

2

2009



Vedecký časopis pre potravinárstvo

číslo

www.potravinarstvo.com

ročník 3
číslo 2
august 2009

potravinárstvo 2 (3)
ISSN 1338-0230 (tlačená verzia)
ISSN 1337-0960 (elektronická verzia)

Potravinárstvo

Vedecký časopis pre potravinárstvo

Šéfredaktor:

Ing. Peter Zajác, PhD.
SPU Nitra

Zástupca šéf redaktora:

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

Redaktori:

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

Predseda redakčnej rady:

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

Redakčná rada

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

Potravinárstvo

Scientific journal of food science

Editor:

Peter Zajác
SUA Nitra

Deputy of Editor:

Jozef Golian
SUA Nitra

Sub-Editor:

Radoslav Židek,
Jozef Čapla,
SUA Nitra

Chairman, Editorial Board:

Jozef Golian,
SUA Nitra

Editorial Board:

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

• **Potravinárstvo**® • **Ročník:** 3, č. 2/2009 • **Vedecký časopis pre potravinárstvo** • **Scientific journal of food science** • **Vydavateľ:** Ing. Peter Zajác, HACCP Consulting. Slivková 12, 951 01 Nitrianske Hrnčiarovce. Vydavateľ úzko spolupracuje s Katedrou hygieny a bezpečnosti potravín, FBP, SPU v Nitre • **Nakladateľ:** Združenie HACCP Consulting. Slivková 12, 951 01 Nitrianske Hrnčiarovce • **Periodicita:** vychádza 4x do roka • **Internetová stránka časopisu:** www.potravinarstvo.com • **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:** 150 ks • **Miesto vydania:** Nitra • **Právne informácie a autorské práva:** Za obsah jednotlivých článkov zodpovedajú autori. Za obsah inzerátov zodpovedajú inzerenti.

Všetky práva vyhradené, © 2009 Potravinárstvo®
Evidenčné číslo Ministerstva kultúry SR: 3771/09
ISSN 1338-0230 (tlačená verzia)
ISSN 1337-0960 (elektronická verzia)



Katedra hygieny a bezpečnosti
potravín

H A C C P
CONSULTING

ANTIMIKROBIÁLNA REZISTENCIA- AKTUÁLNY PROBLÉM VO VETERINÁRNEJ MEDICÍNE A VO VEREJNOM ZDRAVÍ

ANTIMICROBIAL RESISTENCE- CURRENT PROBLEM IN VETERINARY MEDICINE AND PUBLIC HEALTH

Jozef Bíreš, Miroslav Húska, Milan Vasil'

ABSTRACT

The aim of this work was analyze from aspect veterinary medicine hazards antimicrobial resistance in food chain and their impact on public health. The issue of antimicrobial resistance is of world wide concern. Many scientific reviews have focused on antimicrobial resistance in zoonotic bacterial pathogens and the possible link between the use of veterinary antimicrobials, prophylactics and growth promoters and resistance issues in human medicine. Antimicrobial resistant bacteria are biological hazards resulting in increased animals and human morbidity and mortality and are of veterinary and public concern. The use antimicrobial agents in animals, plant production and production of other sources of food and feed has adverse veterinary and public health consequences by creating a resistant bacteria and of bacteria resistance genes. Consequently the transfer of antimicrobial-resistant bacteria and bacteria-borne resistance genes from animals or crops to humans via food remains a matter of public health concerns. The principles that are applied to the prevention and control of the spread of pathogenic bacteria through of food will also contribute to the prevention and control of antimicrobial-resistant bacteria. Resistant *Salmonella* and *Campylobacter* and verotoxigenic *Escherichia coli* involved in human disease are mostly spread through foods.

Keywords: antimicrobial resistance, food chain, veterinary medicine, public health

ÚVOD

Antimikrobiálna rezistencia je v súčasnosti považovaná za závažný zdravotný, sociálny a ekonomický problém. Antimikrobiálna rezistencia baktérií je biologické nebezpečenstvo, ktoré zvyšuje morbiditu a mortalitu zvierat a ľudí a ovplyvňuje verejné veterinárske zdravie a verejné zdravie (EFSA, 2008). Zvyšovanie spotreby antibiotík vo veterinárnej a ľudskej medicíne je v ostatnom období sprevádzaný fenoménom nárastu bakteriálnej rezistencie. Používanie antimikrobiálnych látok u zvierat, pri produkcii rastlín, krmív a potravín má negatívny dopad na verejné zdravie cez nárast rezistentných baktérií alebo baktérií produkujúcich rezistentné gény, ktoré prechádzajú do organizmu ľudí priamo alebo nepriamo. Tento druh rezistencie nerešpektuje fylogenetické, geografické a ani ekologické hranice. Gény rezistencie sú rozširované horizontálne medzi baktériami zo suchozemských zvierat, rýb, ľudí a

okrem toho sú prítomné vo vonkajšom prostredí. Pre antimikrobiálnu rezistenciu sú najdôležitejšie zoonotické bakteriálne patogény a ich možný vzťah k používaniu veterinárskych antimikrobík, profylaktík a rastových promótorov a rezistenciou v ľudskej medicíne. Antimikrobiká zahŕňujú antibakteriálne, antivírusové, antifugálne a antiparazitárne látky. Práca analyzuje z aspektu veterinárskej medicíny riziká antimikrobiálnej rezistencie v jednotlivých článkoch potravinového reťazca a ich dopad na verejné zdravie.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Používanie antimikrobiálnych látok v terapii a prevencii infekčných chorôb zvierat a plodín naďalej prebieha, nakoľko si to vyžadujú podmienky zdravia zvierat, ich welfare a zdravie rastlín. Sekundárne je tým zabezpečený kontinuálny transfer antimikrobiálne rezistentných baktérií a baktérií produkujúcich rezistentné gény zo zvierat a plodín na ľudí (Swam, 1969, Anderson, 2003). Z pohľadu verejného zdravia potraviny vystupujú ako hlavný faktor prenosu antimikrobiálnej rezistencie. Najviac rizikové pre vznik antimikrobiálnej rezistencie je aplikácia subterapeutických dávok antibiotík u potravinových zvierat. Aj to je dôvod zákazu používania antimikrobiálnych aditív v krmive v krajinách EÚ od januára 2006 (Nariadenie EC 1831/2003 európskeho parlamentu a rady z 22 septembra 2003 o aditívach používaných u potravinových zvierat). Efekt tohto zákazu na vývoj antimikrobiálnej rezistencie u zvierat a ľudí je zatiaľ v procese sledovania.

Antimikrobiálna rezistencia je schopnosť baktérií odolávať inhibičným alebo letálnym účinkom antibiotík. Prirodzená alebo primárna rezistencia je geneticky podmienená necitlivosť niektorých baktérií na určité antibiotikum bez väzby na predchádzajúci kontakt s ním (Key et al., 2000). Sekundárna alebo získaná rezistencia je založená na zmenách v genetickej štruktúre baktérií ako výsledku používania antibiotika. Na základe genetických zmien patogéna sa pôvodne účinné antibiotikum stáva proti nemu neúčinným. Mechanizmy vzniku rezistencie sa zakladajú na:

- schopnosti mikroorganizmov znížiť intracelulárnu koncentráciu antibiotika,
- schopnosti mikroorganizmov inaktivovať antibiotikum
- schopnosti mikroorganizmov modifikovať väzobné miesta pre antibiotikum,
- schopnosti antibiotika eliminovať väzobné miesto pre antibiotikum (APHA, 2001).

Používanie antimikrobiálnych látok však nie je jedinou príčinou vzniku a šírenia antimikrobiálnej rezistencie. Spontánna mutácia potravinových baktérií alebo rozširovanie rezistentných kmeňov baktérií pri absencii selektívneho tlaku môže rovnako prispievať k nárastu antimikrobiálnej rezistencie v potravinách. Antimikrobiálne rezistentné baktérie a baktérie produkujúce rezistentné gény môžu byť prenášané na ľudí potravinami rozdielnymi cestami alebo mechanizmami ako napríklad:

- potravinami prenášané rezistentné zoonotické baktérie, napr. *Salmonella*, *Campylobacter* (tieto baktérie pochádzajú z rôznych zdrojov, včítane zvierat, prostredia a ľudí),

- potravinami prenášané rezistentné zoonotické patogénne baktérie pre ľudí, napr. *Shigella spp.*, *Vibrio spp.* (tieto baktérie môžu byť prenášané z ľudí do potravín priamo alebo nepriamo cestou prostredia, vrátane vody),
- potravinami prenášané kmenzátové rezistentné baktérie, ktoré sú nosičmi antimikrobiálnych rezistentných génov a ktoré sú potom transportované do humánnych patogénnych baktérií (rezistentné kmenzátové baktérie môžu pochádzať z rôznych zdrojov, vrátane zvierat, prostredia a ľudí),
- vývoj antimikrobiálne rezistentných baktérií ako výsledok interakcie patogénnych a kmenzátových baktérií s reziduami antimikrobík v potravinách (Bíreš et al., 2008).

Potravinami prenášaná antimikrobiálna rezistencia môže prispieť k prenosu zoonotického patogénu na základe priameho kontaktu so zvieratami (potravínové zvieratá, záujmové zvieratá, ich exkrementy, atď.). Iné potraviny ako živočíšneho pôvodu, môžu rovnako slúžiť ako vektor prenosu antimikrobiálne rezistentných baktérií a baktérií produkujúcich rezistentné gény k spotrebiteľovi. Nezanedbateľná je kontaminácia potravín antimikrobiálne rezistentnými kmeňmi baktérií v priebehu manipulácie (výroba, spracovanie, skladovanie, distribúcia, obchod, verejné stravovanie).

