthocyanidin or prodelfinidin compounds but we found out another specific peak at retention time between 38th and 39th minute.

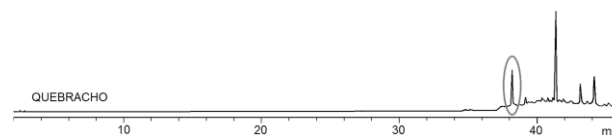


Fig. 2 Chromatogram of **que-bracho** tannin with specific peak.

Tannins extracted from oak wood show similar feature as quebracho tannins, they do not contain any proanthocyanidins as well. Difference was noticed in presence of gallic and ellagic acid. In addition, tannins obtained from toasted oak wood show specific double peak at retention time 44 minutes (Figure 3). For not toasted and medium toasted oak wood distinctive initial peak was typical.

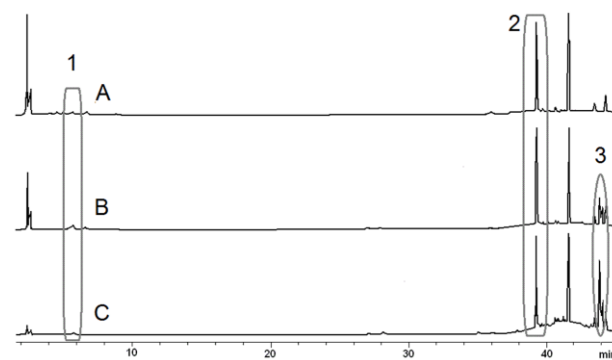


Fig. 3 Chromatograms of **oak wood** tannins, with gallic acid (1), ellagic acid (2) peaks and typical double peak (3) by toasted oak samples. A-not toasted oak wood, B-oak wood medium toasted, C-oak wood heavy toasted.

We analysed 20 samples of tannin preparations available at Austrians market (Table 1), which were marked by supplier as oak wood tannin, quebracho tannin, mixture of concrete tannins without marking of its origin and samples without any information about origin or chemical composition of tannin preparation.

According to the results - chromatograms with typical peaks in Figure 4, we noticed, that eleven samples (T1-T11) were obtained from not toasted oak wood,

Tab. 1 Samples of tannins with declaration of origin, marked by suppliers.

Sample	Origin (marked by supplier)	Sample	Origin (marked by supplier)
T 1	Oak wood	T 11	Oak wood
T 2	Oak wood	T 12	Oak wood medium toasted
T 3	Oak wood	T 13	Oak wood heavy toasted
T 4	-	T 14	Oak wood toasted
T 5	-	T 15	Ellagic tannins + Quebracho
T 6	French Oak wood	T 16	Quebracho
T 7	Oak wood	T 17	Ellagic, gallic, proanthoc. tannin
T 8	Limusin Oak wood	T 18	-
T 9	Oak wood air-dried	T 19	Catechinic tannin
T 10	Oak wood air-dried	T 20	Tropical tree + grape tannin

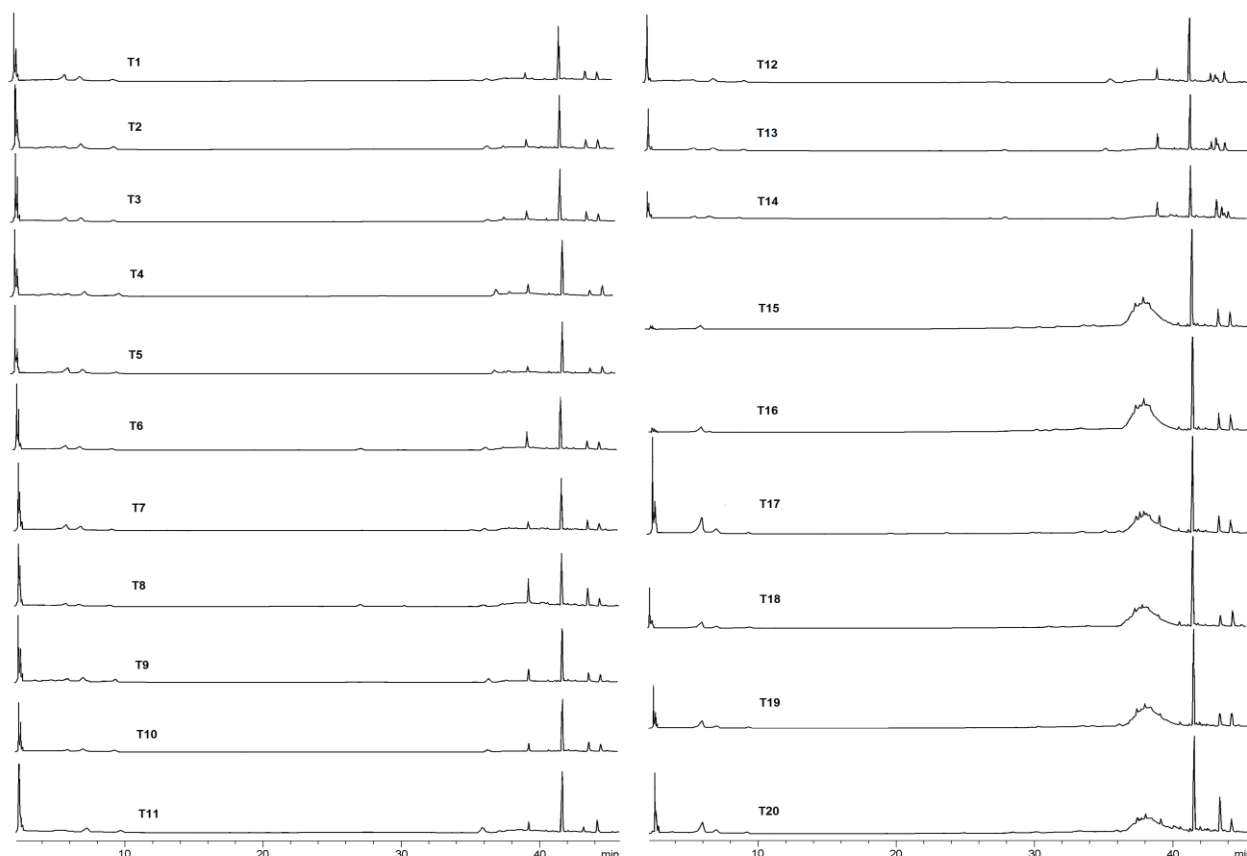


Fig. 4 Chromatograms of tannin samples. Not toasted oak tannins (T1-T11), toasted oak tannins (T12-T14), quebracho tannins T15, T16), tannin mixture (T17-T20).

samples T12-T14 from toasted oak wood and samples T15-T16 were extracted from quebracho wood. We assume, that samples T17-T20 are prepared as a mixture of quebracho and oak wood, because of presence of gallic and ellagic acid and distinctive initial peak specific for not-toasted oak wood. We do not agree with marking of sample T19 as catechinic tannin, as the chromatogram of the sample showed no peak of catechin and sample T17 and T20 as coming from grapes (proanthocyanidic tannins), as we did not identify any flavan-3-ols.

CONCLUSION

Following our results, we can confirm, that the origin of most of tannin samples is labelled correctly. We also determined the origin in cases where it was unknown. Some oenological tannins are prepared from mixture of

materials with different origin. In this case, the identification is more complicated, what requires further research in this area.

REFERENCES

- BAUTISTA-ORTÍN A. B., FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ J. I., LÓPEZ-ROCA J. M., GÓMEZ-PLAZA, E. 2007. The effects of enological practices in anthocyanins, phenolic compounds and wine color and their dependence on grape characteristics. In *Journal of Food Composition and Analysis*, vol. 20, 2007, p. 546-552.
- HARBERTSON, J. F., HODGINS, R. E., THURSTON, L. N., SCHAFFER, L. J., REID, M. S., LANDON, J. L., ROSS, C. F., ADAMS, D. O. 2008. Variability of tannin concentration in red wines. In *American Journal of Enology and Viticulture*, vol. 59, 2008, no. 2, p. 210-214.

- HASLAM, E. 1998. *Practical polyphenolics: From structure to molecular recognition and physiological function*. In Cambridge University Press, Cambridge, U.K.
- LAGHI, L., PARPINELLO, G. P., DEL RIO, D., CALANI, L., MATTIOLI, A. U., VERSARI, A. 2010. Fingerprint of enological tannins by multiple techniques approach. In *Food Chemistry*, vol. 121, 2010, p. 783-788.
- LURTON, L., LAURENT, M., GARNIER, C. 2002. Vinification en rouge: Des tanins de raisins pour stabiliser la couleur. In *La Revue des Oenologues*, vol. 104, 2002, p. 27-28.
- MATTHEWS, S., MILA, I., SCALBERT, A., POLLET, B., LAPIERRE, C., HERVE DU PENHOAT, C. L. M., ROLANDO, C., DONNELLY, D. M. X. 1997. Method for estimation of proanthocyanidins based on their acid depolymerization in the presence of nucleophiles. In *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 45, 1997, p. 1195-1201.
- OBRADOVIC, D., SCHULZ, M., OATEY, M. 2005. Addition of natural tannins to enhance the quality of red wine. In *Australian and New Zealand Grapegrower and Winemaker*, vol. 493, 2005, p. 52-54.
- OBREQUE-SLIER, E., PEÑA-NEIRA, A., LOPEZ-SOLIS, R., RAMIREZ-ESCUADERO, C., ZAMORA-MARIN, F. 2009. Phenolic characterization of commercial enological tannins. In *European Food Research and Technology*, vol. 229, 2009, p. 859-866.
- O.I.V. International Oenological Codex. Issue 2010. Paris. Capter: Oenological Tannins – COEI-1-TANINS: 2009. p. 5-13.
- PASH, H., PIZZI, A., RODE, K. 2001. MALDI-TOF mass spectrometry of polyflavonoid tannins. In *Polymer*, vol. 42, 2001, no. 18, p. 7531-7539.
- RIGAUD, J., PEREZ-ILZARBE, J., RICARDO DA SILVA, J. M., CHEYNIER, V. 1991. Micro method for identification of proanthocyanidin using thiolysis monitored by high-performance liquid chromatography. In *Journal of Chromatography*, vol. 540, 1991, p. 401-405.
- RIBEREAU-GAYON, P., GLORIES, Y., MAUJEAN, A., DUBOURDIEU, D. 2006. *Handbook of Enology*, vol. 2. Chichester : Wiley, 2006. 441 p. ISBN-13: 978-0-470-01037-2.
- VIVAS, N. 1997. Composition et propriétés des préparations commerciales detanins à usage oenologique. In *La Revue des Oenologues*, vol. 84, 1997, p. 15-21.
- VIVAS, N., NONIER, M. F., VIVAS DE GAULEJAC, N., ABSALON, CH., BERTRAND, A., MIRABEL, M. 2004. Differentiation of proanthocyanidin tannins from seeds, skins and stems of grapes (*Vitis vinifera*) and heartwood of Quebracho (*Schinopsis balansae*) by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight/MS and thioacidolysis /LC/electrospray ionization MS. In *Analytica Chimica Acta*, vol. 513, 2004, no.1, p. 247-256.

Contact address:

Ing. Jana Návojská, Slovak University of Agriculture in Nitra, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Department of Storing and Processing Plant Products, Trieda A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovakia, E-mail: jana.navojaska@uniag.sk

Ing. Silvia Wendelin, Lehr- und Forschungszentrum für Wein- und Obstbau, A-3400 Klosterneuburg, Wiener Strasse 74, E-mail: silvia.wendelin@weinobst.at

Dip.-Ing. Dr. Reinhard Eder, Lehr- und Forschungszentrum für Wein- und Obstbau, A-3400 Klosterneuburg, Wiener Strasse 74, E-mail: reinhard.eder@weinobst.at

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

THE VISCOSITY OF PROCESSED CHEESE SAUCES DEPENDING ON ADDITION TYPE AND CONCENTRATION OF 1-MONOGLYCERIDES

Zuzana Hanáková, František Buňka, Eva Weiserová, Rahula Janiš

ABSTRACT

The aim of this work was to study viscosity of processed cheese sauces with 1-monoglycerides (MAG) addition. Six types of 1-monoglycerides (1-monocaprin, C10:0; 1-monolaurin, C12:0; 1-monomyristin, C14:0; 1-monopalmitin, C16:0; 1-monostearin, C18:0; 1-monoolein, C18:1) in concentration of 0.25 and 0.50% w/w were used. Control samples were prepared without MAG but with lecithin. The lowest values of viscosity were found in control samples. The viscosity increased with extending of chain fatty acid in the molecule of monoglycerides. The highest viscosity was found in samples with 1-monomyristin.

Keywords: processed cheese sauce, viscosity, 1-monoglycerides

ÚVOD

Tavené sýrové omáčky patří mezi významnou skupinu výrobků používaných v provozovnách rychlého občerstvení, ale lze je využít také jako součást těstovinových či masových pokrmů (Guinee et al., 1994; Childs et al., 2009). Tyto omáčky můžeme charakterizovat jako emulze typu olej ve vodě, kde olejová fáze je stabilizována vrstvou proteinů. Právě možné rozdělení hydrofilní a lipofilní fáze je nežádoucí při výrobě a/nebo skladování sýrových omáček a může diskvalifikovat tento výrobek u spotřebitele (Mandala et al., 2004; Langton et al., 1999). Z posledně jmenované práce rovněž vyplývá, že stabilita emulze významně ovlivňuje také reologické a texturní vlastnosti, zejména viskozitu. Ta je obvykle považována za jednu z významných fyzikálních vlastností daných výrobků, mimo jiné ovlivňuje jejich senzoričnou kvalitu, a tím i požadavky spotřebitelů (Yilmaz et al., 2011). Výsledné parametry finálního produktu jsou dále ovlivněny chemickým složením, a to jak obsahem sušiny, tak i tuku v sušině, hodnotou pH, množstvím tavicích solí, ale také podmínkami zpracování, jako je tavení, teplota a rychlost chlazení utavené hmoty (Piska et al., 2004).

Monoacylglyceroly resp. jejich deriváty jsou poměrně široce využívány v potravinářském průmyslu jako emulgační činidla. Uplatňují se při výrobě směsných emulgovaných tuků, mražených krémů, pekárenských či masných výrobků. Vlastnosti monoacylglycerolů značně závisí na navázané mastné kyselině (Moonen & Bas, 2004). Monoacylglyceroly můžeme definovat jako parciální estery trojsytného alkoholu glycerolu, jenž mají ve svém řetězci vázanou mastnou kyselinou. Pokud je tato kyselina vázaná na esterovou vazbu prvního uhlíku glycerolu jedná se o 1-monoacylglyceroly (Lawson, 1995).

Cílem práce bylo sledovat změnu viskozity vzorků tavených sýrových omáček v závislosti na druhu přidaného 1-monoacylglycerolu (1-monokaprinylglycerol, C10:0; 1-monolaurylglycerol, C12:0; 1-monomyristylglycerol, C14:0; 1-monopalmitylglycerol, C16:0; 1-monostearylglycerol, C18:0; 1-monooleoylglycerol, C18:1) a jeho koncentraci (0,25 a 0,50 % w/w).

MATERIAL A METODY

Tavené sýrové omáčky byly vyráběny v laboratorních podmínkách a jejich obsah sušiny byl 24 % w/w a obsah tuku v sušině 40 % w/w. Všechny modelové vzorky byly vyráběny pomocí tavicího zařízení Vorwerk Thermomix TM31. Hlavní surovinou byl kaseinát sodný (Natura a.s., Havlíčkův Brod, Česká republika), pitná voda, směsný rostlinný polotuhý olej (Hobum, Oele und fette, Hamburg, Germany) s profilem mastných kyselin v poměru nasycené:mononenasycené:polynenasycené 21:25:54, nativní bramborový škrob 2 % w/w (Natura a.s., Havlíčkův Brod, Česká republika), chlorid sodný 0,50 % w/w, tavicí soli 2,5 % w/w (Fosfa a.s., Břeclav, Česká republika) a 1-monoacylglyceroly. Pro výrobu byla použita ucelená řada 1-monoacylglycerolů, a to 1-monokaprinylglycerol, C10:0; 1-monolaurylglycerol, C12:0; 1-monomyristylglycerol, C14:0; 1-monopalmitylglycerol, C16:0; 1-monostearylglycerol, C18:0; 1-monooleoylglycerol, C18:1; o přidávané koncentraci 0,25 a 0,50 % w/w. Tyto 1-monoacylglyceroly byly vyrobeny dle metodiky Janiš et al. (2000). V případě kontrolního vzorku byl namísto 1-monoacylglycerolů aplikován lecitin (K; Alchimica, Praha, Česká republika), taktéž v koncentraci 0,25 a 0,50 % w/w. Kaseinát sodný byl nejprve smíchán s polovičním množstvím pitné vody a hydratován po dobu 2 minut při teplotě 40 °C. Následně byl přidán škrob, chlorid sodný, lecitin nebo 1-monoacylglyceroly, tavicí soli a nakonec byl přidán

zbytek pitné vody. Poté byla směs zahřívána až na tavicí teplotu 90 °C, která byla udržována po dobu 1 minuty. Tavenina byla za horka plněna do válcových polypropylenových obalů (výška 50 mm, průměr 52 mm) a uzavřena přivařitelných hliníkovým víčkem. Ochlazený produkt byl dále skladován při 6 ± 1 °C do doby analýzy. Každý vzorek byl vyroben dvakrát.

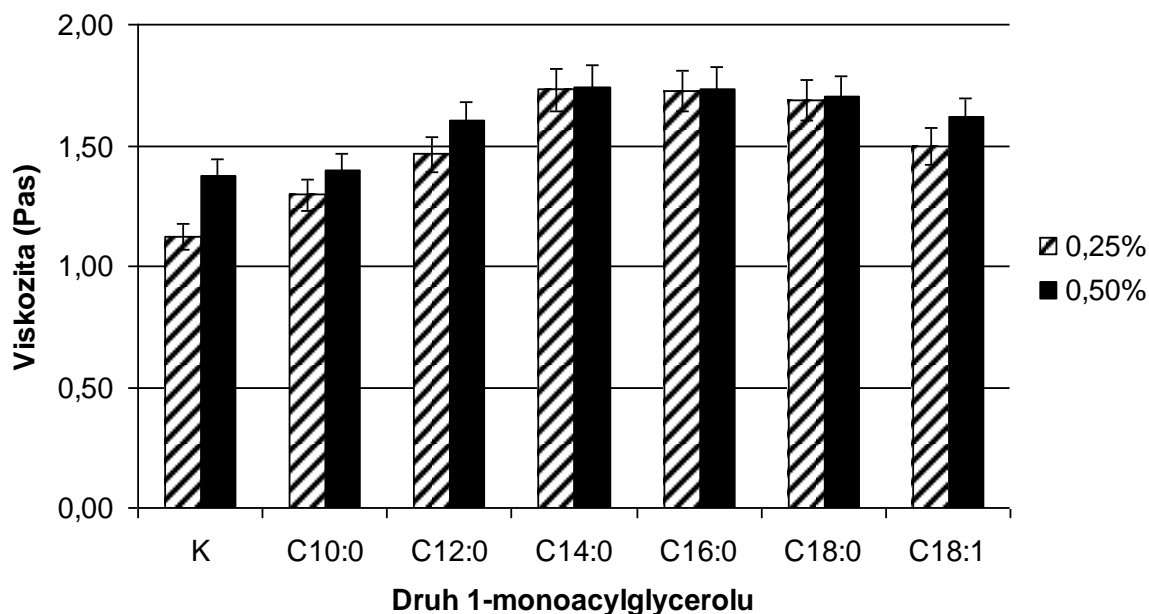
K měření viskozity byl použit rotační viskozimetr Brookfield DV-III Ultra se softwarem Rheocalc (Brookfield Engineering, MA, USA). Vzorky byly před měřením temperovány 1 hod při teplotě 40 ± 1 °C, následně ručně promíchány s použitím lžičky rychlostí přibližně 160 – 200 otáček za 1 minutu (po dobu 1 minuty) a poté nality do vytemperované geometrie (typ válec – válec). Měření probíhalo rovněž při teplotě 40 ± 1 °C. Rychlost otáčejícího se vřetena byla $5 \cdot 10^{-2}$ rad·s⁻¹. Dále bylo provedeno stanovení obsahu sušiny gravimetricky dle ČSN EN ISO 5534. Hodnota pH byla zjištěna pomocí vpichového pH-metru (pH Spear, Eutech Instruments, Oakton, Malajsie).

VÝSLEDKY A DISKUZE

Stanovení obsahu sušiny potvrdilo, že u modelových vzorků bylo dosaženo požadované sušiny. Hodnoty obsahu sušiny se u vzorků pohybovaly v rozmezí 23,95-24,24 % (w/w). Dosažený obsah sušiny je typický pro tavené sýrové omáčky **Guinee et al. (1994)**. Zabezpečení obdobných hodnot modelových vzorků je nezbytné pro zajištění srovnatelnosti vzorků, jelikož by tento parametr mohl viskozitu vzorků podstatně ovlivnit **Lee et al. (2004)** a **Guinee et al. (2004)**. Pomocí vpichového pH-metru byly zjištěny hodnoty pH, které se pohybovaly v rozmezí 7,01-7,06. Obdobné hodnoty pro tyto výrobky ve své práci uvádí také **Guinee et al. (1994)**.

Z výsledků uvedených v obrázku 1 lze pozorovat závislost viskozity na druhu přidávaného 1-monoacylglycerolu a jeho koncentraci. Nejnížší hodnoty viskozity (při stejné koncentraci) byly zjištěny v kontrolních vzorcích, tedy s obsahem lecitinu. Na této skutečnosti se může promítnout vyšší hodnota HLB (*ang. hydrophile-lipophile balance*, hydrofilně-lipofilní rovnováha) lecitinu (8) oproti monoacylglycerolům, která je přibližně 2-5 (**McClements, 2005**). Stejný autor uvádí, že právě vyšší hodnota HLB lecitinu nemusí zajistit požadovnou stabilizaci emulzí, a proto je vhodné jej kombinovat s jinými emulgátory.

Všechny použité 1-monoacylglyceroly měly za následek zvýšení viskozity daných vzorků. Navíc s prodlužujícím se řetězcem mastné kyseliny v molekule 1-monoacylglycerolu se hodnota viskozity zvyšovala a svého maxima dosáhla u vzorku s obsahem 1-monomyristylglycerol. Lze předpokládat, že zvýšení viskozity bylo zapříčiněno změnou vlastností gelu, jelikož se zvyšujícím se stupněm emulgace roste také tuhost (viskozita) vzorků. To potvrzuje také studie autorů **Buňka et al. (2007)**, kteří se zabývali přidávkem 1-monoacylglycerolů do tavených sýrů s různým obsahem sušiny. Viskozita tavených sýrových omáček po dosažení její maximální hodnoty začala s dalším přidávkem 1-monoacylglycerolů postupně snižovat. Velmi obdobný trend vykazovaly také vzorky po aplikaci dvojnásobné koncentrace MAG. Nižší hodnoty viskozity u vzorků s obsahem 1-monoacylglycerolu se zbytkem kyseliny olejové ve své molekule je možné zdůvodnit přítomností nenasyčené vazby v molekule kyseliny. Tato nenasyčená vazba může zapříčinit otáčivost celé molekuly mastné kyseliny a tím snížit tvorbu vodných vrstev mezi jednotlivými molekulami 1-monoacylglycerolů. Právě tyto vodné vrstvy do jisté míry mohou viskozitu snižovat či zvyšovat (**McClements, 2005**).



Obr. 1 Přehled viskozity (Pas) tavených sýrových omáček po aplikaci 1-monoacylglycerolů o celkové koncentraci 0,25 a 0,50 % (w/w)

Označení: K – kontrolní vzorek bez aplikace MAG, pouze s lecitinem; C10:0 – 1-monokaprinylglycerol; C12:0 – 1-monolaurinylglycerol; C14:0 – 1-monomyristylglycerol; C16:0 – 1-monopalmitylglycerol; C18:0 – 1-monostearylglycerol; C18:1 – 1-monooleoylglycerol

Podle Moonen & Bas (2004) se emulgační schopnosti monoacylglycerolů zvyšují s rostoucí délkou uhlíkového řetězce mastné kyseliny esterově vázané na glycerol. Z toho tedy vyplývá, že pro zvýšení emulgační kapacity systému je třeba využívat monoacylglyceroly s delšími mastnými kyselinami. Lze také předpokládat, že při jejich použití bude zajištěna také mikroskopická homogenita vzorků. Tu však bude nutné do budoucna ověřit za pomoci mikroskopické obrazové analýzy.

ZÁVĚR

Cílem práce bylo studovat viskozitu tavených sýrových omáček v závislosti na druhu přidávaných 1-monoacylglycerolů. Celkem bylo použito 6 druhů 1-monoacylglycerolů, a to 1-monokaprinylglycerol, 1-monolaurylglycerol, 1-monomyristylglycerol, 1-monopalmitylglycerol, 1-monostearyl-glycerol a 1-monooleoyl-glycerol. Přídavek všech 1-monoacylglycerolů bez ohledu na použitou koncentraci měl za následek zvýšení viskozity výrobků. Nejvyšší viskozita byla zjištěna u vzorků s přídavkem 1-monoacylmristylglycerolu. Nejnižší hodnoty viskozity byly naměřeny u kontrolního vzorku s lecitinem.

LITERATURA

- BUŇKA, F., PAVLÍNEK, V., HRABĚ, J., ROP, O., JANIŠ, R., KREJČÍ, J. 2007. Effect of 1-monoglycerides on viscoelastic properties of processed cheese. In *Int. J. Food Prop.*, vol. 10, 2007, p. 819-828.
- CHILDS, J. L., YATES, M. D., DRAKE, M. 2009. Sensory properties and consumer perception of wet and dry cheese sauces. In *J. Food Sci.*, vol. 74, 2009, p. 205-218.
- GUINEE, T. P., O'BRIEN, N. B., RAWLE, D. F. 1994. The viscosity of cheese sauce with different starch systems and cheese powders. In *J. Soc. Dairy Technol.* vol. 47, 1994, p. 132-138.
- JANIŠ, R., KREJČÍ, J., KLÁSEK, A. 2000. Preparation of 1-monoacylglycerols from glycidol and fatty acids catalyzed by the chromium(III)-fatty acid system. In *Eur. J. Lipid Sci. Tech.*, vol. 102, 2000, p. 351-354.
- LANGTON, M., JORDANSSON, E., ALTSKÄR, A., SØRENSEN, C., HERMANSSON, A. 1999. Microstructure and image analysis of mayonnaises. In *Food Hydrocolloids*, vol. 13, 1999, p. 113-125.
- LAWSON, H. 1995. *Food oils and fats: technology, utilization, and nutrition*. A division of International Thomson Publishing Inc.,

LI, L., SINGH, R. K., LEE, J., H. 2004. Process conditions influence on characteristics of holding tube fouling due to cheese sauce. In *LWT-Food Sci. Technol.*, vol. 37, 2004, p. 565-572.

MANDALA, I. G., SAVVAS, T. P., KOSTAROPOULOS, A. E. 2004. Xanthan and locust bean gum influence on the rheology and structure of a white model-sauce. In *J. Food Eng.*, vol. 64, 2004, p. 335-342.

MCCLEMENTS, D. J. 2005. *Food emulsion : Principles, Practices, and Techniques*. (2nd ed.). CRC Press.

MOONEN, H., BAS, H. 2004. Mono- and diglycerids. In Whitehurst, R.J. (ed.) *Emulsifiers in Food Technology*, Blackwell Publishing, p. 40-57.

PISKA, I., ŠTĚTINA, J. 2004. Influence of cheese ripening and rate of cooling of the processed cheese mixture on rheological properties of processed cheese. In *J. Food Eng.*, vol. 61, 2004, p. 551-555.

YILMAZ, M. T., KARAMAN, S., CANKURT, H., KAYACIER, A., SAGDIC, O. 2011. Steady and dynamic oscillatory shear rheological properties of ketchup-processed cheese mixtures: Effect of temperature and concentration. In *J. Food Eng.*, vol. 103, 2011, p. 197-210.

Acknowledgments:

This work was supported by grant UTB Zlín no. IGA/18/FT/11/D.

Contact address:

Zuzana Hanáková, Thomas Bata University in Zlín, Faculty of Technology, Department of Fat, Surfactant and Cosmetic Technology, Nám. TGM 5555, 760 01, Zlín, Czech republic, E-mail: zuzanahanakova@email.cz.

František Buňka, Thomas Bata University in Zlín, Faculty of Technology, Department of Food Technology and Microbiology, Nám. TGM 5555, 760 01, Zlín, Czech republic, E-mail: bunka@ft.utb.cz.

Eva Weiserová, Thomas Bata University in Zlín, Faculty of Technology, Department of Fat, Surfactant and Cosmetic Technology, Nám. TGM 5555, 760 01, Zlín, Czech republic, E-mail: weiserova@ft.utb.cz.

Rahula Janiš, Thomas Bata University in Zlín, Faculty of Technology, Department of Fat, Surfactant and Cosmetic Technology, Nám. TGM 5555, 760 01, Zlín, Czech republic, E-mail: janis@ft.utb.cz.

CHEMICAL COMPOSITION OF MUSCLE AFTER POLLEN APPLICATION IN NUTRITION OF BROILER CHICKENS

Peter Haščik, Ibrahim Omer Elamin Elimam, Jozef Garlík, Miroslava Kačániová, Marek Bobko, Vladimíra Kňazovická, Klára Vavrišinová, Henrieta Arpášová, Ondřej Bučko

ABSTRACT

Principle purpose of this study was to monitor the chemical composition of breast and thigh muscular part of chickens of hybrid combination Ross 308 and to verify the differences due to use of pollen extract in feed mixture at a dose of 400 and 800 mg.kg⁻¹ during the feeding of 42 days. We did not find significant differences ($P \geq 0.05$) in followed chemical compounds of thigh muscle with the skin and subcutaneous fat between the groups with and without application of pollen extract: in contents of water (68.49-70.12 g.100g⁻¹), protein (18.82-18.98 g.100g⁻¹), fat (9.96-11.53 g.100g⁻¹) and in energy value (692.20-752.36 kJ.100g⁻¹). Significant differences ($P \leq 0.05$) were found only in protein content of breast muscle between the control group (23.96 g.100g⁻¹) and experimental group I (23.28 g.100g⁻¹). Values of water content (73.97-74.32 g.100g⁻¹), fat content (1.07-1.40 g.100g⁻¹) and energy (441.65-446.64 kJ.100g⁻¹) in breast muscle between the evaluated groups were balanced ($P \geq 0.05$). The results show that pollen extract at the concentration used in feed mixture did not effect basic chemical composition of the most valuable parts of the chicken Ross 308 carcass and we can apply it in their nutrition. Application at a dose of 800 mg.kg⁻¹ seems to be more positive.

Keywords: chickens, pollen extract, chemical composition, muscle

ÚVOD

Produkcia hydínového mäsa predstavuje dôležitú dodávku kvalitných proteínov pre rýchlo rastúcu ľudskú populáciu a je taktiež aj zaujímavým zdrojom finančných prostriedkov pre malých poľnohospodárov v rozvojových krajinách (Guéye, 2009). Tvorbu vysoko kvalitných univerzálnych potravín podmieňuje vznik komodít, ktoré sú zdrojom bielkovín, zvyšujú úroveň príjmov a životnej úrovne obyvateľstva, na čo nadväzuje aj zvýšený dopyt po hydínovom mäse a po hydínových výrobkoch (FAO, 2002).

Chov hydiny zohráva významnú úlohu v rozvojových krajinách pri tzv. proteínovej priepasti, čiže v krajinách, kde je priemerná spotreba bielkovín hlboko pod odporúčaným štandardom (Onyimanyi *et al.*, 2009). V rozvinutých krajinách predstavujú kurčatá jeden z najvyužívanejších živočíšnych druhov v chovoch, avšak to isté neplatí v rozvojových krajinách, kde je tento druh najmä pre pomerne vysoké náklady na krmivá chovaný len v malom počte. Náklady na krmne zmesi tvoria až 80 % z celkových nákladov a preto nie je vždy možné v týchto krajinách dochovať kurčatá na základe požiadaviek jednotlivých hybridných kombinácií (Olugbemi *et al.*, 2010). Zvýšená intenzita chovu brojlerových kurčiat v ostatných desaťročiach bola podmienená hlavne vďaka tvorbe genotypov a taktiež výberu aktivít, ktoré umožnili rýchle tempo rastu kurčiat za kratšie časové obdobie. Aplikovaním tejto stratégie sa dosiahol určitý stupeň úspešnosti, avšak z iného pohľadu sa zvýšilo ukladanie

tuku, problémy s abnormalitou a v neposlednom rade aj metabolické ochorenia, ako je syndróm náhleho úmrtia (Rahimi *et al.*, 2005). Say (1987) konštatuje, že hydínové mäso v porovnaní s ostatnými živočíšnymi druhmi má svoje výhody z hľadiska rýchlej návratnosti investícií a relatívne jednoduchými postupmi riadenia s početnými odbytiskami pre výrobky a je mu pripisovaná vysoká diätetika. Zároveň hydínové výrobky sú predovšetkým dostupné pre ľudí s nižším príjmom. Za účelom zvýšenia rastovej schopnosti bola vyvinutá ako primárna metóda pre zvýšenie úžitkovosti brojlerových kurčiat genetická selekcia hydiny. Avšak mnoho štúdií ukázalo, že táto voľba môže byť zhodou okolností aj faktorom pre zníženie odolnosti voči chorobám a tiež pre zmeny v imunitnej odpovedi zvierat (Li *et al.*, 2001; Fathi *et al.*, 2003; Huff *et al.*, 2005).

Na samotnú produkciu hydiny vplyva celý rad faktorov a jedným z nich je aj nízka jednotnosť v krdli (Deceuyperre *et al.*, 2001; Meijerhof, 2006), genetická variabilita v materskej skladbe (Bruggman *et al.*, 2005), hustota osadenia (Anonymous, 2008), ale závažnú úlohu má vplyv aj kvalita krmív, resp. doplnkov (Koelkebeck *et al.*, 1993; Haščik *et al.*, 2011), výskyt chorôb a parazitov (Matthijs *et al.*, 2003) a environmentálne faktory, akými sú teplota, technológia chovu, vetranie a klimatické podmienky. Ako alternatívne náhrady sa využívajú vo výžive hydiny aj včelie produkty (peľ, propolis, resp. ich extrakty), ktoré v konečnom dôsledku môžu mať tiež pozitívny vplyv na zdravotný stav, hospodárske využitie

krmiva, nutričnú a senzorickú kvalitu produktu, ako aj ekonomiku výroby hydinarskeho priemyslu (Kimoto *et al.*, 1999; Prytyk *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2004; Shalmany a Shivazad, 2006; Seven *et al.*, 2008; Haščík *et al.*, 2011; a i.). Včelí alebo obnôžkový peľ predstavuje základné krmivo pre včelstvá, je pre ne zdrojom bielkovín (Tüylü a Sorkun, 2004) a kvôli bohatému nutričnému zloženiu a antioxidantným vlastnostiam sa v súčasnosti začal v širokej miere využívať ako potravinový doplnok (Schmidt, 1997; Orzaez Villanueva *et al.*, 2002; Bastos *et al.*, 2004; Silva *et al.*, 2006; Märghitas *et al.*, 2009), pričom jeho kvalita vo veľkej miere závisí od druhového zloženia peľových zrn (Carrión *et al.*, 2003, 2004; Barth *et al.*, 2009; De Novais *et al.*, 2009; Modro *et al.*, 2009).

Na základe vyššie uvedených skutočností bolo cieľom experimentu sledovať a matematicko-štatisticky vyhodnotiť vplyv rôzneho množstva peľového extraktu aplikovaného do bežne vyrábaných komerčných krmných zmesí na chemické zloženie svaloviny jatočne opracovaného tela kurčiat Ross 308.

MATERIÁL A METÓDY

Experiment bol realizovaný v testovacej stanici hydiny SPU v Nitre na brojlerových kurčatách hybridnej

jednodňových kurčiat a následne boli vytvorené 3 skupiny zvierat: kontrolná (C) a dve pokusné (I, II) po 90 ks kurčiat. Vlastný výkrm trval 42 dní. Kurčatá boli v experimente kŕmené systémom *ad libitum* rovnakou štartérovou kŕmnom zmesou (HYD-01 - sypká štruktúra) do 21. dňa veku a od 22. dňa do 42. dňa rastovou kŕmnom zmesou (HYD-02 -sypká štruktúra). Skrmované kŕmne zmesi HYD-01 a HYD-02 boli vyrobené bez antibiotických preparátov a kokcidiostatík. Výživná hodnota podávaných kŕmnych zmesí (tabuľka 1) počas experimentu bola rovnaká v jednotlivých skupinách, ale pokusným skupinám bol navyše do kŕmnych zmesí HYD-01 a HYD-02 pridávaný extrakt obnôžkového peľu v dávke 400 mg (I) a 800 mg (II) na 1 kg.

Peľový extrakt bol pripravený z rozomletého peľu (Slovenská republika), ktorý bol následne zmiešaný s 80 %-ným etanolom (Krell, 1996). Extrakcia roztoku peľu prebiehala vo vodnom kúpeli pri 80 °C pod spätným chladičom po dobu 1 hodiny. Zmes bola po extrakcii a ochladení centrifugovaná. Získaný supernatant bol odparený na rotačnej vákuovej odparke pri teplote kúpeľa 40-50 °C a následne odvážený. Odparok v množstve 40 g a 80 g bol rozpustený v 1000 cm³ etanolu o koncentrácii 80 % a aplikovaný do 100 kg príslušnej kŕmnej zmesi.

Tabuľka 1 Zloženie skrmovaných kŕmnych zmesí počas experimentu

Komponenty (%)	Štartérová kŕmna zmes (od 1 do 21 dní veku)	Rastová kŕmna zmes (od 22 do 42 dňa veku)
Pšenica	35,00	35,00
Kukurica	35,00	40,00
Sójový extrahovaný šrot (48 % NL ¹)	21,30	18,70
Rybia múčka (71 % NL ¹)	3,80	2,00
Sušená krv	1,25	1,25
Mletý vápenec	1,00	1,05
Monokalciumpfosfát	1,00	0,70
Kŕmna soľ	0,10	0,15
Hydrogénuhličitan sodný	0,15	0,20
Lyzín	0,05	0,07
Metionín	0,15	0,22
Palmojadrový tuk Bergafat	0,70	0,16
Premix Euromix BR 0,5 % ²	0,50	0,50
Analýza zloženia kŕmnej zmesi (g.kg ⁻¹)		
Dusíkaté látky	210,76	190,42
Vláknina	30,19	29,93
Popol	24,24	19,94
Ca	8,16	7,28
P	6,76	5,71
Mg	1,41	1,36
Kyselina linolová	13,51	14,19
ME _N (MJ.kg ⁻¹)	12,02	12,03
kalkulovaná hodnota		

¹ NL – dusíkaté látky; ² obsah účinných látok v 1 kg premixu: vitamín A 2 500 000 m.j.; vitamín E 50 000 mg; vitamín D3 800 000 m.j.; kyselina nikotínová 12 000 mg; pantoténan vápenatý 3 000 mg; vitamín B₂ 1 800 mg; vitamín B₆ 1 200 mg; vitamín B₁ 600 mg; vitamín K₃ 800 mg; vitamín C 50 000 mg; kyselina listová 400 mg; biotín 40 mg; vitamín B₁₂ 10,0 mg; cholín 100 000 mg; betaín 50 000 mg; Mn 20 000 mg; Zn 16 000 mg; Fe 14 000 mg; Cu 2 400 mg; Co 80 mg; I 200 mg; Se 50 mg

kombinácie Ross 308. Do pokusu bolo zaradených 270 ks

Na konci výkrmu (42. deň) bolo z každej skupiny experimentu vybratých po 60 ks kurčiat na jatočný rozbor (30 ks ♀ a 30 ks ♂). Na vyhodnotenie chemického zloženia sme odobrali prsnú svalovinu (*musculus pectoralis major*) bez kože a stehennú svalovinu (*musculus biceps femoris*) s kožou a podkožným tukom z každej skupiny experimentu. Chemické zloženie mäsa bolo hodnotené prístrojom INFRATEC 1265 (NSR), kde sme sledovali obsah vody, tuku a bielkovín v g.100 g⁻¹. Energetickú hodnotu v kJ.100 g⁻¹ sme zisťovali výpočtom cez prepočítavacie koeficienty na obsah tuku a bielkovín (Strmiska et al., 1988).

Zo získaných údajov sme štatistickým programom Statgraphics Plus version 5.1 (AV Trading, Umex, Dresden, Germany) vypočítali základné variačno-štatistické hodnoty (aritmetický priemer, smerodajná odchýlka) a na určenie preukaznosti rozdielov medzi skupinami sme použili analýzu variancií s následným Scheffého testom.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Hodnoty chemického zloženia prsnej svaloviny bez kože a stehennej svaloviny s kožou a podkožným tukom u hybridnej kombinácie Ross 308 bez (kontrolná skupina) a po aplikácii peľového extraktu (pokusné skupiny I, II)

v krmnej zmesi HYD-01 a HYD-02 je zobrazené v tabuľke 2.

Z výsledkov experimentu vyplýva, že obsah sušiny bol v prsnej svalovine 26,03 g.100 g⁻¹ (kontrolná skupina), 25,68 g.100 g⁻¹ (pokusná skupina I) a 25,99 g.100 g⁻¹ (pokusná skupina II) s rozdielom štatisticky nepreukazným medzi skupinami (P≥0,05). Výsledky obsahu sušiny prsnej svaloviny kurčiat Ross 308 sú porovnateľné s výsledkami Simeonovová (1999), Suchý et al. (2002), Haščík et al. (2011), ktorí zistili obsah sušiny v prsnej svalovine kurčiat rôznych hybridných kombinácii na úrovni 25,36 až 26,19 g.100 g⁻¹. Nižší obsah sušiny zistili v prsnej svalovine Wattanachant et al. (2004), Ševčíková et al. (2008), resp. Skřivan et al. (2010) a naopak vyšší zistili Haščík et al. (2005a), ktorých hodnoty boli od 24,35 do 24,64 g.100 g⁻¹. V stehennej svalovine s kožou a podkožným tukom bola sušina 31,51 g.100 g⁻¹ (kontrolná skupina), 30,21 g.100 g⁻¹ (pokusná skupina I) a 29,88 g.100 g⁻¹ (pokusná skupina II), taktiež bez významných rozdielov medzi skupinami (P≥0,05). Zvýšený obsah sušiny, resp. znížený obsah vody v stehennej svalovine oproti prsnej potvrdzujú aj závery Xiong et al. (1993), Al Sultan (2003), Latschaw a Moritz (2009), resp. Haščík et al. (2009a,b, 2011). Naopak zvýšený obsah vody oproti stehennej svalovine deklarujú

Tabuľka 2 Chemické zloženie prsnej svaloviny a stehennej časti kurčiat Ross 308

Ukazovateľ		P ¹		S ²	
		\bar{x} ⁶	s ⁷	\bar{x} ⁶	s ⁷
Obsah vody (g.100 g ⁻¹)	K ³	73,97	0,579	68,49	2,532
	I ⁴	74,32	0,382	69,79	1,320
	II ⁵	74,01	0,468	70,12	1,783
Obsah bielkovín (g.100 g ⁻¹)	K ³	23,96a	0,604	18,98	0,713
	I ⁴	23,28b	0,492	18,82	0,278
	II ⁵	23,65ab	0,562	18,92	0,339
Obsah tuku (g.100 g ⁻¹)	K ³	1,07	0,437	11,53	3,090
	I ⁴	1,40	0,271	10,39	1,383
	II ⁵	1,34	0,195	9,96	1,944
Energetická hodnota (kJ.100 g ⁻¹)	K ³	441,65	15,323	752,36	106,750
	I ⁴	442,70	8,078	717,60	56,742
	II ⁵	446,64	7,586	692,20	70,354

Pozn.: Priemerné hodnoty v tom istom stĺpci a ukazovateli, pri ktorých nasledujú rôzne písmená sú preukazné pri P≤0,05; ¹P – prsná svalovina; ²S – stehenná svalovina s kožou a podkožným tukom; ³K = kontrolná skupina; ⁴I = prvá experimentálna skupina; ⁵II = druhá experimentálna skupina; ⁶ \bar{x} = aritmetický priemer; ⁷s = smerodajná odchýlka;

Wattanachant *et al.* (2004) a Ševčíková *et al.* (2006), ale vyšší v stehennej časti ako v preverovanom experimente zistili Suchý *et al.* (2002), Kim *et al.* (2009) a Haščík *et al.* (2009b).

Významný rozdiel v obsahu bielkovín ($P \leq 0,05$) bol v prsnej svalovine zistený medzi kontrolnou a I. pokusnou skupinou. Obsah bielkovín bol $23,96 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ (kontrolná skupina), $23,28 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ (pokusná skupina I) a $23,65 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ (pokusná skupina II), čo je v súlade s odporúčeniami Matušovičovej (1986), ktorá požaduje ich obsah v priemere na úrovni 23 %. Obsah bielkovín v prsnej svalovine je v súlade so zisteniami Berri *et al.* (2001), Garlík *et al.* (2011) a Haščík *et al.* (2011), ktorí zistili ich obsah od 23,45 do $23,93 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$, nižší v porovnaní s Baeza *et al.* (2000), Ivanko *et al.* (2011), resp. vyšší ako deklarujú Al Sultan (2003) a Kim *et al.* (2009).

V stehennej časti sa potvrdil znížený obsah bielkovín oproti prsnej svalovine, ale bez významných rozdielov ($P \geq 0,05$) medzi skupinami experimentu. Obsah bielkovín v stehennej časti bol $18,98 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ (kontrolná skupina), $18,82 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ (pokusná skupina I) a $18,92 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ (pokusná skupina II), čo je v súlade so zisteniami Simeonovová (1999), resp. Haščík *et al.* (2005, 2011), ale mierne nižšie v porovnaní s hodnotami Wattanachant *et al.* (2004), Kim *et al.* (2009), resp. Garlík *et al.* (2011).

Množstvo tuku v mäse hydiny je ovplyvňované genetickou determináciou, ale hlavne výživou z hľadiska príjmu metabolizovateľnej energie (Hood, 1984; Fisher *et al.*, 1990; Králik *et al.*, 1999), čo v konečnom dôsledku môže rozhodovať aj o senzorickej, resp. dietetickej kvalite mäsa (Ochrimenko *et al.*, 1997; Suchý *et al.*, 2002; Haščík *et al.*, 2005). Obsah tuku bol v prsnej svalovine $1,07 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ (kontrolná skupina), mierne vyšší ($P \geq 0,05$) v pokusnej skupine II ($1,34 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$) a najvyšší ($P \geq 0,05$) v pokusnej skupine I ($1,40 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$), čo sú hodnoty porovnateľné s výsledkami Ševčíková (2006), Garlík *et al.* (2011), Haščík *et al.* (2011), ktorí zistili jeho obsah na úrovni 1,12 až $1,50 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$, resp. nižšie ako konštatujú Suchý *et al.* (2002), Haščík *et al.* (2009b), ktorých hodnoty boli od 1,69 až $2,73 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ a vyššie v porovnaní s Ivanko *et al.* (2011) s obsahom tuku od 0,40 do $0,59 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$.

V stehennej časti bol obsahu tuku na úrovni $11,53 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ (kontrolná skupina), $10,39 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ (pokusná skupina I) a $9,96 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ (pokusná skupina II), bez významných rozdielov ($P \geq 0,05$) medzi skupinami, čo je porovnateľné s výsledkami Haščík *et al.* (2011), vyššie oproti hodnotám Garlík *et al.* (2011), Suchý *et al.* (2002) a nižšie ako zistili Haščík *et al.* (2009b) a Latshaw a Moritz (2009).

Energetická hodnota svaloviny, ktorá je v zásade ovplyvnená obsahom tuku a bielkovín (Haščík *et al.*, 2011) bola v prsnej svalovine kurčiat Ross 308 $441,65 \text{ kJ} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ (kontrolná skupina), $442,70 \text{ kJ} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ (pokusná skupina I) a $446,64 \text{ kJ} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ (pokusná skupina II), s nepreukaznými štatistickými rozdielmi ($P \geq 0,05$) medzi skupinami experimentu a je porovnateľná s hodnotami dosiahnutými Barteczko a Lasek (2008), Haščík *et al.* (2009a,b, 2011) a Garlík *et al.* (2011), nižšia ako zistili Ševčíková *et al.* (2006, 2008) a vyššia v

porovnaní s výsledkami Suchý *et al.* (2002) a Wattanachant *et al.* (2004).

Energetická hodnota v 100 g stehennej časti podobne ako v prsnej svalovine bola najvyššia v kontrolnej skupine ($752,36 \text{ kJ} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$), mierne nižšia ($P \geq 0,05$) v pokusnej skupine I ($717,60 \text{ kJ} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$) a najnižšia ($P \geq 0,05$) v pokusnej skupine II ($692,20 \text{ kJ} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$). Dosiahnuté výsledky sú porovnateľné s hodnotami, ktoré zistili Haščík *et al.* (2011), ale vyššie ako deklarujú vo svojich experimentoch Xiong *et al.* (1993), Suchý *et al.* (2002), Ševčíková *et al.* (2006), Garlík *et al.* (2011) a Ivanko *et al.* (2011).

ZÁVER

V experimente sme sledovali a štatisticky vyhodnotili vplyv extraktu obnôžkového peľu aplikovaného v kŕmnych zmesiach kurčiat Ross 308 v dávke 400 a $800 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ na chemické zloženie prsnej svaloviny a stehennej svaloviny s kožou a podkožným tukom. Na základe výsledkov experimentu sme nezistili štatisticky preukazné rozdiely ($P \geq 0,05$) v chemickom zložení prsnej svaloviny a stehennej časti bez a po aplikácii peľového extraktu vo výžive kurčiat. Významný rozdiel ($P \leq 0,05$) sme zistili v prsnej svalovine v obsahu bielkovín medzi kontrolnou a pokusnou skupinou I, ale dosiahnutá hodnota $23,28 \text{ g}$ bielkovín v skupine s prídavkom peľového extraktu v množstve $400 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ kŕmnej zmesi je v súlade s požiadavkou pre túto hybridnú kombináciu kurčiat, kde sa vo všeobecnosti požaduje obsah bielkovín v prsnej svalovine na úrovni 23 %. Výsledky ako aj literárne zdroje potvrdzujú, že peľový extrakt vo výžive hydiny má svoje opodstatnenie za účelom možného zvýšenia jej úžitkovosti ale len ako prídavok v preverovanom množstve a v zásade neovplyvňuje základné chemické zloženie najcennejších častí jatočného tela kurčiat Ross 308, pričom ako pozitívnejšia sa javí jeho aplikácia v množstve $800 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ kŕmnej zmesi.

LITERATÚRA

- AL-SULTAN, I. S. 2003. The Effect of *Curcuma longa* (Turmeric) on Overall Performance of Broiler Chickens. In *International Journal of Poultry Science*, vol. 2, 2003, p. 351-353.
- ANONYMOUS, 2008. Cobb Breeder Management Guide. In http://www.cobb-vantress.com/contactus/brochures/Breeder_guide_2008.pdf.
- BAEZA, E., SALICHON, M. R., MARCHE, G., WACRENIER, N., DOMINGUEZ, B., CULIOLI, J. 2000. Effects of age and sex on the structural, chemical and technological characteristics of mule duck meat. In *British Poultry Science*, vol. 41, 2000, p. 300-307.
- BARTECZKO, J., LASEK, O. 2008. Effect of varied protein and energy contents in mixture on meat quality of broiler chicken. In *Slovak Journal of Animal Science*, vol. 41, 2008, p. 173-178.
- BARTH, O. M., MUNHOZ, M. C., LUZ, C. F. P. 2009. Botanical origin of apis pollen loads using colour, weight and pollen morphology data. In *Acta Alimentaria*, vol. 38, 2009, p. 133-139.
- BASTOS, D. H. M., BARTH, O. M., ROCHA, C. I., CUNHA, I. B. D., CARVALHO, P. D., TORRES, E. A. S., MICHELAN, M. 2004. Fatty acid composition and palynological analysis of bee (*Apis*) pollen loads in the states

- of sao paulo and Minas Gerais, Barzil. In *Journal of Apicultural Research*, vol. 43, 2004, p. 35-39.
- BERRI, C., WACRENIER, N., MILLET, N., LE BIHANDUVAL, E. 2001. Effect of Selection for Improved Body Composition on Muscle and Meat Characteristics of broilers from Experimental and Commercial Lines. In *Poultry Science*, vol. 80, 2001, p. 833-838.
- BRUGGMAN, V., ONAGBESAN, O., RAGOT, M. O. 2005. Feed allowance-genotype interaction in broiler breeder hens. In *Poultry Science*, vol. 84, 2005, p. 298-306.
- CARRIÓN, P., CERNADAS, E., GÁLVEZ, J. F., DÍAZ-LOSADA, E. 2003. Determine the composition of honeybee pollen by texture classification. In F.J. Perales et al. (eds.): *IbPRIA 2003, LNCS 2652*, 2003, p. 158-167. ISBN 978-3-540-40217-6.
- CARRIÓN, P., CERNADAS, E., GÁLVEZ, J. F., DAMIÁN, M., SÁ-OTERO, DE P. 2004. Classification of honeybee pollen using a multiscale texture filtering scheme. In *Machine Vision and Applications*, vol. 15, 2004, p. 186-193.
- DECEUYPERE, E., TONA, K., BRUGGMAN, V., BAMELIS, F. 2001. The day-old chick: A crucial hinge between breeders and broilers. In *Worlds Poultry Science Journal*, vol. 57, 2001, p. 127-138.
- DE NOVAIS, J. S., LIMA, L. C. L. E., DOS SANTOS, F. D. R. 2009. Botanical affinity of pollen harvested by *Apis mellifera L.* in semi-arid area from Bahia, Brazil. In *Grana*, vol. 48, 2009, p. 224-234.
- FAO, 2002. World agriculture towards 2015/2030, Rome, Italy, 2002.
- FATHI, M. M., ALI, R. A., QURESHI, M. A. 2003. Comparison of immune responses of Inducible Nitric Oxide Synthase (iNOS) hyper- and hypo responsive genotypes of chickens. In *International Journal of Poultry Science*, vol. 2, 2003, p. 280-286.
- FISHER, C., GOUS, R. M., EMMANS, G. C., BROADBENT, L. A. 1990. Nutritional effects on the growth and fatness of broilers. In *Poultry Science*, vol. 31, 1990, p. 495-505.
- GARLÍK, J., HAŠČÍK, P., KAČÁNIOVÁ, M., ARPÁŠOVÁ, H., ČUBOŇ, J., VAVRIŠINOVÁ, K., ELAMIN, I. O. E. 2011. Impact of propolis applications on chemical composition of chicken meat. In *Potravinárstvo*, vol. 5, 2011, mimoriadne číslo, p. 349-354.
- GUÉYE, E. F. 2009. The role of networks in information dissemination to family poultry farmers. In *Worlds Poultry Science*, vol. 65, 2009, p. 115-123.
- HAŠČÍK, P., WEIS, J., ČUBOŇ, J., KULÍŠEK, V., MAKOVICKÝ, P., KAČÁNIOVÁ, M. 2005. Vplyv probiotického preparátu v KKZ brojlerových kurčiat ROSS 308 na chemické zloženie mäsa. In *Acta fytotechnica et zootechnica*, vol. 8, 2005, p. 20-24.
- 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*, vol. 12, 2009, p. 197-205.
- HAŠČÍK, P., KAČÁNIOVÁ, M., NOVÁKOVÁ, I., FIXELOVÁ, M., KULÍŠEK, V., VAVRIŠINOVÁ, K., ARPÁŠOVÁ, H. 2009b. Effect of probiotics on protein production in fattening chicken meat. In *Slovak Journal of Animal Science*, vol. 42, 2009, p. 22-26.
- HAŠČÍK, P., KAČÁNIOVÁ, M., BOBKO, M., POCHOP, J., MIHOK, M., ARPÁŠOVÁ, H. 2011. Effect of probiotic preparation for chemical composition of meat cocks different combinations of hybrid chicks. In *Acta universitatis agriculturae et silviculturae mendelianae brunensis*, vol. LIX, 2011, p. 83-93.
- HOOD, R. L. 1984. Cellular and biochemical aspects of fat deposition in the broiler chicken. In *Poultry Sciences*, vol. 61, 1984, p. 160-169.
- HUFF, G. R., HUFF, W. E., BALOG, J. M., RATH, N. C., ANTHONY, N. B., NESTOR, K. E. 2005. Stress response differences and disease susceptibility reflected by heterophil to lymphocyte ratio in turkeys selected for increased body weight. In *Poultry Science*, vol. 84, 2005, p. 709-717.
- IVANKO, Š., MAREČEK, E., BĚLOHRADSKÁ, J., STRAKOVÁ, E., SUCHÝ, P. 2011. White lupin as perspective protein source for substitution of soya meal in broiler diets and its influence on performance, meat quality and fatty acid profile. In *Potravinárstvo*, vol. 5, 2011, p. 363-371.
- KIM, Y. J., JIN, S. K., YANG, H. S. 2009. Effect of dietary garlic bulb and husk on the physicochemical properties of chicken meat. In *Poultry Science*, vol. 88, 2009, p. 398-405.
- KIMOTO, N., HIROSE, M. H., KAWABE, M., SATOH, T., HIDEKI, M., SHIRA, T. 1999. Post-initiation effects of a super critical extract of propolis in a rat two-stage carcinogenesis model in female F344 rats. In *Cancer Lett.*, vol. 147, 1999, p. 221-227.
- KOELKEBECK, K. W., PARSONS, C. M., LEEPER, R. W. 1993. Effect of early feed withdrawal on subsequent laying hen performance. In *Poultry Science*, vol. 72, 1993, p. 2229-2235.
- KRÁLÍK, G., KUŠEČ, G., SCITOVSKI, R. 1999. Růst a kvalita jatečného trupu u brojlerů. In *Czech Journal of Animal Science*, vol. 49, 1999, p. 233-239.
- KRELL, R. 1996. Value-Added products from bee keeping. In Milan, *FAO Publications*, 1996, 395 p. ISBN 92-5-103819-8.
- LATSHAW, J. D., MORITZ, J. S. 2009. The partitioning of metabolizable energy by broiler chickens. In *Poultry Science*, vol. 88, 2009, p. 98-105.
- LI, Z., NESTOR, K. E., SAIF, Y. M., ANDERSON, J. W., PATTERSON, R. A. 2001. Effect of selection for increased body weight in Turkey on lymphoid organ weights. Phagocytosis and antibody responses to fowl cholera and Newcastle disease-localization of a protein antigen in the chicken spleen. Effect of various manipulative procedures on the orphogenesis of the germinal center. In *Immunology*, vol. 28, 2001, p. 1-21.
- MĂRGHITAS, L. A., STANCIU, O. G., DEZMIREAN, D. S., BOBIS, O., POPESCU, O., BOGDANOV, S., CAMPOS, M. G. 2009. *In vitro* antioxidant capacity of honeybee-collected pollen of selected floral origin harvested from Romania. In *Food Chemistry*, vol. 115, 2009, p. 878-883.
- MATTHIJS, M. G., VAN ECK, J. H., LANDMAN, W. J., STEGEMAN, J. A. 2003. Ability of Massachusetts-type infectious bronchitis virus to increase colibacillosis susceptibility in commercial broilers: A comparison between vaccine and virulent field virus. In *Avian Pathology*, vol. 32, 2003, p. 473-481.
- MATUŠOVIČOVÁ, E. 1986. *Technology of Poultry Production (in Slovak)*. In Bratislava: Príroda, 1986, p. 393.
- MEIJERHOF, R. 2006. Chick size matters. In *World Poultry*, vol. 22, 2006, p. 30-31.
- MODRO, A. F. H., SILVA, I. C., LUZ, C. F. P., MESSAGE, D. 2009. Analysis of pollen load based on color, physicochemical composition and botanical source. In *Anais*

- da *Academia Brasileira de Ciências*, vol. 81, 2009, p. 281-285. ISSN 0001-3765.
- OCHRIMENKO, W. I., RICHTER, G., RUDOLPH, B., BARGHOLZ, J., REICHARDT, W., LUBBE, F., LEMSER, A. 1997. Influence of linseed on fattening performance and fat quality of broilers. In *Archiv für Geflügelkunde*, vol. 61, 1997, p. 181-185.
- OLUGBEMI, T. S., MUTAYOBA, S. K., LEKULE, F. P. 2010. Effect of Moringa (*Moringa oleifera*) Inclusion in Cassava Based Diets Fed to Broiler Chickens. In *International Journal of Poultry Science*, vol. 9, 2010, p. 363-367.
- ONYIMONYI, A. E., ADEYEMI, O., OKEKE, G. C. 2009. Performance and Economic Characteristics of Broilers Fed Varying Dietary Levels of Neem Leaf Meal (*Azadirachta indica*). In *International Journal of Poultry Science*, vol. 8, 2009, p. 256-259.
- ORZAEZ VILLANUEVA, M. T., DIAZ MARGUINA, A., BRAVO SERRANO, R., BLAZQUEZ ABELLAN, G. 2002. The importance of bee-collected pollen in the diet: a study of its composition. In *International Journal of Food Science and Nutrition*, vol. 53, 2002, p. 217-224.
- PRYTZYK, E., DANTAS, A. P., SALOMAO, K., PEREIRA, A. S., BANKOVA, V. S., DE CASTRO, S. L., AQUINO NETO, F. R. 2003. Flavonoids and trypanocidal activity of bulgarian propolis. In *Journal Ethnopharmacol.*, vol. 88, 2003, p. 189-193.
- RAHIMI REZAEI, G., HAFEZIAN M, H., SAIYAHZADEH, H. 2005. The effect of intermittent lighting schedule on Broiler performance. In *International Journal of Poultry Science*, vol. 4, 2005, p. 396-398.
- SAY, R. R. 1987. Manual of Poultry Production in the tropics. Technical Centre for Agricultural and Rural Co-operation. In CTA, CAB International Wallingford, UK, 1987, p. 118.
- SEVEN, T. P., SEVEN, I., YILMAZ, M., SIMSEK, G. Ü. 2008. The effect of Turkish propolis on growth and carcass characteristics in broilers under heat stress. In *Animal Feed Science and Technology*, vol. 146, 2008, p. 137-148.
- SHALMANY, S., SHIVAZAD, M. 2006. The effect of diet propolis supplementation on Ross broiler chicks performance. In *International Journal of Poultry Science*, vol. 5, 2006, p. 84-88.
- SCHMIDT, J. O. 1997. Bee products: Chemical composition and application. In MIZRAHI, A., LENSKY, Y. 1997. In the bee products: *Properties, Applications and Apitherapy*. New York and London, Pleum Press: 1997, p. 15-26.
- SILVA, T. M. S., CAMARA, C. A., LINS, A. C. S., BARBOSA-FILHO, J. M., SILVA, E. M. S., FREITAS, B. M., SANTOS, F. DE A. R. 2006. Chemical composition and free radical scavenging activity of pollen loads from stingless bee *Melipona subnitida* Ducke. In *Journal of Food Composition and Analysis*, vol. 19, 2006, p. 507-511.
- SKŘIVAN, M., DLOUHA, G., ENGLMAIEROVA, M., ČERVINKOVA, K. 2010. Effects of different levels of dietary supplemental caprylic acid and vitamin E on performance, breast muscle vitamin E and A, and oxidative stability in broilers. In *Czech Journal of Animal Science*, vol. 55, 2010, p. 167-173.
- SIMEONOVÁ, J. 1999. Technology of Poultry, Eggs and other Minor Animal Products (in Czech). In *MZLU Brno*, 1999, p. 247. ISBN 80-7157-405-8.
- STRMISKA, F., HOLČIKOVÁ, K., SIMONOVÁ, E., MRÁZOVÁ, M., HODEKOIVÁ, J., VOJTAŠŠÁKOVÁ, A., PRISTAŠOVÁ, M., STRMISKA, J., STRMISKOVÁ, G., KRUPAŘOVÁ, M., GOLA, J., PAPAJOVÁ, H., MAREŠ, J., KOSTKANOVÁ, E., EHRENHAFT, B. 1988. *Poživatínové tabuľky pre potravinové suroviny*. Bratislava : Výskumný ústav potravinársky, 1988, p. 10-12.
- SUCHÝ, P., JELÍNEK, P., STRAKOVÁ, E., HUCL, J. 2002. Chemical composition of muscles of hybrid broiler chickens during prolonged feeding. In *Czech Journal of Animal Science*, vol. 47, 2002, p. 511-518.
- ŠEVČIKOVA, S., SKŘIVAN, M., DLOUHA, G., KOUCKÝ, M. 2006. The effect of selenium source on the performance and meat quality of broiler chickens. In *Czech Journal of Animal Science*, vol. 51, 2006, p. 449-457.
- ŠEVČIKOVÁ, S., SKŘIVAN, M., DLOUHÁ, G. 2008. The effect of lycopene supplementation on lipid profile and meat quality of broiler chickens. In *Czech Journal of Animal Science*, vol. 53, 2008, p. 431-440.
- TÜYLÜ, A. S., SORKUN, K. 2004. Organoleptic analysis of economically significant pollen samples collected in bursa region by *Apis mellifera* L. In *Mellifera*, vol. 4, 2004, p. 38-44.
- WANG, B. J., LIEN, Y. H., YU, Z. R. 2004. Supercritical fluid extractive fractionation—study of the antioxidant activities of propolis. In *Food Chemistry*, vol. 86, 2004, p. 237-243.
- WATTANACHANT, S., BENJAKUL, S., LEDWARD, D. A. 2004. Composition, Color and Texture of Thai Indigenous and Broiler chicken Muscles. In *Poultry Science*, vol. 83, 2004, p. 123-128.
- XIONG, Z. L., CANTOR, A. H., PESCATORE, A. J., BLANCHARD, S. P., STRAW, M. L. 1993. Variations in muscle chemical composition, pH and protein extractability among eight different broiler crosses. In *Poultry Science*, vol. 72, 1993, p. 583-588.

Acknowledgments:

This work was supported by grants VEGA 1/0897/11 and KEGA 053 SPU-4/2011.

Contact address:

doc. Ing. Peter Haščík, PhD., Department of Evaluation and Processing of Animal Products, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Slovak University of Agriculture in Nitra, Trieda A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovakia,

E-mail: peter.hascik@uniag.sk

MSc. Ibrahim Omer Elamin Eliman, Department of Evaluation and Processing of Animal Products, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Slovak University of Agriculture in Nitra, Trieda A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovakia, E-mail: alkrskola@yahoo.com

Ing. Jozef Garlík, Department of Evaluation and Processing of Animal Products, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Slovak University of Agriculture in Nitra,

Trieda A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovakia, E-mail: jozef.garlik@gmail.com

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

Ing. Marek Bobko, PhD., Department of Evaluation and Processing of Animal Products, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Slovak University of Agriculture

in Nitra, Trieda A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovakia,
E-mail: marek.bobko@uniag.sk

Ing. Vladimíra Kňazovická, PhD., Department of
Evaluation and Processing of Animal Products, Faculty of
Biotechnology and Food Sciences, Slovak University of
Agriculture in Nitra, Trieda A. Hlinku 2, 949 76 Nitra,
Slovakia, E-mail: vladimira.knazovicka@uniag.sk

doc. Ing. Klára Vavrišinová, PhD. Department of Animal
Husbandry, Faculty of Agrobiolgy and Food Resources,
Slovak University of Agriculture in Nitra,
Trieda A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovakia,
E-mail: klara.vavrisinova@uniag.sk

doc. Ing. Henrieta Arpášová, PhD., Department of
Poultry and Small Animal Husbandry, Faculty of
Agrobiolgy and Food Resources, Slovak University of
Agriculture in Nitra, Trieda A. Hlinku 2, 949 76 Nitra,
Slovakia, E-mail: henrieta.arapasova@uniag.sk

Ing. Ondřej Bučko, PhD., Department of Animal
Husbandry, Faculty of Agrobiolgy and Food Resources,
Slovak University of Agriculture in Nitra, Trieda A. Hlinku
2, 949 76 Nitra, Slovakia, E-mail: ondrej.bucko@uniag.sk

EFFECT OF CHICKPEA AND PEA FLOUR ADDITION ON THE QUALITATIVE AND SENSORY PARAMETERS OF BAKERY PRODUCTS

Michal Magala, Zlatica Kohajdová, Jolana Karovičová, Veronika Kuchtová

ABSTRACT

The purpose of this study was to determine chemical composition and functional properties of legume flours (chickpea, pea) and fine wheat flour. The effect of chickpea and pea flour incorporation at different levels (10, 20, 30 % w/w) on the qualitative parameters and sensory characteristics of bakery product was also investigated. It can be concluded, that incorporation of leguminous flours led to changes of the investigated qualitative and sensory parameters, especially in samples with higher amount of leguminous flour (20 and 30 %). Results showed, that a proper alternative to standard bakery products are products with 10 % portion of leguminous flour.

Keywords: chickpea, pea, bakery products, qualitative parameters, sensory properties

ÚVOD

Strukoviny ako hrach, cícer, fazuľa a šošovica sú dôležitými zdrojmi bielkovín v potrave najmä pri nedostatočnom príjme živočíšnych bielkovín. Strukoviny sa vyznačujú vysokým obsahom lyzínu, leucínu, arginínu, kyseliny asparágovej a kyseliny glutámovej čo v kombinácii s cereáliami, ktoré majú vysoký obsah sírnych aminokyselín a tryptofánu umožňuje vytvoriť vyvážený príjem aminokyselín (Boye et al., 2010; Christou, 1997).

Okrem obsahu rôznych výživových zložiek (bielkoviny, vitamíny, minerálne látky) vykazujú strukoviny aj dobré funkčné vlastnosti. K najvýznamnejším funkčným vlastnostiam strukovín patrí: schopnosť viazať a zadržiavať vodu, schopnosť viazať a zadržiavať tuk, emulgačné vlastnosti, zahusťovanie a penotvorná schopnosť (Boye et al., 2010).

V súčasnosti sa mnohé výskumy zaoberajú možnosťami náhrady časti pšeničnej múky cicerovou alebo hrachovou múkou v receptúrach rôznych cereálnych výrobkov (Tiwari et al., 2011; Zucco et al., 2011; Hatzikamari et al., 2007; Coda et al., 2010; Marco a Rosell, 2008; Mariotti et al., 2009; Han et al., 2010). Cieľom práce bolo stanoviť chemické zloženie a funkčné vlastnosti pšeničnej, cicerovej a hrachovej múky. Následne bolo pripravené pečivo nahradením časti pšeničnej múky cicerovou resp. hrachovou múkou s koncentráciou 10, 20 a 30 hmot. %. Následne bol zhodnotený vplyv inkorporácie strukovinových múk z hľadiska zmien kvalitatívnych a senzoričných parametrov finálnych produktov.

MATERIÁL A METÓDY

Na výrobu pšenično-cicerového a pšenično-hrachového pečiva boli použité nasledovné suroviny: pšeničná múka hladká špeciál 00 extra (Penam, Nitra), celozrnná hrachová múka (Kroner Bratislava), instantná cicerová múka (Natu-

ral, Jihlava na Doleh), kuchynská soľ (Solné mlýny a.s., Olomouc), slnečnicový olej (Clever, Bratislava), kryštálový cukor (Považský cukor, Trenčianska Teplá), pekárske drożdžie (Lesaffre a.s, Trnava).

V použitých múkach bol stanovený obsah vlhkosti, škrobu (Simsek et al., 2009), bielkovín podľa Kjeldala prepočtom z obsahu celkového dusíka pomocou faktora (pšenica 5,70, strukoviny 6,25), tuky podľa Soxhleta a hodnota pH meraná prístrojom InoLab pH Level 2 (WTW Weilheim, Nemecko) (Ibanoglu et al., 1999). Z funkčných vlastností múk bola stanovená schopnosť viazať a zadržiavať vodu, napučiacia schopnosť (Raghavendra et al., 2004), schopnosť vytvoriť emulziu a penotvorná schopnosť (Siddiq et al., 2010).

Štandardné pšeničné pečivo bolo pripravené receptúrou a postupom podľa autorov Kohajdová a Karovičová (2007). Pečivo s podielom strukovinových múk bolo vyrobené nahradením časti pšeničnej múky cicerovou resp. hrachovou múkou s hmotnostnou koncentráciou 10, 20 a 30 %. Následne sme analyzovali kvalitatívne parametre (objem, merný objem, výška a šírka po pečení, klenutosť, straty pečením) a senzoričné vlastnosti pečiva (tvar výrobku, farba a hrúbka/tvrdosť, vôňa a chuť kôrky; vôňa, pružnosť, pórovitosť, farba, chuť, tvrdosť a lepivosť striedky) pomocou hedonickej stupnice v rozsahu 0 (žiaden senzoričný vnem) až 4 (veľmi intenzívny senzoričný vnem) a celkovú chuťnosť pomocou štruktúrovanej úsečky v rozsahu 0 – 100 %.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Zvýšenie výživovej hodnoty potravín je súčasťou trendu zdravého životného štýlu a narastajúcich nárokov spotrebiteľského výberu. V práci sme sa zamerali na sledovanie vplyvu prídavku cicerovej a hrachovej múky na kvalitatívne a senzoričné parametre pečiva. V tabuľke 1 je uvedené chemické zloženie použitých múk.

potravinárstvo

Tabuľka 1 Chemické zloženie múk

Vzorka	Vlhkosť [%]	Škrob [%]	Bielkoviny [%]	Tuky [%]	pH
pšeničná hladká múka	14,16±0,02	75,00±0,66	10,07±0,24	1,54±0,03	5,41±0,07
cícerová instantná múka	11,16±0,11	47,83±0,71	20,64±0,39	5,95±0,10	6,23±0,01
hrachová celozrnná múka	7,96±0,05	53,70±0,30	20,94±0,51	1,12±0,05	6,29±0,06

Tabuľka 2 Funkčné vlastnosti múk

Vzorka	SVV [g·g ⁻¹]	SZV [g·g ⁻¹]	NS [cm ³]	SVE [cm ³ /100 cm ³]	PS [cm ³ /100 cm ³]
pšeničná hladká múka	3,20±0,04	0,76±0,02	2,05±0,05	*N	10,00±0,05
cícerová instantná múka	5,00±0,12	2,37±0,09	3,30±0,23	45,00±0,26	14,00±0,18
hrachová instantná múka	3,90±0,03	1,41±0,04	3,30±0,26	12,78±0,78	20,00±0,28

SVV-schopnosť viazať vodu, SZV-schopnosť zadržiavať vodu, NS-napučiavacia schopnosť, SVE-schopnosť vytvoriť emulziu, PS-penotvorná schopnosť, *N-emulzia sa nevytvorila

Z nameraných údajov je zrejmé, že strukovinové múky obsahujú menej škrobu ako múka pšeničná. Obsah bielkovín v strukovinových múkach presiahol dvojnásobok množstva v pšeničnej múke. Analýza obsahu tuku poukázala na porovnateľné množstvá v pšeničnej a v hrachovej múke, zatiaľ čo výrazne vyšší obsah tuku bol stanovený v cícerovej múke.