Väčšina technológií pri výrobe a spracovaní potravín redukuje výskyt patogénov vrátane antimikrobiálne rezistentných baktérií. Rýchle tzv. netermické technológie, ktoré sa v súčasnosti využívajú pri výrobe a skladovaní potravín (napr. vysoko tlakové technológie, ionizujúce žiarenie, pulzové elektrické pole, ultrafialové žiarenie) sú postupy, ktoré zabezpečujú zdravé potraviny a zároveň udržiavajú ich nutričné a senzorické vlastnosti. Experimentálne sledovania však potvrdili, že technológie ošetrovania potravín založené na poškodení bunkových membrán a enzýmov môžu prispieť ku generovaniu alebo transferu antimikrobiálnej rezistencie (Lado and Youself 2002, Kharazmi et al., 2002, McMahon et al., 2007). Hoci tieto zistenia zatiaľ pochádzajú z laboratórnych podmienok, ich praktický dopad vyžaduje ďalšie sledovania v potravinárskom priemysle.

V súčasnosti sa posudzuje viacej druhov rezistencií. Klinicky rezistentné infekcie sú charakterizované infekciami s nízkou pravdepodobnou reakciou na terapiu aj v prípade aplikácie maximálnych dávok antimikrobík (EUCAST, 2000). Nakoľko účinnosť terapie je závislá na mnohých faktoroch (napr. farmakokinetika lieku, miesto a charakter infekcie, vlastnosti patogénu, klinický stav pacienta), nevyužíva sa pre diagnostiku rezistencie samostatne, ale objektívizuje sa laboratórnym testom *in vitro* (minimálna inhibičná koncentrácia lieku – MIC pre patogéna izolovaného z klinických vzoriek). Mikrobiologicky rezistentná baktéria je považovaná vtedy, ak toleruje vyššie koncentrácie antimikrobiálnych látok ako fenotypicky blízky patogén alebo tzv. „divé typy“ kmeňov (Acar and Rostel, 2003). Tieto izoláty baktérií sú väčšinou rozdielne od divých typov, pretože mechanizmus získavania rezistencie prebieha prenosom génu alebo mutáciou (získaný typ rezistencie). Inherentná rezistencia sa vyskytuje u bakteriálnych kmeňov u ktorých nie je prítomná antimikrobiálna látka z dôvodu nízkej permeability bunkovej steny pre niektoré molekuly alebo

keď patogén dokáže produkovať enzýmy, ktoré deštruujú antimikrobiálne látky. Získaná rezistencia vzniká u patogénov ako následok mutácie alebo príjmom exogénneho génu horizontálnym transferom z iných bakteriálnych kmeňov. Najčastejšie sú to gény kódujúce enzýmy, ktoré modifikujú štruktúru antimikrobík a dobre prechádzajú bunkovými štruktúrami (napr. penicilinázy, cefalosporinázy- bla- gény, acetyl transferázy modifikujúce napr. aminoglykozidázy – aac- gény, gény spôsobujúce cieľovú modifikáciu- erm- gény, rezistenciu na meticilín- mecA- gény a glykopeptidy- van- gény).

Pre väčšinu patogénov je charakteristická viacnásobná rezistencia, čo len zvyšuje nebezpečenstvo pre zdravie zvierat a ľudí. V praxi to znamená, že cieľená aplikácia antimikrobika proti jednému alebo skupine patogénu potencuje ich rezistenciu k ďalším štruktúrou podobným antimikrobiálnym látkam. Zodpovednými za hromadenie a prenos antimikrobiálnej rezistencie sú gény jednotlivých baktérií. Gény kódujúce rezistenciu v baktériách, ktorá sa manifestuje viacnásobnou odolnosťou môžu byť lokalizované oddelene na mobilnom nosiči. V klinickej praxi sa to prejavuje aj tým, že baktérie rezistentné k novým formám antimikrobík sú pravdepodobne geneticky vybavené pre viacnásobnú odolnosť (napr. pre 3. a 4. generáciu cefalosporínov). Terapeutické zvládnutie chorôb vyvolaných takýmto druhom patogénov u zvierat a ľudí je následne problematické. Podľa údajov (WHO, 2007) tento stav sa u ľudí prejavuje zvýšenou frekvenciou a predlžovaním doby chorobných stavov, nárastom počtu krvných infekcií, zvýšenou hospitalizáciou a mortalitou.

V súčasnosti z hľadiska výskytu rezistencie sú známe tri skupiny mikroorganizmov:

- zoonotické a ostatné potravinami prenášané patogény kmenzátovia,
- tzv. priemyselné alebo technologické a ostatné baktérie, ktoré sa pridávajú do potravín a predstavujú potenciálne riziko antimikrobiálnej rezistencie.

Pri posudzovaní nebezpečenstva antimikrobiálnej rezistencie u zvierat a ľudí vystupujú najčastejšie v potravinovom reťazci napr. *Salmonella spp.*, *Campylobacter spp.*, verotoxigénne *Escherichia coli*, *Shigella spp.*, *Vibrio spp.*, k meticilínu rezistentný *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, kmenzátovia *Enterococcus spp.*, *Escherichia coli* a potravinárske mikroorganizmy *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* a *Streptococcus thermophilus*.

Znižovanie antimikrobiálnej rezistencie vyžaduje kontrolu prítomnosti infekcie a rezistentných baktérií v celom potravinovom reťazci. Znižovanie chorobnosti zvierat nie je v súčasnosti založené iba na používaní antimikrobík. Alternatívne metódy predpokladajú využívanie napr. vakcinačných programov, podpora obranných mechanizmov, hygiena chovu, optimálna výživa zvierat, welfare zvierat, ochrana chovov proti zavlečeniu chorôb. Efektívne pre zníženie počtu potravinových patogénov je zlepšenie hygieny vo všetkých článkoch potravinového reťazca. Dôležité za účelom zníženia kontaminácie potravín patogénnymi baktériami je aplikácia účinných technológií pri spracovaní a výrobe potravín. Častým zdrojom kontaminácie potravinového reťazca patogénnymi a ostatnými baktériami vrátane antimikrobiálne rezistentných sú živočíšne vedľajšie

produkty a komunálny odpad, špeciálne odpad z nemocníc (Reinthal et al., 2003), preto ich neškodné odstraňovanie v programe redukcie antimikrobiálnej rezistentných baktérií je limitujúce.

ZÁVER

Prevenencia a kontrola prítomnosti patogénnych baktérií v potravinovom reťazci musí zahŕňať i prevenciu a kontrolu antimikrobiálnej rezistentných baktérií. V súčasnosti riziko šírenia antimikrobiálnej rezistentných baktérií cez potraviny alebo ich úloha pri prenose rezistentných génov nie je dostatočne študovaná. Baktérie prítomné v krmivách a v potravinách (patogény, komenzálie) zvyšujú rezistenciu proti antimikrobikám vo veterinárskej a humánnej medicíne. Antimikrobiálna rezistencia v potravinách predstavuje z hľadiska transferu rezistencie priame riziko (antimikrobiálnej rezistentnej patogény z potravín kolonizujú alebo infikujú človeka, alebo sa infikuje pri manipulácii s nakazenou potravinou) a nepriame riziko (baktériami produkované rezistentné gény sú prenášané na iné baktérie- patogény alebo komenzálie). Potravinami sú na ľudí najviac prenášané rezistentné kmene *Salmonella spp.* a *Campylobacter spp.* Hlavným zdrojom antimikrobiálnej rezistencie pre ľudí je kontaminované hydinové, bravčové, hovädzie mäso a vajcia. Nezanedbateľné riziko pri prenose antimikrobiálnej rezistencie majú okrem patogénov aj komenzálie.

LITERATÚRA

- ACAR, J., ROSTEL, B., 2003. Antimicrobial resistance: an overview. In: OIE international standards on antimicrobial resistance. OIE Paris, France. s. 45- 68.
- ANDERSON, A. D., NELSON, J. M., ROSSITER, S., ANGULO, F. J., 2003. Public health consequences of use of antimicrobial agents in food animals in the United States. In: *Microbiol. Drug Resist.*, vol. 9, 373-379.
- APHA (American Pharmaceutical Association). 2001. Combating antibiotic resistance. Special report. Washington, D. C., s. 24.
- BÍREŠ, J., VASIL, M., HÚSKA, M., 2008. Riziká jednotlivých článkov potravinového reťazca pri antimikrobiálnej rezistencii u ľudí. In Zborník- X. Manažment bezpečnosti a kvality potravinárskych výrobkov. Štrbské Pleso, ELSEWA. ISBN 978-80-89365-00-3.

EFSA. 2008. Foodborne antimicrobial resistance as a biological hazard. In Draft Scientific Opinion of the Panel on Biological Hazards (Question No EFSA- Q-2007- 089). Draft endorsed on 6 March 2008.

EUCAST.2007. Terminology relating to the determination of the susceptibility of bacteria to antimicrobial agents. In: *Clin. Microbiol. Inf.* vol. 6, 2007, no 5, p. 503- 508.

KEY, K. S., FRAIMOW, H. S., ABRUTYN, A., 2000. Pathogens resistant to antimicrobial agents: Epidemiology, molecular mechanisms, and clinical management. In *Infect. Dis. Clin. N. Am.*, vol. 14, 2000, no 3, p. 293-319.

KHARAZMI, Y., HAMMES, W. P., HERTELI, C., 2002. Construction of a marker rescue system in *Bacillus subtilis* for detection of horizontal gene transfer in food. In *Syst. Appl. Microbiol.*, vol. 25, 2002, no. 3, p.471-477.