V tabuľke 2 sú uvedené funkčné vlastnosti múk. Funkčné vlastnosti ovplyvňujú štruktúru potravín, organoleptické vlastnosti a sú dôležité pri výrobe mnohých potravinárskych produktoch. Schopnosť viazať vodu (SVV) možno definovať ako množstvo vody, ktoré môže absorbovať gram látky. Schopnosť zadržiavať vodu (SZV) úzko súvisí s SVV s tým rozdielom, že voda nie je látkou

viazaná akýmkoľvek druhom väzby (Boye et al., 2010). Zo získaných údajov možno konštatovať, že strukovinové múky vykazujú väčšiu schopnosť viazať a zadržiavať vodu ako múka pšeničná. Napučivacia schopnosť (NS) sa zvyšuje so znižovaním rozmerov jednotlivých častíc (Raghavendra et al., 2004). Strukoviny vykazovali vyššiu napučivaciu schopnosť ako pšeničná múka. Vzorka pšeničnej múky nemala schopnosť vytvoriť emulziu (SVE). Schopnosť tvorby emulzie cícerovej múky bola o 32,22 cm³/100 cm³ vyššia ako v prípade hrachovej múky. Penotvornú schopnosť (PS) ovplyvňuje obsah bielkovín vo vzorke (Boye et al., 2010). Všetky múky vykazovali penotvornú schopnosť, pričom najvýraznejšiu vykazovala múka hrachová (20,00 ± 0,28 cm³/100 cm³).

Tabuľka 3 Kvalitatívne parametre pečiva

Vzorka pečiva	Objem [cm ³]	Merný objem [cm ³ ·100g ⁻¹]	Výška [cm]	Šírka [cm]	Klenutosť	Straty pečením [%]
štandard	300,00±5,00	348,00±5,81	5,61±0,08	9,58±0,13	0,59±0,02	13,70±0,36
cícer 10 %	281,67±2,89	315,33±3,99	5,09±0,06	9,54±0,11	0,52±0,01	10,67±0,25
cícer 20 %	218,33±7,64	245,20±3,10	4,34±0,08	9,75±0,10	0,44±0,02	10,97±0,38
cícer 30 %	178,33±2,89	204,67±2,83	3,75±0,18	9,68±0,04	0,39±0,02	12,87±0,21
hrach 10%	255,00±5,00	292,67±6,23	4,57±0,12	9,91±0,08	0,46±0,01	12,93±0,15
hrach 20%	183,33±2,89	222,53±2,23	3,15±0,14	9,99±0,14	0,30±0,01	13,13±0,51
hrach 30%	168,33±5,77	198,10±5,72	2,98±0,08	9,68±0,04	0,27±0,01	13,64±0,47

Tabuľka 4 Senzorické hodnotenie pečiva

Senzorický parameter	Štandard	Cícer 10 %	Cícer 20 %	Cícer 30 %	Hrach 10 %	Hrach 20 %	Hrach 30 %
Tvar výrobku	4,0±0,0	3,6±0,2	3,0±0,1	1,9±0,1	3,3±0,1	2,0±0,1	0,8±0,0
Kôrka	Farba	4,0±0,1	3,4±0,1	2,0±0,0	2,0±0,1	2,8±0,0	1,5±0,1
	Hrúbka/Tvrdosť	4,0±0,0	3,7±0,2	3,6±0,2	2,0±0,1	3,3±0,1	2,2±0,0
	Vôňa	4,0±0,0	3,7±0,2	3,5±0,1	2,5±0,1	3,6±0,0	3,0±0,0
	Chuť	4,0±0,0	3,8±0,0	3,6±0,1	2,6±0,1	3,4±0,1	3,0±0,1
Striedka	Vôňa	4,0±0,0	3,7±0,2	3,4±0,0	3,0±0,0	3,6±0,0	3,2±0,3
	Pružnosť	4,0±0,0	3,8±0,3	3,0±0,1	2,6±0,1	3,6±0,1	2,3±0,1
	Pórovitosť	3,9±0,1	3,1±0,2	2,5±0,1	2,0±0,0	3,7±0,0	3,5±0,0
	Farba	4,0±0,0	3,6±0,3	3,0±0,1	2,5±0,1	3,6±0,2	2,9±0,1
	Chuť	4,0±0,0	3,7±0,2	3,5±0,3	3,0±0,0	3,6±0,1	3,1±0,2
	Tvrdosť	3,9±0,1	3,6±0,2	3,3±0,2	2,4±0,1	3,8±0,0	2,2±0,1
Lepivosť	4,0±0,1	3,5±0,1	3,5±0,1	3,3±0,2	3,8±0,0	3,2±0,2	
Celková chutnosť [%]	99,8±0,2	95,4±0,6	81,3±1,1	71,1±1,0	94,0±0,2	69,3±0,9	57,5±0,7

Analýzou kvalitatívnych znakov pripraveného pečiva (tabuľka 3) bolo zistené, že zvyšovanie podielu strukovinovej múky viedlo k poklesu objemu, výšky, šírky a klenutosti pečiva. Pozitívne výsledky sa dosiahli znížením strát pečením, pričom pečivo s podielom 10 % cicerovej múky dosiahlo až o 3 % nižšie straty v porovnaní so štandardom, čo je výhodné z hľadiska hospodárnosti procesu pečenia.

V tabuľke 4 sú uvedené výsledky senzorickej analýzy jednotlivých vzoriek pečiva. Pre všetky sledované senzorické znaky došlo so zvyšovaním podielu strukovinovej múky k zníženiu bodového hodnotenia deskriptorov, pričom najvýraznejší pokles bol zaznamenaný u vzoriek s vyšším zastúpením strukovinových múk (20 a 30 %). Preto je na základe senzorickeho hodnotenia prijateľné pečivo s podielom 10 % strukovinovej - cicerovej múky.

ZÁVER

Strukoviny majú dobré výživové a funkčné vlastnosti, preto sú vhodné k začleneniu do receptúry pečiva. Bolo zistené, že strukovinové múky obsahovali viac ako dvojnásobné množstvo bielkovín v porovnaní s pšeničnou múkou. Strukovinové múky sa okrem toho vyznačovali vyššou schopnosťou tvorby emulzie a peny. Zo senzorickeho hľadiska bolo pre konzumenta najprijateľnejšie pečivo s 10 percentným podielom cicerovej múky.

LITERATÚRA

BOYE, J., ZARE, F., PLETCH, A. 2010. Pulse proteins: Processing, characterization, functional properties and applications in food and feed. In *Food Resarch International*, vol. 43, 2010, no. 2, p. 414-431.

BOYE, J. I., AKSAY, S., ROUFIK, S., RIBÉREAU, S., MONDOR, M., FARNWORTH, E. R., RAJAMOHAMED, S. H. 2010. Comparison of the functional properties of pea, chickpea and lentil protein concentrates processed using ultrafiltration and isoelectric precipitation techniques. In *Food Research International*, vol. 43, 2010, no. 2, p. 537-546.

CHRISTOU, P. 1997. Biotechnology applied to grain legumes. In *Field Crops Research*, vol. 53, 1997, no. 1-3, p. 83-97.

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 γ -aminobutyric acid (GABA). In *International Journal of Food Microbiology*, vol. 137, 2010, no. 2-3, p. 236-245.

HAN, J. J., JANZ, J. A. M., GERLAT, M. 2010. Development of gluten free cracker snacks using pulse flours and fractions. In *Food Research International*, vol. 43, 2010, no. 2, p. 627-633.

HATZIKAMARI, M., YIANGOU, M., TZANETAKIS, N., LITOPOULOU-TZANETAKI, E. 2007. Changes in numbers and kinds of bacteria during a chickpea submerged fermentation used as leavening agent for bread production. In *International Journal of Food Microbiolgy*, vol. 116, 2007, no. 1, p. 37-43.

IBANOĞLU, Ş., IBANOĞLU, E., AINSWORTH, P. 1999. Effect of different ingredients of the fermentation activity in tarhana. In *Food chemismy*, vol. 64, 1999, no. 1, p. 103-106.

KOHAJDOVÁ, Z., KAROVIČOVÁ, J. 2007. Effect of incorporation of spelt flour on the dough properties and wheat bread quality. In *Žywność. Nauka. Technologia, Jakość*, vol. 4, 2007, no. 53, p. 36-45.

MARCO, C., ROSELL, C. M. 2008. Functional and rheological properties of protein enriched gluten free composite flours. In *Journal of Food Engineering*, vol. 88, 2008, no. 1, p. 94-103.

MARIOTTI, M., LUCISANO, M., PAGANI, M. A., NG, P. K. W. 2009. The role of corn starch, amaranth flour, pea isolate and Psyllium flour on the rheological properties and the ultrastructure of gluten-free doughs. In *Food Research International*, vol. 42, 2009, no. 8, p. 963-975.

RAGHAVENDRA, S. N., RASTOGI, N. K., RAGHAVARAO, K. S. M. S., THARANATHAN, R. N. 2004. Dietary fiber from coconut residue: effects of different treatments and particle size on the hydration properties. In *European Food Research Technology*, vol. 218, 2004, p. 563-567.

SIDDIQ, M., RAVI, R., HARTE, J. B., DOLAN, K. D. 2010. Physical and functional characteristics of selected dry bean (*Phaseolus vulgaris* L.) flours. In *LWT – Food Science and Technology*, vol. 43, 2010, no. 2, p. 232-237.

SIMSEK, S., TULBEK, M. C., YAO, Y., SCHATZ, B. 2009. Starch characteristics of dry peas (*Pisum sativum* L.) grown in the USA. In *Food Chemistry*, vol. 115, 2009, no. 3, p. 832-838.

TIWARI, B. K., BRENNAN, C. S., JAGANMOHAN, R., SURABI, A., ALAGUSUNDARAM, K. 2011. Utilisation of pigeon pea (*Cajanus cajan* L) byproducts in biscuit manufacture. In *LWT-Food Science and Technology*, vol. 44, 2011, no. 6, p. 1533-1537.

ZUCCO, F., BORSUK, Y., ARNTFIELD, S. D. 2011. Physical and nutritional evaluation of wheat cookies supplemented with pulse flours of different particle sizes. In *LWT-Food Science and Technology*, vol. 44, 2011, no. 10, p. 2070-2076.

Acknowledgments:

This work was financed by the program on support of young researchers no. 6409.

Contact address:

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

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

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

ANALYSIS OF CAROTENOIDS AND LYCOPENE IN TOMATO (*LYCOPERSICON ESCULENTUM* MILL.) AND THEIR RETENTION IN TOMATO JUICE

Andrea Mendelová, Alena Andrejiová, Miriam Líšková, Dagmar Kozelová, Ján Mareček

ABSTRACT

In this work we investigated the effect of variety and processing on the content of carotenoids and lycopene in fruits and Tomato juice from the fruit after heat treatment. The experiment included four varieties of edible tomato for industrial processing (Báb, Žiara PK, Šampion and Roti PK). The concentration of total carotenoids and lycopene were determined spectrophotometrically on UV-VIS spectrophotometer Jenway at a wavelength of 445 and 472 nm. The highest average content of carotenoids in fruits were recorded at a variety Roti PK ($7.0 \text{ mg}/100 \text{ g}^{-1}$) and lowest in variety Báb ($4.8 \text{ mg}/100 \text{ g}^{-1}$). Heat treatment had a statistically significant positive effect on the lycopene content, changes in carotenoid content were not significant. Effect of genotype (variety) for the content of the endpoint was significantly important.

Keywords: tomato, carotenoids, lycopene, spektrofotometry

ÚVOD

Karotenoidy sú značne rozšírené žlté, oranžové, červené a ojedinele i žltozelené pigmenty rastlín, húb, rias, mikroorganizmov a živočíchov. Dnes je známych približne 700 prirodzene sa vyskytujúcich karotenoidných pigmentov (Velíšek, 2002). V rastlinných bunkách vznikajú po nadmernej absorpcii slnečného žiarenia chlorofylom v chloroplastoch, ktoré sa následne zmenia na chromoplasty (Nyogi, 1999; Johnson 2002). Lycopén je charakterizovaný ako základný karotenoid, od ktorého boli odvodené všetky ostatné karotenoidy (Telef et al., 2006). Rajčiaky a rajčiakové produkty sú hlavným zdrojom nielen lycopénu ale sú považované aj za hlavný zdroj všetkých karotenoidov v ľudskej potrave (Rao, 1999; Shi, 2000). Rajčiaky sú na 80% konzumované vo forme výrobkov ako je šťava, pretlak, kečup, pasta, pyré alebo omáčky, preto sledovanie ich retencie má veľký význam (Gartne et al., 1997, Shi et al, 1999). V prírode sa lycopén vyskytuje v all-*trans* forme a do poly-*cis* formy je izomerizovaný vplyv tepla, svetla a chemických činidiel. *Cis* izoméry sú lepšie rozpustné v tukoch a organických rozpúšťadlách ako formy *trans*, a preto je aj ich využiteľnosť v ľudskom organizme lepšia (Wang et al., 2006). Lycopénu chýba aktivita provitamínu A z dôvodu neprítomnosti β -ionového kruhu, ale i napriek tomu je to významný a najsilnejší antioxidant vyskytujúci sa v prírode (Shi, 2000). Konjugované dvojité väzby dávajú lycopénu silnú antioxidačnú aktivitu, vrátane schopnosti zhášať singletový kyslík a peroxylové radikály. Aktivita zhášať singletový kyslík sa ukázala najväčšia zo všetkých karotenoidov vrátane β -karoténu (Takeoka et al., 2001). Uvádza sa, že lycopén je schopný inaktivovať hydrogenperoxylový a dusitanový radikál. Lycopén je takmer dvakrát aktívnejší než β -karotén v ochrane bielych krviniek pred NO^2 radikálom (Shi, 1999).

Cieľom práce bolo analyzovať obsah celkových karotenoidov a lycopénu v rôznych odrodách rajčiaka

jedlého a tiež sledovať retenciu a zmeny v obsahu po tepelnom spracovaní na rajčiakovú šťavu.

MATERIÁL A METÓDY

Do pokusu sme vybrali štyri odrody rajčiaka vhodné na priemyselné spracovanie (Báb, Žiara PK, Šampion, Roti PK). Hodnotenie sme vykonávali v dvoch vegetačných obdobiach (2009 a 2010). Plody sme zberali v plnej technologickej zrelosti, dostatočne vyfarbené. Plody sme analyzovali v čerstvom stave a vo forme rajčiakovej šťavy. Príprava šťavy pozostávala z dôkladného podrtenia plodov. Drť tvorenú z dužiny i šupiek plodov sme vystavili účinku teploty $95 \text{ }^\circ\text{C}$ po dobu 5 minút. Následne sme zmes prepaširovali a schladili na teplotu $25 \text{ }^\circ\text{C}$. Koncentráciu celkových karotenoidov a lycopénu sme stanovili spektrofotometricky. Ako rozpúšťadlo sme použili acetón. Farbivá sa po rozpustení extrahovali do petroléru. Vlastné stanovenie obsahu karotenoidov a lycopénu sa uskutočnilo meraním absorpcie zložiek v petrolérovom extrakte na spektrofotometri JENWAY pri vlnovej dĺžke 445 a 472 nm. Získané výsledky sme matematicko-štatisticky vyhodnotili.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Priemerné hodnoty obsah karotenoidov za oba sledované ročníky sa v jednotlivých odrodách pohybovali v rozsahu od $4,8 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ v odrode Báb $7,00 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ v odrode Roti PK. Vzájomným testovaním rozdielov medzi odrodami sme zistili štatisticky preukazné rozdiely v obsahu karotenoidov medzi všetkými odrodami vzájomne. Obsah karotenoidov v testovaných odrodách klesal v poradí Roti PK > Šampion > Žiara PK > Báb. Ako uvádza Valšíková (2009) na nutričné zloženie plodov rajčiaka má vplyv genotyp, t.j. pestovaná odroda, stupeň zrelosti plodov, termín zberu ako aj pestovateľské podmienky.

Tab. 1 Priemerné hodnoty obsahu karotenoidov a homogénne skupiny z LSD testu v čerstvých plodoch rajčiaka jedlého

Odroda	karotenoidy (mg.100 g ⁻¹)	homogénne skupiny*	+95 %	-95 %
Báb	4,81	a	4,74	4,88
Žiara PK	5,13	b	5,06	5,20
Šampion	5,85	c	5,77	5,92
Roti PK	7,00	d	6,93	7,07

N=4; α=0,01; *a,b,c,d - priemery označené rovnakými písmenami nie sú štatisticky významne rozdielne p>0,05

Štatistickým hodnotením sa nám preukazne potvrdil vplyv ročníka i vplyv odrody (p>0,05) na obsah karotenoidov v čerstvých plodoch rajčiaka jedlého.

Dominantným karotenoidom v plode rajčiaka jedlého je lykopén, ktorý podľa **Ollanketa et al. (2001)** predstavuje 80-90 % zo všetkých karotenoidov prítomných v plode rajčiaka jedlého. **Clinton (1999)** uvádza, že obsah lykopénu v plodoch rajčiaka je v intervale od 0,88 až 4,20 mg.100 g⁻¹. Podľa našich zistení bol obsah lykopénu vyšší ako uvádza tento autor, v roku 2009 to bolo 4,54 mg.100 g⁻¹ a v roku 2010 5,58 mg.100 g⁻¹. Vzájomným testovaním rozdielov v obsahu lykopénu za oba pokusné ročníky sme zistili štatistické preukazné rozdiely vzájomne medzi všetkými testovanými odrodami.

Tab. 2 Priemerné hodnoty obsahu lykopénu a homogénne skupiny z LSD testu v čerstvých plodoch rajčiaka jedlého

Odroda	lykopén (mg.100 g ⁻¹)	homogénne skupiny*	+95 %	-95 %
Báb	4,11	a	4,03	4,19
Žiara PK	4,51	b	4,43	4,59
Šampion	5,50	c	5,43	5,58
Roti PK	6,11	d	6,04	6,19

N=4; α=0,01; *a,b,c,d - priemery označené rovnakými písmenami nie sú štatisticky významne rozdielne p>0,05

O'Neill et al. (2001) vo svojich prác zistil, že v plode rajčiaka je zo skupiny karoténových farbív prítomný β-karotén v priemernom množstve 0,61 mg.100 g⁻¹, luteín v množstve 0,077 mg.100 g⁻¹ a lykopén v množstve 2,718 mg.100 g⁻¹.

Plody rajčiakov sme v laboratórnych podmienkach spracovali na šťavu. Priemerný obsah karotenoidov v šťave za oba sledované ročníky sa pohybovali od 5,18 mg.100 g⁻¹ v šťave z odrody Žiara PK po 7,25 mg.100 g⁻¹ v šťave z odrody Šampion. Najnižší priemerný obsah lykopénu 5,00 mg.100 g⁻¹ bol nameraný v šťave pripravenej z odrody Žiara PK a najvyšší 6,75 mg.100 g⁻¹ v šťave z odrody Roti PK. Medzi testovanými vzorkami štiav z hodnotených odrôd sa potvrdili preukazné rozdiely v obsahu karotenoidov aj lykopénu.

Tab. 3 Priemerné hodnoty obsahu karotenoidov a homogénne skupiny z LSD testu v šťave z rajčiaka jedlého

Odroda	karotenoidy (mg.100 g ⁻¹)	homogénne skupiny*	+95 %	-95 %
Báb	5,18	a	5,08	5,28
Žiara PK	5,32	b	5,22	5,42
Roti	6,54	c	6,44	6,64
Šampion	7,25	d	7,15	7,35

N=4; α=0,01; *a,b,c,d - priemery označené rovnakými písmenami nie sú štatisticky významne rozdielne p>0,05

Tab. 4 Priemerné hodnoty obsahu lykopénu a homogénne skupiny z LSD testu v šťave z rajčiaka jedlého

Odroda	lykopén (mg.100 g ⁻¹)	homogénne skupiny*	+95 %	-95 %
Báb	4,69	a	4,62	4,77
Žiara PK	5,00	b	4,92	5,08
Šampion	6,31	c	6,23	6,39
Roti PK	6,75	d	6,67	6,82

N=4; α=0,01; *a,b,c,d - priemery označené rovnakými písmenami nie sú štatisticky významne rozdielne p>0,05

Hodnotením dynamiky zmien obsahu karotenoidov a lykopénu v tepelne ošetrenej šťave z rajčiaka jedlého sme zistili, že v prípade odrôd Báb, Šampion a Žiara PK došlo po tepelnom spracovaní k zvýšeniu obsahu sledovanej zložky. V šťave z odrody Roti PK bol obsah karotenoidov po spracovaní nižší. Testovaním vplyvu tepelného ošetrovania na retenciu karotenoidov dvojfaktorovou analýzou sa nepotvrdil štatistický preukazný vplyv spracovania na zmenu obsahu karotenoidov. To znamená, že zmeny ktoré nastali neboli štatisticky významné a retencia karotenoidov po tepelnom ošetrovaní bola dobrá. Testovaním dvojfaktorovou analýzou ANOVA sa potvrdil len vplyv odrody na obsah karotenoidov v plodoch rajčiaka a rajčiakovej šťave, čo už bolo zrejmé aj z výsledkov LSD testu.

Tab. 5 Štatistická významnosť faktorov na základe dvojfaktorovej ANOVA pre obsah karotenoidov v závislosti na forme rajčiaka jedlého

Zdroj variability	Suma štvorcov	df	Priemerné štvorce	F
Odroda	19,661	3	6,554	11,066**
Forma	1,143	1	1,143	1,931
odroda*forma	3,566	3	1,189	2,007
Chyba	14,213	24	0,592	

** štatistická významnosť p<0,01; df - stupne voľnosti

Obsah lykopénu v šťave z rajčiaka jedlého bol vyšší ako v čerstvých plodoch v prípade všetkých hodnotených odrôd. Pri testovaní vplyvu tepelného ošetrovania na obsah lykopénu, sme zistili štatisticky preukazný rozdiel v obsahu. Vplyvom spracovania vyššie popísanou technológiu došlo k zvýšeniu obsahu lykopénu v šťave z rajčiaka jedlého oproti obsahu v čerstvých plodoch. To znamená, že retencia lykopénu je horšia ako retencia

karotenoidov, ale zmena, ktorá nastala bola pozitívna. Po tepelnom ošetrení dochádza k zvýšeniu obsahu a tiež k lepšej využiteľnosti lykopénu. Schulzová et al. (2005), uvádza, že pri záhreve rajčiakovej dužniny pri teplote blízkej 100 °C je degradácia lykopénu pomalá. Je to dôsledok toho, že niektoré makromolekuly, ako napr. pektín, môžu lykopén ochrániť pred rozkladom.

Tab. 6 Štatistická významnosť faktorov na základe dvojfaktorovej ANOVA pre obsah lykopénu v závislosti na forme rajčiaka jedlého

Zdroj variability	Suma štvorcov	df	Priemerné štvorce	F
odroda	20,2535	3	6,7512	11,804**
forma	3,1737	1	3,1737	5,549*
odroda*forma	1,6446	3	0,5482	0,959
Chyba	13,726	24	0,5719	

** štatistická významnosť $p < 0,01$; * štatistická významnosť $p < 0,05$; df - stupne voľnosti

ZÁVER

Na základe dosiahnutých výsledkov môžeme konštatovať, že sa nám v práci potvrdil vplyv odrody, aj vplyv pestovateľských podmienok, konkrétne klimatických faktorov v danej vegetácii na obsah karotenoidov i lykopénu v plodoch rajčiaka jedlého. Odrodou s veľkým potenciálom oboch sledovaných zložiek bola odroda Roti PK. Relatívne najnižší obsah oboch farbív bol detegovaný v odrode Báb. Z hľadiska spracovateľského môžeme skonštatovať výbornú retenciu karotenoidov a zvýšenie obsahu lykopénu v sledovanom výrobku. Zmeny, či už pozitívne alebo negatívne, ktoré nastali po spracovaní plodov na šťavu za použitia tepla boli zo štatistického hľadiska v prípade karotenoidov bezvýznamné. V prípade lykopénu sme zistili štatisticky preukazne ($p < 0,05$) nárast obsahu lykopénu po spracovaní, čím sa potvrdil pozitívny vplyv tepelného ošetrenia na obsah lykopénu. Ako uvádzajú viaceré literárne zdroje, tepelné ošetrenie má však významný pozitívny vplyv na využiteľnosť karotenoidov i lykopénu v ľudskom organizme.

LITERATÚRA

CLINTON, S. 1999. Lycopene: Chemistry, biology and implication for human health and disease. In *Nut. Rev.*, vol. 56, 1998, p. 35-51.

GARTNER, C., STAHL, W., SIES, H. 1997. Lycopene is more bioavailable from tomato paste than from fresh tomatoes. In *Am J Clin Nutr*, vol. 66, 1999, no. 1, p. 116-222.

JOHNSON, E. J. 2002. The role of carotenoids in human health. In *Nutr. Clin Care*, vol. 5, 2002, p. 56-65.

NIYOGI, K. K. 1999. Photoprotection revisited. In *Ann Rev Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, vol. 1999, 50, p. 391-417.

OLLANKETO, M., HARTONEN, K., RIEKOLLA, M. L. 2001. Supercritical carbon dioxide extraction of lycopene in tomato skins. In *European Food Research and Technology*, vol. 121, 2001, no. 4, p. 561-565.

O'NEILL M. E. et al. 2001. A European carotenoid database to assess carotenoid intakes and its use in a five

comparative study. In *British Journal of Nutrition*, vol. 58, 2001, p. 499-507.

RAO, A. V., ZEESHAN, W., AGARWAL, S. 1999. Lycopene content of tomatoes and tomato products and their contribution to dietary lycopene. In *Food Res Int.*, vol. 31, 1999, p. 737-741.

SCHULZOVÁ, V., HAJŠLOVÁ, J., BOTKET, P. 2005. Nové poznatky v oblasti hodnotení kvality produktů ekologického zemědělství, [online], Retrieved from the web: <http://www.phytopsanitary.org/projekty/2005/VVF_06_2005.pdf>.

SHI, J., LE MAGUER, M., KAKADA, Y., LIPTAY, A., NIEKAMP, F. 1999. Lycopene degradation and isomerization in tomato dehydration. In *Food Research International*, vol. 32, 1999, p. 15-21.

SHI, J. 2000. Lycopene in Tomatoes, In Chemical and Physical Properties Affected by Food Processing. In *Food Science and Nutrition*, vol. 40, 2000, no. 1, p. 1-42.

TAKEOKA, R. G., DAO, L., FLESSA, S., GILLESPIE, D., M. 2001. Processing Effects on lycopene Content and Antioxidant Activity of Tomatoes. In *J. Agric Food Chem.*, vol. 49, 2001, p. 3713-3716.

TELEF, N et al. 2006. Sucrose deficiency delays lycopene accumulation in tomato fruit pericarp discs. In *Plant Mol. Biol.*, vol. 2006, 62, p. 453-469.

VALŠÍKOVÁ, M. 2009. Rajčiak jedlý (*Lycopersicon esculentum* Mill.). In *Zeleninárstvo (poľné pestovanie)*. Nitra : Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre, 2009. p. 39-45. ISBN 978-80-552-0199-3.

VELÍŠEK, J. 2002. *Chemie potravin 3*, Tábor: OSSIS, 2002, 343 p. ISBN 80-86659-03-8.

WANG, C. Y. , CHEN, B. H. 2005. Tomato pulp as source for the production of lycopene powder containing high proportion of cis-isomers. In *Eur Food Res Technol*, 2006, vol. 222, no. 3-4, p. 347-353.

Acknowledgments:

This work was supported by grant VEGA 1/0282/10 and KEGA 015SPU-4/2001.

Contact address:

Ing. Andrea Mendelová, 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: Andrea.Mendelova@uniag.sk

Ing. Alena Andrejiová, PhD. Slovak University of Agriculture, Horticulture and Landscape Engineering Faculty, Department of vegetable, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovakia. E-mail: Alena.Andrejiova@uniag.sk

Ing. Miriam Lišková, 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: Miriam.Liskova@uniag.sk

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

Ing. Ján Mareček, 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: Jan.Marecek@uniag.sk

EFFECT OF HUMIC SUBSTANCES AND PROBIOTICS ON GROWTH PERFORMANCE AND MEAT QUALITY OF RABBITS

Eubmír Ondruška, Eubica Chrastinová, Ján Rafay, Darina Pospíšilová, Vladimír Parkányi

ABSTRACT

The aim of this work was determined effect of supplemental humic substances and probiotics on growth performance and meat quality of rabbits. The growth performances were observed on twohundred and twelve growing rabbits assigned randomly by weight to two treatments. The treatments included: 1) Control group: in this group were rabbits fed with basal diet during all experiment (35th – 77th day), 2) experimental group: the animals were fed with basal diet+3kg/t humic substances – Humac Nature during whole experiment. In this group was during fattening period (35th – 49th and 63rd – 70th days of age) added to feed the probiotic preparation – Propoul (Lactobacillus fermentum CCM 7158 1x10⁸ CFU) 2 g per ten pieces. Body weight and feed intake were measured weekly in order to determine the average daily gain, average daily feed intake and gain/feed. The characteristics of meat quality were determined on twelve rabbit males at the age of 77 days, when the rabbits achieved average slaughter weight 2500g. Results of the whole experimental period showed that addition humic substances and probiotic preparation to the diet had positive effect (not significantly) on intensity of growth live weight in the last phase of fattening period. The results of this study suggest that humic substances with probiotics might be utilized as a feed additive in the rabbit diet. It could not significantly improve growth performance and meat quality of rabbits.

Keywords: meat, quality, rabbits, humic substances, probiotics

ÚVOD

Viacere legislatívne zmeny v Európe spojené s vyradením využívania antibiotických stimulátorov rastu a iných chemických prípravkov vo výžive hospodárskych zvierat otvorili priestor pre hľadanie alternatívnych riešení stimulácie produkčných vlastností hospodárskych. Tieto skutočnosti viedli k tomu, že v súčasnosti sa neoddeliteľnou súčasťou výživy hospodárskych zvierat a v chove králikov tomu nie je inak, stali bylinné preparáty, éterické oleje, probiotiká, organické kyseliny, tkanivové biostimulátory a iné.

V poslednom období sa vo výžive zvierat čoraz častejšie stretávame aj s využitím humínových látok. Humínové látky patria k najrozšírenejším prírodným organickým zlúčeninám. Humínové látky zaraďujeme medzi prírodné organické zlúčeniny, ktoré vznikajú chemickým a biologickým rozkladom organických látok, najmä rastlín a živočíchov. V minulosti sa humínové látky vďaka vysokej adsorpčnej kapacite a schopnosti viazať na seba mikrobiálne jedy, plesňové toxíny a iné pre organizmus jedovaté zlúčeniny, napr. amoniak, polychlórované-bifenyly (PCB), dioxíny a pod využívali hlavne na redukciu amoniaku v ustajňovacích objektoch veľkých hospodárskych zvierat (Ndayegamiye and Cote, 1989; Shiet al., 2001). Efektívne využívanie antibakteriálneho, antivírusového a antikarcinogénneho účinku humínových látok vo veterinárnej praxi a vo výžive zvierat opisujú autori Thielet al., 1977; Hucklet al., 1991; Yamadaet al., 1998 a Jooneet al., 2003.

Vďaka pozitívnemu vplyvu na zdravotný stav sú vo výžive králikov čoraz intenzívnejšie využívané rôzne probiotické preparáty. Ide o produkty so živými mikrobiálnymi zložkami, ktoré po perorálnej aplikácii prispievajú k vytvoreniu priaznivej mikroflóry v tráviacom trakte. Najčastejšie ide o stabilizovanú kultúru živých mikroorganizmov, ktoré obsadia povrch epitelu čreva a následne potláčajú nežiaduce mikroorganizmy. Medzi probiotiká patria najmä laktobacily, rôzne kmene *Enterococcus faecium* a iné mikroorganizmy mliečneho kvasenia.

Cieľom našej práce bolo zhodnotenie vplyvu prídavku humínových látok v kŕmnej zmesi v kombinácii s probiotickým prípravkom na vybrané úžitkové parametre králikov.

MATERIÁL A METÓDY

Pokus sa uskutočnil v schválenom pokusnom zriadení Centra výskumu živočíšnej výroby Nitra na brojlerových králikoch línie P91 založených na báze kalifornského králika. Všetky králiky boli ustajnené v kovových klieťkových technológiách pre chov králikov v počte 2 ks/klieťku, v čiastočne klimatizovanej hale.

Počas celého obdobia experimentu mali zvieratá stály prístup k pitnej vode zabezpečený automatickými níplovými napájačkami. V ustajňovacom objekte sa udržiavali požadované chovateľské podmienky: teplota sa pohybovala v rozpätí 16-21°C a relatívna vlhkosť vzduchu: 70 ± 5%.

Počas experimentu sme sa zamerali na hodnotenie vybraných produkčných ukazovateľov: rast živej hmotnosti, spotrebu kŕmnej zmesi (KZ), konverziu krmiva a kvalitu mäsa jatočných zvierat.

Do pokusnej skupiny bolo zaradených spolu 106 ks králikov obidvoch pohlaví (70 ks ♂ a 36 ks ♀) vo veku 35. dní. Králikom bola počas celého obdobia výkrmu (35. do 77. dňa) podávaná experimentálna KZ s prídavkom kŕmneho doplnku s vysokým podielom humínových kyselín - HUMAC Natur v množstve 3 kg na tonu KZ (tabuľka 1). Pokusným zvieratám sa okrem humínových látok v určitom období výkrmu (od 35. do 49. dňa a od 63. – 70. dňa veku) podával zamiešaním do krmiva probiotický prípravok PROPOUL s obsahom *Lactobacillusfermentum* CCM 7158 1×10^8 CFU v množstve 2g na 10 ks.

Do kontrolnej skupiny bolo rovnako, ako pri experimentálnej skupine spolu zaradených 106 ks králikov obidvoch pohlaví (66 ks ♂ a 40 ks ♀) vo veku 35. dní. Týmto zvieratám bola v období od 35. do 63. dňa predkladaná kontrolná KZ (tabuľka 1) so zakomponovaným antikocidikom – robenidínom (60 mg/kg KZ), po tomto období bola týmto zvieratám predkladaná KZ rovnakého zloženia, ale už bez prídavku robenidínu. Rast živej hmotnosti a spotrebu KZ sme zaznamenávali v pravidelných týždňových intervaloch.

Hodnotenie kvalitatívnych ukazovateľov mäsa sme uskutočnili spolu na 12 ks (6ks pokus a 6 ks kontrola) zvierat, samčieho pohlavia po dosiahnutí živej hmotnosti 2500 g (+ 100g). Porážanie m ladých králikov sa realizovalo po omráčení elektrickým prúdom, prerezaním jugulárnych tepien s následným vykvrvením. Chemickú analýzu základných zložiek mäsa sme hodnotili zo vzoriek chrbtového svalu (musculuslongissimusdorsi). Vzorka mäsa bola odobraná 1 hodinu po zabití, zabalená do fólie a

uskladnená pri teplote 4 °C počas 24 hodín. Hodnota pH mäsa sa stanovila vpichovou elektródou a prístrojom Radelkis OP-109. Obsah vody, bielkovín a intramuskulárneho tuku bol stanovený prístrojom Infrartec1265 48 hodín post mortem. Farba mäsa sa analyzovala na prístroji Spekol 11.

Namerané hodnoty sme štatisticky analyzovali v programe SAS 9.1. Vplyv sledovaných doplnkov v KZ na ukazovatele úžitkovosti sa vyhodnotil jednofaktorovou ANOVA analýzou rozptylu. Preukaznosť rozdielov aritmetických priemerov sa odhadla pomocou t-testu. Na testovanie súborov bol použitý Scheffeho test.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

V tabuľke 1 je uvedené percentuálne zastúpenie jednotlivých komponentov a podiel vybraných živín v 100% sušine kŕmnej zmesi. Pokusná kŕmna zmes sa od kontrolnej odlišovala iba obsahom testovaného prípravku humínových látok - HumacNatur v pomere $3g \cdot kg^{-1}$ KZ.

V tabuľke 2 sú uvedené základné ukazovatele úžitkovosti králikov v priebehu výkrmu. Pri hodnotení intenzity rastu živej hmotnosti sme zaznamenali pozitívny vplyv skrmovania KZ s obsahom humínových látok a probiotík v druhej polovici výkrmového obdobia (63.-77. dňa), kedy králiky dosahovali vyššie priemerné denné prírastky. Tieto rozdiely, podobne ako pri ostatných sledovaných ukazovateľoch však neboli štatisticky preukazné. Autori **Karaogluet al. (2004)**, **Yalcinet al. (2005)**, **Avciet al. (2007)**, **Hanafyet al. (2008)**, ktorí uskutočnili pokusy s prídavkom humínových kyselín v kŕmnej dávke hydiny, tak ako aj my nezaznamenali ich štatistiky významný vplyv na prírastky živej hmotnosti. Avšak **Kocabagliet al. (2002)** zaznamenal signifikantný vplyv prídavku humínových kyselín na rast živej hmotnosti a najmä konverziu krmiva v závere sledovaného výkrmového

Tab. 1 Zloženie KZ použitej v pokusných a kontrolných skupinách králikov

Podiel komponentov v KZ (%)		Podiel živín v 100% sušine (%)	
Lucernové úsušky	41,4	Sušina	88,57
Pšeničné otruby	32,9	NL	20,46
Ovos	12,8	Tuk	4,08
Slniečnicový extr.šrot	7,8	Vláknina	19,61
Melasové výpalky	2,0	Škrob	14,09
Sójový olej	0,9	Popol	8,05
Premix doplnkových látok	1,4	Organická hmota	91,95
CaCO ₃	0,5	ADV	22,77
NaCl	0,3	NDV	36,89

Tab. 2 Porovnanie jednotlivých ukazovateľov počas výkrmu králikov

Skupina/ukazovateľ	Pokus	Kontrola
Priem. prírastok živej (g/ks/deň)	38,41	39,13
Priemerná konverzia krmiva (g/g)	3,58	3,51
Priemerná spotreba KZ /kŕmny deň (g/ks)	133,55	134,82

Tab. 3 Porovnanie jednotlivých ukazovateľov počas výkrmu králikov

ukazovateľ	Pokus x±sd	Kontrola x±sd
Obsah celkovej vody (g.100g ⁻¹)	75,87±0,25	75,53± 0,65
Obsah celkových bielkovín (g.100g ⁻¹)	21,7±0,1	22,07±0,49
Obsah celkového tuku (g.100g ⁻¹)	1,43±0,23	1,4±0,26
Energetická hodnota (kJ.100g ⁻¹)	417,48±8,86	422,37±15,40
pH	5,59±0,1	5,58±0,05
Elektrická vodivosť (μS)	0,59±0,14	0,42±0,21
Farba L	49,61±6,01	52,97±2,71
A	1,16±0,74	0,65±0,31
B	7,25±1,54	8,31±0,92
Voľne viazaná voda (g.100g ⁻¹)	34,51±4,63	33,73±2,01

obdobia.

Po zhodnotení vybraných ukazovateľov chemického zloženia mäsa sme nezaznamenali štatisticky významný

ZÁVER

Výsledky našej práce poukazujú na pozitívny vplyv humínových látok v kombinácii s probiotickými preparátmi na intenzitu rastu králikov. V pokusnej skupine zvierat s prídavkom humínových látok (HumacNatur) a probiotík (Propoul) sme zaznamenali vyššiu intenzitu rastu živej hmotnosti v poslednej fáze výkrmového obdobia. Vo využití predkladaných kŕmnych zmesí na rast živej hmotnosti – konverzia krmiva, ako aj v kvalitatívnych ukazovateľoch mäsa sme štatisticky významné rozdiely medzi obidvoma skupinami nezaznamenali.

LITERATÚRA

AVCI, M., DENEK, N., KAPLAN, O. 2007. Effects of humic acid at different levels on growth performance, carcass yields and some biochemical parameters of quails. In *J. Anim. Vet. Adv.*, vol. 6, 2007, p. 1-4.

HANAFY, M. M., EL-SHEIKH, A. M. H. 2008. The effect of dietary Humic Acid supplementation on some productive and physiological traits of laying hens. In *Egypt. Poult. Sci.*, vol.28, 2008, p.1043-1058.

HUCK, J. A., PORTER, N., BUSHED, M. E. 1991. Effect of humates on microbial activity. In *Journal of General Microbiology*, vol. 137, 1991, p. 2321-2329.

JOONÉ, G. K., J. DEKKER, VAN RENSBURG, C. E. J. 2003. Investigation of the Immunostimulatory Properties of Oxyhumat. In *Zeitschrift für Naturforschung Redaktion*, vol. 58c, 2003, p. 263-267.

KARAOGLU, M., MACIT, M., ESENBAGA, N., DURDAG, H., TURGUT, L., BILGIN, O.C., 2004. Effect of supplemental humate at different levels on the growth performance slaughter and carcass traits of broilers. In *International Journal of Poultry Science*, vol. 3, 2004, p. 406-410.

KOCABAGLI, N., ALP, M., ACAR, N., KAHRAMAN, R. 2002. The effects of dietary humate supplementation on broiler growth and carcass yield. In *Poult. Sci.*, vol. 81, 2002, p. 227-230.

NDAYEGAMIYE, A., COTE, D. 1989. Effect of long-term pig slurry and solid cattle manure application on soil chemical

vplyv humínových látok v kombinácii s probiotickým prípravkom v žiadnom z hodnotených ukazovateľov (tabuľka 3).

and biological properties. In *Can. J. Soil. Sci.*, vol. 69, 1989, p. 39-47.

SHI, Y., PARKER, D. B., COLE, N. A., AUVERMANN, B. W., MEHLHORN, J. E. 2001. Surface amendments to minimize ammonia emissions from beef cattle feedlots. In *Trans. Am. Soc. Agric. Eng.*, vol.44, 2001, p. 677-682.

THIEL, K.D., KLOCKING, R., SCHWEIZER, H., SPROSSIG, M. 1977. Invitro studies of the antiviral activity of ammonium humate against herpes simplex virus type 1 and type 2. In *Zentralbl. Bakteriol.*, vol. 239, 1977, p. 304-321.

YALCIN, S., ERGUN, A., EROL, H., YALCIN, S., OZSOY, B., 2005. Use of L-carnitine and humate in laying quail diets. In *Acta Veterinaria Hungarica*, vol. 53, 2005, no 3, p. 361-370.

YAMADA, E., OZAKI, T., KIMURA, M., 1998. Determination and behavior of humic substances as precursors of trihalomethane in environmental water. In *Anal. Sci.*, vol. 14, 1998, p. 327-332.

Acknowledgments:

This work was supported by grant APVV, project no. VMSP-P-0024-09.

Contact address:

Ing. Lubomír Ondruška, PhD., Animal Production Research Centre Nitra, Institute of Small Farm Animals Hlohovecká 2, 951 41 Lužianky, Slovakia, E-mail: ondruska@cvzv.sk

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

doc. RNDr. Ján Rafay, CSc., Animal Production Research Centre Nitra, Institute of Small Farm Animals Hlohovecká 2, 951 41 Lužianky, Slovakia, E-mail: rafay@cvzv.sk

MVDr. Darina Pospíšilová, PhD., Vetservis s.r.o. Nitra Kalvária 3, 949 01 Nitra, Slovakia, E-mail: pospisilova@vetservis.sk

RNDr. Vladimír Parkányi, CSc., Animal Production Research Centre Nitra, Institute of Small Farm Animals Hlohovecká 2, 951 41 Lužianky, Slovakia, E-mail: parkanyi@cvzv.sk

CHANGES IN THE PHYSICAL PROPERTIES OF BREAD DURING STORAGE

Paulina Paják, Celina Habryka, Teresa Fortuna

ABSTRACT

The aim of this work was to compare the physical properties of breadcrumb during five days of storage in vacuum containers and polyethylene bags. On the basis of result it was stated, that storage of baguettes in vacuum condition and in polyethylene foil did not prevent the staling of breadcrumb. Hardness of breadcrumb stored in plastic bags on the fifth day was higher than hardness of bread stored in vacuum containers. The others texture values did not differ significantly on the fifth day of storage between packaging methods. The changes in water activity values both in vacuum containers and polyethylene bags were negligible during storage. Increase in lightness and decrease in yellowness were observed over the storage period, regardless of packaging method, while the values of a^* remained essentially unchanged.

Keywords: breadcrumb, TPA, water activity, colour measurement

INTRODUCTION

Staling of bread is a phenomenon that is not yet fully understood. Some authors showed that bread staling is associated to starch retrogradation, however others suggested that it is due to an increase in interactions between starch molecules and gluten proteins (Pühr & D'Appolonia, 1992; Ribotta & Le Bail, 2007; Ronda & Roos, 2011). Staling involves changes in textural properties (e.g. hardening, decrease in elasticity or cohesion), sensory attributes and colour characteristic (Rasmussen & Hansen, 2001; Wagner et al., 2007).

Vacuum packaging is one of the way to extend the food's shelf-life because it removes air (oxygen) from around the product. More often bread is packed and stored in plastic bags. However packaging is used to limit moisture loss or evaporation, which influence physicochemical changes in bread during storage. Several reports were found in the literature on the effects of packaging in modified atmosphere on the properties of bread (Rasmussen & Hansen, 2001; Ceglińska et al., 2004). Although there is a lack of information about the impact of vacuum packaging or in plastic bags on the physical properties of bread.

The aim of this work was to compare changes in texture – TPA, water activity and colour parameters of breadcrumb during five days of storage in vacuum containers and in polyethylene bags.

MATERIAL A METHODOLOGY

The materials subjected to analysis were bread concentrate "Chleb swojski zytmi": mix of wheat and rye flours, dried sourdough starter and salt, purchased in the local market.

Sample preparation: The dough formulation comprised: 1000 g of concentrate, 550 g of water and 10 g of fresh yeast. Mixing, dough rise and baking were carried out in Moulinex Home Bread Ow 6000 Baguette & Co. After 70 min of mixing and resting, dough was divided in portions of 190±5g and baguettes were formed. The pieces

of dough were baking in Moulinex for 47 min. Samples were packed in a glass containers in vacuum condition and in polyethylene bags and were stored during 5 days at room temperature. Samples were duplicate.

The analysis of the breadcrumb involved determination of textural properties using TPA test (Texture Profile Analysis). Textural properties were made with a Texture Analyser EZ Test (Schimadzu, Japan). On the test days, breadcrumb in cylindrical shape (4 cm height, 1 cm diameter) were compressed to 50% (20 mm) using stainless steel plunger having a diameter of 30 mm and height of 5 mm. The samples were tested at plunger speed 25 mm/min. Following magnitudes were determined during measurements: hardness [N], elasticity [mm], cohesiveness [-], guminess [N] and mastication[N·mm].

The water activity (a_w) of the crumb was measured by using LabSwift- a_w (Novasina, Switzerland). The breadcrumb was loaded in a sample dish and put in the measurement chamber. The equilibrium air humidity over a sample (water-vapour pressure) which is proportional to the a_w -value was measured.

Parameters of colour $L^*a^*b^*$ were determined in CIELAB system ($10^\circ/D_{65}$ colour spaces, gap 10mm) by using spectrophotometer X – Rite Color i5. The colour parameters of the breadcrumb were expressed as L^* (lightness; from 0=black, to 100=white), a^* (+a=redness, -a=greenness) and b^* (+b=yellowness, -b=blueness).

RESULTS AND DISCUSSION

Texture parameters of breadcrumb depends on many factors: recipe, baking condition, storage period and temperature (Ceglińska et al., 2004). The changes in hardness and elasticity for the baguettes stored in vacuum containers compared to polyethylene bags are shown in Fig.1 and Fig.2. On the basis of the results obtained in this work, it was stated that crumb hardness stored in vacuum conditions increased during the first three days of storage (starch retrogradation occurred). On the fifth day of storage reduction of crumb hardness was observed. Such behaviour may probably be due to remigration of water

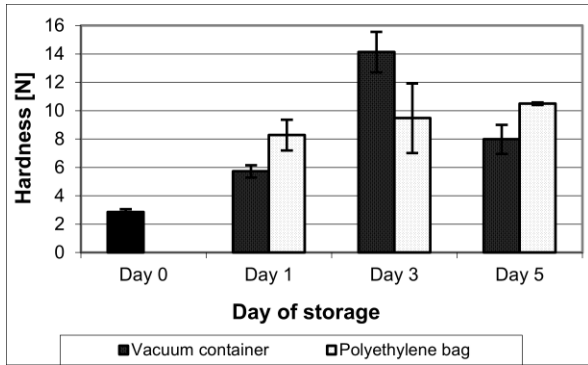


Fig. 1 Hardness of breadcrumb stored in vacuum containers and polyethylene bags during five days

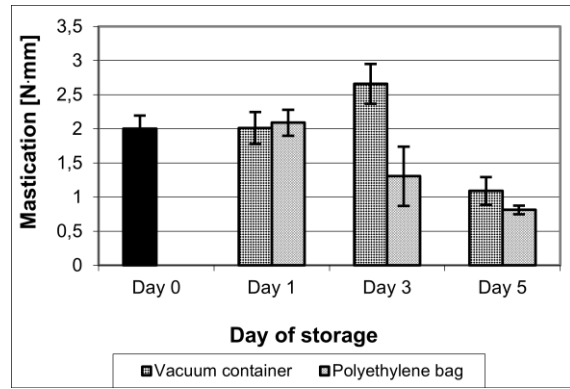


Fig. 5 Mastication of breadcrumb stored in vacuum container and polyethylene bags during five days

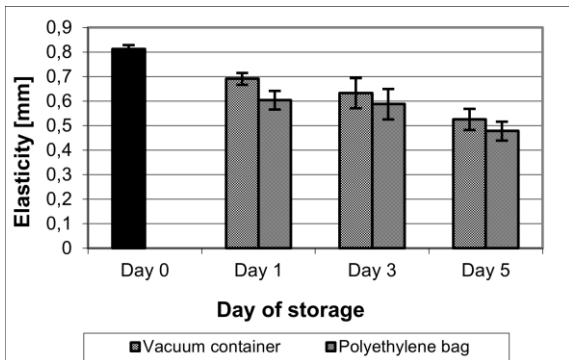


Fig. 2 Elasticity of breadcrumb stored in vacuum containers and polyethylene bags during five days

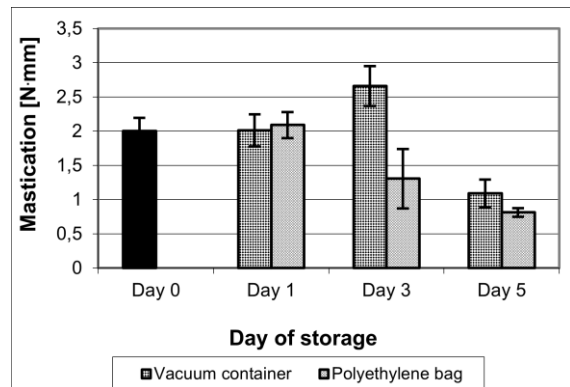


Fig. 6 The water activity (a_w) of the breadcrumb during storage in vacuum container and polyethylene bags during five days.

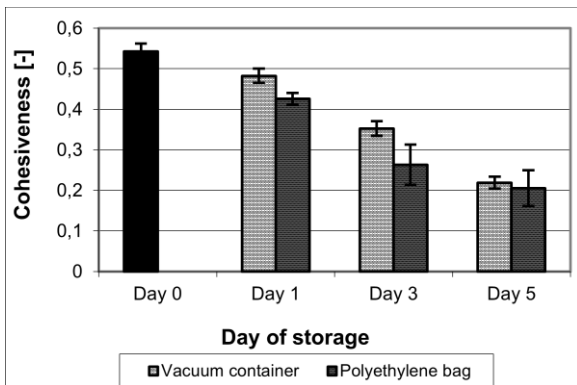


Fig. 3 Cohesiveness of breadcrumb stored in vacuum container and polyethylene bags during five days

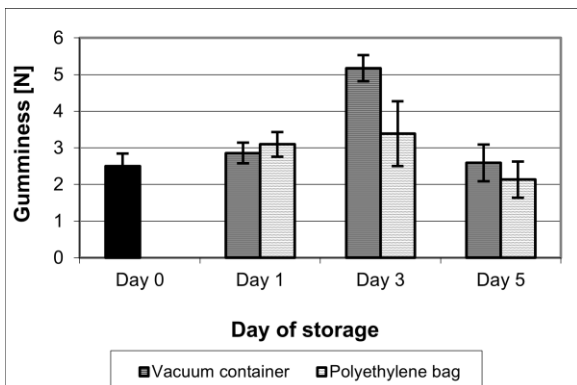


Fig. 4 Gumminess of breadcrumb stored in vacuum container and polyethylene bags during five days

from the crust to the crumb in closed container. **Rasmussen & Hansen (2001)** reported that in the case of bread stored in modified atmosphere increase in firmness was linear with time during the first three days of storage, and then the firming rate decreased with time. The authors suggested that bread firmness is influenced by both the crystallisation behaviour of starch and by changes in hydration. **Puhr & D'Appolonia (1992)** reported that high crumb moisture retarded hardening rate.

Hardness of breadcrumb stored in plastic bags on the fifth day was higher than hardness of bread stored in vacuum containers. It may suggest that vacuum packaging is more efficient in delaying bread staling than polyethylene bags. Elasticity (Fig. 2) decreased gradually over time, this behaviour was similar, irrespective of the type of packaging.

Cohesiveness (Fig. 3) of bread stored in vacuum containers significantly decreased from 0.543 in fresh baguette to 0.219 at the fifth day of storage. Slightly lower values of cohesiveness showed breadcrumb stored in polyethylene bags, however on the fifth day of storage cohesiveness was similar (0.205). The aging of bread diminishes cohesiveness usually due to the loss of intermolecular attractions between ingredients that cause the crumbling of crumb, and that is usually associated with the loss of water (**Ronda & Ross, 2011**).

Gumminess and mastication values of breadcrumb during storage are presented at Fig. 4 and Fig. 5. The changes in these parameters in the case of bread stored in vacuum condition were similar to hardness behaviour. Slight increase in gumminess was observed during three days of

Tab. 1 Changes in colour parameters of breadcrumb during storage

Day of storage	L*		a*		b*	
	vacuum container	polyethylene bag	vacuum container	polyethylene bag	vacuum container	polyethylene bag
Day 0	63.40±0.54	63.15±0.22	3.36a±0.61	3.57a±0.54	19.59±0.36	19.73±0.27
Day 1	67.43a±0.65	65.00±0.20	3.38a±0.15	3.76a±0.12	18.75a±0.49	18.87a±0.19
Day 3	67.29a±0.46	66.41±0.42	3.35a±0.26	3.62a±0.15	18.41a±0.33	18.67a±0.48
Day 5	68.99±1.25	68.69±0.77	3.42a±0.25	3.60a±0.07	17.47±0.36	16.62±0.17
NIR	1.21	0.87	0.56	0.54	0.53	0.57

*Within columns. values followed by the same small letters do not differ significantly at p=0.05

storage, followed by a sharp decline on the fifth day. Mastication values of bread stored in polyethylene bags decreased gradually over time. Although on the fifth day of storage texture parameters did not differ, irrespective of packaging method.

The water activity of breadcrumb is summarized at Fig. 6. After one day of storage both in vacuum containers and polyethylene bags there were no statistical differences in water activity values comparing to value of fresh crumb. Some statistical variation has been seen after three (vacuum) or five (foil) days of storage. Although, the changes in water activity values were very small (from 0.958 on the day of baking to 0.944 after 5 days of storage). Similar small changes in water activity presented **Puhr & D'Appolonia (1992)** for wheat breadcrumb stored in polyethylene bags at room temperature. However these values were a bit higher (changes from 0.995 to 0.975). In parallel there was not significant reduction in breadcrumb moisture during the same five-day storage period (data not shown). The relationship between water activity of breadcrumb and its moisture is known in literature (**Puhr & D'Appolonia, 1992**).

The final product colour can be usually associated with ingredients, processing factors, quality and shelf-life of the product (**Lucisano et al., 2010**). Packaging lengthen the shelf-life of bread, but do not prevent the staling process, which can manifest in colour alteration. In this study the changes in lightness values (tab.1) were significant over the whole storage period.

The 9 percent increase in lightness during the five days of storage were determined both in vacuum and plastic conditions. These values were much lower than lightness of breadcrumb measured by **Lucisano et al. (2010)**, although similar to lightness of breadcrumb obtained from frozen partially baked breads (**Altamirano-Fortoul & Rosell, 2011**). There were no changes in a* (redness) values during storage period. while b* (yellowness) slightly decreased from 19.59 to 17.47 and from 19.72 to 16.62 respectively for vacuum and foil stored bread.

CONCLUSION

Storage of baguettes in vacuum containers and in polyethylene bags did not prevent the staling of breadcrumb.

Hardness of breadcrumb stored in plastic bags on the fifth day was higher than hardness of bread stored in vacuum containers. The others texture values did not differ significantly on the fifth day of storage between packaging method.

The changes in water activity values during five days of storage both in vacuum containers and polyethylene bags were negligible.

Increase in lightness and decrease in yellowness were observed over the storage period. irrespective of packaging method. while the values of a* remained essentially unchanged.

REFERENCES

- ALTAMIRANO-FORTOUL, R., ROSELL, C. M. 2011. Physico-chemical changes in breads from bake off technologies during storage. In *LWT – Food Science and Technology*, vol. 44, 2011, p. 631-636.
- CEGLIŃSKA, A., HABER, T., WICHOWSKA, M. 2004. Wpływ opakowania na jakość i trwałość pieczywa. In *Przegląd Piekarski i Cukierniczy*, vol. 4, 2004, p. 2-5.
- LUCISANO, M., CAPPÀ, C., FONGARO, L., MARIOTTI M. 2010. Methods for the characterization of breadcrumb. an important ingredient of stuffed pasta. In *Journal of Cereal Science*, vol. 51, 2010, p. 381-387.
- RASSMUSEN, P. H., HANSEN, A. 2001. Staling of wheat bread stored in modified atmosphere. In *Lebensm.-Wiss. U.-Technol.*, vol. 34, 2001, p. 487-491.
- PUHR, D. P., D'APPOLONIA, B. L. 1992. Effect of baking absorption on bread yield. crumb moisture and crumb water activity. In *Cereal Chemistry*, vol. 69, 1992, p. 582-586.
- RIBOTTA, P. D., LE BAIL, A. 2007. Thermo-physical assessment of bread during staling. In *Lebensm.-Wiss. U.-Technol.*, vol. 40, 2007, p. 879-884.
- RONDA, F., ROOS, Y. H. 2011. Staling of fresh and frozen gluten-free bread. In *Journal of Cereal Science*, vol. 53, 2011, p. 340-346.
- WAGNER, M. J., LUCAS, T., LE RAY, D., TRYSTRAM, G. 2007. Water transport in bread during baking. In *Journal of Food Engineering*, vol. 78, 2007, p. 1167-1173.
- WANG, X., CHOI, S-G., KERR, W. L. 2004. Water dynamics in white bread and starch gels as affected by

water and gluten content. In *Lebensm.-Wiss. U.-Technol.*, vol. 37, 2004, p. 377-384.

Contact address:

Paulina Pająk. PhD. University of Agriculture, Department of Food Analysis and Quality Assessment, Balicka Street 122, 30-149 Krakow, Poland, E-mail: p.pajak@ur.krakow.pl

Celina Habryka, University of Agriculture, Department of Food Analysis and Quality Assessment, Balicka Street 122, 30-149 Krakow, Poland, E-mail: celhab@wp.pl

Teresa Fortuna, University of Agriculture, Department of Food Analysis and Quality Assessment, Balicka Street 122, 30-149 Krakow, Poland, E-mail: rrfortun@cyf-kr.edu.pl

FACTORS AFFECTED DECARBOXYLATION ACTIVITY OF *ENTEROCOCCUS FAECIUM* ISOLATED FROM RABBIT

Pavel Pleva, Leona Buňková, Andrea Lauková, Eva Lorencová, Vlastimil Kubáň, František Buňka

ABSTRACT

Biogenic amines (BA) are basic nitrogenous compounds formed mainly by the decarboxylation of amino acids. There are generated in course of microbial, vegetable and animal metabolisms. The aim of the study was to monitor influencing factors of biogenic amine production by *Enterococcus faecium*, which is found in rabbit meat. Biogenic amines were analyzed by the means of UPLC (ultrahigh performance liquid chromatography) equipped with a UV/VIS DAD detector. Decarboxylation activity of *E. faecium* was mainly influenced by the cultivation temperature and by the amount of NaCl in this study. *E. faecium* produced most of the monitored biogenic amines levels: tyramine <math><2500 \text{ mg.l}^{-1}</math>; putrescine <math><30 \text{ mg.l}^{-1}</math>; spermidine <math><10 \text{ mg.l}^{-1}</math> and cadaverine <math><5 \text{ mg.l}^{-1}</math>.

Keywords: biogenic amines, *Enterococcus*, ultrahigh performance liquid chromatography

ÚVOD

Biogenní aminy (BA) jsou organické dusíkaté sloučeniny s nízkou molekulovou hmotností, které lze podle chemické struktury rozdělit na aromatické (např. tyramin, 2-fenylethylamin), heterocyklické (např. histamin, tryptamin) a alifatické diaminy (např. putrescin, kadaverin) (Smělá et al., 2004). Biogenní aminy se vyskytují v mnohých tkáních a jsou součástí metabolických procesů buněk. Mají funkci prekurzorů syntézy proteinů, nukleových kyselin, hormonů i alkaloidů (Karovičová et al., 2005).

Biogenní aminy se vyskytují téměř v každé potravine, která obsahuje určité množství volných aminokyselin nebo proteinů podléhajících mikrobiální aktivitě. Činností mikrobiálních enzymů dochází k dekarboxylaci volných aminokyselin, čímž vznikají BA a polyaminy (Křížek, 1998). Nízká koncentrace BA může být lidským tělem tolerována, pokud jsou účinné detoxikační mechanismy ve střevním traktu. Na detoxikaci se podílí enzymy monoaminoxidázy a diaminoxidázy. Jestliže však nastane nadměrný příjem některého biogenního aminu, jsou katabolické cesty potlačeny a dochází k fyziologickým poruchám (Shalaby, 1996). Spanier et al. (1991) navrhuji tolerovatelné sumární množství BA (histaminu, tyraminu, putrescinu a kadaverinu) pro potraviny do 900 mg/kg. S množstvím biogenních aminů souvisí i nařízení ES č. 2073/2005, kde je uváděn limit pro histamin v rybách a výrobcích z ryb do 200 mg.kg⁻¹.

U masa a masných výrobků patří mezi významné bakterie produkující BA (zejména histamin, kadaverin a putrescin) rody *Pediococcus*, *Lactobacillus*, *Pseudomonas*, *Streptococcus*, *Micrococcus* a zástupci čeledi *Enterobacteriaceae*. Zároveň se tyto bakterie mohou lišit v produkci BA i o několik řádů (Shalaby, 1996). Je nemožné najít korelaci mezi obsahem biogenních aminů a počtem buněk (Halász et al. 1994).

Vliv podmínek vnějšího prostředí na tvorbu BA (např. teplota, pH, přístup kyslíku a množství NaCl), se liší i

v rámci kmenů stejného druhu (Křížek et al., 1998). Většina aminů je tepelně stálá, některé dekarboxylázy si však uchovávají aktivitu i po tepelném ošetření (např. pasteraci), takže obsah BA může dále růst i během skladování potraviny (Brink et al., 1990).

MATERIÁL A METÓDY

Mikroorganizmus a kultivační podmínky

Enterococcus faecium M2C byl izolován z masa králíka a byl získán z Ústavu fyziologie hospodářských zvířat, Slovenské akademie věd v Košicích. Bakterie byly kultivovány v Brain Heart Infusion Broth (BHI; HiMedia) s aminokyselinami (histidin, ornitin, arginin, lyzin, tyrozin; Sigma-Aldrich) jako prekurzory testovaných biogenních aminů v koncentraci 0,2 % (w/v). Produkce biogenních aminů byla zkoumána v závislosti na teplotě (6±1°C a 30±1°C), dostupnosti kyslíku a koncentraci NaCl (0; 1; 2; 3 a 6 % w/v). Vliv dostupnosti kyslíku na produkci biogenních aminů byl sledován tak, že polovina zkumavek byla kultivována aerobně a druhá anaerobně, anaerobního prostředí bylo dosaženo zakápnutím média sterilním parafinovým olejem (1 ml; Pliva-Lachema). Každý izolát byl kultivován třikrát podle Buňková et al., (2009). Růst *E. faecium* byl sledován pomocí optické denzity ($\lambda=600$ nm; Fotometr TECAN Sunrise TW/TC).

Stanovení biogenních aminů

Produkce 7 biogenních aminů (kadaverinu, CAD; histaminu, HIS; fenylethylaminu, PHE; putrescinu, PUT; tyraminu, TYR; spermidinu, SPD; a sperminu, SPN) byla stanovována pomocí ultra-vysoko účinné kapalinové chromatografie (UPLC) s binární pumpou (autosampler LabAlliance, Statr Colleges; kolona s termostatem; UV/VIS DAD detektor ($\lambda=254$ nm); a degaser 1260 Infinity, Agilent Technologies).

Bujón po kultivaci testovaných bakterií byl centrifugován (4000 x g; 22±1 °C; 20 minut; EBA 20, Hettich) a získaný supernatant byl zředěn v poměru 1:1 (v/v) kyselinou

chloristou ($c = 1.2 \text{ mol.l}^{-1}$). Směs byla filtrována (porozita filtru $0.45 \mu\text{m}$) a filtrát byl podroben derivatizaci dansylchloridem podle **Dadáková et al., (2009)**. Jako interní standard byl použit 1,7-heptandiamin. Derivatizované vzorky byly po danzylaci opět filtrovány (porozita $0.22 \mu\text{m}$) a nanášeny na kolonu (Cogent HPLC Column HPS C18, $150 \times 4.6 \text{ mm}$, $5 \mu\text{m}$). Podmínky separace sledovaných biogenních aminů jsou popsány v **Smělá et al., (2004)**. Každý ze tří supernatantů (pro jeden testovaný mikroorganismus) byl derivatizován dvakrát a každá derivatizována směs nanášena na kolonu ve dvojnásobném opakování ($n = 12$).

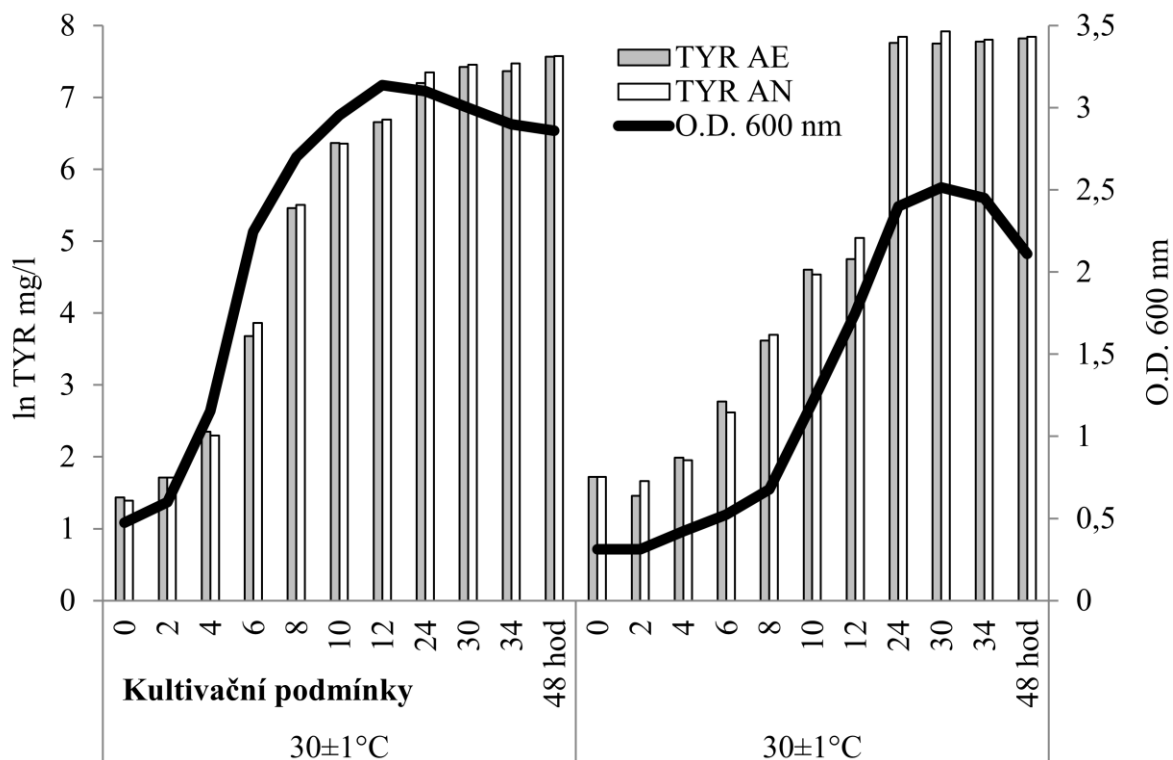
VÝSLEDKY A DISKUZE

Schopnost tvorby biogenních aminů rodem *Enterococcus* potvrdil předcházející skrínig (**Pleva et al., 2011**). Na základě těchto výsledků byl pro další studii vybrán kmen *E. faecium* M2C schopný produkce tyraminu, putrescinu, kadaverinu, fenylethylaminu a spermidinu. U tohoto kmene byly v modelových podmínkách sledovány vybrané faktory, u kterých existuje předpoklad, že jsou schopny ovlivňovat produkci BA ($\text{NaCl } 0 - 6\%$ (w/v); aerobní/ anaerobní prostředí, kultivační teplota $6 \pm 1^\circ\text{C}$ a $30 \pm 1^\circ\text{C}$). Tyto faktory byly voleny tak, aby se přiblížily podmínkám zpracování a skladování masa a masných výrobků.

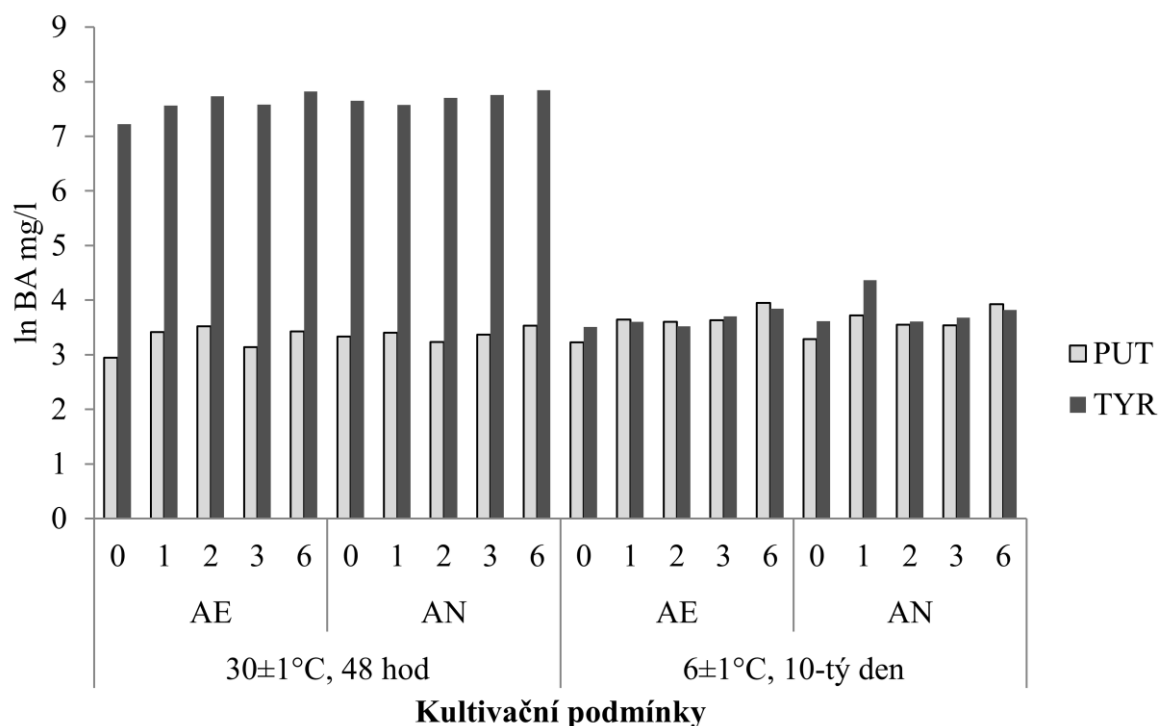
Tvorba biogenních aminů za aerobních i anaerobních podmínek se v čase zvyšovala. Biogenní aminy po 16 dnech kultivace při $6 \pm 1^\circ\text{C}$ za aerobních podmínek

dosahovaly následujících hodnot: TYR $<50 \text{ mg/l}$; PUT $<40 \text{ mg.l}^{-1}$; SPD $<25 \text{ mg.l}^{-1}$ a za anaerobních podmínek TYR $<80 \text{ mg.l}^{-1}$; PUT $<50 \text{ mg.l}^{-1}$; SPD $<20 \text{ mg.l}^{-1}$. Při $30 \pm 1^\circ\text{C}$ byla po 48 hodinách kultivace (obr. 1) zjištěna vyšší produkce BA: aerobně TYR $<2500 \text{ mg.l}^{-1}$; PUT $<30 \text{ mg.l}^{-1}$; SPD $<10 \text{ mg.l}^{-1}$ a CAD $<5 \text{ mg.l}^{-1}$; anaerobně TYR $<2250 \text{ mg.l}^{-1}$; PUT $<30 \text{ mg.l}^{-1}$; SPD $<7 \text{ mg.l}^{-1}$; CAD $<5 \text{ mg.l}^{-1}$. Rozdíl v množství vytvořených BA je dán především vlivem anaerobního prostředí, které může růst *E. faecium* zpomalovat.