LADO, B., YOUSEF, A., 2002. Alternative foodpreservation technologies: efficacy a mechanisms. In *Microbes and Infection.* vol. 4., 2002, no. 6 p. 433-440.

MCMAHON, M. A. S., BLAIR, I. S., MOORE, J. E., McDOWELL, D. A., 2007. The rate of horizontal transmission of antibiotic resistance plasmids is increased in food preservation-stressed bacteria. In: *J. Appl. Microbiol.*, vol. 10, 2007, no. 3. p. 1883- 1888.

REINTHALAR, F. F., POSCH, J., FEIERL, G., WURST, G., HAAS, D., RUCKENBAUER, G., MASCHER, F., MARTH, E., 2003. Antibiotic resistance of *E. coli* in sewage and sludge. In *Water Research.*, vol. 37, 2003, no. 5, p. 1685-1690.

SWAM, M. M., 1969. In Report of the Joint Committee on the use of antibiotics in animal husbandry and veterinary medicine. London: her Majority's Stationary Office.

WHO. 2007. In Critically important antimicrobials for human medicine: Categorization for the development of risk management strategies to contain antimicrobial resistance due to non-human antimicrobial use. Copenhagen. s. 29- 31.

Pod'akovanie

Práca bola realizovaná za podpory APAV 4/2041/08, VEGA 1/0348/08.

Kontaktná adresa:

prof. MVDr. Jozef Bíreš, DrSc.

Klinika prežuvavcov, Univerzita veterinárskeho lekárstva v Košiciach, bires@uvm.sk

VPLYV PRÍDAVKU FYTOADITÍV NA KVALITU KURACIEHO MÄSA

VPLYV PRÍDAVKU FYTOADITÍV NA KVALITU KURACIEHO MÄSA

Marek Bobko, Ladislav Lagin, Mária Angelovičová, Alica Bobková, Peter Haščík

ABSTRACT

The aim of our experiment was to verify the effect of different phyto additives (oregano, cinnamon and thymus essential oils 0,05 %) and their impact on the losses in freezing, roasting, shear force and total sensory evaluation in broiler type of chickens hybrid mix COBB 500. In

experiment realize by us using of oregano and cinnamon essential oils (1,42 resp. 1,53 %) had a positive influence on reduction of losses by freezing in comparison with the control group (1,82 %). The losses by roasting we recorded in the lowest experiment group with additive of oregano essential oil (17,06 %) in the other monitored groups were those losses more than 2 %. We recorded lower shear force and therefore higher fragility in all groups with additive of essential oils. In the course of total sensory evaluation we did not recorded expressive influence in replacing antibiotic amount of essential oils. Our scores suggest on a possibility of replacing antibiotic amount of essential oils without negative effect on the quality of chicken meat.

Keywords: essential oils, antibiotic, quality meat

ÚVOD

Úplný zákaz používania kŕmnych antibiotík a rastových stimulátorov v štátoch EÚ od 1. januára 2006 je sprevádzaný intenzívnym hľadaním účinných prírodných aditív, ktoré by významne zlepšili úžitkovosť aj pri vysokej koncentrácii zvierat vo veľkochovoch a pri zabezpečení požadovaného zdravotného stavu zvierat. Legislatívne obmedzenia používania klasických antibiotických stimulátorov rastu a antimikrobiálnych látok v krmovinárstve vedie k aplikácii nových možných produktov v biotechnológii. Z tohto dôvodu sa hľadajú nové možnosti a spôsoby, ktorými by bolo možné tieto látky nahradiť.

Použitie rastlinných silíc ako jednej z možných alternatív za kŕmne antibiotiká, ktoré kladne ovplyvnili úžitkovosť zvierat vo svojich experimentoch sledovali **Demeterová (2004)**, **Mudroňová et al. (2005)**, **Angelovičová et al. (2005)**, **Angelovičová et al. (2006)** a iní.

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

Použitie bylín a esenciálnych olejov závisí od ich antimikrobiálnej aktivity. Väčšina rastlín má priaznivé multifunkčné vlastnosti, ktoré sú dané špecifickým obsahom bioaktívnych zložiek. **Kamel a McKay (2003)** charakterizujú fytogéne substancie ako prírodné látky rastlinného pôvodu, ktoré nezanechávajú rezídua v živočíšnych produktoch a nie je nutné dodržiavať ochrannú dobu pred jatočnou porážkou zvierat. **Lawrence a Reynolds (1984)** definovali rastlinné silice ako číre súbory zložiek zmesi, ich chemických zlúčenín a koncentrácií jednotlivých zložiek.

V posledných rokoch sa prejavil zvýšený záujem o využitie rastlinných silíc. Biologicky aktívne komponenty rastlín sú prevažne sekundárnymi produktmi ich metabolizmu, ako sú napr. terpenoidy, glykozidy a alkaloidy. Existuje veľká variabilita v ich zložení predovšetkým vzhľadom na biologické faktory, podmienky prípravy a skladovanie. Je nevyhnutné identifikovať a kvantifikovať ich biologický účinok najmä v snahe zlepšenia utilizácie živín a zdravotného stavu zvierat.

Neoddeliteľnou súčasťou skúmania využiteľnosti kŕmnych fytoaditív je aj problematika ich vplyvu na technologicko – spotrebiteľskú kvalitu živočíšnych produktov, vrátane ich zdravotnej bezpečnosti. Literárne poznatky svedčia o širokom spektre antimikrobiálnych a antioxidačných účinkov rastlinných extraktov na kvalitu výsledného produktu (**Marcin et al., 2004**, **Horosová et al., 2004**, **Tuberoso et al., 2005**, **Basile et al., 2006**, **Bozin et al., 2006**, **Singh et al., 2006** a **Trevisan et al., 2006**).

Nesprávna aplikácia rastlinných extraktov. Môže naopak spôsobiť opačný efekt. Dokazujú to výsledky **Busatta et al. (2008)**, ktorí pri hodnotení vplyvu prídavkov rastlinných extraktov na senzorickú kvalitu párkov zaznamenali, že so zvyšovaním ich koncentrácie dochádza k zhoršovaniu celkovej senzorickej kvality mäsového výrobku.

Cieľom práce bolo zhodnotenie vplyvu prídavku fytogénnych aditív na ukazovatele kvality kuracieho mäsa vybranej hybridnej kombinácie COBB 500 kŕmeného kompletnou kŕmnou zmesou (KKZ) s prídavkami fytoaditív a porovnať ich s výsledkami kontrolnej skupiny kŕmenej KKZ s prídavkom kŕmneho antibiotika avilamycín.

MATERIÁL A METODIKA

Na základe poznatkov o zmenách v oblasti výživy týkajúcich sa vylúčenia mäsokostných múčok a taktiež zakázania používania kŕmnych antibiotík od roku 2006 sa uskutočnil kŕmny pokus s výkrmovými kurčatami COBB 500 do 36 dňa výkrmu. Do pokusu sa zaradilo 100 kusov výkrmových kurčiat v každej skupine. Zvieratá sa rozdelili do štyroch skupín (kontrolná a tri pokusné skupiny). V kontrolnej skupine sa do kŕmnej zmesi počas skrmovania štartérovej kŕmnej zmesi pridávalo antibiotikum avilamycín vo forme komerčného prípravku Maxus 10 % (0,012 %). V prvej pokusnej skupine sa do kŕmnej zmesi pridával premix škoricovej silice (0,1 %), v druhej pokusnej skupine (0,05 %) a v tretej pokusnej skupine premix škoricovej silice (0,025 %).

Kurčatá všetkých skupín boli kŕmené kŕmnymi zmesami HYD-01(štartérová) od 1 do 18 dňa výkrmu, HYD-02 (rastová) od 19 do 31 dňa výkrmu a HYD-03 (finálna) od 32 do 36 dňa výkrmu. Po jatočnom opracovaní kurčiat sa jatočne opracované telá uskladnili na dobu 2 mesiacov v mraziarenských podmienkach pri teplote -18° C. Po rozmrazení JOT sa sledovali straty mrazením. Hmotnosť JOT a následné straty mrazením sa zisťovali na analytických váhach typu *Kern* s presnosťou na 0,1 g.

Následne sa odobrali z každého sledovaného kusa vzorky hydínového mäsa (stehná a prsia), ktoré boli získané z 12 ks kurčiat z každej skupiny vzorky, ktoré sa tepelne upravili pri 200 °C a vlastnom pečení počas doby 60 minút, s dopečením 10 až 15 minút. Následne sa anonymne vyhodnotili senzorické vlastnosti hydínového mäsa 5 člennou komisiou, pričom sa pri samotnom hodnotení použila 5-bodová stupnica hodnotenia. Z hľadiska senzorického sa sledovali nasledovné ukazovatele: vôňa, chuť, šťavnatosť, jemnosť a krehkosť mäsa. Strižná sila sa merala konzistometrom Warner-Bratzler značky Chatillon, metódou **Goodson et al., (2002)**, ktorá je definovaná ako sila potrebná na prestrihnutie vzorky mäsa o priereze 1 cm² naprieč vláknami mäsa.