Tvorba biogenních aminů je ovlivněna především růstovou fází buněk, tedy množstvím a aktivitou bakterií *E. faecium* v médiu. Při $30 \pm 1^\circ\text{C}$ byla zřetelná významná produkce BA již po hodině kultivace (TYR $5,91 \pm 0,13 \text{ mg.l}^{-1}$; PUT $41,93 \pm 6,53 \text{ mg.l}^{-1}$; CAD $4,16 \pm 0,59 \text{ mg.l}^{-1}$; SPD $5,32 \pm 0,12 \text{ mg.l}^{-1}$; PHE $2,99 \pm 0,03 \text{ mg.l}^{-1}$). Po 48 hodinové kultivaci bylo množství BA následující: TYR $1650 \pm 118 \text{ mg.l}^{-1}$; PHE $7,60 \pm 0,20 \text{ mg.l}^{-1}$; PUT $35,30 \pm 1,05 \text{ mg.l}^{-1}$; CAD $5,00 \pm 0,12 \text{ mg.l}^{-1}$; SPD $5,00 \pm 0,10 \text{ mg.l}^{-1}$. Ze studovaných faktorů měla na růst a dekarboxylázovou aktivitu vliv především teplota (obr. 2), která je schopna zpomalit buněčný růst, prodloužit generační dobu a úměrně tomu i tvorbu BA. Dekarboxylázová aktivita *E. faecium* při teplotě $6 \pm 1^\circ\text{C}$ v prvním až 16 dnů byla řádově obdobná. Nejvyšší zaznamenaný nárůst produkce tyraminu byl čtvrtý den (TYR $83,22 \pm 11,93 \text{ mg.l}^{-1}$) od tohoto dne se produkce zpomalovala. Množství tvořeného spermidinu (SPD $<25 \text{ mg/l}$) kontinuálně rostlo s dobou kultivace.



Obr. 1 Produkce tyraminu u *E. faecium* M2C; při $\text{pH}=7$. Kultivační teplota 30°C , 1 % a 6 % NaCl. TYR AE – produkce v aerobním prostředí; TYR AN – produkce v anaerobním prostředí; O. D. (optická densita) měřena při 600 nm za aerobních podmínek.



Obr. 2 Produkce tyraminu a putrescinu u *E. faecium* M2C při pH7. AE – aerobní prostředí; AN – anaerobní prostředí; 30 ± 1°C po 48 hodinách a 6 ± 1°C po 10-ti dnech kultivace; 0-6 – % koncentrace přidaného NaCl.

Množství NaCl ovlivňuje tvorbu BA významněji pouze u tyraminu, kdy byl znatelný rozdíl v produkci tyraminu při koncentracích do 3 % (TYR 1958± 201 mg.l⁻¹) a nad 3% (w/v) koncentrací soli (TYR 2500±67,8 mg.l⁻¹) při 30±1°C. Koncentrace 6 % (w/v) NaCl výrazně inhibovala produkci tyraminu, a po 12 hodinách kultivace bylo množství vyprodukovaného tyraminu menší (TYR <110 mg.l⁻¹), než u 3 % (w/v) NaCl, (TYR <1500 mg.l⁻¹). Dá se tedy říci, že NaCl má do koncentrací 3 % (w/v) efekt akcelérátoru, zatímco přidavek 6 % (w/v) NaCl tvorbu BA zpomaluje. Putrescin byl tvořen *in vitro* za aerobních i anaerobních podmínek až od 4. dne kultivace u koncentrace NaCl <1 % (w/v) při 6±1°C, dále se produkce postupně zvyšovala za aerobních i anaerobních podmínek (41,51±1,47 mg.l⁻¹).

Obsah tyraminu, kadaverinu a fenylethylaminu se v bujónu po kultivaci *E. faecium* v čase zvyšoval. Množství vytvořeného spermidinu (max. SPD 23,48±0,45 mg.l⁻¹) a putrescinu (max. PUT 52,03±2,48 mg.l⁻¹) se po 16-ti dnech kultivace při 6°C výrazně nenavýšovalo. **Burdychová et al. (2007)** uvádí, že řada kmenů rodu *Enterococcus* tvoří takové koncentrace tyraminu, které již překračují hladinu toxicity (100 mg.l⁻¹), což se slučuje i s našimi výsledky. **Bover-Cid et al. (2001)** zjistili produkci tyraminu v rozmezí 500-4300 mg.l⁻¹ a fenylethylaminu 40-432 mg.l⁻¹ u všech jimi testovaných kmenů *E. faecium* (5 testovaných kmenů). Naopak u těchto izolátů nedetekovali produkci putrescinu a kadaverinu. Stejní autoři rovněž označují studované enterokoky za časté producenty tyraminu a fenylethylaminu, což opět koresponduje s našimi výsledky. Častou produkcí tyraminu u kmenů *E. faecium* popisují také **Roig-Sagués et al. (2002)**, **Cosentino et al. (2004)** a **Komprda et al.**

(2008). **Latorre-Moratalla et al. (2010)** detekovali u kmenů *E. faecium* kromě již zmíněného tyraminu i produkci fenylethylaminu a tryptaminu. **Podle Marcobal et al. (2006)** je produkce BA ovlivněna mimo jiné i množstvím prekurzorů (zejména volných aminokyselin) a úpravou fyzikálně chemických podmínek prostředí. Dále je nutné konstatovat, že produkce BA je rovněž vlastnost silně kmenově závislá (**Pischer et al., 2007; Buňková et al., 2009**).

ZÁVĚR

V práci byla studována *in vitro* produkce biogenních aminů u izolátu *Enterococcus faecium*. Bylo zjištěno, že maso králíka může být kontaminováno mikroflórou bohatou na produkci BA, což může podstatně ohrozit bezpečnost a zdravotní nezávadnost této suroviny. Nejčastěji byla detekována produkce tyraminu, putrescinu, fenylethylaminu a spermidinu. Vzhledem k možnému ohrožení zdraví konzumentů, by bylo vhodné dále prozkoumat další faktory ovlivňující intenzitu dekarboxylační aktivity dekarboxyláza-pozitivních kmenů rodu *Enterococcus*.

LITERATURA

- BOVER-CID, S., HUGAS, M., IZQUIERDO-PULIDO, M., VIDAL-CAROU, M. C. 2001. Amino acid-decarboxylase activity of bacteria isolated from fermented pork sausages. *Int. J. Food Microbiol.*, vol. 66, 2001, 185-189.
- BUŇKOVÁ, L., BUŇKA, F., HLOBILOVÁ, M., VAŇÁTKOVÁ, Z., NOVÁKOVÁ, D., DRÁB, V. 2009. Tyramine production of technological important strains of *Lactobacillus*, *Lactococcus* and *Streptococcus*. *Eur. Food Res. Technol.*, vol. 229, 2009, 533-538.

- BURDYCHOVA, R., KOMPRDA, T. 2007. Biogenic amine-forming microbial communities in cheese. In *FEMS Microbiol. Lett.*, vol. 276, 2007, 149-155.
- BRINK, B., DAMINK, C., JOOSTEN, H. M., HUIS IN 'T VELD J. H. 1990. Occurrence and formation of biologically active amines in foods. In *Int. J. Food Microbiol.*, vol. 11 1990, no.1, p. 73-84.
- COSENTINO, S., PISANO, M. B., CORDA, A., FADDA, M. E., PIRAS, C. 2004. Genotypic and technological characterization of enterococci isolated from artisanal Fiore Sardo cheese. In *J. Dairy Res.*, vol. 71, 2004, p. 444-450.
- HALÁSZ, A. BARÁTH, SIMON-SARKADI, L., HOLZAPFEL, W. 1994. Biogenic amines and their production by microorganisms in food. In *Trends Food Sci. Technol.*, vol. 5, 1994, p. 42-49.
- KAROVIČOVÁ, J., KOHAJDOVÁ, Z. 2005. Biogenic amines in food. In *Chemical Papers*, vol. 59, 2005, no. 1, p. 70-79.
- KOMPRDA, T., BURDYCHOVÁ, R., DOHNAL, V., CWIKOVÁ, O., SLÁDKOVÁ, P., DVOŘÁČKOVÁ, H. 2008. Tyramine production in Dutch-type semi-hard cheese from two different producers. In *Food Microbiol.*, vol. 25, 2008, p. 219-227.
- KŘÍŽEK, M., KALÁČ, P. 1998. Biogenic amines in foods and their roles in human nutrition. In *Czech. J. Food Sci.*, vol. 16, 1998, p. 151-159.
- LATORRE-MORATELLA, L., BOVER-CID, S., TALON, R., AYMERICH, T., GARRIGA, M., ZANARDI, E., IANIERI, A., FRAQUWZA, M. J., ELIAS, M., DROSINOS, E. H., LAUKOVA, A., VIDAL-CAROU, M. C., 2010. Distribution of Aminogenic Activity among Potential Autochthonous Starter Cultures for Dry Fermented Sausages. In *J. Food Prot.*, vol. 73, 2010, no. 3, p. 524-528.
- MARCOBAL, Á., ÁLVAREZ P. J. M., MORENO-ARRIBAS M. V., MUÑOZ, R., 2006. A multifactorial design for studying factors influencing growth and tyramine production of the lactic acid bacteria *Lactobacillus brevis* CECT 4669 and *Enterococcus faecium* BIFI-58. In *Res. Microbiol.*, vol. 157, 2006, p. 417-424.
- PIRCHER, A., BAUER, F., PAULSEN, P. 2007. Formation of cadaverine, histamine, putrescine and tyramine by bacteria isolated from meat, fermented sausages and cheeses. In *Eur. Food Res. Technol.*, vol. 226, 2007, p. 225-231.
- PLEVA, P., BUŇKOVÁ, L., LORENCOVÁ, E., LAUKOVÁ, A., BUŇKA, F. 2011. Produkce biogenních aminů u enterokoků izolovaných z masa králíků a stafylokoků získaných z vnitřního obsahu střev pstruhů. In *Proteiny 2011 : sborník z vědecké konference*. 1. vyd. - Zlín : Univerzita Tomáše Bati, 2011, ISBN 978-80-7454-022-6.
- ROIG-SAGUÉ, A. X., MOLINA, A. P., HERNÁNDEZ-HERRERO, M. M. 2002. Histamine and tyramine-forming microorganisms in Spanish traditional cheeses. In *Eur. Food Res. Technol.*, vol. 215, 2002, p. 96-100.
- SANTOS, M. H. S. 1996. Biogenic amines: Their importance in foods. In *Int. J. Food Microbiol.*, vol. 29, 1996, p. 213-231.
- SHALABY, A., R. 1996. Significance of biogenic amines to food safety and human health. In *Food Res. Int.*, vol. 29, 1996, no. 7, p. 675-690.
- SMĚLÁ, D., PECHOVÁ, P., KOMPRDA, T., KLEJDUS, B., KUBÁŇ, V., 2004. Chromatografické stanovení biogenních aminů v trvanlivých salámech během fermentace a skladování. In *Chemické listy*, vol. 98, 2004, p. 432-437.
- SPANIER, M. C., BRUIN, T. J. F., VAN ROODE, B. A. S. W. 1991. HPLC determination of biogenic amines and evaluation of results. In *Food Policy Trends in Europe*, vol. 6, 1991, p. 213.

Acknowledgments:

This work was supported by grant UTB Zlín no. IGAFT/2012/027 and GAČR 503/11/1417.

Contact address:

Pavel Pleva, Department of Fat, Tenside and Cosmetics Technology, Faculty of Technology, Tomas Bata University in Zlín, nám. T. G. Masaryka 5555, 760 01 Zlín, Czech Republic, E-mail: ppleva@ft.utb.cz

Leona Buňková, Department of Fat, Tenside and Cosmetics Technology, Faculty of Technology, Tomas Bata University in Zlín, nám. T. G. Masaryka 5555, 760 01 Zlín, Czech Republic, E-mail: bunkova@ft.utb.cz

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

Eva Lorencová, Department of Fat, Tenside and Cosmetics Technology, Faculty of Technology, Tomas Bata University in Zlín, nám. T. G. Masaryka 5555, 760 01 Zlín, Czech Republic, E-mail: lorencova@ft.utb.cz

Vlastimil Kubáň, Department of Food Technology and Microbiology, Faculty of Technology, Tomas Bata University in Zlín, nám. T. G. Masaryka 5555, 760 01 Zlín, Czech Republic E-mail: kuban@ft.utb.cz

František Buňka, Department of Food Technology and Microbiology, Faculty of Technology, Tomas Bata University in Zlín, nám. T. G. Masaryka 5555, 760 01 Zlín, Czech Republic, E-mail: bunka@ft.utb.cz

CONTAMINATION OF PROPOLIS USED AS A DIETARY SUPPLEMENT

Adam Roman, Ewa Popiela-Pleban

ABSTRACT

The aim of the study was to determine the extent of chosen toxic elements (zinc, copper, lead, arsenic and cadmium) bioaccumulation in propolis collected in Opole area. The present study demonstrates that propolis can be used as a dietary supplement. The research material were samples of propolis originated from 3 bee colonies in 30 apiaries ($n=3 \times 30=90$). Quantitative analysis of studied elements were conducted using Varian ICP-AES plasma spectrometer with mass detection controlled, and CETAC-5000 AT ultrasonic nebulizer. The presence of toxic elements was determined in an examined biological materials. The sequence of accumulation level of studied elements in propolis was as follows: $Zn \gg Cu > Pb > As > Cd$. An average concentration of zinc, copper, lead, arsenic and cadmium amounted to 56.28, 7.12, 6.91, 0.745, 0.218 $mg \cdot kg^{-1}$, respectively. Only the copper average content in propolis was within acceptable standards, whereas the mean contents of other elements greatly exceed these standards. All portions of propolis should be subjected to toxicological testing before applying these samples for internal use.

Keywords: propolis, heavy metals, arsenic, cadmium, copper, lead, zinc, accumulation, dietary supplement

INTRODUCTION

The industry and motorization development as well as intensive agriculture based on the chemicalization contributed to a massive increase of environment pollution. Among many pollutants there are elements of toxic properties, which natural content in soil and the atmosphere is negligible (Bayçu and Önal 1993, Celli and Maccagnani 2003, Chlopecka et al. 1996, Jones 1987, Kabata-Pendias and Pendias 1999, Stankovska et al. 2008). They are widely used in the human economy, therefore they are common environmental pollutants. Even at low concentrations they may cause a lot of diseases and abnormalities in the functioning of the human organism.

Honey bee (*Apis mellifera* L.) is inextricably linked with the external environment, from which it derives not only air and water, but food as well. The products gathered by the bee colony are kind of pooled samples derived from such a large area. The pollutants occurring in a given area can also be accumulated in the raw material collected by bees, and in bees itself (Bogdanov 2006, Iannotti et al. 2000, Roman 2009, Roman 2010).

During the processing of raw materials to propolis by worker bees its purification does not take place. Propolis is an extremely complicated material which has many biologically active compounds valuable to the human organism. Most of these substances belong to the following groups flavonoids, diterpene, phenolic acids, aromatic esters, alcohol-phenols, keto-phenols, coumarins, lipid and wax, bio-elements, vitamins, proteins and other compounds (Bankova et al. 2000, de Casrtro 2001, Marcucci 1995). Propolis it contains many minerals and trace elements, which concentration reflects the given region abundance with these chemical elements (Conti and Botrè 2001, Roman 1997). There is a close correlation between the level of heavy metals accumulation in soil and plants and their content in bee products (Kabata-Pendias and Pendias 1999, Roman

1997, Roša 2006, Roman 2009 and 2010). Therefore, only selected portions of propolis collected from bee are suitable for internal use by humans.

The aim of the study was to determine the accumulation degree of chosen toxic elements (arsenic, cadmium, copper, lead and zinc) in propolis collected from bee colonies in Opole area. Can propolis be used as an additive to food supplements?

MATERIAL A METHODOLOGY

The research material for the investigation were samples of propolis originated from stationary apiaries situated in Opole area. Material was collected from May-June to August 2010. Propolis samples originated from 3 bee colonies in 30 apiaries ($n=3 \times 30=90$). The individual samples were combined into one pooled sample weighting about 30 g, representative for the particular apiary. Propolis was collected directly from the hives, by scraping down with a sharp instrument from their wooden elements (walls and frames) to a clean plastic containers. The received samples were homogenized by freezing, fragmentation and mixing. The 2000 mg of material from each sample was weighted (with precision of 0.1 mg) and diluted with 20 ml of concentrated, spectrally pure, nitric acid solution produced by Merck company. Next, samples were mineralized using the microwave technique at an elevated pressure in the chip-type MD-2000 station manufactured by CEM-USA. Quantitative analysis of studied elements were conducted using Varian ICP-AES plasma spectrometer with mass detection controlled by P-3202 computer cooperating with Philips Scientific analytical combine (PU-7000 model), and CETAC-5000 AT ultrasonic nebulizer. Quantitative analysis were conducted in Analytical Laboratory of Wrocław University of Environmental and Life Science (Poland). The one-way analysis of variance (ANOVA) was performed to evaluate differences among groups. Mean concentrations of

elements, standard deviations and correlations between elements were calculated. Significance level was taken as $p \leq 0.05$ and $p \leq 0.01$.

RESULTS AND DISCUSSION

Toxicological status of propolis fully reflects the harmful compounds and toxic elements contamination of raw materials and the environment. The concentration of some toxic elements in the propolis samples is high variability. Numerous authors draw an attention to the fact that there is a high correlation between the concentration level of minerals in bee products and their content in an external environment (Barišic et al. 2002, Bayçu and Önal 1993, Conti and Botrè 2001, Leita et al. 1996, Rashed et al. 2009, Roša 2006). Present study demonstrated that propolis was contaminated with toxic elements. This is confirmed by numerous research of other authors, which showed high concentrations of heavy metals in the propolis (Conti and Botrè 2001, Cvek et al. 2008, Kulevanova et al. 1995) also claimed that propolis is much more contaminated with heavy metals than any other bee products. The study results are presented in Table 1. Very high level in this product was observed in the case of zinc, which averaged $55.79 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ and in individual samples ranged from 10.91 to $115.22 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$. The content of this element observed by Dogan et al. (2006) in propolis samples from different regions of Turkey was $176\text{-}676 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$. Cvek et al. (2008) demonstrated even the value of $9326 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$. In turn, the maximum copper content was determined as $18.32 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, and the average was $8.94 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$. Roman (1997) observed several times higher concentration of that metal in the propolis from the region of Głogów which ranged from 23.51 to $34.15 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, while Dogan et al. (2006) received higher value in the propolis from different regions of Turkey - an average of i.e. $45\text{-}96 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$. Lead is one of the most burdensome heavy metals in the environment. Its concentration was also high in propolis and reached an average level of $6.54 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ (maximum $18.29 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$). In other studies, Roman (2000) showed the mean level of lead concentration amounted to $18.39 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ in the propolis from Głogów and from Rudna area from $6.73\text{-}17.83 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ on average (Roman 2000). Similar results were obtained when examining the mean concentration of this element in propolis from the region of Opole ($6.62\text{-}13.63 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$). It can be thus concluded that lead concentration in propolis was high and relatively stable. The present study demonstrated that arsenic content in propolis amounted to $0.698 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ on

average, and in individual samples ranged from 0.007 to $1.806 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$. The average concentration of arsenic should be considered as a very high in the propolis. Very similar results were shown by Roman (1997) in propolis originating from the Opole and LGOM area, i.e. 0.561 and $0.670 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, respectively. This is most likely the result of a significant contamination of soils in the areas of metallurgical and chemical industries and extensive urban areas, where the accumulation of arsenic in the soil reaches up to $2500 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ (Kulevanova et al. 1995). Generally, the cadmium concentration in the examined bee product was the smallest and was an average of $0.203 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$. However, the dispersion of results was very wide from 0.006 to $0.811 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$. In earlier studies conducted by Roman (1997), lower levels of cadmium, ranged from 0.043 to $0.116 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, were observed in propolis originating from the region of the copper industry, but significantly higher in the product coming from the region of the cement industry - an average of 0.513 to $0.795 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$. Moreover, Roman (2000) noted higher cadmium content in the propolis from the Wałbrzych region ($0.260 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$).

The results of the present study and review of other authors results allow to conclude unequivocally that the level of toxic trace elements concentration in propolis depends on the state of environmental pollution in the area of the material sampling.

Only the copper average content in propolis did not exceed the maximum allowable standards (Polish Standard) (PN 1998), which is set at $10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$. In case of other elements mean values were significantly exceeded. It demonstrates that bee products show significant contamination level. Therefore, only selected portions of propolis can be used to produce natural medicines and dietary supplements for humans. Each lot of propolis intended for that purpose must be subjected to toxicological analysis.

CONCLUSION

In present study propolis has shown high contamination level by toxic elements. Zinc, lead and arsenic showed the highest level of concentration of studied elements in relation to current standards. The sequence of accumulation level of studied elements in propolis was as follows: $\text{Zn} \gg \text{Cu} > \text{Pb} > \text{As} > \text{Cd}$.

All portions of propolis should be subjected to toxicological testing before applying these samples for internal use as a dietary supplement.

Table 1 Concentration of chosen elements in bee propolis (N=90)

No. of sample	Chemical elements (in $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)				
	As	Cd	Cu	Pb	Zn
Minimum	0.007	0.006	1.09	0.39	10.91
Maximum	1.806	0.811	18.32	18.29	115.22
Average	0.698^A	0.203^B	8.94^C	6.54^D	55.79^E
SD	0.577	0.184	4.89	4.51	33.21
Variation coefficient in %	81.7	90.6	54.7	69.0	59.5
LOQ	≤ 0.001	≤ 0.01	≤ 0.01	≤ 0.100	≤ 0.001

A, B, C, D, E - differences between the elements assessed highly significant on a level of $p \leq 0.01$

REFERENCES

- BANKOVA, V. S, CASTRO S. L, MARCUCCI M. C. 2000. Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. In *Apidologie*, vol. 31, 2000, p. 3-15
- BARIŠIĆ, D., BROMENSHENK, J. J., KEZIĆ, N., VERTAĀNIK, A. 2002. The role of honey bees in environmental monitoring in Croatia. In *Honey Bees: Estimating the Environmental Impact of Chemicals*, p. 160-185.
- BAYÇU, G., ÖNAL, M. 1993. An Investigation of the Levels of Cadmium and Lead in the Soil and in the Leaves of Selected Specimens of *Ailanthus altissima* Found Growing Beside a Freeway in Istanbul. In *The Journal of Biology*, vol. 56, 1993, p. 21-34.
- BOGDANOV, S. 2006. Contaminants of bee products. In *Apidologie*, vol. 37, 2006, p. 1-18.
- CELLI, G., MACCAGNANI B. 2003. Honey bees as bioindicators of environmental pollution. In *Bulletin of Insectology*, vol. 56, 2003, p. 137-139.
- CHŁOPECKA, A., BACON, J. R., WILSON, M. J., KAY, J. 1996. Forms of cadmium, lead, and zinc in contaminated soils from southwest Poland. In *Journal of Environmental Quality*, vol. 25, 1996, p. 69-79.
- CONTI, M. E., BOTRĚ, F. 2001. Honeybees and their products as potential bioindicators of heavy metals contamination. In *Environmental Monitoring and Assessment*, vol. 69, 2001, p. 267-282.
- CVEK, J., MEDIĆ-ŠARIĆ, M., WITALI, D., VEDRINA-DRAGOJEVIĆ, I., SMIT, Z., TOMIĆ, S. 2008. The content of essential and toxic elements in Croatian propolis samples and their tinctures. In *Journal of Apicultural Research*, vol. 47, 2008, p. 35-45.
- DE CASRTRIO, S. L. 2001. Propolis: biological properties and pharmacological activities. Therapeutic uses of this bee-product. In *Annual Review Biomedical Sciences*, vol. 3, 2001, p. 49-83.
- DOGAN, M., SILICI, S., SARAYMEN, R., ILHAN, I. O. 2006. Element content of propolis from different regions of Turkey. In *Acta Alimentaria*, vol. 35, 2006, p.127-130.
- IANNOTTI, O., MINCIGRUCCI, G., BRICCHI, E., FRENGUELLI, G. 2000. Pollen viability as a bio-indicator of air quality. In *Aerobiologia*, vol. 16, 2000, p. 361-365.
- 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. *Biogeochemistry of vestigial elements*. PWN, Warszawa, 74-288.
- KULEVANOVA, S., STAFILOV, T., DOREVSKI, K. 1995. Determination of some macroelements in propolis by atomic absorption spectrometry. In *Acta Pharmaceutica*, vol. 45, 1995, p. 45-52.
- LEITA, L., MUHLBACHOVA, G., CESCO, S., BARBATTINI, R., MONDINI, C. 1996. Investigation of the use of honey bees and honey bee products to assess heavy metals contamination. In *Environmental Monitoring and Assessment*, vol. 43, 1996, p. 1-9.
- MARCUCCI, M. C. 1995. Propolis: Chemical composition, biological properties and therapeutic activity. In *Apidologie*, vol. 26, 1995, p. 83-99.
- PN-R-78891:1996 *Propolis - kit pszczeli*. Dz. U. Nr 139. poz. 300, 1998.
- RASHED, M. N., EL-HATY, M. T. A., MOHAMED, S. M. 2009. Bee honey as environmental indicator for pollution with heavy metals. In *Toxicological and Environmental Chemistry*, vol. 91, 2009, p. 389-403.
- ROMAN, A. 1997. Bees and their products as pollution bioindicator in the copper (LGOM) and lime-cement (Opole) industry areas. In *Scientific Exercise Books of Agricultural University in Wroclaw*, 323, p. 175-193.
- ROMAN, A. 2000. The study comparative contents Cd, Pb and Zn in honey, propolis and wax come from regions of Wałbrzych and Głogów. In *Apicultural Scientific Exercise Books*, Supplement No 1, p. 76-77.
- ROMAN, A. 2009. Concentration of Chosen Trace Elements of Toxic Properties in Bee Pollen Loads. In *Polish Journal of Environmental Studies*, vol. 18, 2009, no. 2, p. 265-272.
- ROMAN, A. 2010. Level of Copper, Selenium, Lead, and Cadmium in Forager Bees. In *Polish Journal of Environmental Studies*, vol.19, 2010, no. 3, p. 663-669.
- ROŠA, J. 2006. Tannins and microelements in the cells of silver fir tree needles (*Abies alba* Mill.) and the microelements in bee honey as indicators of the silver fir forests condition in the area of Gorski Kotar. In *Sumarski List*, vol. 130, 2006, p. 493-509.
- 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.

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-Pleban, 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

PHYSICOCHEMICAL PROPERTIES OF STARCH-MALTODEXTRIN AND STARCH-MALTODEXTRIN-GLUCOSE SYSTEMS

Joanna Sobolewska-Zielińska, Magdalena Grzelak, Teresa Fortuna

ABSTRACT

Starch is a widely used food additive. The addition of other ingredients changes the physical properties of resulting systems. The aim of this study was to investigate the rheological characteristics and susceptibility to retrogradation of starch-maltodextrin and starch-maltodextrin-glucose systems. Flow curves of 5% starch - maltodextrin and starch-maltodextrin-glucose pastes were tested by using rotational rheometer. The susceptibility to retrogradation of 2% pastes starch-maltodextrin and starch-maltodextrin-glucose systems by means of turbidimetric method was evaluated. It was found that all samples (systems) were a non-Newtonian, pseudoplastic fluids, with tend to the yield stress. Moreover addition of low and high DE maltodextrins and glucose to the starch caused a decrease in the values of shear stress throughout whole shear rate range. Starch pastes with greater concentration of the maltodextrins had less tendency to retrogradation. Also addition of glucose to starch-maltodextrin systems reduce the susceptibility to retrogradation.

Keywords: starch, maltodextrin, glucose, flow curves, retrogradation

INTRODUCTION

Both starch and maltodextrin have different functional properties. Alone it creates pastes with specific properties. However, by mixing the two substances, the obtained product may have different physicochemical properties. Maltodextrins are partially hydrolyzed starch products. They are commonly characterized by their degree of hydrolysis, expressed as the dextrose equivalent (DE), which is the percentage of reducing sugar calculated as dextrose on dry-weight basis (Marchal *et al.* 1999).

Starch and maltodextrin are commonly added to many food products, because they give specific characteristics to the final product, among others properties of stabilizers or thickeners the product. Interaction of these mixtures with other food ingredients are not exactly known, and therefore this kind of research is carried out.

The aim of this study was to investigate the rheological properties of starch systems with commercial low and high DE maltodextrins and glucose.

MATERIAL A METHODOLOGY

The material consisted of potato starch (from „PEPPEES S.A.” Łomża, Poland), low DE (DE=10,7) and high DE (DE=23,9) maltodextrins (from „PEPPEES S.A.” Łomża, Poland) and glucose (POCh Gliwice, Poland).

The study was carried out on systems: 90% S + 10% ML; 90% S + 10% MH; 80% S + 20% ML; 80% S + 20% MH; 70% S + 30% ML; 70% S + 30% MH; 89% S + 10% ML + 1% G; 89% S + 10% MH + 1% G; 79% S + 20% ML + 1% G; 79% S + 20% MH + 1% G; 69% S + 30% ML + 1% G; 69% S + 30% ML + 1% G, where S – mean starch, ML – low DE maltodextrin, MH – high DE maltodextrin, G- glucose and number- participation of component in pastes.

In this paper the symbol MD labeled maltodextrin (low and high DE together).

By means of turbidimetric method, according to Jacobson (1997), the susceptibility to retrogradation of 2% pastes starch with maltodextrin and pastes starch-maltodextrin-glucose was evaluated. The studies were performed at 4 and 20°C.

The rheological measurements of the samples (5% pastes) were carried out with the rotational rheometer Rheolab MC1 (Physica, Germany). The coaxial cylinder (cup diameter: 27,12 mm, bob diameter 25 mm) were used as a measuring system. The flow curves at the temperature 50±1°C were obtained in the range of sheare rate from 1-500s⁻¹ by 3 minutes; next samples were obtained in constans of sheare rate 500s⁻¹ by 2 minutes, and finally pastes were obtained in the range of sheare rate from 500-1s⁻¹ by 3 minutes. The control of the rheometer were carried out using US 200 software (Physica, Germany).

RESULTS AND DISCUSSION

Retrogradation of gelatinized starch is a reorganization process which changes mainly in the structure of amylose. This phenomenon is often unfavorable in the food industry.

In this study differences in the initial turbidities of the analysed systems S-MD and S-MD-G both in 4°C i 20°C were observed. Higher the initial turbidities characterized samples with content of maltodextrin low and high DE. Samples containing 90% starch already on the 3rd day of storage showed a significant increase in turbidance, which subsequently continued to grow significantly during next days. Until on 7th day it was observed a slight increase in turbidance for samples with 20% and 30% maltodextrin (fig.1.). In studies Sobolewska-Zielińska and Fortuna (2010) it was concluded that the addition of low levels of maltodextrins to food products may prevent the retrogradation of starch to some extent.

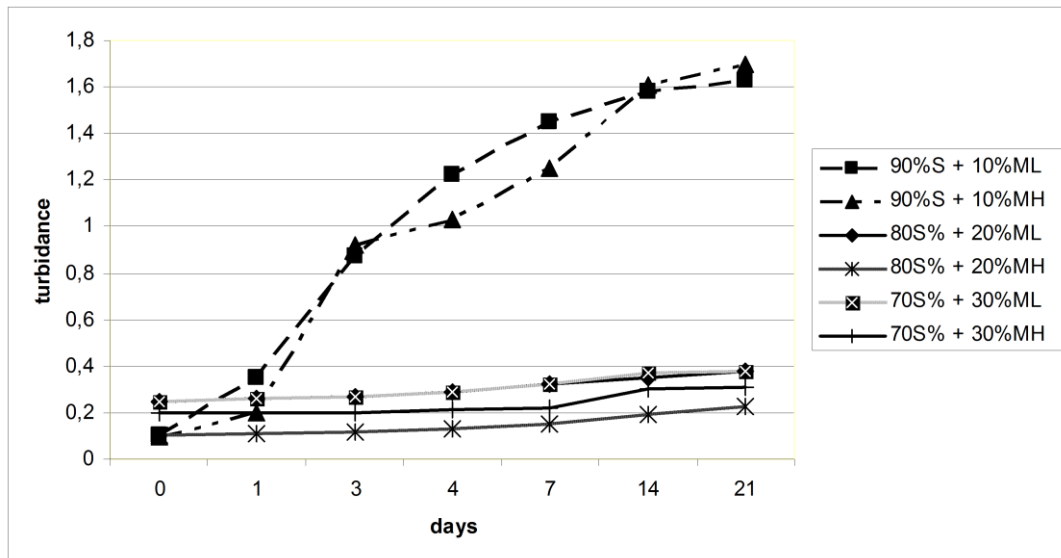


Figure 1 The susceptibility of systems S-ML and S-MH to retrogradation at 4°C

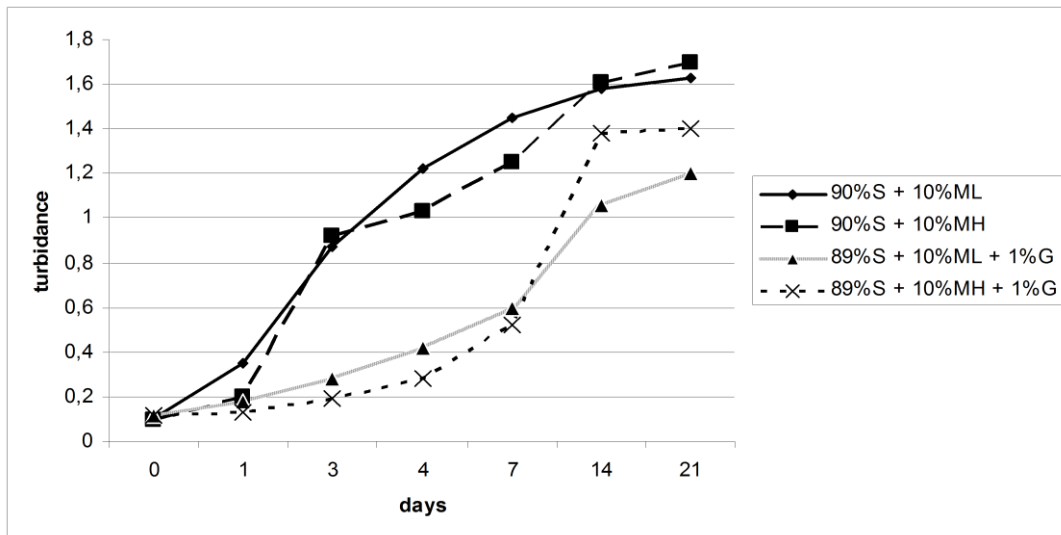


Figure 2 The susceptibility of systems S-ML and S-MH with and without glucose to retrogradation at 4°C

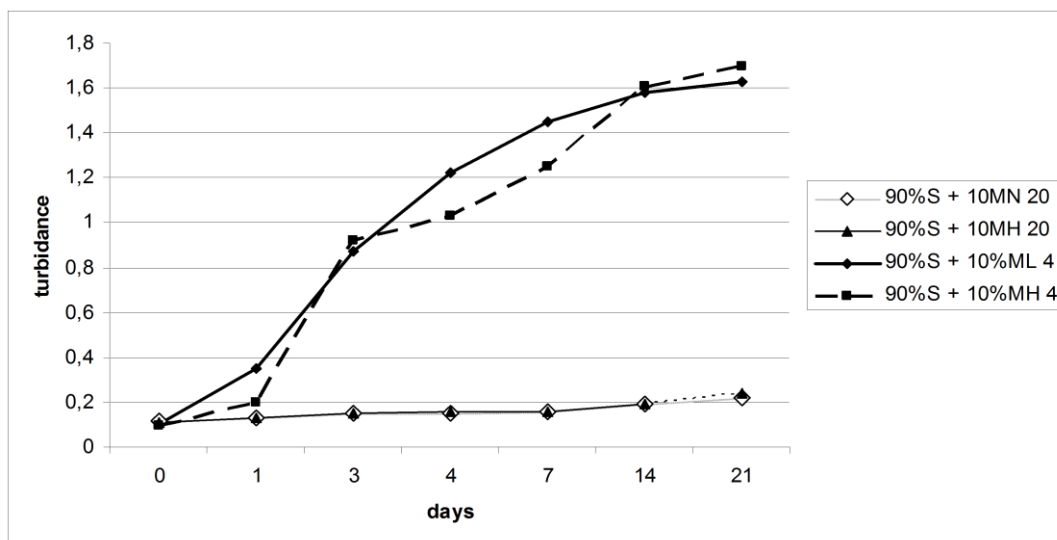


Figure 3 The susceptibility of systems S-ML and S-MH with and without glucose to retrogradation at 4°C and 20°C

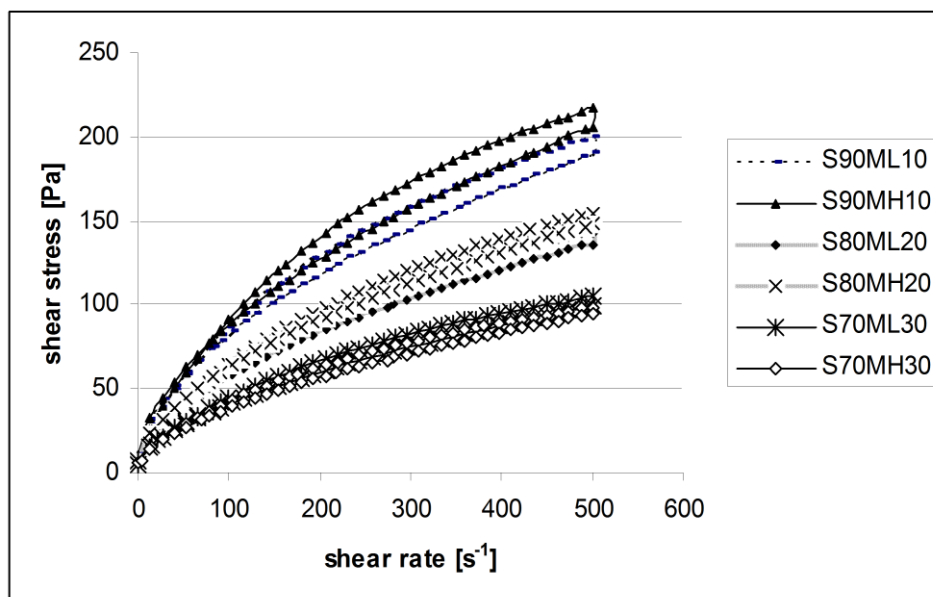


Figure 4 Flow curves of pastes starch with low and high DE maltodextrins

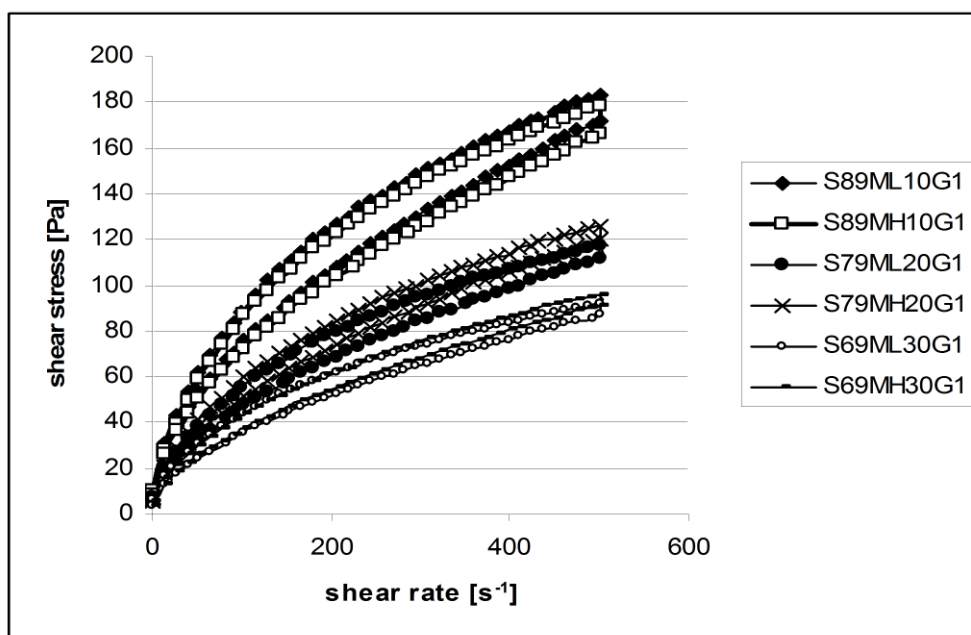


Figure 5 Flow curves of pastes starch with low and high DE maltodextrins and glucose

Addition of 1% glucose resulted in reduction of turbidance of systems S-MD. The increase in turbidance on days 1-7 was not so fast as for samples without glucose. Turbidance on the last day of the test (21 days) of samples with the addition of glucose was also significantly lower than for samples without additive glucose. This is shown in figure 2 for pastes of systems 89%S+10%MH+1%G and 89%S+10%ML+1%G. Studies of other authors indicate, that sugars (glucose, fructose, maltose) inhibit retrogradation of rice and potato starch (Chang & Liu 1991, Katsuta et al. 1992).