Výsledky experimentu sa štatisticky vyhodnotili pomocou štatistického programu Statgraphics pri sledovaní základných štatistických ukazovateľov a na určenie preukaznosti rozdielov medzi sledovanými skupinami sa použil t-test.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Na základe poznatkov o zmenách v oblasti výživy týkajúcich sa vylúčenia mäsokostných múčok a taktiež zakázania používania kŕmnych antibiotík od roku 2006 sa uskutočnil kŕmny pokus s výkrmovými kurčatami COBB 500 do 36. dňa výkrmu. Do pokusu sa zaradilo 100 kusov výkrmových kurčiat v každej skupine. Zvieratá sa rozdelili do štyroch skupín (kontrolná a tri pokusné skupiny). V kontrolnej skupine sa do kŕmnej zmesi počas skrmovania štartérovej kŕmnej zmesi pridávalo

rozmrazením vyššie v porovnaní so zisteniami **James a James (2002)**, ktorí zaznamenali pri svojich sledovaniach straty rozmrazením $1 \pm 0,3$ % v závislosti od teplotných podmienok počas rozmrazovania. K podobným záverom dospeli aj **Malton a James (1984)**, ktorí zaznamenali pri mraziarenskom uskladnení pri -20 °C straty chladením na úrovni 1,4 – 1,6 %.

Tabuľka 2 udáva straty pečením jatočne opracovaných tiel hydiny. Najnižšie straty tepelným opracovaním (pečením) sme zaznamenali v 1. pokusnej skupine (17,03 %)

Tabuľka 1 **Straty JOT mrazením u kurčiat hybridnej kombinácie COBB 500**

Ukazovateľ	Kontrolná skupina	1. pokusná skupina	2. pokusná skupina	3. pokusná skupina
x (%)	1,82	1,42	1,53	2,03
s	1,09	0,69	0,38	0,62
min	1,09	0,77	1,09	1,03
max	3,72	2,55	2,12	2,64
v (%)	59,89	48,59	24,84	30,54

Tabuľka 2 **Straty JOT pečením u kurčiat hybridnej kombinácie COBB 500**

Ukazovateľ	Kontrolná skupina	1. pokusná skupina	2. pokusná skupina	3. pokusná skupina
x (%)	19,69	17,03	21,36	20,22
s	4,54	7,02	3,55	2,46
min	14,14	7,10	15,02	17,52
max	26,15	24,41	21,18	24,04
v (%)	23,57	41,69	16,62	12,17

antibiotikum avilamycín vo forme komerčného prípravku Maxus 10 % (0,012 %). V prvej pokusnej skupine sa do kŕmnej zmesi pridával premix pamajoránovej silice (0,05 %), v druhej pokusnej skupine premix škoricovej silice (0,05 %) a v tretej pokusnej skupine premix tymiánovej silice (0,05 %).

Straty mrazením po 2 mesiacoch skladovania pri teplote -18 °C udáva tabuľka 1. Z dosiahnutých výsledkov môžeme konštatovať, že aplikácia premixu pamajoránovej a škoricovej silice mala pozitívny vplyv na zníženie strát mrazením, nakoľko najnižšie straty sme dosiahli v 1. pokusnej skupine (1,42 %) s premixom pamajoránovej silice (0,05 %), a v 2. pokusnej skupine s premixom škoricovej silice (1,53 %). V 3. pokusnej skupine s prídavkom premixu tymiánovej silice sme zaznamenali straty mrazením na úrovni 2,03 %, čo predstavovalo najvyššie straty spolu s kontrolnou skupinou s prídavkom antibiotického preparátu avilamycín vo forme komerčného prípravku Maxus 10 % (0,012 %), pri ktorom sme zaznamenali straty mrazením 2,02 %. Štatistickým porovnaním zistených výsledkov strát mrazenia medzi jednotlivými sledovanými skupinami sme nezaznamenali významné rozdiely ($P > 0,05$). Nami dosiahnuté hodnoty strát

a najvyššie v 2. pokusnej skupine (21,36 %). V kontrolnej skupine a 3. pokusnej skupine sme zaznamenali straty 19,69 % resp. 20,22 %. Štatistickým porovnaním dosiahnutých výsledkov sme nezaznamenali štatisticky preukazné rozdiely medzi jednotlivými sledovanými skupinami ($P > 0,05$). Nami dosiahnuté straty pečením sú nižšie v porovnaní so zisteniami **Castellini et al. (2002)**, ktorí zaznamenali straty tepelnou úpravou celých jatočne opracovaných tiel v priemere od 32,65 do 35,17 %. Pri hodnotení strát tepelnou úpravou prsnej svaloviny dosiahli straty pečením podľa **Claus et al. (2001)** v priemere od 24,3 do 26,3 %. Straty pečením sú často ovplyvnené aj chemickým zložením svaloviny, a to predovšetkým množstvom tuku vo svalovine zvierat (**Haščík et al. 2005**).

Pri hodnotení priemerných hodnôt strižnej sily prsnej svaloviny (tabuľka 10) sme zaznamenali najvyššiu strižnú silu v kontrolnej skupine s prídavkom antibiotického preparátu $4,01 \text{ kg.cm}^{-2}$. V pokusných skupinách sme zaznamenali nasledovné ukazovatele strižnej sily. V 1. pokusnej skupine s prídavkom premixu pamajoránovej silice $3,75 \text{ kg.cm}^{-2}$. V 2. pokusnej skupine s prídavkom premixu škoricovej silice $3,16 \text{ kg.cm}^{-2}$ a najnižšiu strižnú silu a najlepšiu krehkosť mäsa sme zaznamenali v 3. pokusnej skupine prídavkom premixu tymiánovej silice $2,94 \text{ kg.cm}^{-2}$. V kontrolnej skupine s prídavkom antibiotika sme namerali hodnotu $2,56 \text{ kg.cm}^{-2}$ a v 1. pokusnej skupine s 0,1 % prídavkom škoricovej silice $2,49 \text{ kg.cm}^{-2}$. Štatistickým porovnaním dosiahnutých výsledkov sme nezaznamenali štatisticky preukazné rozdiely medzi jednotlivými sledovanými skupinami ($P > 0,05$).

Nami dosiahnuté priemerné hodnoty strižnej sily prsnej

Tabuľka 3 **Strižná sila prsnej svaloviny kurčiat hybridnej kombinácie COBB 500**

Ukazovateľ	Kontrolná skupina	1. pokusná skupina	2. pokusná skupina	3. pokusná skupina
x (kg.cm^{-2})	4,01	3,75	3,16	2,94
s	2,83	2,33	0,36	0,74
min	1,80	1,60	2,82	1,86
max	8,90	7,60	3,63	3,90
v (%)	70,57	62,13	11,39	25,17

a stehennej svaloviny potvrdzujú aj výsledky Haščíka et al. (2005), Costa et al. (2007), ktorí zaznamenali pri skrmovaní kŕmnych zmesí na báze rastlinných kŕmív

Tabuľka 4 Celkové senzorické hodnotenie prsnej svaloviny kurčiat hybridnej kombinácie COBB 500

Ukazovateľ	Kontrolná skupina	1. pokusná skupina	2. pokusná skupina	3. pokusná skupina
x (body)	17,06	16,75	16,55	16,83
s	1,12	0,46	1,11	0,75
min	15,66	16,00	15,16	15,50
max	18,50	17,16	18,25	17,58
v (%)	6,57	2,75	6,71	4,46

priemerné hodnoty strižnej sily nižšie ako 4 kg. cm⁻². Celkové senzorické posúdenie predstavuje súhrne hodnotenie nasledovných znakov: vôňa, chuť, šťavnatosť a jemnosť a krehkosť mäsa. Každá z týchto vlastností bola hodnotená 5-bodovou stupnicou. Maximálny počet bodov pridelených za celkové senzorické hodnotenie bol 20 bodov.

Pri hodnotení celkovej senzorickej hodnoty prsnej svaloviny (tabuľka 4) sme zaznamenali najvyššiu priemernú senzorickú hodnotu u kontrolnej skupiny 17,06 bodu. V 1. pokusnej skupine s prídavkom premixu pamajoránovej silice sme zaznamenali senzorickú hodnotu 16,75 bodu, v 2. pokusnej skupine s prídavkom škoricovej silice 16,55 bodu a v 3. pokusnej skupine s prídavkom premixu tymianovej silice 16,83 bodu. Štatistickým porovnávaním dosiahnutých výsledkov sme nezaznamenali štatisticky preukazné rozdiely medzi jednotlivými sledovanými skupinami (P>0,05).

ZÁVER

V nami realizovanom experimente použitie pamajoránovej a škoricovej silice pozitívne vplývalo na zníženie strát mrazením. Straty pečením sme zaznamenali najmenšie v pokusnej skupine s prídavkom pamajoránovej silice, u ostatných sledovaných skupín boli tieto straty vyššie o viac ako 2 %. Nahradenie antibiotického preparátu Maxus rastlinnými silicami malo vplyv i na krehkosť mäsa prsnej svaloviny, kedy sme zaznamenali nižšiu strižnú silu a teda vyššiu krehkosť vo všetkých skupinách s prídavkom rastlinných silíc. Pri celkovom senzorickom hodnotení sme nezaznamenali výraznejší vplyv nahradenia antibiotického preparátu rastlinnými silicami.

Nami dosiahnuté výsledky poukazujú na to, že pri nahradení antibiotických prípravkov v kŕmnych zmesiach pre výkrm hydiny rastlinnými silicami dosahujeme porovnateľné resp. lepšie ukazovatele kvality kuracieho mäsa.

LITERATÚRA

ANGELOVIČOVÁ, M. – MELLEN, M. – ANGELOVIČ, M. 2005. Použitie pamajoránovej silice ako náhrady za antibiotikum vo výžive výkrmových kurčiat. In *Dni výživy*, SPU : Nitra, 2005, s. 1-5. ISBN 80-8069-530- X

ANGELOVIČOVÁ, M. – MELLEN, M. – ANGELOVIČ, M. 2006. Uplatnenie biotechnologického postupu náhrady kŕmneho antibiotika premixom škoricovej silice vo výžive výkrmových kurčiat. In *Biotechnológia 2006*, JU: České Budejovice, 2006, s. 134 – 136. ISBN 8085-645-53-X.