The most common flavors that are added to starch products are sucrose, glucose, lactose or fructose. The addition of these substances affects the viscoelastic properties of starch. Viscoelasticity of starch pastes greatly

depends on the origin of starch, starch concentration and kind of sweet substances (Hirashima et al. 2005). The results of measurements of rheological properties of 5% pastes S-MD and S-MD-S was shown in figure 4 and 5. All tested pastes were non-Newtonian, pseudoplastic fluids with yield stress. This character is typical of starch pastes, which is confirmed by studies on natural starch and modified starch (Al-Malah et al. 2000, Gruchala et al. 2000, Yoo & Yoo 2005). With the increasing participation of low-DE and high DE maltodextrins in pastes S-MD system shear stress values gradually decreased. The highest values of shear stress at the maximum shear rate it was observed for the system with the highest content of starch 90%S+10%ML i 90%S+10%MH (fig. 4.). Systems with the addition of ML and MH (in the same

concentration) differed slightly from each other in the whole range of shear rates.

Addition of 1% glucose contributed to the further reduction of the shear stress for system S-ML and S-MH. These conclusions are confirmed by the literature data (Fortuna and Galkowska 2006). The lowest values of this parameter in the whole range of shear rates were observed for samples 69%S+30ML+1%G and 69%S+30MH+1%G (fig.5.).

CONCLUSION

1. Starch pastes with greater percentage share of the maltodextrins had less tendency to retrogradation.
2. Addition of glucose to starch-maltodextrin systems slowed down the process of retrogradation.
3. The most susceptible to retrogradation S-MD and S-MD-G pastes were these with the largest percentage of share starch and stored at 4°C. The pastes stored at 20°C did not reach as high turbidance as pastes stored at 4°C.
4. All tested samples were a non-Newtonian, pseudoplastic fluids, with tend to the yield stress.
5. Addition of maltodextrins and glucose to the systems caused a decrease in the values of shear stress throughout whole shear rate range.

REFERENCES

- AL-MALAH, K. I., AZZAM, M. O. J., ABU-JDAYIL, B. 2000. Effect of glucose concentration on the rheological properties of wheat-starch dispersion. In *Food Hydrocoll.*, vol. 14, 2000, no. 5, p.491-496.
- CHANG, S. M., LIU, L-CH.1991. Retrogradation of rice starches studied by differential scanning calorimetry and influence of sugars, NaCl and lipids. In *J Food Sci.*, vol. 56, 1991, p. 564-566.
- FORTUNA, T., GAŁKOWSKA, D. 2006. Wpływ dodatku sacharydów na właściwości reologiczne skrobi modyfikowanych. In *Żywność, Technologia, Jakość*, vol. 49, no. 4, 2006, p. 5-17.
- GRUCHAŁA, L., BALCEREK, W., BĄKOWSKA, M. 2000. Badania właściwości reologicznych modyfikatorów skrobiowych. In *Żywność, Technologia, Jakość*, vol. 25, supl. 2000, no. 4, p. 99-108.

HIRASHIMA, M., TAKAHASHI, R., NISHINARI, K., 2005. Changes In the viscoelasticity of maize starch pastes by adding sucrose at different stages. In *Food Hydrocoll.*, vol. 19, 2005, p. 777-784.

JACOBSON, M. R., OBANNI, M., BEMILLER, J. N. 1997. Retrogradation of starches from difrent botanical sources. In *Cereal Chem.*, vol. 74, 1997, no. 5, p. 511-517;

KATSUTA, K., NISHIMURA, A. 1992. MIURA, M.: Effects of saccharides on stabilities of rice starch gels. II Oligosaccharides. In *Food Hydrocoll.*, vol. 6, 1992, no. 4, p. 387-398.

LU, T. J., JANE J., KESLING P. L.. 1997. Temperature effect on retrogradation rateand crystalline structure of amylose. In *Carbohydr. Polym.*, vol. 33, 1997, p. 19-26.

MARCHAL, L. M., BEEFTINK, H. H., TRAMPER, J. 1999. Towards a rational design of commercial maltodextrins. In *Trends in Food Science & Technology*, vol. 10, 1999, p. 345-355

SOBOLEWSKA-ZIELIŃSKA, J., FORTUNA, T. 2010. Retrogradation of starches and maltodextrins of various origin, In *Acta Sci. Pol., Technol. Aliment.*, vol. 9, 2010, no. 1, p. 71-81.

YOO D., YOO, B. 2005. Rheology of rice starch-sucrose composites. In *Starch*, vol. 57, 2005, no. 6, p. 254-261.

Contact address:

Joanna Sobolewska-Zielińska, University of Agriculture, Department of Food Analysis and Quality Assessment, Balicka Street 122, 30-149 Krakow, Poland, E-mail: rrsobole@cyf-kr.edu.pl

Magdalena Grzelak, University of Agriculture, Department of Food Analysis and Quality Assessment, Balicka Street 122, 30-149 Krakow, Poland, E-mail:zelka9@op.pl

Teresa Fortuna, University of Agriculture, Department of Food Analysis and Quality Assessment, Balicka Street 122, 30-149 Krakow, Poland. E-mail: rrfortun@cyf-kr.edu.pl

ASSESSMENT OF FAT QUALITY DURING STORAGE CHICKEN MEAT

Jana Tkáčová, Mária Angelovičová

ABSTRACT

The aim of study was assessment of fat quality in chicken meat during storage. The experiment verified the quality of fat as the fat acid number. The experiment was performed on the final fattening type of chickens ROSS 308. Chickens were fed by 2% lucerne meal in feed mixture. The carcass was stored in a freezer box at -18 °C after killing. Fat analysis was carried out after 12 and 15 months of storage. Acid number after 12 months storage was ranged from 5.97 to 8.39 mg KOH.g⁻¹ fat, after 15 months, was ranged from 3.26 to 7.80 mg KOH.g⁻¹ fat. The differences between values of acid number and storage periods of chicken meat (12 and 15 months) was statistically significant ($P \leq 0.05$). The results indicate a tendency for increased intensity fat the oxidation processes depending on storage length chicken meat. We recommend to assessment other indicators of chemical changes for example peroxide value for confirmation the hypothesis.

Keywords: acid number, fat, storage, broiler chicken

ÚVOD

Produkcia a predaj jatočnej hydiny má na Slovensku vzrastajúci trend, pričom v spotrebe sa zaraďuje hneď za bravčové mäso (Benková et al., 2005). Za hlavné akostné znaky hydínového mäsa sa považujú jeho chemické zloženie a pomer svalov k tuku v jatočne opracovanom tele (Matušovičová, 1986). Tuk zohráva v mäse dôležitú úlohu, nakoľko je z hľadiska senzorických vlastností veľmi dôležitý a je zdrojom mnohých aromatických látok ovplyvňujúcich hlavne chuť (Pipek, 2000).

Obsah lipidov v hydínovom mäse závisí najmä od druhej príslušnosti, ale tiež od veku, spôsobu výživy, plemena, pohlavia, pôvodu anatómie svalov a pod. (Benková et al., 2005; Klíma, 1996). Kvalitu hydínového mäsa ovplyvňuje genotyp zvieratá, výživa, vek, chovateľské prostredie a rôzne ďalšie extra a intravitálne činitele (Haščik et al., 2005). Obsah a zloženie tukov, ako aj produkty ich metabolizmu ovplyvňujú aromatické a chuťové vlastnosti mäsa (Mottram, 1998). Tukové zložky vystupujú ako nosič chute, pričom postačí iba 1-2 % z celkovej hmotnosti, aby bola táto funkcia splnená (Winkelmayer et al., 2005). Kurací tuk, ako uvádza Velíšek (1999), obsahuje 27-30 % nasýtených mastných kyselín, 42-47 % mono-énových mastných kyselín (nenasýtené s jednou dvojitou väzbou) a 20-24 % polyénových mastných kyselín (nenasýtené s niekoľkými dvojitými väzbami). V depotnom tuku (tuk ukladajúci sa v podkožnom tkanive a obalujúci vnútorné orgány) úžitkových vtákov je obsah nasýtených mastných kyselín nižší. Voľné mastné kyseliny, ktoré vznikli hydrolýzou lipidov za katalytického pôsobenia hydroláz sa vyskytujú v rastlinných a živočíšnych organizmoch len v malom množstve (Velíšek, 1999).

MATERIÁL A METÓDY

Skupinový kŕmny pokus sme uskutočnili na komerčnej hydínovej farme pre výkrm 24000 ks kurčiat na hlboké podstielke. Pre kŕmny pokus sme použili finálny hybrid

kurčiat Ross 308 určený na produkciu mäsa. Na začiatku haly sme vyčlenili priestor pre umiestnenie 100 ks jednodňových kurčiat. Kurčatá boli kŕmené 38 dní komerčnými kŕmnymi zmesami, do ktorých sme použili 2 % lucernej múčky. Príprava kŕmnych zmesí v práškovej štruktúre bola v súlade so zákonom o kŕmnych zmesiach č. 440/2006 Z.z.. Kurčatá skrmovali kŕmnu zmes HYD-01 (štartérovú) od 1. do 18. dňa veku, HYD-02 (rastovú) od 19. do 31. dňa veku a HYD-03 (finálnu) od 32. do 38. dňa veku *ad libitum*. Lucernová múčka obsiahnutá v kŕmnej zmesi bola vyrobená sušením a mletím z vňate lucernej siatej (*Medicago sativa*), pričom zber lucernej sa uskutočnil v štádiu tvorby pukov.

Jatočnú rozrábku sme uskutočnili na Katedre hodnotenia surovín živočíšneho pôvodu FBP SPU v Nitre. Jatočné telá hydiny sme uskladnili pri -18 °C a zabalili do mikroténových obalov. Analýzy sme vykonali po 12 mesiacoch a 15 mesiacoch skladovania, kde vzorka pre analýzu bola zložená z rovnakého podielu prsnej a stehrovej svaloviny a približne z 1 cm² kože s podkožným tukom. Vzorky mäsa aj s kožou a podkožným tukom sme najprv vysušili, z ktorých sme následne vyextrahovali tuk pomocou prístroja Det Gras N Selecta P. Z takto získaného tuku sme stanovili číslo kyslosti.

Číslo kyslosti tuku sme stanovili po rozpustení extraktu - tuku v zmesi etanol-dietyléter v pomere 1:1 alkalimetrickou titráciou na fenolftaleín. Extrakčnú banku s vyextrahovaným tukom sme mierne zahriali a tuk sme rozpustili v 25 ml zmesi etanol-dietyléter. Obsah extrakčnej banky sme po pridaní niekoľkých kvapiek indikátora titrovali odmerným roztokom hydroxidu draselného až do vzniku slabozložového sfarbenia titrovaného roztoku. Číslo kyslosti tuku sme vyjadrili ako spotrebu mg KOH.g⁻¹.

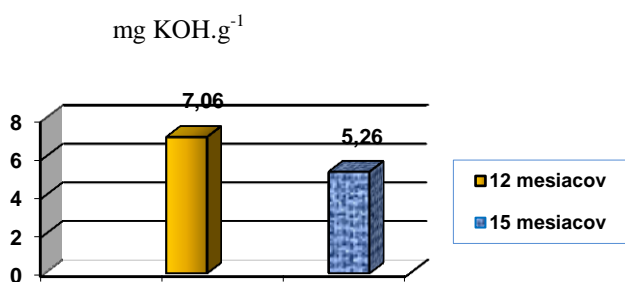
Matematicko-štatistické vyhodnotenie výsledkov sme vykonali v programe SAS, kde sme sledovali základné matematické charakteristiky (aritmetický priemer,

smerodajnú odchýlku, variačný koeficient) a na určenie preukaznosti rozdielov sme použili t-test.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Hodnoty čísla kyslosti boli po 12 mesiacoch uskladnenia v rozpätí 5,97 až 8,39 mg KOH.g⁻¹ tuku. Po ďalších troch mesiacoch, t.j. po 15 mesiacoch skladovania mäsa sme znova vykonali analýzu tuku, kde sme zistili číslo kyslosti v rozpätí 3,26 až 7,80 mg KOH.g⁻¹ tuku.

Priemerná hodnota čísla kyslosti tuku v závislosti od doby skladovania sa pohybovala pri 12 mesiacoch skladovania kurčacieho mäsa pri teplote -18 °C od usmrtenia kurčiat na úrovni 7,06 mg KOH.g⁻¹ a o tri mesiace neskôr, t.j. po 15 mesiacoch skladovania kurčacieho mäsa pri -18 °C od usmrtenia kurčiat bolo číslo kyslosti tukov 5,26 mg KOH.g⁻¹.



Obr. 1 Priemerné číslo kyslosti tuku v závislosti od doby skladovania mäsa (mg KOH.g⁻¹ tuku)

Na základe výsledkov štatistickej charakteristiky sme zistili nižšie kolísanie hodnôt čísla kyslosti tuku pri dobe skladovania kurčacieho mäsa od usmrtenia kurčiat 12 mesiacov ($s = 0,89$ mg KOH.g⁻¹ a $v_k = 12,55$ %) oproti hodnotám čísla kyslosti tuku pri dobe skladovania kurčacieho mäsa 15 mesiacov od usmrtenia brojlerových kurčiat ($s = 1,77$ mg KOH.g⁻¹ a $v_k = 33,57$ %). Rozdiel v hodnotách čísla kyslosti medzi dĺžkou skladovania kurčacieho mäsa 12 a 15 mesiacov pri -18 °C bol štatisticky preukazný ($P \leq 0,05$).

Voľné mastné kyseliny vznikajú sekundárnym enzymatickým štiepením triacylglycerolov, ktorých množstvo býva vyššie v tukoch z nevhodne skladovaných a manipulovaných surovín (Koman et al., 1989).

Houška et al. (1956) uvádzajú, že kurací tuk obsahuje 35-38 % kyseliny olejovej, 25-30 % kyseliny palmitovej, 20-22 % kyseliny linolovej, 6-8 % kyseliny palmitolejovej, 5-7 % kyseliny stearovej a v malom množstve kyselinu myristovú. Naproti tomuto tvrdeniu uvádza obsah mastných kyselín Velíšek (1999) nasledovne: kyselina laurová 0,1 %, kyselina myristová 0,9 %, kyselina

palmitová 22 %, kyselina palmitolejová 6 %, kyselina stearová 6 %, kyselina olejová 37 %, kyselina linolová 20 %, kyselina linolenová 1 %, kyselina eikosenová 1 %. Uvedené podiely uvádza z celkového množstva mastných kyselín.

Hydrolyza prebieha ľahšie v tukoch, ktoré obsahujú nenasýtené mastné kyseliny a mastné kyseliny s krátkym reťazcom (Choe a Min, 2007), pričom kurací tuk podľa Velíška (1999) obsahuje 62 až 71 % nenasýtených kyselín.

Hydrolytická degradácia tukovej zložky je prezentovaná vo všeobecnosti vyššími hodnotami čísla kyslosti tukov (Sopková et al., 2007).

Číslo kyslosti tuku poukazuje na množstvo látok kyslej povahy, prevažne voľných karboxylových kyselín.

Pri skladovacích teplotách dochádza k zmenám prakticky iba pri nenasýtených mastných kyselinách (Min et al., 1989).

Karboxyl voľných mastných kyselín môže urýchľovať rozklad hydroperoxidov a môže reagovať s niektorými oxidačnými produktmi. Pri skladovaní alebo spracovaní potravín sú vytvorené také podmienky, ktoré umožňujú autooxidáciu mastných kyselín. Pri bežných teplotách so vzdušným kyslíkom oxidujú iba nenasýtené mastné kyseliny. Pri nenasýtených mastných kyselinách je odštiepenie vodíka pomerne ľahké, aspoň vodíka z metylovej skupiny, ktorá susedí s dvojitou väzbou. Ešte menej energie je potrebnej k odštiepeniu vodíka z diénových a triénových mastných kyselín (Velíšek, 1999).

Rýchlosť oxidácie je daná stupňom nenasýtenosti reťazca mastných kyselín. Kyselina linolová je oxidovaná 64krát rýchlejšie ako kyselina olejová a oxidácia kyseliny linolenovej prebieha až 100krát rýchlejšie ako pri kyseline olejovej (Allen a Hamilton, 1994).

Výnos MP SR a MZ SR č. 1895/2004-100, ktorým sa vydáva hlava Potravinového kódexu Slovenskej republiky upravujúca mäsové výrobky iba definuje pojem tukové tkanivo, pričom je to tkanivo obsahujúce tuk, ktoré je oddelené od mäsa alebo pochádza z telových dutín jatočných zvierat a hydiny, ale nie z čriev a okružia. Zákon však nestanovuje jeho kvalitatívne parametre.

Nariadenie vlády č. 286/2003 o požiadavkách v záujme ochrany zdravia ľudí pri výrobe a uvádzaní na trh mäsových výrobkov a určitých ostatných produktov živočíšneho pôvodu, resp. Nariadenie európskeho parlamentu a rady (ES) č. 853/2004, ktorým sa ustanovujú osobitné hygienické predpisy pre potraviny živočíšneho pôvodu rieši obsah voľných mastných kyselín škvarného živočíšneho tuku (hovädzí loj, bravčová masť, ostatné živ. tuky).

Napriek týmto legislatívnym úpravám, ani jedna nepojednáva o číse kyslosti tuku hydínového mäsa či už v čerstvom alebo mrazenom stave.

Tabuľka 1 Číslo kyslosti v závislosti od doby skladovania mäsa (mg KOH.g⁻¹ tuku)

Doba skladovania	1. vzorka	2. vzorka	3. vzorka	4. vzorka	5. vzorka	6. vzorka
12 mesiacov	6,22	7,55	5,97	8,39	7,22	7,02
15 mesiacov	3,26	4,0	7,8	4,97	4,56	6,99

Tabuľka 2 Matematicko-štatistické vyhodnotenie čísla kyslosti tuku v závislosti od doby skladovania mäsa

Skupina	n	s	v_k	t-test $P_{0,05}$
12 mesiacov	6	0,89	12,55	2,23 ⁺
15 mesiacov	6	1,77	33,57	

n – početnosť, s – smerodajná odchýlka, v_k – variačný koeficient, t-test: ⁺ $P \leq 0,05$

ZÁVER

Na základe výsledkov experimentu môžeme konštatovať, že po 12 mesiacoch skladovania kurčacieho mäsa pri -18 °C bola hodnota čísla kyslosti tukov 7,06 mg KOH.g⁻¹ a po 15 mesiacoch skladovania mäsa 5,26 mg KOH.g⁻¹. Z výsledkov je možné predpokladať tendenciu zvýšenia intenzity oxidačných procesov tuku v závislosti od dĺžky skladovania kurčacieho mäsa.

Pre potvrdenie vyslovenej hypotézy odporúčame sledovanie aj ďalších ukazovateľov chemických zmien tuku vrátane peroxidového čísla, resp. TBA a tiež sledovanie čísla kyslosti po dlhšom skladovaní.

LITERATÚRA

- ALLEN, J. C., HAMILTON, R. J. 2007. *Rancidity in Foods*. Springer, 1994. ISBN 0-8342-1287-0.
- BENKOVÁ, J., BAUMGARTNER, J., HETÉNYI, L. 2005. Hydínové mäso – významná zložka racionálnej výživy obyvateľstva. In *Realizácia komplexného programu ozdravenia výživy obyvateľstva SR – využitie nutričných poznatkov v primárnej a sekundárnej prevencii neinfekčných chorôb*. Nitra: SAPV, no. 49, 2005, p. 31-32. ISBN 80-89162-18-5.
- HAŠČÍK, P., ČUBOŇ, J., HORŇIAKOVÁ, E., KRIVÁNEK, L., KULÍŠEK, V. 2005. Vzťah medzi aplikáciou probiotického preparátu a množstvom abdominálneho tuku u výkrmových kurčiat. In *Agriculture (Poľnohospodárstvo)*, vol. 51, 2005, no. 11, p. 574-579.
- HOUŠKA, J., KACOVSKÝ, J., KALINA, R. et al. 1956. *Kniha o hydine*. 1. vyd. Bratislava SVPL, 1956. 608 p.
- CHOE, E., MIN, D. B. 2007. Chemistry of Deep-Fat Frying Oils. In *Journal of Food Science*, vol. 72, 2007, no. 5, p. 1-12.
- KLÍMA, D. 1996. Animal fats. In *Meat*, vol. 6, 1996, p. 3-5.
- KOMAN, V., HOJEROVÁ, J., SCHMIDT, Š. 1989. *Chémia a technológia tukov I*. Bratislava SVŠT, 1989, p. 150, ISBN 80-227-0108-4.
- MATUŠOVIČOVÁ, E. 1986. *Technology of Poultry Production*. In *Príroda* : Bratislava. 1986, 393 p.

MIN, D. B., SMOUSE, H., CHANG, S. S. 1989. *Flavor Chemistry of Lipid Foods*. The American Oil Chemists Society, Champaign. 1989, p. 462, ISBN, 0935315241.

MOTTRAM, D. S. 1998. Flavour formation in meat and meat products; a review. In *Food Chemistry*, vol. 62, 1998, p. 415-424.

PIPEK, P. 2000. Kvalitní hovězí maso z technologického a spotřebitelského hlediska. In *Maso*, vol. 11, 2000, no. 3, p. 18-22.

SOPKOVÁ, D., STANÍKOVÁ, A., PÁSTOROVÁ, B. 2007. Analýza produktov degradácie lipidov v tukovom tkanive ošipáných. In *VII. Celoslovenský seminár z fyziológie živočíchov*. Topoľčianky - Nitra: SPU, 2007, p. 298-302. ISBN 978-80-8069-886-7.

VELÍŠEK, J. 1999. *Chemie potravin*. 1.vyd. Tábor OSSIS. 1999, 352 p, ISBN 80-902391-3-7.

WINKELMAYER, R., LEBERSORGER, P., ZEDKA, H. F., FOREJTEK, P., VODŇANSKÝ, M., VEČEREK, V., MALENA, M., NAGY, J., LAZAR, P. 2005. *Hygiena zvěřiny*. Wien-Brno-Nitra: Středoevropský institut ekologie zvěře. 2005, 168 p.

Výnos MP SR a MZ SR č. 1895/2004-100 z 18. augusta 2005, ktorým sa vydáva hlava Potravinového kódexu Slovenskej republiky upravujúca mäsové výrobky

Nariadenie vlády č. 286/2003 z 9. júla 2003 o požiadavkách v záujme ochrany zdravia ľudí pri výrobe a uvádzaní na trh mäsových výrobkov a určitých ostatných produktov živočíšneho pôvodu.

Nariadenie európskeho parlamentu a rady (ES) č. 853/2004, z 29. apríla 2004, ktorým sa ustanovujú osobitné hygienické predpisy pre potraviny živočíšneho pôvodu.

Acknowledgments:

This work was supported by grant VEGA no. 1/0007/11

Contact address:

Ing. Jana Tkáčová, Slovak University of Agriculture, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Department of Food Hygiene and Safety, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Tel.: +421/37/6415826, E-mail:tkacova.jt@gmail.com

prof. Ing. Mária Angelovičová, CSc., Slovak University of Agriculture, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Department of Food Hygiene and Safety, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovakia, Tel.: +421/37/6415805, E-mail: maria.angelovicova@uniag.sk

OCCURRENCE OF SOME PATHOGENITY FACTORS IN COAGULASE NEGATIVE STAPHYLOCOCCI ISOLATED FROM MASTITIS MILK IN DAIRY COWS

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

ABSTRACT

Experiment we carried out on the herd of 115 Slovak Pied dairy cows. Were realized three collections of individual milk samples for isolation and identification of coagulase-negative staphylococci (CNS). We collected 341 milk samples. Coagulase-negative staphylococci were isolated in 18.8 % (64). Highest number of CNS we isolated from acute, subclinical, subacute and latent forms of mastitis, respectively. *S. warneri* (2.88 %), *S. chromogenes* (17.19 %), *S. cohnii* (15.63 %) and *S. xylosus* (14.06 %) was isolated in highest percentage. Was detected presence of 7 virulence factors, include production of staphylococcal enterotoxins, and resistance for antibiotics. *S. chromogenes*, *S. warneri* and *S. xylosus* were detected as most virulent species carrying most virulence factors, and were resistant for most species of tested antibiotics (*S. xylosus* resistant for N, NV, L, P, E; *S. chromogenes*, *S. sciuri* for 4 species of antibiotics). There pathogens were isolated from acute forms of mastitis. This work resulted, that CNS with some virulence factors and multiple resistance, are very important in pathogenesis of mastitis in dairy cows.

Keywords: mastitis, dairy cows, coagulase negative staphylococci, virulence factors

ÚVOD

Koaguláza negatívne stafylokoky (KNS) sú považované za minoritné patogény pri mastitídach dojníc, avšak pribúdajú práce autorov, ktorí zdôrazňujú ich význam pri vzniku zápalov mliečnej žľazy (Pyörälä & Taponen, 2009; Čapla et al., 2008; Zajác et al., 2004; Zajác et al., 2008). K rozšíreniu ich výskytu v chovoch dojníc dochádza po redukcii výskytu hlavných patogénov, pričom sa uplatňujú tie KNS, ktoré sa vyznačujú zvýšenou rezistenciou voči bežne používaným antibiotikám a dezinfekčným látkam (Moniri et al., 2007). V porovnaní so *S. aureus* majú KNS spravidla nižšie zastúpenie faktorov virulencie, avšak ich podstatným faktorom patogenity je produkcia biofilmu (Otto, 2005). Melchior et al., (2006) udávajú, že nie len *S. epidermidis*, ale aj iné druhy dokážu vzdorovať uplatňovaným postupom dezinfekcie a sanitácie. Okrem toho vo svojej štúdií Nascimento et al. (2005) potvrdili u *S. epidermidis*, *S. saprophyticus*, *S. hominis* a *S. aerletae*, ktoré izolovali z mastitíd kráv aj schopnosť produkovať niektoré z bakteriocínov. Haveri et al. (2008) považujú schopnosť tvoriť stafylokokové enterotoxíny za dôležitý faktor virulencie, ktorý je zodpovedný za vznik klinických mastitíd. Podľa ďalších prác k významným faktorom virulencie patrí produkcia hemolýzínov, leukocidínu, termonukleázy, hyaluronidázy a lipázy (Kuroda et al., 2007). Avšak, žiaden z faktorov alebo ich kombinácia neboli doteraz v patogenéze mastitíd jednoznačne označené ako rozhodujúce (Ebrahimi et al., 2009).

Cieľom práce bolo sledovať výskyt druhov koaguláza negatívnych stafylokokov pri jednotlivých formách mastitíd dojníc a prítomnosť ich vybraných faktorov patogenity podmienujúcich intenzitu zápalu.

MATERIÁL A METÓDY

Počas roka boli uskutočnené 3 komplexné vyšetrenia (klinické vyšetrenie vemená, vyšetrenia mlieka NK–testom a bakteriologické vyšetrenie) v stáde 115 dojníc (plemena slovenský strakatý dobytok). Z 341 individuálnych vzoriek mlieka bolo 65,6 % (229) pozitívnych. Celkom 64 (18,8 %) baktérií *Staphylococcus spp.* spôsobovalo rôzne formy mastitíd dojníc. Baktérie *Staphylococcus spp.* sme identifikovali (setom STAPHYtest 24, Pliva-Lachema, Brno, ČR), vyšetřili na prítomnosť vybraných faktorov virulencie (tvorbu hemolýzínov α , β , δ , DNA-zy, želatinázy a biofilmu) a génov kódujúcich stafylokokové enterotoxíny (*sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*) metódou PCR. DNA bola separovaná QiAMP tissue kit-om (QIAGEN, Hilden, Germany). Pre PCR metódu boli použité referenčné kmene produkujúce typ SEA až SEE (Bergdoll; CNCTC, Brno) a komerčné oligonukleotidové primery. Kmene s potvrdeným génom sme testovali na produkciu SE *in vitro* (súpravou Ridascreen® Set A,B,C,D,E, R-Biopharm AG, Darmstadt, Nemecko). Všetky baktérie *Staphylococcus spp.* boli *in vitro* otestované na citlivosť voči 14 antibiotikám na Mueller-Hinton agare diskovou metódou (NCCLS, 2002). Koncentrácie antibiotík v diskoch: Ampicilin (10 μ g); Amoxycilin (25 μ g); Cloxacilin (5 μ g); Cefaperazone (30 μ g) Erythromycin (10 μ g); Linkomycin (15 μ g); Neomycin (10 μ g); Novobiocin (5 μ g); Penicillin (10 U); Streptomycin (10 μ g); Ampicilin/Sulbactam (10 μ g); Oxacilin (5 μ g); ; Cephalotin (30 μ g) Tetracyklin (10 μ g) (Oxoid, Anglicko). Baktérie boli následne posudzované ako rezistentné, citlivé alebo s medzihraničnou citlivosťou podľa referenčných zón uvádzaných výrobcou diskov.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

V rámci troch vyšetrení stáda 115 dojníc, celkový bakteriologický nález vyšetrení 341 individuálnych vzoriek mlieka predstavoval 65,6 % (229). Koaguláza negatívne stafylokoky (KNS) mali podstatné zastúpenie 18,8 % (64). Celkové výsledky experimentu sú uvedené v tabuľke. Bolo izolovaných 12 druhov KNS, pričom ako najpočetnejšie druhy boli zaznamenané: *S. warneri* (21.88 %), *S. chromogenes* (17.19 %), *S. cohnii* (15.63 %) a *S. xyloso* (14.06 %).

Podiel jednotlivých KNS na formách mastitíd bol značne rozdielny. Najviac sa vyskytovali prípady akútnej mastitídy (29), ktorá bola spôsobená hlavne *S. cohnii* (7), *S. warneri* a *S. xyloso* (5). Subakútna bola zistená v 13 prípadoch a spôsobená v prevažnej miere *S. chromogenes* (5) a *S. warneri* (4). Pri subklinickej forme mastitídy (14) boli prevažne izolované *S. xyloso* (4) a *S. warneri* (3). Na latentných mastitídach (8) sa podieľali *S. warneri* a *S. haemolyticus* (2). Pre porovnanie našich výsledkov **Pyörälä & Taponen (2009)** uvádzajú *S. simulans* a

Table 1 Podiel koaguláza negatívnych stafylokokov (n = 64) na jednotlivých formách mastitíd dojníc a výskyt sledovaných faktorov virulencie

Izolácia KNS z mastitíd			Vybrané faktory virulencie					
druhy	status ¹	lyzíny ²	DN ³	žel. ⁴	biof ⁵	SE ⁶	seg ⁷	rezistencia ku antibiotikám ⁸
<i>S. capitis</i> (3)	AK	δ	-	-	-	-	-	OXA, NV, P
	SBAK	δ	-	-	-	-	-	NV, P
	SBKL		-	-	-	-	-	AML, NV, P
<i>S. cohnii</i> (10)	AK 7	3 δ	-	-	2	-	-	2 OXA, 6 P, 5 NV,
	SBAK	δ	-	-	1	-	-	NV, P, TE
	SBKL		-	-	-	-	-	AML, P, S
	LAT	δ	-	-	1	-	-	E, NV, P
<i>S. epidermidis</i> (3)	AK	δ	-	-	-	-	-	S
	SBKL		-	-	1	-	-	
	SBKL	δ	-	-	1	-	-	S
<i>S. haemolyticus</i> (3)	AK	δ	-	-	1	-	-	AMP, P, S
	LAT	β+δ	-	-	1	-	-	P, S,
	LAT	-	-	-	1	-	-	N, P, S,
<i>S. hyicus</i>	LAT	-	1	1	-	-	-	N, P, S,
<i>S. chromogenes</i> (11)	AK 4	-	2	3	3	-	sec	NV, 2 N, 2S, 2 P
	SBAK 5	δ	5	1	4	SEB	seb	2 S,
	SBKL 2	δ	1	1	2	-	seb	E, N, P, S
<i>S. lentus</i>	AK		-	-	1	-	-	NV, P, S
<i>S. piscifermentas</i> (3)	AK		1	-	1	-	-	AML, P
	SBAK	β+δ	-	-	1	-	-	L,
	SBKL	δ	-	-	1	-	-	L,
<i>S. sciuri</i> (2)	AK	δ	-	-	1	-	-	N, NV, P, S
	LAT		-	-	1	-	-	OXA, NV, P
<i>S. vitulinus</i> (4)	AK 2	-	-	-	1	-	-	2 NV, P, S
	SBAK	-	-	-	1	-	-	NV, S,
	LAT	-	-	-	1	-	-	NV,
<i>S. warneri</i> (14)	AK 5	4 β+δ	-	-	3	SEA	sea	P, 3 S
	SBAK 4	δ; β+δ	-	-	1	-	-	AML, P, 3 S,
	SBKL 3	2 β+δ	1	-	2	SEE	see	P, S
	LAT 2	β+δ	1	-	1	-	-	S,
<i>S. xyloso</i> (9)	AK 5	δ	-	-	5	-	-	N, 5 NV, 2 L, P, E
	SBKL 4	δ; β+δ	-	-	3	SEB; C	seb; c	2 E, 4 NV, 4 P, S

¹ - mastitída akútna (AK); subakútna (SBAK); subklinická (SBKL); latentná (LAT); ² - lyzíny (α;β;δ);

³ - DNAza; ⁴ - želatináza; ⁵ - biofilm; ⁶ - stafylokokový enterotoxín; ⁷ - gén pre SE;

⁸ - AMP ampicilín, AMO amoxicilín, OXA oxacilín, N neomycín, NV novobiocín, L linkomycín, P penicilín, S streptomycín, E erytromycín, TE tetracyklín

S. chromogenes ako dominantné druhy KNS pri mastitídach dojníc. KNS boli príčinou hlavne subklinických mastitíd spojených so zvýšením počtu somatických buniek v mlieku a rezistencia u nich bola zaznamenaná hlavne voči penicilínu

Čo sa týka jednotlivých faktorov virulencie, spoločná produkcia lyzínov β a δ bola zaznamenaná v 12 prípadoch, samostatný lyzín δ v 23 prípadoch. Produkcia DNAzy a želatinázy bola zistená u *S. hyicus*, *S. chromogenes* a produkcia iba DNAzy v jednom prípade u *S. piscifermentas*, pochádzajúceho z akútnej mastitídy a v 2 prípadoch *S. warneri* zo subklinickej a latentnej mastitídy. Produkcia resp. tvorba biofilmu bola zistená u 52 izolátov, pričom u *S. capitis* a *S. hyicus* nebola tvorba biofilmu detekovaná. Baktérie *S. chromogenes* mali najpočetnejšie zastúpenie faktorov virulencie: produkcia želatinázy bola zistená v 4 prípadoch, produkcia DNAzy v 8 a tvorba biofilmu v 9 prípadoch. Taktiež u *S. warneri* (7) a *S. xylosus* (8) bola zistená tvorba biofilmu vo väčšej miere v porovnaní s ostatnými izolovanými druhmi stafylokokov, rovnako aj produkcia lyzínov β a δ . **Melchior et al. (2006)** pri štúdiu kmeňov *S. aureus* izolovaných z mastitíd dojníc uvádzajú, že rezistencia voči antibiotikám bola viac frekvencovaným faktorom virulencie ako tvorba biofilmu. Zvýšená produkcia biofilmu bola zjavná u kmeňov z opakovaných a chronických prípadov mastitíd. **Otto (2004)** označuje produkciu biofilmu za určujúci faktor patogenity *S. epidermidis* pri nemocničných nákazách.