BASILE, A. – SENATORE, F. – GARGANO, R. ET AL. 2006. Antibacterial and antioxidant activities in *Sidertis italica*(miller) Greuter et Burdet essential oils. In *J. Ethnopharmacol*, 107, 2006, s.240-248.

BIKLER, P. 2006. Performing nature – aplikovaná príroda. In *Slovenský chov*, 2006, roč. 11, č. 6, s. 45.

BOZIN, B. – MIMICA-DUKIC, N. – SIMIN, N. ET AL 2006. . Charakterization of the volatile composition of essential oils

of some lamiaceae spices and the microbial and antioxidant activities of the entire oils. In *J. Agric. Food Chem.*, roč. 54, 2006, s. 1822-1828.

BUSATTA, C. – VIDAL, R. S. – POPIOLSKI, A. S. 2008. Application of *Origanum majorana* L. essential oil as an antimicrobial agent in sausage. In *Food Microbiology*, roč. 25, 2008, s. 207 – 211.

CASTELLINI, C. – MUGNAI, C. – DAL BOSCO, A. 2002. Effect of organicproduction system on broiler carcass and meat quality. In *Meat Science*, roč. 60, 2002, s. 219-225.

CLAUS, J. R. – SCHILLING, J. K. – MARRIOTT, N. G. – DUNCAN, S. E. – SOLOMON, M. B. – WANG, H. 2001. Tenderization of chicken and turkey breasts with electrically produced hydrodynamic shockwaves. In *Meat Science*, roč. 58, 2001, s. 283-286.

COSTA, A. I. A. – TELEDDESCHI, E. – GERRITZEN, M. A. – REIMERT, H. G. M. – LINSSEN, J. P. H. – CONE, J. W. 2007. Influence of flock treatment with the antibiotic tylosin on poultry meat quality : results of a preliminary experiment. In *NJAS Wageningen Journal of Life Sciences*, roč. 54, 2007, č. 3, s. 269-278.

DEMETEROVÁ, M. 2004. Súčasné trendy vo výžive hydiny. In *Slovenský veterinársky časopis*, roč. 29, 2004, č. 5, s. 38-40.

DOCIC, M. - BILKEI, G. 2003. Differences in antibiotic in *Escherichia coli*, insolated from East-Europen swine hers with or without prophylactic use of antibiotics. In *J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health*, roč. 50, 2003, s. 27-30.

GOODSON, K. J. – MORGAN, W. W. – REAGAN, J. O. ET AL. 2002. Beef customer satisfaction: Factors affecting consumer evaluation of clod steaks. In *J. Anim. Science*, roč. 80, 2002, s. 401-408.

HASCIK ET AL. 2005. Vplyv probiotického preparátu na krehkosť hydínového mäsa. In *Maso*, 2005, roč. 16, č. 5, s. 22 – 23.

HOROSOVÁ, K – BUJŇAKOVÁ, D. – KMEŤ, V. 2004. Antimikrobiálne účinky rastlinných silíc na *E. coli* z podstavovej hnačky. In *Slovenský veterinársky časopis*, 2004, č. 5, s. 30.

JAMES, S. J. – JAMES, C. 2002. *Meat refrigeration*. Cambridge: Woodhead Publishing, 1. vyd., 347 s. ISBN 1-85573-442-7.

KAMEL, C. – MC KAY, R. 2003. Plant extracts enhance performance in broilers under *Clostridium perfringers* challenge. In *Journal of Animal Science*, roč. 81, 2003, č. 1, s. 103.

MALTON, R. – JAMES, S. J. 1984. Using refrigeration to reduce weight loss from meat, In *Proc. Symp. Profitability of Food Processing – 1984 Onwards – The Chemical Engineers Contribution*, Pub Ichem E, s. 207–217.

MARCIN, A. – MOLNÁROVÁ, I. – VALIGA, J. ET AL. 2004. Využitie kŕmnych aditív rastlinného pôvodu, modifikujúcich metabolickú aktivitu v gastrointestinálnom trakte, vo výžive hospodárskych zvierat. In *Správa za účelovú činnosť, Michalovce* : Oblastný výskumný ústav agroekológie, 2004.

MUDROŇOVÁ, D. – NEMCOVÁ, R. – GANCARČIKOVÁ, S. – JONECOVÁ, Z. – BOMBA, A. 2005. Alternatíva antibiotík v odchove mláďat HZ. In *Slovenský chov*, roč. 11, 2005, č. 1, s. 33-35.

OPLETAL, L. 2006. Performing nature – aplikovaná príroda. In *Slovenský chov*, 2006, roč. 11, č. 6, s. 44.

SINGH, G. – MARIMUTHU, P. – DE HELUANI, C. S. ET AL. 2006. Antioxidant and biocidal activities of *Carum nigrum* essential oil, oleoresin, and their selected components. In *J. Agric. Food. Chem.*, roč. 54, 2006, s. 174 – 181.

TREVISAN, M. T. – VASCONCELOS, SILVA, M. G. – PFUNDSTEIN, B. ET AL. 2006. Charakterization of the

volatile pattern and antioxidant capacity of essential oils from different species of the genus *Ocimum*. In *J. Agric. Food Chem.*, roč. 52, 2006, 4378 – 4382.

TUBEROSO, C. I. – KOWALCZYK, A. – CORONEO, V. ET AL. 2005. Chemical composition and antioxidant, antimicrobial and antifungal activities of the essential oils of *Achillea ligustica* all. In *J. Agric. Food Chem.*, roč. 53, 2005, s. 10148 – 10153.

PodĎakovanie: Práca vznikla s podporou VEGA 1/4420/07 a 1/0509/08.

Kontaktná adresa: Ing. Marek Bobko, PhD. Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre. Fakulta biotechnológie a potravinárstva. Katedra hodnotenia a spracovania živočíšnych produktov. Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra. email: marek.bobko@uniag.sk

PRODUKCE BIOGENNÍCH AMINŮ BAKTERIEMI IZOLOVANÝMI Z POVRCHU DRŮBEŽE

BIOGENIC AMINES PRODUCTION BY BACTERIA ISOLATED FROM POULTRY SKIN

Leona Buňková, František Buňka, Pavlína
Lukešová, Vladimír Mrkvíčka, Magda
Doležalová, Stanislav Kráčmar

ABSTRACT

The aim of this study is to explore production of biogenic amines (histamine, tyramine, putrescine, cadaverine, agmatine, spermine and spermidine) by 98 bacteria isolated from poultry skin (41 isolates of family *Enterobacteriaceae*, 21 isolates of genus *Aeromonas*, 16 isolates of genus *Pseudomonas*, 10 isolates of other gram-negative rods, and 10 isolates of gram-positive cocci). Ion-exchange chromatography was employed to analyze the above mentioned amines. Enterobacteria were found the largest producers of amines with proved presence of tyramine, agmatine, putrescine, and cadaverine in cultivation broth after incubation of bacteria. Putrescine and cadaverine were the most abundant products. Presence of at least 2 biogenic amines, i.e. mainly concurrent presence of putrescine and cadaverine, was revealed in 19 enterobacteria strains. Eleven isolates classified into *Aeromonas* genus produced putrescine and five of them formed also cadaverine. Gram-positive cocci produced tyramine especially. The other observed biogenic amines (histamine, spermine and spermidine) were not found among tested isolates. Production of biogenic amines by any *Pseudomonas* family isolates was not proved.

Keywords: biogenic amines, bacteria, chicken skin microflora

ÚVOD

Bezpečnosť potravín môže byť ohrozená mnohými rizikami biologického, fyzikálneho alebo chemického pôvodu (Golian et al., 2008; Sergent et al., 2008; Kačániová et

al., 2009). Mezi často sledované kontaminanty potravín patrí v poslednej dobe i biogenné aminy.

Biogenné aminy jsou nízkomolekulární bazické sloučeniny, které mohou způsobovat alimentární intoxikace (Halász et al., 1994; Silla Santos, 1996). Proto je z důvodu prevence v potravinářství nutná včasná detekce bakterií, které tyto sloučeniny produkují. Biogenné aminy mohou tedy sloužit jako indikátory procesu kažení potravin (Silla Santos, 1996; Vinci, Antonelli, 2002). Jejich výskyt je v potravinách závislý zejména na dekarboxylázové aktivitě přítomných mikroorganismů (Halász et al., 1994). Výskyt biogenních aminů lze předpokládat v potravinách obsahujících bílkoviny nebo volné aminokyseliny (jako prekurzory biogenních aminů), zvláště pokud poskytují vhodné podmínky pro biochemickou aktivitu přítomných mikroorganismů. Přítomnost biogenních aminů bývá často detekována v mase a masných produktech, včetně drůbeže (Geornaras et al., 1995; Patsias et al., 2006; Pircher et al., 2007). Produkce biogenních aminů je kromě dostupnosti prekurzorů (aminokyselin) závislá také na dalších vnitřních a vnějších (intrinsic and extrinsic) faktorech potravin, jako je např. teplota a pH prostředí, aero-/anaerobióza, dostupnost zdrojů uhlíku (např. glukózy), přítomnost růstových faktorů, růstová fáze buněk aj. (Gardini et al., 2001; Gardini et al., 2005; Greif et al., 2006; Fernández et al., 2007; Bover-Cid et al., 2008).