Podiel KNS produkujúcich najviac faktorov virulencie na jednotlivých formách mastitíd nie je jednoznačný, najvirulentnejší kmeň *S. chromogenes* spôsobil najviac prípadov subakútnej, ďalej akútnej a subklinickej mastitídy. *S. warneri* bol izolovaný pri všetkých formách mastitídy, *S. xylosus* pri akútnych a subakútnych mastitídach.

Produkcia stafylokokových enterotoxínov (SE) resp. prítomnosť génov pre produkciu SE ako ďalšieho faktora virulencie bola zistená u 3 druhov KNS a to *S. chromogenes*, *S. warneri* a *S. xylosus*, ktoré súčasne produkovali aj ostatné vyššie spomenuté faktory. U *S. chromogenes* bola potvrdená prítomnosť génov pre produkciu SE a to *sec* a *2 seb*, pričom kmene pochádzali z rôznych foriem mastitíd. U kmeňov *S. warneri* bol potvrdený gén *sea* a *see*, resp. u *S. xylosus* *seb* a *sec*, ktoré pochádzali z akútnej a subklinickej mastitídy. Samotná produkcia SE bola zistená v jednom prípade *S. chromogenes* (SEB) zo subakútnej mastitídy; *S. warneri* v 2 prípadoch - SEA pri akútnej a SEE pri subklinickej mastitíde a rovnako v 2 prípadoch u *S. xylosus* - SEB a SEC zo subklinických mastitíd.

U všetkých izolovaných stafylokokov bola testovaná *in vitro* rezistencia voči antibiotikám, pričom len v jednom prípade *S. epidermidis* nebola zistená rezistencia ani voči jednému z testovaných antibiotík. Ďalšie 2 kmene *S. epidermidis* boli rezistentné len voči streptomycínu, rovnako 1 kmeň *S. warneri*. Rezistencia voči jednému antibiotiku bola ďalej zistená u *S. vitulinus* a to voči novobiocínu a u *S. piscifermentas* voči linkomycínu. Najvyššia rezistencia bola zaznamenaná voči penicilínu (30), novobiocínu (27) a streptomycínu (21). Ako najrezistentnejšie kmene sa javia *S. xylosus*, kde kmene izolované z akútnych mastitíd boli rezistentné voči

5 antibiotikám (N, NV, L, P, E) a kmene zo subklinickej mastitídy voči 4 druhom (E, NV, P, S). Rovnako voči 4 testovaným antibiotikám boli rezistentné druhy *S. chromogenes* (Nv, N, S, P) a *S. sciuri* (N, NV, P, S), všetko kmene pochádzajúce z akútnych mastitíd.

ZÁVER

Koaguláza negatívne stafylokoky boli v našom experimente izolované v pomerne vysokom percente 18,8 %, čo predstavuje 64 kmeňov patriacich do 12 izolovaných druhov KNS. Druhy *S. chromogenes*, *S. warneri* a *S. xylosus* izolované z klinických prípadov mastitíd (akútnych, subakútnych) vykázali najvyšší stupeň patogenity, produkovali viacero faktorov virulencie (lyzíny, DNAza, želatináza, biofilm), vykázali prítomnosť génov pre produkciu SE, ale aj produkciu SE. Baktérie *Staphylococcus spp.* vykazujúce najvyšší stupeň rezistencie boli izolované z akútnych mastitíd. Môžeme konštatovať, že akútne a subakútne mastitídy spôsobujú prevažne baktérie KNS s najvyšším stupňom patogenity (t.j. produkciou viacerých faktorov virulencie) rovnako ako pri *S. aureus*.

LITERATÚRA

- ČAPLA, J., ZAJÁC, P., VACZLOVÁ, Z., GOLIAN, J. 2008. Mikrobiologická kvalita surového kravského mlieka vo výrobnej oblasti. In: *Bezpečnosť a kontrola potravín, Zborník vedeckých prác II. diel*, SPU Nitra, 2008, p. 227- 231.
- EBRAHIMI, A., AKHAVAN TAHERI, M. 2009. Characteristics of staphylococci isolated from clinical and subclinical mastitis cows in Shahrekord, Iran. In *Iranian Journal of Veterinary Research*, vol. 10, 2009, no. 3, p. 270-277.
- HAVERI, M., ROSLÖF, A., PYÖRÄLÄ, S. 2007. Virulence genes of bovine *Staphylococcus aureus* from persistent and nonpersistent intramammary infections with different clinical characteristics. In *J. Appl. Microbiol.*, vol. 103, 2007, p. 993-1000.
- KALMUS, P., AASMÄE, B., KÄRSSIN, A., ORRO, T., KASK, K. 2011. Udder pathogens and their resistance to antimicrobial agents in dairy cows in Estonia. In *Acta Veterinaria Scandinavica*, vol. 53, 2011, p. 4-10.
- KIRKAN, S., GOKSOY, E. O., KAYA, O. 2005. Identification and Antimicrobial Susceptibility of *Staphylococcus aureus* and coagulase negative staphylococci from bovine mastitis in the Aydin region of Turkey. In *Turk J. Vet. Anim. Sci.*, vol. 29, 2005, p. 791-796.
- KURODA, M., NAGASAKI, S., ITO, R., OHTA, T. 2007. Sesquiterpene farnesol as a competitive inhibitor of lipase activity of *Staphylococcus aureus*. In *FEMS Microbiology Letters*, vol. 273, 2007, no.1, p. 28-34.
- MELCHIOR, M. B., FINK-GREMMEIS, J., GAASTRA, W. 2006. Comparative assessment of the antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis in biofilm versus planktonic culture. In *J. Vet. Med. B. Infect. Dis. Vet. Public Health.*, vol. 53, 2006, no. 7, p. 326-32.
- MONIRI, R., DASTEHGOLI, K., AKRAMIAN, A. 2007. Increasing Resistant CNS in Bovine Clinical Mastitis. In *Pakistan J. Biolog. Sci.*, vol. 10, 2007, no. 15, p. 2465-2469.
- NASCIMENTO, J. S., FUGUNDES, P. C., BRITO, A. V., DOS SANTOS, K. R., BASTOS, M. C. 2005. Production of bacteriocins by coagulase-negative staphylococci involved in

bovine mastitis. In *Veterinary Microbiology*, vol. 106, 2005, p. 61-71.

PERSSON, Y., ANN-KRISTIN J. NYMAN, A-K. J., GRÖNLUND-ANDERSSON, U. 2011. Etiology and antimicrobial susceptibility of udder pathogens from cases of subclinical mastitis in dairy cows in Sweden. In *Acta Veterinaria Scandinavica*, vol. 53, 2011, 36-43.

PYÖRÄLÄ, S., TAPONEN, S. 2009: Coagulase-negative staphylococci - Emerging mastitis pathogens. In *Veterinary Microbiology*, vol. 134, 2009, no. 1-2, p. 3-8.

OTTO, M.. 2004. Virulence factors of the coagulase-negative staphylococci. In *Frontiers in Bioscience*, 9, January 1, 2004, p. 841-863.

ZAJÁC, P., GOLIAN, J., ČAPLA, J. 2008. Rezídua inhibičných látok v surovom kravskom mlieku v Slovenskej republike v roku 2007. In *Bezpečnosť a kontrola potravín, Zborník vedeckých prác II. diel*, SPU Nitra, 2008, p. 274-277.

ZAJÁC, P., GOLIAN, J., SOKOL, J. 2004. Výsledky vyšetrenia surového kravského mlieka na RIL v slovenskej republike a rok 2001, 2002, 2003. In: *Zborník prednášok a posterov, Hygiena alimentorum XXV*, UVL Košice 2004, p. 228-232.

Acknowledgments:

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

Contact address:

Doc. MVDr. Milan Vasil', CSc., Department of Nutrition, Dietetics and Animal Husbandry, Institute of Animal Husbandry, University of Veterinary Medicine and Pharmacy, Komenského 71, 041 81 Košice, Slovakia, tel., fax : + 421 55 2982 630, E-mail: vasil@uvm.sk

MVDr. Juraj Elečko, CSc., Department of Nutrition, Dietetics and Animal Husbandry, Institute of Animal Husbandry, University of Veterinary Medicine and Pharmacy, Komenského 71, 041 81 Košice, Slovakia

MVDr. František Zigo, Department of Nutrition, Dietetics and Animal Husbandry, Institute of Animal Husbandry, University of Veterinary Medicine and Pharmacy, Komenského 71, 041 81 Košice, Slovakia, E-mail: zigo@uvm.sk

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

QUALITY AND SAFETY OF RAW COW'S MILK IN SLOVAKIA IN 2011

Peter Zajac, Martin Tomáška, Anna Murárová, Jozef Čapla, Jozef Čurlej

ABSTRACT

The quality and safety of raw cow's milk is very important for dairy companies and consumers of milk products. Due to the methods of production, it is impossible to completely eliminate contamination of milk with microorganisms, therefore the microbial content of milk is a major feature in determining its quality. Other important factors to consider include somatic cells count, veterinary drug residues, milk composition and freezing point. Somatic cells represent the udder health and can be used for monitoring of subclinical mastitis. A high level of somatic cells can increase proteolysis in milk which affects technological processes. Veterinary drugs administered to cows may lead to residues in the milk which are harmful to humans. The content of fat, protein and solids-non-fat are the main indicators used by dairies for technological purposes. In this article we discuss the quality and safety of raw cow's milk in Slovakia during 2011. We found that 73.53% of samples tested for somatic cell count, and 84.54% of samples tested for total bacterial count, met the European Union legislation limits. We found the largest decrease in fat and protein content was during the summer period and the largest increase was in the winter period. We found that 92.14 %, 98.7% and 91.38% of samples met the limit presented in STN 570529:1999 for fat content, protein content and freezing point respectively. The percentage of drug positive samples was 0.087%.

Keywords: raw cow's milk, total bacterial count, somatic cell count, fat, protein, solids-not-fat, freezing point, drug residue

INTRODUCTION

Cow's milk has long been considered a highly nutritious and valuable human food and is consumed daily by millions, in a variety of different products. Due to the importance of milk in the human diet, it is essential to increase milk production and to improve its quality (Dănuș et al., 2011). Milk has been called nature's most complete food (Ataro et al., 2008; Park, 2009). Milk is more than a source of nutrients for any mammalian neonate, as it is also important for the growth of children and nourishment of adults. Aside from the nutritional values of milk, milk borne biologically active compounds, such as casein and whey proteins, have been found to be increasingly important for physiological and biochemical functions that have crucial impacts on human metabolism and health (Gobbetti et al., 2007; Korhonen and Pihlanto-Leppälä, 2004). Four major areas of bioactivity of milk components have been categorised: 1) gastrointestinal development, activity and function; 2) infant development; 3) immunological development and function; and 4) microbial activity, including antibiotic and probiotic action (Gobbetti et al., 2007; Park, 2009).

Its nutrient composition makes milk an ideal medium for bacterial growth and therefore it can be considered one of the most perishable agricultural products because it can so easily be contaminated (Bryan, 1983). Raw cow and sheep milk may contain microorganisms which can cause food borne diseases (Adesiyun et al., 1995; Steele et al., 1997; Headrick et al., 1998, Dudriková et al., 2010, Fabianová et al., 2011, Pořáková et al., 2011, Zigo et al., 2011). Because of the specific methods of production, it is impossible to avoid contamination of milk with microorganisms. The microbial content of milk is a major

feature in determining its quality (HUI, 1993, Chandan, 2008; Tamine 2009). It has been stated that the number, and type, of microorganisms in milk immediately after milking, are affected by factors such as, animal and equipment cleanliness, the season, feed and animal health. Bacterial contamination of raw milk can originate from different sources: the air, milking equipment, feed, soil, faeces or grass (Coorevits et al., 2008). The occurrence of mastitis in dairy farms depends on three biosystems: dairy cows, the environment and microorganisms. Application of antimastitis programs is very important (Pukáčová et al., 2010).

Deficiency in the nutrition of dairy cows may influence many biochemical and physiological processes, as well as milk composition (Filipejová et al., 2011).

Physicochemical and microbiological analyses are an important tool to monitor the quality of food products (Hettinga et al., 2008). Monitoring the quality and safety of milk requires careful analysis of microbial and somatic cell loading (Gunasekera et al., 2003). Biological monitoring of raw milk, which involves analysis of microbial and somatic cells, is essential for milk and dairy quality assurance. Milk microbiology impacts on issues such as the shelf life of dairy products, as well as on determination of the type of product for which raw milk is to be used (Muir, 1996). A high biological count in raw milk alerts the dairy processor to possible problems with product safety (Sørhaug and Stepaniak, 1997).

Poor milk hygiene, and more specifically high somatic cell counts (SCC), also have implications on the structure of milk, its processing value, shelf life and edible food loss (Barbano et al., 2006), and indirectly on consumer concerns with regard to human health, bacterial

contamination and antimicrobial residues (Ruegg and Tabone, 2000; Saville et al., 2000; Jayarao and Henning, 2001; Hogan, 2005; Straley et al., 2006).

Several studies have implicated high SCC as a causative factor in the reduced shelf life of fluid milk (Ma et al., 2000), as well as reduced cheese yield and quality (Kitchen, 1981; Munro et al., 1984; Barbano et al., 1991).

Herds with higher SCC exhibit an increased risk of antibiotic residue violation because of their increased antibiotic usage, owing to the greater prevalence of subclinical mastitis (Ruegg and Tabone, 2000).

In addition, elevated SCC is associated with lower milk yields, resulting in potential losses in income. Hence, monitoring and control of SCC at a national level, as well as on an individual farm basis, is necessary to identify and monitor trends. It is also a fundamental resource for quality assurance programs (Berry et al., 2006).

The European Union currently imposes a regulatory limit of 400,000 somatic cells/ml and 100,000 bacterial cells/ml (Commission Regulation (EC) No 1662/2006 of 6 November 2006 amending Regulation (EC) No 853/2004).

Milk composition varies considerably throughout the seasons, as shown in multiple studies (Auld et al., 1998; Lindmark-Månsson et al., 2003; Lock and Garnsworthy, 2003).

The composition of raw milk determines, to a large extent, the nutritional value and the technological properties of milk and dairy products. Therefore, the composition of milk is of great importance for the dairy industry and there is great interest in changing the composition of milk. The composition of milk varies due to the stage of lactation, feeding, health status of the cow and genetic factors (Fox and McSweeney 1998).

The production of high quality milk, and keeping the herd in good health, are the main objectives in primary milk production (Janštová et al., 2011).

MATERIAL AND METHODOLOGY

Raw cow's milk

Samples of raw cow's milk were collected from individual dairy farms in Slovakia by trained personnel of dairy companies, according to the standard ISO 707:2008 and stored until analysed in a fridge at 0 - 4 °C.

Samples were analysed in laboratories accredited according to ISO17025:2005 (general requirements for the competence of testing and calibration laboratories):

- EXAMINALA, Dairy Research Institute, Dlhá 95, 010 01 Žilina, Slovakia,
- Milex Progres a.s., Beňadická 13, 851 06, Bratislava, Slovakia,
- State Veterinary and Food Institute Bratislava, Detached testing Laboratory, Akademická 3, Nitra, National Reference Laboratory for Milk and Milk Products

Laboratory methods

Determination of milk composition

STN 57 0536 (1.4.1995) - Determination of milk composition with infrared absorption analyser.

Determination of somatic cells

ISO 13366-2:2006 Milk - Enumeration of somatic cells - Part 2: Guidance on the operation of fluoro-opto-electronic counters.

Determination of total bacterial counts

ISO 4833:2003 Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the enumeration of microorganisms - Colony-count technique at 30 °C.

ISO 7218:2007 Microbiology of food and animal feeding stuffs - General requirements and guidance for microbiological examinations.

ISO 6887-1:1999 Microbiology of food and animal feeding stuffs - Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination - Part 1: General rules for the preparation of the initial suspension and decimal dilutions.

ISO 6887-5:2010 Microbiology of food and animal feeding stuffs - Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination - Part 5: Specific rules for the preparation of milk and milk products.

Determination of freezing point

ISO 5764:2009 Milk - Determination of freezing point - Thermistor cryoscope method (Reference method).

Determination of drug residues

STN 570531:2001 - Identification and determination of antibiotics and sulphonamides in raw milk and heat-treated milk.

Testing period

Samples were collected and analysed during the year 2011.

Number of samples

The total number of samples analysed during the testing period was different according to tested analyte. We analysed 19,830 samples for total bacterial counts, 24,457 samples for somatic cell count, 24,260 samples for milk composition, 15,453 samples for freezing point and 19,475 samples for drug residues.

Evaluation of the results

Evaluation of the results was performed according to the limits specified in European Union legislation and Slovak technical standards:

Commission Regulation (EC) No 1662/2006 of 6 November 2006 amending Regulation (EC) No 853/2004 of the European Parliament and of the Council laying down specific hygiene rules for food of animal origin.

STN 570529:1999 Raw cow's milk to dairy processing and treatment.

RESULTS AND DISCUSSION

The number of analysed samples and results of bulk cow's milk collected from dairy farms in Slovakia in 2011 are presented in the tables and figures. Results of the determination of total bacterial count (TBC), and somatic cell count (SCC), in bulk raw cow's milk are presented in Table 1, Figure 1 and Figure 2. Results of determination of fat content, protein content, lactose content and solids-not-fat content in bulk raw cow's milk are presented in Table 2 and Figures 3 - 6. Results of determination of freezing point and drug residues in bulk raw cow's milk are

potravinárstvo

presented in Table 3 and Figures 7 - 8. Results of individual indicators of quality and safety, divided into

categories according to legislation limits and requirements of standard are presented in Figures 9 - 14.

Table 1 Results of determination total bacterial count (TBC) and somatic cells count (SCC) in bulk raw cow's milk in Slovakia in 2011

Year 2011		TBC	TBC < 50,000 /ml	TBC 51,000 - 100,000 /ml	TBC CFU/ml (average)	SCC	SCC < 300,000 /ml	SCC 301,000 - 400,000 /ml	SCC/ml (average)
January	No. of samples	1,641	1,228	206	63,000	1,977	1,137	356	315,000
	%	-	74.8 %	12.6 %	-	-	57.5 %	18.0 %	-
February	No. of samples	1,653	1,249	215	58,500	2,025	1,127	432	324,000
	%	-	75.6 %	13.0 %	-	-	55.7 %	21.3 %	-
March	No. of samples	1,692	1,221	176	7,1000	2,086	1,048	476	343,000
	%	-	72.2 %	10.4 %	-	-	50.2 %	22.8 %	-
April	No. of samples	1,674	1,227	186	67,000	2,022	1,086	448	339,000
	%	-	73.3 %	11.1 %	-	-	53.7 %	22.2 %	-
May	No. of samples	1,650	1,134	273	77,500	2,071	1,137	441	312,000
	%	-	68.7 %	16.5 %	-	-	54.9 %	21.3 %	-
June	No. of samples	1,679	1,169	199	78,500	2,072	1,066	456	345,000
	%	-	69.6 %	11.9 %	-	-	51.4 %	22.0 %	-
July	No. of samples	1,652	1,052	236	84,000	1,958	916	384	365,000
	%	-	63.7 %	14.3 %	-	-	46.8 %	19.6 %	-
August	No. of samples	1,653	1,058	246	87,000	2,087	943	425	367,000
	%	-	64.0 %	14.9 %	-	-	45.2 %	20.4 %	-
September	No. of samples	1,623	1,190	177	66,500	2,048	1,065	405	334,000
	%	-	73.3 %	10.9 %	-	-	52.0 %	19.8 %	-
October	No. of samples	1,647	1,255	165	64,000	2,114	1,161	405	327,000
	%	-	76.2 %	10.0 %	-	-	54.9 %	19.2 %	-
November	No. of samples	1,633	1,283	170	54,500	1,984	1,229	340	297,000
	%	-	78.6 %	10.4 %	-	-	61.9 %	17.1 %	-
December	No. of samples	1,633	1,241	207	57,500	2,013	1,122	376	331,000
	%	-	76.0 %	12.7 %	-	-	55.7 %	18.7 %	-
Sum	No. of samples	19,830	14,307	2,456	-	24,457	13,037	4,944	-
	%	-	72.15 %	12.39 %	-	-	53.3 %	20.2 %	-

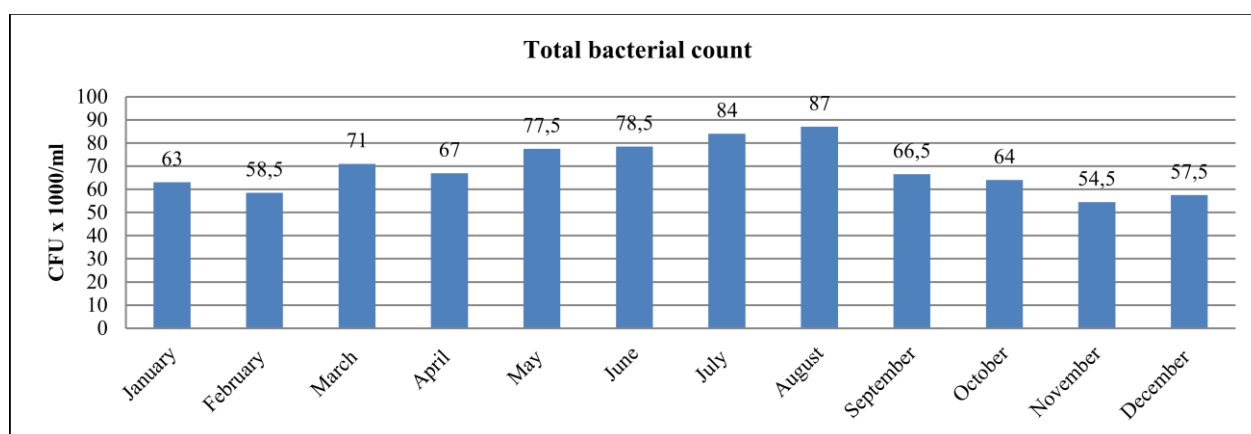


Fig. 1 Average results of determination of total bacterial count (TBC) in bulk raw cow's milk in Slovakia in 2011

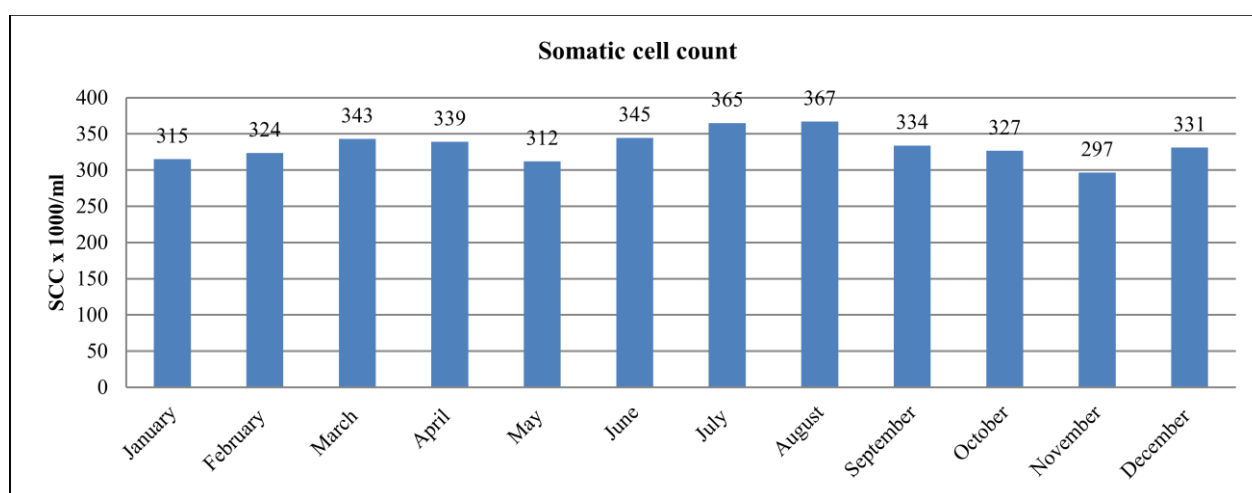


Fig. 2 Average results of determination of somatic cell count (SCC) in bulk raw cow's milk in Slovakia in 2011

Table 2 Results of determination of fat content, protein content, lactose content and solids-not-fat (SNF) content in bulk raw cow's milk in Slovakia in 2011

Year 2011		Compo sition	Fat > 3.3 g/100g	Fat > 3.6 g/100g	Fat g/100g (average)	Protein > 2.8 g/100g	Protein > 3.2 g/100g	Protein g/100g (average)	Lactose g/100g (average)	SNF ≥ 8.5 g/100g	SNF g/100g (average)
January	No. of samples	1,978	1,875	1,667	3.875	1,970	1,739	3.405	4.805	1,751	8.810
	%	-	94.8 %	84.3 %	-	99.6 %	87.9 %	-	-	88.5 %	-
February	No. of samples	2,013	1,898	1,689	3.680	1,806	1,758	3.405	4.830	1,776	8.830
	%	-	94.3 %	83.9 %	-	89.7 %	87.3 %	-	-	88.2 %	-
March	No. of samples	2,074	1,989	1,731	3.830	2,060	1,619	3.415	4.855	1,819	8.720
	%	-	95.9 %	83.5 %	-	99.3 %	78.1 %	-	-	87.7 %	-
April	No. of samples	2,010	1,890	1,627	3.795	1,989	1,319	3.255	4.860	1,583	8.660
	%	-	94.0 %	80.9 %	-	99.0 %	65.6 %	-	-	78.8 %	-
May	No. of samples	2,059	1,826	1,356	3.685	2,051	1,431	3.265	4.875	1,648	8.690
	%	-	88.7 %	65.9 %	-	99.6 %	69.5 %	-	-	80.0 %	-
June	No. of samples	2,072	1,797	1,182	3.610	2,061	1,366	3.255	4.820	1,689	8.640
	%	-	86.7 %	57.0 %	-	99.5 %	65.9 %	-	-	81.5 %	-
July	No. of samples	2,038	1,751	1,104	3.605	2,029	1,212	3.235	4.810	1,490	8.565
	%	-	85.9 %	54.2 %	-	99.6 %	59.5 %	-	-	73.1 %	-
August	No. of samples	2,074	1,879	1,312	3.690	2,069	1,473	3.260	4.790	1,582	8.60
	%	-	90.6 %	63.3 %	-	99.8 %	71.0 %	-	-	76.3 %	-
September	No. of samples	2,036	1,866	1,443	3.735	2,018	1,738	3.325	4.815	1,798	8.695
	%	-	91.7 %	70.9 %	-	99.1 %	85.4 %	-	-	88.3 %	-
October	No. of samples	2,118	1,944	1,725	3.915	2,117	2,027	3.450	4.770	1,995	8.820
	%	-	91.8 %	81.4 %	-	100.0 %	95.7 %	-	-	94.2 %	-
November	No. of samples	1,987	1,932	1,852	4.055	1,985	1,941	3.520	4.805	1,846	8.885
	%	-	97.2 %	93.2 %	-	99.9 %	97.7 %	-	-	92.9 %	-
December	No. of samples	2,001	1,890	1,760	3.940	1,987	1,922	3.490	4.790	1,870	8.850
	%	-	94.5 %	88.0 %	-	99.3 %	96.1 %	-	-	93.5 %	-
Sum	No. of samples	24,460	22,537	18,448	-	24,142	19,545	-	-	20,847	-
	%	-	92.1 %	75.4 %	-	98.7 %	79.9 %	-	-	85.2 %	-

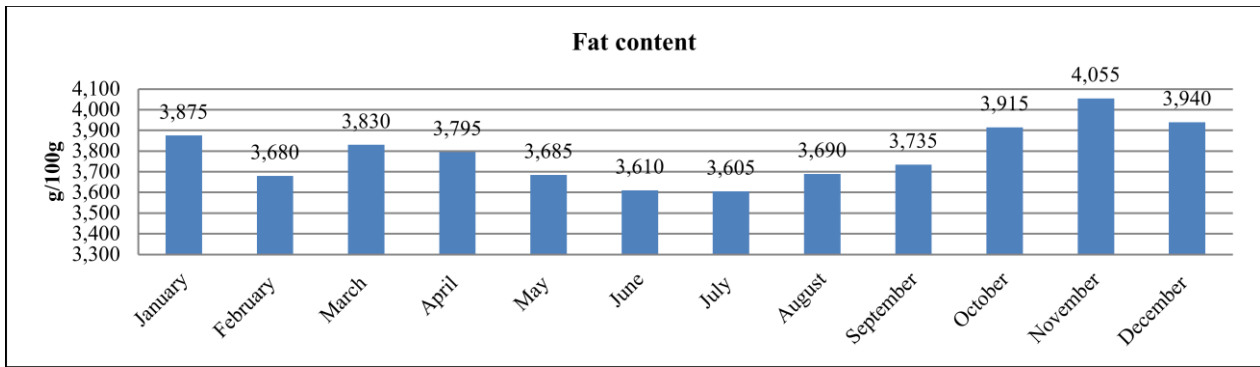


Fig. 3 Average results of determination of fat content in bulk raw cow's milk in Slovakia in 2011

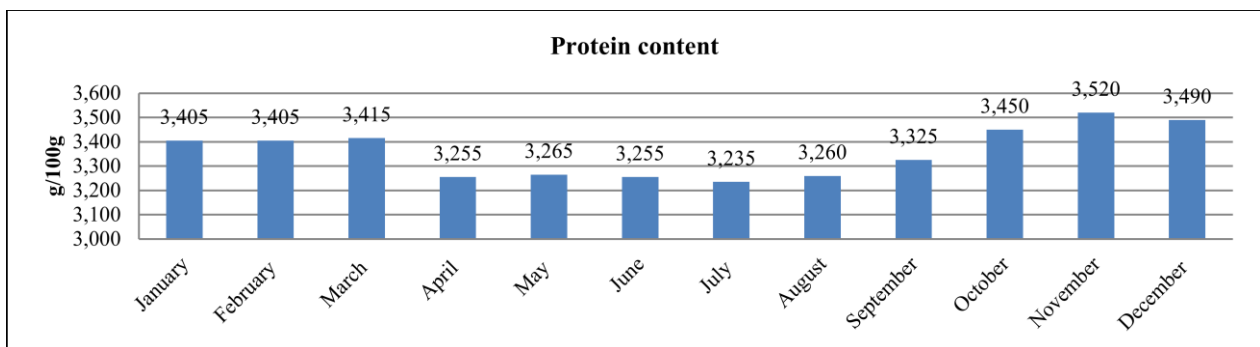


Fig. 4 Average results of determination of protein content in bulk raw cow's milk in Slovakia in 2011

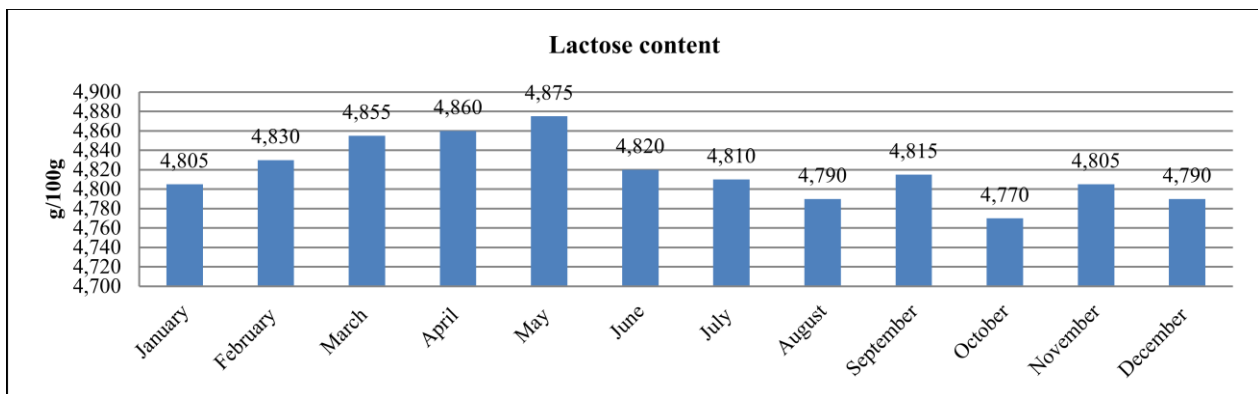


Fig. 5 Average results of determination of lactose content in bulk raw cow's milk in Slovakia in 2011

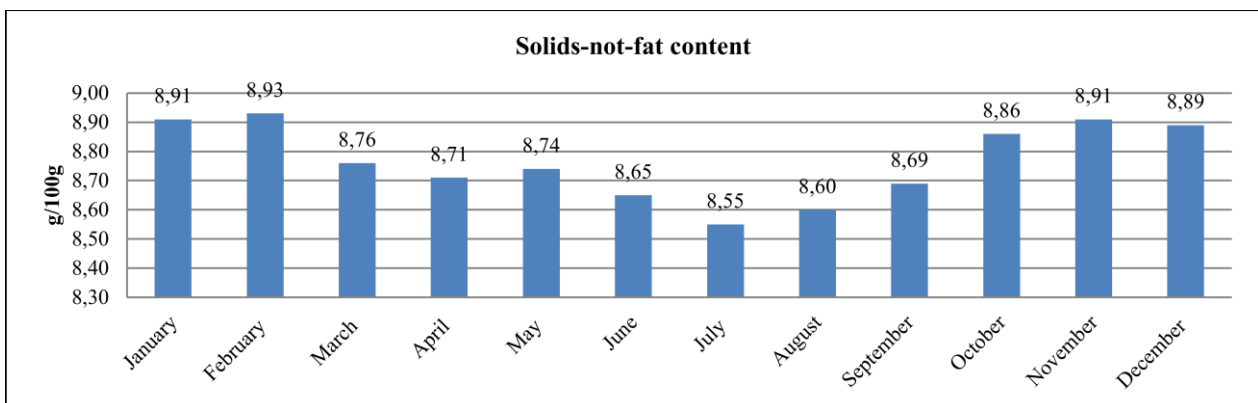


Fig. 6 Average results of determination of solids-not-fat content in bulk raw cow's milk in Slovakia in 2011

potravinárstvo

Table 3 Results of determination of freezing point and drug residues in bulk raw cow's milk in Slovakia in 2011

Year 2011		Freezing point	Freezing point > -0.515	Freezing point < -0.515 - > -0.520	Freezing point < -0.520	Freezing point (°C) (average)	Drug residues	Drug residues (positive samples)
January	No. of samples	1,394	136	281	977	-0.524	1,618	1
	%	-	9.8 %	20.2 %	70.1 %	-	-	0.062 %
February	No. of samples	1,341	140	214	987	-0.525	1,628	3
	%	-	10.4 %	16.0 %	73.6 %	-	-	0.184 %
March	No. of samples	1,270	89	180	1,001	-0.525	1,662	0
	%	-	7.0 %	14.2 %	78.8 %	-	-	0.000 %
April	No. of samples	1,380	133	201	1,046	-0.527	1,642	2
	%	-	9.6 %	14.6 %	75.8 %	-	-	0.122 %
May	No. of samples	1,300	91	197	1,012	-0.527	1,622	2
	%	-	7.0 %	15.2 %	77.8 %	-	-	0.123 %
June	No. of samples	1,286	119	195	972	-0.525	1,644	1
	%	-	9.3 %	15.2 %	75.6 %	-	-	0.061 %
July	No. of samples	1,244	116	197	931	-0.524	1,612	0
	%	-	9.3 %	15.8 %	74.8 %	-	-	0.000 %
August	No. of samples	1,243	106	214	923	-0.525	1,609	3
	%	-	8.5 %	17.2 %	74.3 %	-	-	0.186 %
September	No. of samples	1,127	91	204	832	-0.524	1,591	1
	%	-	8.1 %	18.1 %	73.8 %	-	-	0.063 %
October	No. of samples	1,334	120	204	1,010	-0.524	1,641	0
	%	-	9.0 %	15.3 %	75.7 %	-	-	0.000 %
November	No. of samples	1,362	95	177	1,090	-0.525	1,629	0
	%	-	7.0 %	13.0 %	80.0 %	-	-	0.000 %
December	No. of samples	1,172	95	144	933	-0.525	1,577	4
	%	-	8.1 %	12.3 %	79.6 %	-	-	0.254 %
Sum	No. of samples	15,453	1,331	2,408	11,714	-	19,475	17
	%	-	8.6 %	15.6 %	75.8 %	-	-	0.087 %

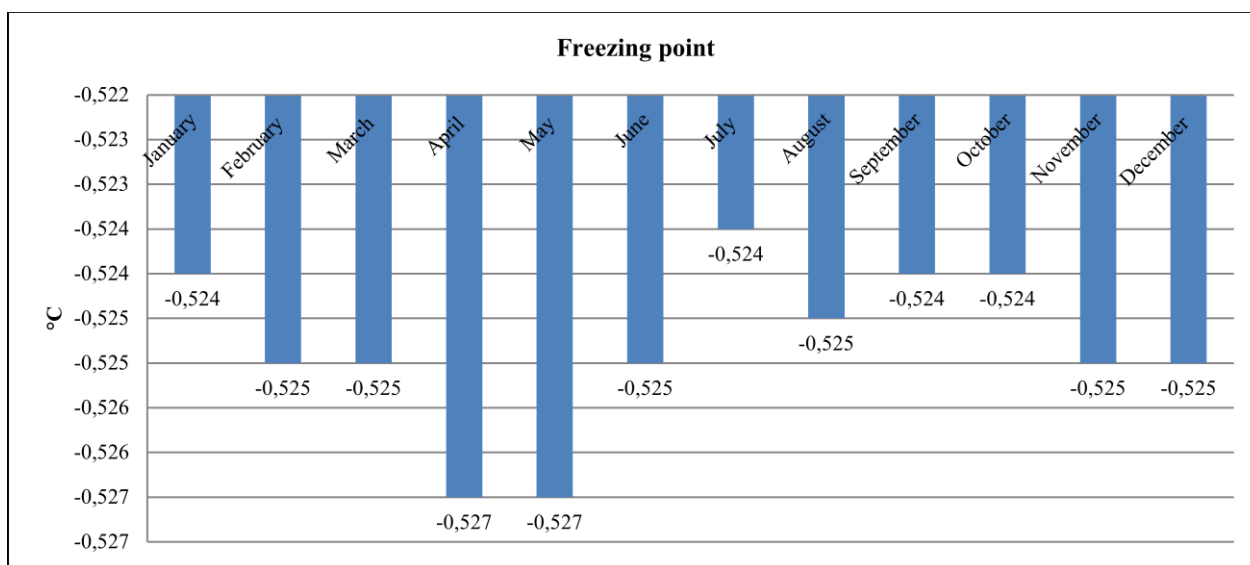


Fig. 7 Average results of determination of freezing point in bulk raw cow's milk in Slovakia in 2011

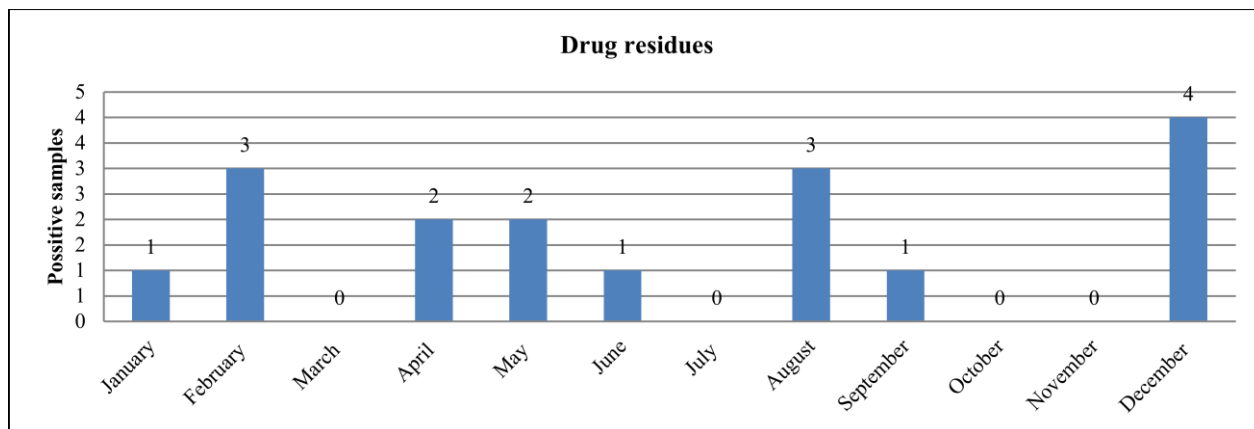


Fig. 8 Results of determination of drug residues in bulk raw cow's milk in Slovakia in 2011

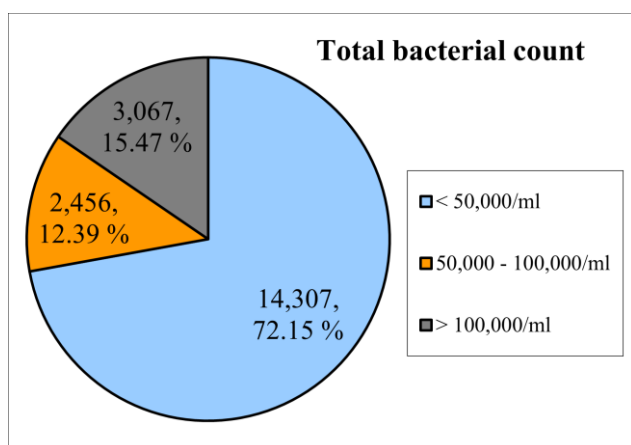


Fig. 9 Results of total bacterial count in raw cow's milk divided into three categories

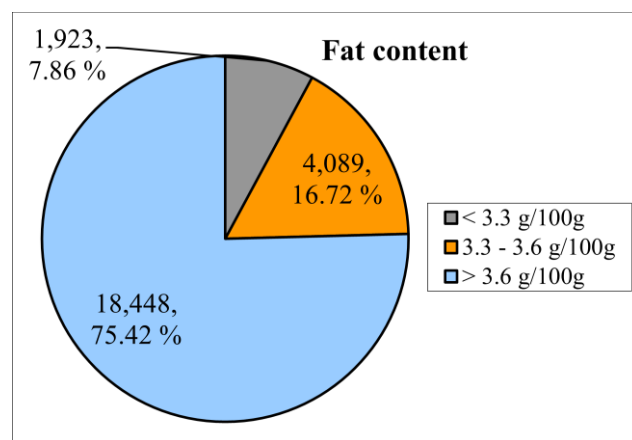


Fig. 11 Results of determination of fat content in raw cow's milk divided into three categories

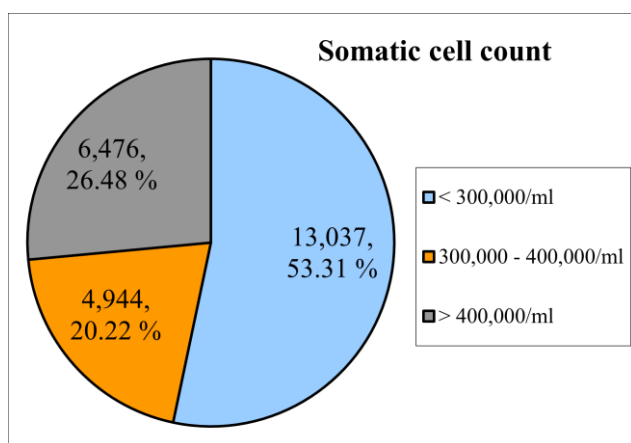


Fig. 10 Results of determination of somatic cell count in raw cow's milk divided into three categories

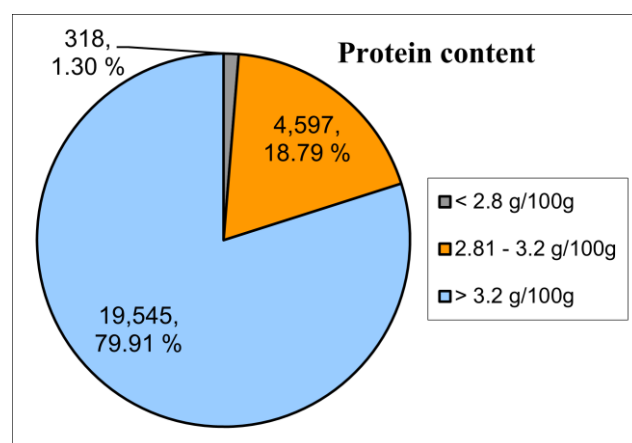


Fig. 12 Results of determination of protein content in raw cow's milk divided into three categories

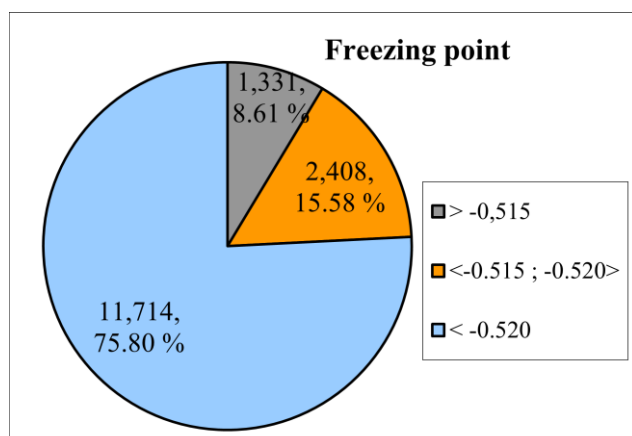


Fig. 13 Results of freezing point in raw cow's milk divided into three categories

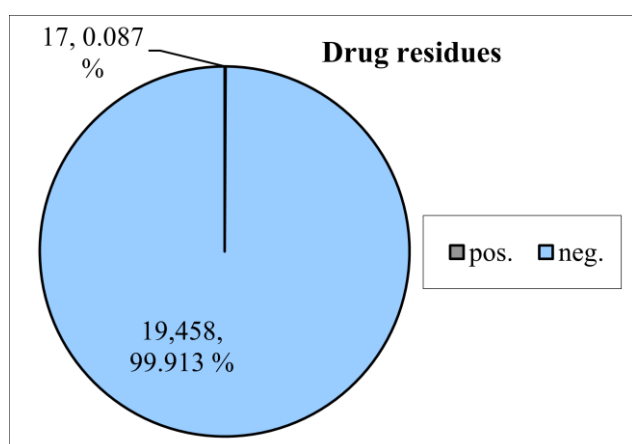


Fig. 14 Results of drug residues in raw cow's milk divided into two categories

The results from bulk cow's milk collected from dairy farms in Slovakia in 2011 show that 15.47 % of samples did not meet the legislation limit of a maximum of 100×10^3 CFU.ml⁻¹ total bacterial count. We found that the highest increase in the average total bacterial count, 84×10^3 CFU.ml⁻¹ and 87×10^3 CFU.ml⁻¹, were in summer period in July and August respectively. The lowest average total bacterial count, 55×10^3 CFU/ml and 58×10^3 CFU.ml⁻¹, were detected in November and December respectively.

The lowest average somatic cell count (97×10^3 SC.ml⁻¹) was detected in November, and the highest increase in the average somatic cell count (367×10^3 SC.ml⁻¹) was seen in August. We found that 26.48 % of samples did not meet the legislation limit of 400 000 SC.ml⁻¹ in 2011.

The percentage of unsatisfactory results did not mean that farmers had to be immediately penalised, because in Slovakia a rolling geometric mean is used, according to the Commission Regulation EC No. 1662/2006. However, there is a large potential to improve the quality and safety of raw cow's milk, as well as economic losses in dairy farms in Slovakia.

Other indicators of quality and safety were tested. We found that the minimum average fat content was 3.605 g/100g in July and maximum average fat content was 4.055 g/100g in November and 7.86 % of samples did

not meet the limit presented in STN 570529:1999, 16.72% of samples had a fat content between 3.3 - 3.6 g/100g and 75.42% of samples had a fat content > 3.6 g/100g. This means that 92.14% of samples meet the limit presented in STN 570529:1999. **Bujko et al. (2011)** evaluated milk performance indicators in dairy cows of the Holstein breed. They found a fat content 3.87 g/100g. **Heck et al. (2009)** found a fat content of 4.38 g/100g. **Tamime (2009)** indicate a fat content 3.70 g/100g. **Chandan et al., (2008)** indicate a fat content 3.80 g/100g. According to **Hui (2009)** milk has to contain not less than 3.25 g/100g of milk fat. The fat content of milk for various breeds differs. The Holstein breed contains 3.54 g/100g, Ayshire 3.95 g/100g, Jersey 5.13 g/100g and Brown Swiss 3.99 g/100g (**Hui, 2009**).

We found that the highest increase in average fat content was over the winter period. The lowest average fat content was detected during the summer period.

The minimum average protein content was 3.235 g/100g in July and maximum average protein content was 3.520 g/100g in November, and 1.30 % of samples did not meet the limit presented in STN 570529:1999, 18.79% of samples had a protein content between 2.81 - 3.2 g/100g and 79.91% of samples had a protein content > 3.2 g/100g. This means that 98.7% of samples meet the limit presented in STN 570529:1999.

Bujko et al. (2011) found an average protein content of 3.36 g/100g. **Heck et al. (2009)** found a protein content of 3.48 g/100g. According to **Tamime (2009) and Chandan et al., (2008)** the protein content in raw cow's milk is 3.4 g/100g. We found that the highest increase in the average protein content was in the autumn and winter periods. The lowest average protein content was detected in the summer period. According to **Hui (2009)**, the protein content of milk of the Holstein breed is 3.29 g/100g, Ayshire 3.48 g/100g, Jersey 3.98 g/100g and Brown Swiss 3.64 g/100g (**Hui, 2009**).

We found that the highest increase in the average lactose content (4.875 g/100g) was in May. **Heck et al. (2009)** found a lactose content of 4.51 g/100g. According to **Tamime (2009) and Chandan et al., (2008)** the lactose content is 4.8 g/100g, and **Bujko et al. (2011)** found a lactose content of 4.96 g/100g.

The lowest average solids-not-fat content was 8.565 g/100g in July. We found that the highest increase in the average solids-not-fat content (8.93 g/100g) in February. According to **Hui (2009)**, milk has to contain not less than 8.25 g/100g of solids-not-fat.

Based on our results we agree with the results published by **Hui (2009)**, regarding seasonal variations in protein and fat content in raw cow's milk. We found the largest decrease in the fat and protein content was during the summer period and the largest increase in the winter period. This seasonal variation can lead to significant economic consequences.

The lowest average freezing point was -0.524 °C and 8.61% of samples did not meet the limit of STN 570529:1999, 15.58% of samples had freezing point in interval $< -0.515 ; -0.520>$ and 75.80% of samples had freezing point < -0.520 °C. This means that 91.38% of samples meet the limit presented in STN 570529:1999.

Heck et al. (2009), found a freezing point of -0.519 °C.

We found that the highest average freezing point was -0.527 °C, detected in the spring period in April and May.

We have found 17 drug positive samples representing 0.087% of all samples.

CONCLUSION

The quality and safety of raw cow's milk in Slovakia in 2011 was satisfactory. However, there is a large potential to improve farm management to eliminate economic losses in dairy farms. We found that 73.53 % of samples tested for somatic cells count, and 84.54 % samples tested for total bacterial count, met the legislation limits. We found the largest decrease in the fat and protein content was during the summer period and the largest increase in the winter period. We found that 92.14 %, 98.7 % and 91.38 % of samples met the limit presented in STN 570529:1999 for fat content, protein content and freezing point respectively. The percentage of drug positive samples was 0.087 %.

REFERENCES

- ADESIYUN, A. A., WEBB AND, L., RAHMAN, S. 1995. Microbiological quality of raw cow milk at collection centers in Trinidad. In *J. Food Prod.*, vol. 58, 1993, p. 139-146.
- ATARO, A., MCCRINDLE, R. I., BOTHA, B. M., MCCRINDLE, C. M. E., NDIBEWU, P. P. 2008. Quantification of trace elements in raw cow's milk by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS). In *Food Chemistry*, vol. 111, 2008, no. 1, p. 243-248.
- AULDIST, M. J., WALSH, B. J., THOMSON, N. A. 1998. Seasonal and lactational influences on bovine milk composition in New Zealand. In *J. Dairy Res.*, vol. 65, 1998, p. 401-411.
- BARBANO, D. M., MA, Y., SANTOS, M. V. 2006. Influence of raw milk quality on fluid milk shelf life. In *J. Dairy Sci.*, vol. 89, 2006, p. E15-E19.
- BARBANO, D. M., RASMUSSEN, R. R., LYNCH, J. M. 1991. Influence of milk somatic cell count and milk age on cheese yield. In *J. Dairy Sci.*, vol. 74, 1991, p. 369-388.
- BERRY, D. P., O'BRIEN, B., O'CALLAGHAN, E. J., SULLIVAN, K. O., MEANEY, W. J. 2006. Temporal Trends in Bulk Tank Somatic Cell Count and Total Bacterial Count in Irish Dairy Herds During the Past Decade In *J. Dairy Sci.* vol. 89, 2006, p. 4083-4093.
- BRYAN, F. L. 1983. Epidemiology of milk-borne diseases. In *J. Food Prot.*, vol. 46, 1983, p. 637-649.
- BUJKO, J., KOČMAN, R., ŽITNÝ, J., TRAKOVICKÁ, A., HRNČÁR, C. 2011. Analyse of traits of milk production in dairy cows. In *Potravinárstvo*, vol. 5, 2011, no. 1, p. 5-9.
- CHANDAN, R. C., KILARA, A., SHAN, N. P. 2008. *Dairy Processing and Quality Assurance*, AMES, IOWA, USA : Wiley-Blackwell, 2008, 329 p. ISBN 0-8138-2756-6.
- COMMISSION REGULATION (EC) No 1662/2006 of 6 November 2006 amending Regulation (EC) No 853/2004 of the European Parliament and of the Council laying down specific hygiene rules for food of animal origin *OJ L 320*, 18.11.2006, p. 1-10.
- COOREVITS, A., DE JONGHE, V., VANDROEMME, J., REEKMANS, R., HEYRMAN, J., MESSENS, W., DE VOS, P., HEYNDRIKX, M. 2008. Comparative analysis of the diversity of aerobic-spore-forming bacteria in raw milk from organic and conventional dairy farms system. In *Appl. Microbiol.*, vol. 31, 2008, no. 2, p. 126-140.
- DĂNUȚ M., G., ANDRONOIU, D. G., NISTOR, O. V., BOTEZ, E. 2011. Quality control of raw cow milk from Galati county. In *Journal of Agroalimentary Processes and Technologies*, vol. 17, 2011, no. 3, p. 303-307.
- DUDRIKOVÁ, E., POĽAKOVÁ, L. PUKÁČOVÁ, J. 2010. Health and hygienic conditions of ewe's milk processing from the aspect of food safety. In *Potravinárstvo*, vol. 4, 2010, no. 3, p. 14-18.
- FABIANOVÁ, J., DUCKOVÁ, V., ČANIGOVÁ, M., KROČKO, M. 2011. Presence of *Enterococci* in cow milk and their antibiotic resistance. In *Potravinárstvo*, vol. 4, 2010, no. 2, p. 17-21.
- FILÍPEJOVÁ, T., KOVÁČIK, J. KIRCHNEROVÁ, K. FOLTÝS, V. 2011. Changes in milk composition as a result of metabolic disorders of dairy cows. In *Potravinárstvo*, vol. 5, 2011, no. 1, p. 10-16.
- FOX, P. F., MC SWEENEY, P. L. H. 1998. *Dairy Chemistry and Biochemistry*. London, UK : Blackie Academic and Professional, 1998, 479 p. ISBN 0-412-72000-0
- GOBBETTI, M., MINERVINI, F., RIZZELLO, C. G. 2007. Bioactive peptides in dairy products. In: HUI, Y. H. et al., 2007 *Handbook of Food Products Manufacturing*. Hoboken, NJ, USA : John Wiley & Sons, Inc., p. 489-517. ISBN 978-0-470-04964-8.
- GUNASEKERA, T. S., VEAL, D. A., ATTFIELD, P. V. 2003. Potential for broad applications of flow cytometry and fluorescence techniques in microbiological and somatic cell analyses of milk. In *International Journal of Food Microbiology*, vol. 85, 2003, p. 269-279.
- HEADRICK, M. L., KORANGY, S., BEAN, N. H., ANGULO, F. J., ALTEKRUSE, S. F., POTTER, M. E., KLONTZ, K. C. 1998. The epidemiology of raw milk associated food borne disease out breaks reported in the United States, 1973 through 1992. In *Am. J. Public Health*, vol. 88, 1998, p. 1219-1221.
- HECK, J. M. L., VAN VALENBERG, H. J. F., DIJKSTRA, J., VAN HOOIJDONK, A. C. M. 2009. Seasonal variation in the Dutch bovine raw milk composition. In *Journal of Dairy Science*. vol. 92, 2009, no. 10, p. 4745-4755.
- HETTINGA, K. A., VAN VALENBERG, H. J. F., VAN HOOIJDONK, A. C. M. 2008. Quality control of raw cows' milk by headspace analysis. In *International Dairy Journal*, vol. 18, 2008, no. 5, p. 506-513.
- HOGAN, J. 2005. Human health risks associated with high BTSCC milk: Symposium overview. Pages 73-75 in Proc. 44th NMC Annu. Mtg. Natl. Mastitis Counc. Inc., Verona, WI.
- HUI, Y. H. 1993. *Dairy Science and Technology Handbook*, New York : John Wiley & Sons, 1993, 329 p. ISBN 1-56081-078-5.
- JANŠTOVÁ, B., DRAČKOVÁ, M., DLESKOVÁ, K., CUPÁKOVÁ, Š., NECIDOVÁ, L., NAVRÁTILOVÁ, P., VORLOVÁ, L. 2011. Quality of raw milk from a farm with automatic milking system in the Czech Republic. In *Acta Vet. Brno*, vol. 80, 2011, p. 207-214.
- JAYARAO, B. M., HENNING, D. R. 2001. Prevalence of foodborne pathogens in bulk tank milk. In *J. Dairy Sci.*, vol. 84, 2001, p. 2157-2162.
- KITCHEN, B. J. 1981. Review of the progress of dairy science: Bovine mastitis: Milk compositional changes and related diagnostic tests. In *J. Dairy Res.*, vol. 48, 1981, p. 167-188.
- KORHONEN, H., PIHLANTO-LEPPÄLÄ, A. 2004. Milk – derived bioactive peptides: Formation and prospects for health promotion. In: SHORTT, C., O'BRIEN, J. 2004. *Handbook of Functional Dairy Products*. Boca Raton, FL, USA : CRC Press, 2004, p. 109-124.

- LINDMARK-MÅNSSON, H., FONDÉN, R., PETTERSSON, H. E. 2003. Composition of Swedish dairy milk. In *Int. Dairy J.*, vol. 13, 2003, p. 409-425.
- LOCK, A. L., GARNSWORTHY, P. C. 2003. Seasonal variation in milk conjugated linoleic acid and delta(9)-desaturase activity in dairy cows. In *Livest. Prod. Sci.*, vol. 79, 2003, p. 47-59.
- MA, Y., RYAN, C., BARBANO, D. M., GALTON, D. M., RUDAN, M. A., BOOR, K. J. 2000. Effects of somatic cell count on quality and shelf-life of pasteurized fluid milk. In *J. Dairy Sci.*, vol. 83, 2000, p. 264-274.
- MUIR, D. D. 1996. Shelf-life of dairy products: 2. Raw milk and fresh products. In *Journal of the Society of Dairy Technology*, vol. 49, 1996, p. 44- 48.
- MUNRO, G. L., GRIEVE, P. A., KITCHEN, B. J. 1984. Effects of mastitis on milk yield, milk composition, processing properties and yield and quality of milk products. In *Aust. J. Dairy Technol.*, vol. 39, 1984, p. 7-16.
- PARK, Y. W. 2009. Overview of Bioactive Components in Milk and Dairy Products. In: *Bioactive Components in Milk and Dairy Products*. Iowa, USA : Wiley-Blackwell, 2009, p. 3-12. ISBN 978-0-8138-1982-2.
- POEÁKOVÁ, L., DUDRIKOVÁ, E., GALLO, J. 2011. Presence of *S. aureus* and *Enterococcus* spp. in goat's cheese and their antibiotics resistance. In *Potravinárstvo*, vol. 5, 2011, no 3, p. 33-37.
- PUKÁČOVÁ, J., POEÁKOVÁ, L., DUDRIKOVÁ, E. 2010. Sensitivity to antibiotics in strains of *Staphylococcus aureus* isolated from cow's milk. In *Potravinárstvo*, vol. 4, 2010, no. 4, p. 56-64.
- RUEGG, P. L., TABONE, T. J. 2000. The relationship between antibiotic residue violations and somatic cell counts in Wisconsin dairy herds. In *J. Dairy Sci.*, vol. 83, 2000, p. 2805-2809.
- SAVILLE, W. J., WITTUM, T. E., SMITH, K. L. 2000. Association between measures of milk quality and risk of violative antimicrobial residues in grade-A raw milk. In *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, vol. 217, 2000, p. 541-545.
- SØRHAUG, T., STEPANIAK, L. 1997. Psychrotrophs and their enzymes in milk and dairy products quality aspects. In *Trends in Food Science and Technology*, vol. 8, 1997, p. 35- 41.
- STEELE, M. L., MCNAB, W. B., POPPE, C., GRAFFITHS, M. W., CHEN, S., DEGRANDIS, S. A., FRUHNER, L. C., LARKIN, C. A., LYNCH J. A., ODUMERU, J. A. 1997. Survey of Ontario bulk tank milk for food borne pathogens. In *J. Food Prot.*, vol. 60, 1997, p. 1341-1346.
- STN 570529:1999 *Raw cow's milk to dairy processing and treatment*.
- STRALEY, B. A., DONALDSON, S. C., HEDGE, N. V., SAWANT, A. A., SRINIVASAN, V., OLIVER, S. P., JAYARAO, B. M. 2006. Public health significance of antimicrobial-resistant gram-negative bacteria in raw bulk tank milk. In *Foodborne Pathog. Dis.*, vol. 3, 2006, p. 222-233.
- TAMIME, A. Y. 2009. *Milk Processing and Quality management*. Chichester, UK : John Wiley & Sons in Blackwell Publishing Ltd., 2009. 316 p. ISBN 978-1-4051-4530-5.
- ZIGO, F., VASIL, M., KADÁŠI, M., ELEČKO, J., FARKAŠOVÁ, Z. 2011. Bacteria *Staphylococcus* spp. isolated from mastitis of sheep their enterotoxigenic properties. In *Potravinárstvo*, vol. 5, 2011, p. 70-72.

Contact address:

Ing. Peter Zajác, PhD. State Veterinary and Food Institute Bratislava, Detached testing Laboratory, Akademicka 3, Nitra, National Reference Laboratory for Milk and Milk Products, Akademicka 3, 949 01 Nitra, E-mail: zajac@potravinarstvo.com

Ing. Martin Tomáška, PhD. Dairy Research Institute, Dlhá 95, 010 01 Žilina, Slovakia, E-mail: tomaska@vumza.sk

doc. Ing. Anna Murárová, CSc. Milex Progres a.s., Ružová dolina 27, 82465, Bratislava, Slovakia, E-mail: murarova@milex-progres.sk

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: zajac@potravinarstvo.com

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



**KATEDRA HYGIENY
A BEZPEČNOSTI POTRAVÍN**

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

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

* Predmety označené hviezdíčkou sa vyučujú aj v anglickom jazyku.

Váš výhradný dodávateľ laboratórnych prístrojov a zariadení ThermoFisher Scientific

Plynová chromatografia

Kvapalinová chromatografia

Hmotnostná spektrometria

Elementárna analýza CHNS/O

Spaľovacia analýza Cl, S, N, TOX, AOX

Atómová absorpčná spektrometria AAS

Indukčne viazaná plazma ICP/OES, ICP/MS

UV, UV-VIS, VIS spektrometre

IR, FTIR, IRa, FT-IRa, NIR

RTG fluorescenčná spektrometria (ED XRF)

Laboratórne informačné systémy LIMS

Archívne laboratórne SW

Chromatografické SW

Viskozimetre, reometre

Reologické vlastnosti plastov

Plastometre, extrúdre

Termostaty, kryostaty, obehové chladiace zariadenia

Porozimetre, BET sorpčné systémy

He pyknometre

TGA, DTA prístroje

Systémy na stanovenie kontaktného uhla

IR mikroskopy





Školenia pre potravinárske firmy

Školenia sú akreditované Ministerstvom školstva SR

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

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

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

HACCP Consulting
0908164361, 0904138562
www.haccp.szm.sk

THE EFFECT OF REDUCTION CONCENTRATIONS OF THE BROILER CHICKENS PER UNIT AREA ON THE FINAL LIVE WEIGHT AND PRODUCTION ECONOMICS <i>Mária Angelovičová, Martin Kliment, Ľubica Mrázová, Jana Tkáčová, Martin Kráľ, Ebrahim Alfaig, Ľubomír Lopašovský</i>	1-8
QUANTITATIVE AND STRUCTURAL CHANGES OF TESTIS AND SEMEN QUALITY PARAMETERS CHANGES CAUSED BY PERORAL ADMINISTRATION OF DIAZINON IN RATS <i>Michal Cabaj, Róbert Toman, Mária Adamkovičová, Peter Massányi, Branislav Šiška, Norbert Lukáč, Jozef Golian, Svätoslav Hluchý</i>	9-14
ENTEROCOCCI AND THEIR ABILITY TO FORM A BIOFILM <i>Margita Čanigová, Viera Ducková, Miroslav Kročko, Jana Račková, Jana Bezeková</i>	15-18
IDENTIFICATION OF OENOLOGICAL TANNINS EXTRACTED FROM OAK WOOD <i>Jana Návojská, Silvia Wendelin, Reinhard Eder, Helena Frančáková</i>	19-22
THE VISCOSITY OF PROCESSED CHEESE SAUCES DEPENDING ON ADDITION TYPE AND CONCENTRATION OF 1-MONOGLYCERIDES <i>Zuzana Hanáková, František Buňka, Eva Weiserová, Rahula Janiš</i>	23-25
CHEMICAL COMPOSITION OF MUSCLE AFTER POLLEN APPLICATION IN NUTRITION OF BROILER CHICKENS <i>Peter Haščík, Ibrahim Omer Elamin Elimam, Jozef Garlík, Miroslava Kačániiová, Marek Bobko, Vladimíra Kňazovická, Klára Vavrišinová, Henrieta Arpášová, Ondřej Bučko</i>	26-32
EFFECT OF CHICKPEA AND PEA FLOUR ADDITION ON THE QUALITATIVE AND SENSORY PARAMETERS OF BAKERY PRODUCTS <i>Michal Magala, Zlatica Kohajdová, Jolana Karovičová, Veronika Kuchtová</i>	33-35
ANALYSIS OF CAROTENOIDS AND LYCOPENE IN TOMATO (<i>LYCOPERSICON ESCULENTUM</i> MILL.) AND THEIR RETENTION IN TOMATO JUICE <i>Andrea Mendelová, Alena Andrejiová, Miriam Líšková, Dagmar Kozelová, Ján Mareček</i>	36-38
EFFECT OF HUMIC SUBSTANCES AND PROBIOTICS ON GROWTH PERFORMANCE AND MEAT QUALITY OF RABBITS <i>Ľubomír Ondruška, Ľubica Chrastinová, Ján Rafay, Darina Pospíšilová, Vladimír Parkányi</i>	39-41
CHANGES IN THE PHYSICAL PROPERTIES OF BREAD DURING STORAGE <i>Paulina Pająk, Celina Habryka, Teresa Fortuna</i>	42-45
FACTORS AFFECTED DECARBOXYLATION ACTIVITY OF <i>ENTEROCOCCUS FAECIUM</i> ISOLATED FROM RABBIT <i>Pavel Pleva, Leona Buňková, Andrea Lauková, Eva Lorencová, Vlastimil Kubáň, František Buňka</i>	46-49
CONTAMINATION OF PROPOLIS USED AS A DIETARY SUPPLEMENT <i>Adam Roman, Ewa Popiela-Pleban</i>	50-52
PHYSICOCHEMICAL PROPERTIES OF STARCH-MALTODEXTRIN AND STARCH-MALTODEXTRIN-GLUCOSE SYSTEMS <i>Joanna Sobolewska-Zielińska, Magdalena Grzelak, Teresa Fortuna</i>	53-56
ASSESSMENT OF FAT QUALITY DURING STORAGE CHICKEN MEAT <i>Jana Tkáčová, Mária Angelovičová</i>	57-59
OCCURRENCE OF SOME PATHOGENITY FACTORS IN COAGULASE NEGATIVE STAPHYLOCOCCI ISOLATED FROM MASTITIS MILK IN DAIRY COWS <i>Milan Vasil, Juraj Elečko, František Zigo, Zuzana Farkašová</i>	60-63
QUALITY AND SAFETY OF RAW COW'S MILK IN SLOVAKIA IN 2011 <i>Peter Zajác, Martin Tomáška, Anna Murárová, Jozef Čapla, Jozef Čurlej</i>	64-73

Správna voľba pre Vaše laboratórium!

Firma O.K.SERVIS BioPro, s.r.o., je poskytovateľom kompletného riešenia v oblasti laboratórneho vybavenia. Mnohoročné skúsenosti v tejto oblasti, nepretržitý vývoj, najmodernejšie technológie, flexibilita a hlavne spoľahlivý zákaznícky servis robia z našich produktov vysoký celosvetový štandard.

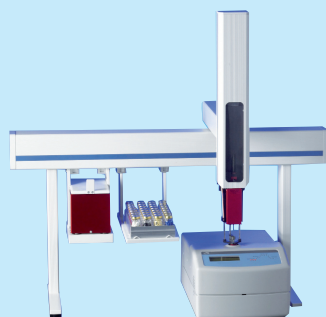
TANGO



- Nová generácia FT – NIR spektrometrov
- Rýchle analýzy obsahových zložiek s vysokou kapacitou vzoriek
- Robustný FT – NIR spektrometer i pre prevádzkové podmienky
- Jednoduché ovládanie a vysoká presnosť výsledkov
- Dodávaný so základnými kalibráciami
- Odporúčaný pre špecifické aplikácie zamerané na danú oblasť použitia (farmácia potravinársky priemysel, ...), vyžadujúce presnú analýzu obsahových zložiek.
- Rýchla, jednoduchá a bezpečná obsluha prístroja

Elektronický jazyk

- Objektívne hodnotenie chuti, citlivejší ako ľudský jazyk
- Identifikácia pomocou elektrochemických senzorov - výsledky do 2 minút
- Použitie potravinársky priemysel a farmácia



Elektronický nos

- Vôňa - kľúčový parameter výrobkov
- Presná a objektívna analýza, využíva detekčné metódy
- Vyhodnotenie analýzy v priebehu niekoľkých minút



TA.XT plus analyzátor textúry

- Analyzátor je určený pre testovanie texturálnych vlastností potravinárskych výrobkov , pre štandardnú kontrolu jednotlivých výrobných šarží určitých produktov
- Je vhodný i pre oblasti vývoja a výskumu
- Spolu s vysoko sofistikovaným softwarom umožňuje kontrolu parametrov dôležitých v potravinárskom priemysle (konzistencia, viskozita, stupeň zrenia napr. syrov, kontrolu tvrdosti, tuhosti, roztierateľnosti, atď.)
- Možnosť využitia i pre testovanie nakupovaných surovín a obalových materiálov.

ALPHA – FT - IR analyzátor vína

- Nový spôsob kontroly kvality Vášho vína - presné a spoľahlivé výsledky
- Robustný, malý a prenosný analyzátor
- ALPHA analyzátorom vína môžete rýchle určiť mnoho parametrov vína, ako alkohol, kyseliny, obsah cukru a ďalšie
- Žiadna príprava vzorky, žiaden spotrebný materiál
- Priame dávkovanie vzorky, rýchle meranie
- Neobmedzený prístup na nastavenie nových kalibrácií



® O.K. SERVIS
BioPro
s.r.o.
www.biopro.cz

Bližšie informácie o kompletnej ponuke:

O.K. SERVIS BioPro, Bulharská 70, 821 04 Bratislava, SR

Tel.: +421 243 634 967, E-mail: info@oks.cz

O.K. SERVIS BioPro, Bořetická 2668/1, 193 00 Praha 9, ČR

Tel.: +420 281 091 460, +420 841 111 114, E-mail: info@oks.cz