Kůže chlazené drůbeže má ideální podmínky pro růst širokého spektra mikroorganismů. S výjimkou fermentovaných masných výrobků, kde je metabolická činnost vybraných mikroorganismů nezbytná pro průběh zrání, jsou bakterie v mase a na jeho povrchu nežádoucí. Rychlost procesu kažení masa závisí na počtu a zastoupení přítomných mikroorganismů a na podmínkách pro jejich růst (zdroje živin, teplota, pH, složení atmosféry, vodní aktivita) (ICMSF, 2005). Mikroflóra chlazené drůbeže se nejčastěji skládá ze zástupců čeledi *Enterobacteriaceae*, *Micrococcaceae*, rodů *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Campylobacter*, *Arcobacter*, *Staphylococcus*, *Enterococcus* a bakterií mléčného kvašení (del Río et al., 2007; Son et al., 2007; Vihavainen et al., 2007; Nychas et al., 2008). Zástupci těchto bakterií bývají mnohdy popisováni jako producenti biogenních aminů (Geornaras et al., 1995; Bover-Cid et al., 2003; Özogul, Özogul,

2007; Pircher et al., 2007). Přítomnost bakterií s dekarboxylázovou aktivitou může tedy ukazovat na možnou přítomnost toxických produktů v potravinách. Ani chladiřské skladování nemusí zamezit vzniku biogenních aminů. Vinci, Antonelli, (2002) zjistili, že se obsah biogenních aminů zvyšuje během skladování při teplotě + 4 °C.

Cílem této studie bylo pomocí iontově-výměnné chromatografie prověřit bakterie izolované z povrchu chlazené drůbeže na produkci biogenních aminů: histaminu, tyraminu, putrescinu, kadaverinu, agmatinu, sperminu a spermidinu.

MATERIÁL A METODIKA

Izolace a charakterizace bakterií

Chlazená drůbež byla získána z obchodní sítě v České republice v období roku 2006 a skladována při teplotě 4 ± 1 °C po dobu 3 dnů. Vzorkování kuřecí kůže bylo prováděno metodou výplachu. Asepticky bylo naváženo 10 g kůže do 100 ml sterilního fyziologického roztoku, který byl následně 15 minut třepán. Následně byly vzorky kuřecí kůže podrobeny rutinní mikrobiologické analýze, byly sledovány psychrotrofní a mezofilní aerobní a fakultativně anaerobní bakterie. Vybrané kolonie bakterií různého fenotypu byly kultivovány na masopeptonovém agaru (HiMedia, Bombai, India) a čisté kultury byly následně identifikovány na základě biochemického profilu (Švec et al., 2004; Nováková, et. al., 2009). Z takto identifikovaných bakterií bylo testováno na produkci biogenních aminů 98 izolátů.

Kultivační podmínky a analýza produkce biogenních aminů

Dekarboxylační médium obsahovalo příslušné prekurzory testovaných biogenních aminů (aminokyseliny lyzin, histidin, tyrozin, ornitin, arginin; Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) v koncentraci 3,0 g/l a následující komponenty: 5,0 g/l pepton (HiMedia), 3,0 g/l kvasničný extrakt (HiMedia) a 0,002 % bromkresol purpur (Sigma-Aldrich). Následně bylo 5,0 ml média autoklávováno v uzavřených zkumavkách (121 °C, 15 min).

Bakterie byly kultivovány při 30 °C po dobu 24 hodin (každý izolát byl očkovan třikrát). Po inkubaci bakterií

byly buňky odstraněny centrifugací ($10000 \times g$, 30 min) a filtrováno přes 0,45 µm filtr.

Produkce 7 biogenních aminů (histamin, tyramin, putrescin, kadaverin, spermin, spermidin a agmatin) byla zjišťována pomocí iontově-výměnné chromatografie (Automatický analyzátor aminokyselin AAA400, Ingos Praha, Česká republika) podle Buňková et al. (2009). Každý izolát byl analyzován alespoň třikrát. Standardy byly získány ze Sigma-Aldrich.

VÝSLEDKY A DISKUZE

V této studii bylo na schopnost tvorby biogenních aminů histaminu, tyraminu, putrescinu, kadaverinu, agmatinu, sperminu a spermidinu testováno celkem 98 kmenů aerobních a/nebo fakultativně anaerobních bakterií izolovaných z povrchu drůbeže: 41 kmenů čeledi *Enterobacteriaceae* (11 *Escherichia coli*, 11 *Pantoea* sp., 3 *Serratia marcescens*, 2 *Serratia liquefaciens*, 1 *Serratia* sp., 4 *Proteus vulgaris* 1 *Klebsiella oxytoca*, 3 *Klebsiella* sp., 3 enteric group 69, 1 *Leclercia adecarboxylata*, 1 *Yersinia enterocolitica*), 21 izolátů rodu *Aeromonas* (7 *A. caviae*, 2 *A. sobria*, 1 *A. hydrophila*, 11 *Aeromonas* sp.), 16 izolátů rodu *Pseudomonas* (8 *P. fragi*, 4 *P. putida*, 4 *Pseudomonas* sp.), 10 kmenů jiných gramnegativních tyčinek (2 *Acinetobacter* sp., 1 *Delftia acidovorans*, 1 *Moraxella* sp., 3 blíže neurčené gramnegativní aerobní tyčinky, nefermentující, oxidáza-pozitivní a 3 blíže neurčené gramnegativní fakultativně anaerobní tyčinky, fermentující, oxidáza-negativní) a 10 kmenů grampozitivních koků (2 *Staphylococcus aureus*, 2 *Staphylococcus* sp., 1 *Micrococcus luteus*, 1 *Enterococcus faecium*, 1 *Streptococcus* sp., 3 blíže neurčené grampozitivní koky fakultativně anaerobní, kataláza-pozitivní). Zjištěné bakterie lze považovat za typické zástupce mikrobioty a/nebo kontaminanty povrchu drůbeže (ICMSE, 2005; del Río et al., 2007; Nychas et al., 2008). Z celkového počtu 98 testovaných izolátů byla *in vitro* zjištěna produkce alespoň 1 biogenního aminu u 49 izolátů (tabulka 1), z toho 21 kmenů produkovalo 2 biogenní

Tabulka 1. *In vitro* minimální a maximální produkce biogenních aminů (mg/l) u bakteriálních izolátů z povrchu drůbeže

	N / Pozitivní*	Histamin	Tyramin	Putrescin	Kadaverin	Agmatin	Spermin	Spermidin
<i>Aeromonas</i> sp.	21 / 11	ND	ND	2,08-3,77	6,04-73,84	ND	ND	ND
<i>Pseudomonas</i> sp.	16 / 0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>Enterobacteriaceae</i>	41 / 31	ND	2,02-4,58	2,00-109,80	3,90-143,18	7,20-32,29	ND	ND
ostatní G- tyčinky	10 / 3	ND	ND	2,15-12,86	2,66	ND	ND	ND
G+ koky	10 / 4	ND	2,08-9,82	7,62	ND	ND	ND	ND

* Počet izolátů dané skupiny bakterií / počet pozitivních izolátů.

ND – biogenní aminy nebyly detekovány.

Tabulka 2. Produkce dvou a více biogenních aminů bakteriemi izolovanými z povrchu drůbeže.

	<i>Aeromonas</i> sp.	<i>Enterobacteriaceae</i>	ostatní G- tyčinky	G+ koky
Tyramin + putrescin	0	1	0	0
Putrescin + kadaverin	5	18	1	0
Putrescin + kadaverin + agmatin	0	4	0	0

aminy, nejčastěji v kombinaci putrescin a kadaverin, a 4 kmeny dokonce 3 biogenní aminy (putrescin, kadaverin a agmatin; tabulka 3). Žádný z testovaných kmenů neprodukoval histamin, spermin ani spermidin (tabulka 1). Pro lepší orientaci byla tvorba biogenních aminů jednotlivými bakteriemi rozdělena do 4 skupin: (i) bez produkce biogenních aminů nebo velmi slabá produkce (do 2 mg/l kultivačního média); (ii) slabá produkce (2-10 mg/l); (iii) střední produkce (>10-100 mg/l); a (iv) silná produkce (>100 mg/l) biogenních aminů testovanými gramnegativními bakteriemi (tabulka 3).

Slabá produkce tyraminu byla *in vitro* zjištěna u celkem 4 izolátů z čeledi *Enterobacteriaceae*: u 3 kmenů *Pantoea* sp. (v rozmezí 2,02-2,52 mg/l média), a 1 kmene *Proteus vulgaris* v množství 4,58±0,38 mg/l média a také u 3 kmenů grampozitivních koků v rozmezí 2,08-9,82 mg/l média. Z grampozitivních koků byl tyramin detekován u

Staphylococcus aureus, *Enterococcus faecium* a *Streptococcus* sp. (tabulka 3). K podobným výsledkům dospěli i **Pircher et al. (2007)** a **Pons-Sánchez-Cascado et al. (2005)**, kteří zjistili pouze slabou produkci tyraminu u malého počtu z testovaných enterobakterií, respektive gramnegativních bakterií. Slabou produkci tyraminu u gramnegativních bakterií zaznamenali také **Özogul a Özogul (2007)**. Naproti tomu **Geornaras et al. (1995)** zjistili kultivační metodou produkci tyraminu u většiny z testovaných gramnegativních bakterií izolovaných z drůbeže. Kultivační metoda je však pro zjišťování produkce biogenních aminů méně vhodná, protože může docházet k falešně pozitivním reakcím (**Bover-Cid, Holzapfel, 1999; Buňková et al., 2009**). Produkce tyraminu je typická spíše pro grampozitivní bakterie, resp. bakterie mléčného kvašení (**Bover-Cid, Holzapfel, 1999; Pircher et al., 2007**).

Přítomnost agmatinu v kultivačním médiu po inkubaci

Tabulka 3. Produkce biogenních aminů u bakterií izolovaných z povrchu drůbeže

	N	Tyramin [*] -/+ /+++ /++++	Putrescin -/+ /+++ /++++	Kadaverin -/+ /+++ /++++	Agmatin -/+ /+++ /++++
<i>Enterobacteriaceae</i>					
<i>Escherichia coli</i>	11	11/0/0/0	3/6/2/0	1/0/2/8	8/1/2/0
<i>Pantoea</i> sp.	11	8/3/0/0	10/1/0/0	11/0/0/0	11/0/0/0
<i>Proteus vulgaris</i>	4	3/1/0/0	2/2/0/0	2/0/1/1	3/0/1/0
<i>Serratia marcescens</i>	3	3/0/0/0	0/0/3/0	0/2/0/1	3/0/0/0
<i>Serratia liquefaciens</i>	2	2/0/0/0	0/2/0/0	0/0/0/2	2/0/0/0
<i>Serratia</i> sp.	1	1/0/0/0	0/1/0/0	0/0/0/1	1/0/0/0
<i>Klebsiella</i> sp.	4	4/0/0/0	4/0/0/0	0/0/0/4	4/0/0/0
Enteric group 69	3	3/0/0/0	0/0/1/2	1/1/1/0	3/0/0/0
<i>Leclercia adecarboxylata</i>	1	1/0/0/0	1/0/0/0	1/0/0/0	1/0/0/0
<i>Yersinia enterocolitica</i>	1	1/0/0/0	0/1/0/0	0/0/1/0	1/0/0/0
<i>Aeromonas</i>					
<i>Aeromonas caviae</i>	7	7/0/0/0	4/3/0/0	6/0/1/0	7/0/0/0
<i>Aeromonas sobria</i>	2	2/0/0/0	2/0/0/0	2/0/0/0	2/0/0/0
<i>Aeromonas hydrophila</i>	1	1/0/0/0	0/1/0/0	0/0/1/0	1/0/0/0
<i>Aeromonas</i> sp.	11	11/0/0/0	4/7/0/0	8/2/1/0	11/0/0/0
ostatní G- tyčinky					
<i>Acinetobacter</i> sp.	2	2/0/0/0	2/0/0/0	2/0/0/0	2/0/0/0
<i>Delftia acidovorans</i>	1	1/0/0/0	0/1/0/0	1/0/0/0	1/0/0/0
<i>Moraxella</i> sp.	1	1/0/0/0	1/0/0/0	1/0/0/0	1/0/0/0
aerobní nefermentující oxidáza pozitivní	3	3/0/0/0	3/0/0/0	3/0/0/0	3/0/0/0
fakultativně anaerobní fermentující oxidáza negativní	3	3/0/0/0	1/1/1/0	2/1/0/0	3/0/0/0
grampozitivní koky					
<i>Staphylococcus aureus</i>	2	1/1/0/0	2/0/0/0	2/0/0/0	2/0/0/0
<i>Staphylococcus</i> sp.	2	2/0/0/0	1/1/0/0	2/0/0/0	2/0/0/0
<i>Micrococcus luteus</i>	1	1/0/0/0	1/0/0/0	1/0/0/0	1/0/0/0
<i>Enterococcus faecium</i>	1	0/1/0/0	1/0/0/0	1/0/0/0	1/0/0/0
<i>Streptococcus</i> sp.	1	0/1/0/0	1/0/0/0	1/0/0/0	1/0/0/0
ostatní G+ koky	3	3/0/0/0	3/0/0/0	3/0/0/0	3/0/0/0

N – počet izolátů dané skupiny bakterií;

* Počet izolátů produkujících biogenní aminy v rozmezí: <2 mg/l (-); 2-10 mg/l (+); >10-100 mg/l (++); > 100 mg/l (+++).

bakterií byla, podobně jako v případě tyraminu, zjištěna pouze u zástupců čeledi *Enterobacteriaceae*, a to u 3 kmenů *Escherichia coli* a 1 kmene *Proteus vulgaris* (tabulka 3). U 1 kmene (*E. coli*) byla produkce slabá ($7,20 \pm 0,81$ mg/l), u zbývajících 3 kmenů byla detekována produkce střední ($22,85\text{--}32,29$ mg/l). Slabou produkci agmatinu zaznamenali u některých gramnegativních bakterií *in vitro* také **Özogul a Özogul (2007)**.

Nejčastěji produkovaným biogenním aminem byl putrescin, jehož produkce byla zjištěna u celkem 35 testovaných kmenů gramnegativních bakterií a 1 grampozitivního izolátu (tabulka 3) v rozmezí $2,00\text{--}109,80$ mg/l. Většina putrescin-pozitivních gramnegativních bakterií náležela do čeledi *Enterobacteriaceae* (21 izolátů) nebo do rodu *Aeromonas* (11 izolátů). U všech pozitivních kmenů z rodu *Aeromonas* byla zaznamenána slabá produkce putrescinu v rozmezí $2,08\text{--}3,77$ mg/l. Z 41 testovaných izolátů čeledi *Enterobacteriaceae* nebyla produkce putrescinu zjištěna u 20 izolátů, slabá produkce byla zaznamenána u 12 kmenů (6 kmenů *E. coli*, 1 kmen *Pantoea* sp., 3 kmeny *Serratia* sp. a 2 kmeny *P. vulgaris*), střední produkce u 6 kmenů a silná produkce u 2 kmenů (enteric group 69). Ve studii **Özogul a Özogul (2007)** většina testovaných gramnegativních bakterií také produkovala putrescin, podobně jako gramnegativní bakterie izolované z ančoviček (**Pons-Sánchez-Cascado et al., 2005**). Značnou produkci putrescinu u enterobakterií izolovaných z potravin živočišného původu zaznamenali také **Pircher et al. (2007)**. Podobně jako u našich izolátů z povrchu drůbeže byly největšími producenty putrescinu *E. coli*, *Klebsiella* sp. a *Serratia* sp.

Více jak třetina (37,5 %) všech testovaných kmenů produkovala kadaverin. U většiny kadaverin-pozitivních izolátů lze produkci hodnotit jako střední nebo silnou (tabulka 3). Slabá nebo střední produkce ($6,04\text{--}73,84$ mg/l) byla zaznamenána u 5 izolátů *Aeromonas*. S výjimkou bakterií rodu *Pantoea* byla zaznamenána produkce kadaverinu u všech identifikovaných rodů čeledi *Enterobacteriaceae*. U testovaných izolátů *E. coli* byl negativní pouze 1 kmen, u ostatních byla zjištěna produkce kadaverinu v rozmezí $90,22\text{--}143,18$ mg/l. Schopnost dekarboxylace lyzinu byla zjištěna také u izolátů rodů *Serratia* a *Klebsiella*, přičemž u všech kmenů rodu *Klebsiella* byla zaznamenána silná produkce ($127,43\text{--}140,00$ mg/l). U zbývajících kmenů enterobakterií byla zjištěna produkce kadaverinu v rozmezí $3,89\text{--}117,67$ mg/l. K podobným závěrům dospěli i jiní autoři (**Özogul, Özogul, 2007; Pircher et al., 2007**), kteří rovněž zjistili poměrně výraznou produkci kadaverinu u mnohých testovaných gramnegativních bakterií. Biogenní aminy jsou produkty metabolismu mnohých mikroorganismů a mohou být tedy využity jako indikátory procesu kažení potravin bohatých na bílkoviny a tím i poukazovat a na kvalitu masa, resp. hygienické podmínky při jeho

zpracování a skladování. S prodlužující se dobou skladování dochází v maso a masných produktech s nárůstem kontaminující mikroflóry i ke zvýšení obsahu biogenních aminů (**Nassar, Emam, 2002; Silva, Glória, 2002; Min et al., 2004; Villanueva Valero et al., 2005**). Drůbeží povrch i maso jsou obzvláště vhodným prostředím pro růst mikroorganismů a tedy i produkci biogenních aminů (**Tamim, Doerr, 2003; Min et al., 2004**). Ke zvýšení produkce biogenních aminů v drůbeží svalovině může docházet i během zamrazení (**Moreira et al., 2008**), proto se v současné době hledají metody vedoucí ke snížení množství biogenních aminů v drůbežím maso (**Min et al., 2007**). Popis mikroflóry povrchu drůbeže z hlediska produkce biogenních aminů tak může přispět k poznatkům, které mohou napomoci ke zvýšení bezpečnosti i kvality drůbežího masa.

ZÁVĚR

Z drůbežího povrchu byly izolovány gramnegativní bakterie, u kterých byla v podmínkách *in vitro* zjištěna produkce biogenních aminů tyraminu, agmatinu, putrescinu a kadaverinu. Nejčastěji byly produkovány putrescin a kadaverin, a to zejména bakteriemi čeledi *Enterobacteriaceae*. U testovaných gramnegativních bakterií nebyla zjištěna produkce histaminu, sperminu ani spermidinu.

LITERATURA

- BOVER-CID, S., HOLZAPFEL, W. H., 1999. Improved screening procedure for biogenic amine production by lactic acid bacteria, In *International Journal of Food Microbiology*, roč. 53, 1999, s. 33-41.
- BOVER-CID, S., HERNÁNDEZ-JOVER, T., MIGUÉLEZ-ARRIZADO, M. J., VIDAL-CAROU, M. C., 2003. Contribution of contaminant enterobacteria and lactic acid bacteria to biogenic amine accumulation in spontaneous fermentation of pork sausages, In *European Food Research and Technology*, roč. 216, 2003, s. 477-482.
- BOVER-CID, S., MIGUÉLEZ-ARRIZADO, M. J., BECKER, B., HOLZAPFEL, W. H., VIDAL-CAROU, M. C., 2008. Amino acid decarboxylation by *Lactobacillus curvatus* CTC273 affected by the pH and glucose availability, In *Food Microbiology*, roč. 25, 2008, s. 269-277.
- BUŇKOVÁ, L., BUŇKA, F., HLOBILOVÁ, M., VAŇÁTKOVÁ, Z., NOVÁKOVÁ, D., DRÁB, V., 2009. Tyramine production of technological important strains of *Lactobacillus*, *Lactococcus* and *Streptococcus*. In *European Food Research and Technology*, DOI 10.1007/s00217-009-1075-3.
- DEL RÍO, E., PANIZO-MORÁN, M., PRIETO, M., ALONSO-CALLEJA, C., CAPITA, R., 2007. Effect of various chemical decontamination treatments on natural microflora and sensory characteristics of poultry. In

International Journal of Food Microbiology, roč. 115, 2007, s. 268-280.

FERNÁNDEZ, M., LINARES, D. M., RODRÍGUEZ, A., ALVAREZ, M. A., 2007. Factors affecting tyramine production in *Enterococcus durans* IPLA 655. In *Applied Microbiology and Biotechnology*, roč. 73, 2007, s. 1400-1406.

GARDINI, F., MARTUSCELLI, M., CARUSO, M. C., GALGANO, F., CRUDELE, M. A., FAVATI, F., GUERZONI, M. E., SUZZI, G., 2001. Effects of pH, temperature and NaCl concentration on the growth kinetics, proteolytic activity and biogenic amine production of *Enterococcus faecalis*. In *International Journal of Food Microbiology*, roč. 64, 2001, s. 105-117.

GARDINI, F., ZACCARELLI, A., BELLETI, N., FAUSTINI, F., CAVAZZA, A., MARTUSCELLI, M., MASTROCOLA, D., SUZZI, G., 2005. Factors influencing biogenic amine production by a strain of *Oenococcus oeni* in a model system. In *Food Control*, roč. 16, 2005, s. 609-616.

GEORNARAS, I., DYKES, G. A., von HOLY, A., 1995. Biogenic amine formation by poultry-associated spoilage and pathogenic bacteria. In *Letters in Applied Microbiology*, roč. 21, 1995, s. 164-166.

GOLIAN, J., ŠIŠKA, B., TOMAN, R., HLUCHÝ, S., 2008. Content of cadmium and lead in selected food of animal origin. In *Toxicology Letters*, roč. 180, 2008, s. S235-S235.

GREIF, G., GREIFOVÁ, M., KAROVIČOVÁ, J., 2006. Effects of NaCl concentration and initial pH value on biogenic amine formation dynamics by *Enterobacter* spp. bacteria in model conditions. In *Journal of Food and Nutrition Research*, roč. 45, 2006, s. 21-29.

HALÁSZ, A., BARÁTH, Á., SIMON-SARKADI, L., HOLZAPFEL, W., 1994. Biogenic amines and their production by microorganisms in food. In *Trends in Food Science and Technology*, roč. 5, 1994, s. 42-49.

ICMSF – International Commission on Microbiological Specification for Foods., 2005. *Microorganisms in foods 6*. 2nd ed. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2005, 736 s.

KAČÁNIOVÁ, M., KŇAZOVICKÁ, V., MELICH, M., FIKSELOVÁ, M., MASSÁNYI, P., STAWARZ, R., HAŠČÍK, P., PECHOČIAK, T., KUCZKOWSKA, A., PUTALA, A., 2009. Environmental concentration of selected elements and relation to physicochemical parameters in honey. In *Journal of Environmental Science Health Part A – Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering*, roč. 44, 2009, s. 414-422.

MIN, J. S., LEE, S. O., JANG, A., JO, C., LEE, M., 2007. Control of microorganisms and reduction of biogenic amines in chicken breast and thigh by irradiation and organic acids. In *Poultry Science*, roč. 86, 2007, s. 2034-2041.

MIN, J. S., LEE, S. O., JANG, A., LEE, M., KIM, Y., 2004. Production of biogenic amines by microflora inoculated in meats. In *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, roč. 17, 2007, s. 1472-1478.

MOREIRA, A. P. S., GIOMBELLI, A., LABANCA, R. A., NELSON, D. L., GLORIA, M. B. A., 2008. Effect of aging on bioactive amines, microbial flora, physico-chemical

characteristics, and tenderness of broiler breast meat. In *Poultry Science*, roč. 87, 2008, s. 1868-1873.

NASSAR, A. M., EMAM, W. H., 2002. Biogenic amines in chicken meat products in relation to bacterial load, pH value and sodium chloride content. In *Nahrung/Food*, roč. 46, 2002, s. 197-199.

NOVÁKOVÁ, D., ŠVEC, P. & SEDLÁČEK, I. (2009). Characterization of *Aeromonas encheleia* strains isolated from aquatic environments in the Czech Republic. *Letters in Applied Microbiology*, 48, 289-294.

NYCHAS, G.-J. E., SKANDAMIS, P. N., TASSOU, C. C., KOUTSOUMANIS, K. P., 2008. Meat spoilage during distribution. In *Meat Science*, roč. 78, 2008, s. 77-89.

ÖZOGUL, F., ÖZOGUL, Y., 2007. The ability of biogenic amines and ammonia production by single bacterial cultures. In *European Food Research and Technology*, roč. 225, 2007, s. 385-394.

PATSIAS, A., CHOULIARA, I., PALEOLOGOS, E. K., SAVVAIDIS, I., KONTOMINAS, M. G., 2006. Relation of biogenic amines to microbial and sensory changes of precooked chicken meat stored aerobically and under modified atmosphere packaging at 4 °C. In *European Food Research and Technology*, roč. 223, 2006, s. 683-689.

PIRCHER, A., BAUER, F., PAULSEN, P., 2007. Formation of cadaverine, histamine, putrescine and tyramine by bacteria isolated from meat, fermented sausages and cheeses. In *European Food Research and Technology*, roč. 226, 2007, s. 225-231.

PONS-SÁNCHEZ-CASCADO, S., BOVER-CID, S., VECIANA-NOGUÉS, M. T., VIDAL-CAROU, M. C., 2005. Amino acid-decarboxylase activity of bacteria isolated from ice-preserved anchovies. In *European Food Research and Technology*, roč. 220, 2005, s. 312-315.

SERGEANT, T., RIBONNET, L., KOLOSOVA, A., GARSOU, S., SCHAUT, A., DE SAEGER, S., VAN PETEGHEM, C., LARONDELLE, Y., PUSSEMIER, L., SCHNEIDER, Y.-J., 2008. Molecular and cellular effects of food contaminants and secondary plant components and their plausible interactions at the intestinal level. In *Food and Chemical Toxicology*, roč. 46, 2008, s. 813-841.

SILLA SANTOS, M. H., 1996. Biogenic amines: their importance in foods. In *International Journal of Food Microbiology*, roč. 29, 1996, s. 213-231.

Poděkování:

Práce vznikla za podpory projektu MŠMT: MSM 7088352101.

Kontaktní adresa:

RNDr. Leona Buňková, Ph.D. Ústav technologie tuků, tenzidů a kosmetiky, Fakulta technologická, Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, nám. T.G. Masaryka 275, 762 72 Zlín.

Tel: 00420 576 031 154, email: bunkova@ft.utb.cz

INHIBIČNÝ VPLYV KATIÓNOV RIZIKOVÝCH PRVKOV NA ÚRODU SÓJE

THE INHIBITION INFLUENCE OF RISKY ELEMENTS CATIONS ON SOYA BEAN YIELD

Judita Bystrická, Ján Tomáš, Július Árvay,
Mária Timoracká

ABSTRAKT

Lead and cadmium influence on ecosystem, its risk for man from the standpoint of carcinogenity, mutagenity and teratogenity are discussed problem. Nowadays the attention is paid not only to content of individual heavy metals in system soil-plant-foodstuff, but also to survey of individual interactions and mutual influencing of heavy metals with some microelements.

Obtained results suggest that individual application of lead and cadmium into the soil (lead 200 mg.kg⁻¹, cadmium 10 mg.kg⁻¹) had negative influence not only on the yield of soya bean, but also on evaluated qualitative parameters. In the case of added lead the yield lowered by 19.3 % when compared with control variant and in the case of added cadmium into the soil the yield also lowered (by 35.9 % when compared with control).

When the combinations of lead + zinc (80 mg/kg - variant B) and another one (cadmium + zinc - variant E) were added into the soil, only moderate lowering of soya bean yield was observed (by 8.4 % and by 10.1 %, respectively) when compared to control variant, what could be cleared probably by positive effects of added zinc cations. Common applications of lead and zinc affected the decline of assessed lead content in dry matter of soya bean by 0.36 mg.kg⁻¹, while in variant B (200 mg.kg⁻¹) this value was 0.74 mg.kg⁻¹. When the combination of cadmium and zinc was applied (variant E) the similar results were gained. While the individual dose of cadmium into the soil (variant D) had enhanced its content in dry matter of soya even to the value 3.41 mg.kg⁻¹. The latter affecting of zinc declined this value on 0.19 mg.kg⁻¹ what could be positively summarized.

Keywords: lead, cadmium, zinc, yield, soya bean

ÚVOD

Sója (*Glycine max.*) svojim zložením a možnosťami využitia má osobitné postavenie v ľudskej výžive a je dôležitou surovinou. Zaujme medzi prírodnými potravinami prvé miesto v bohatosti na bielkoviny (35 %), pričom sa bielkoviny vyznačujú výbornou skladbou esenciálnych aminokyselín. Obsahuje draslík, fosfor, horčík, vápnik, železo, zinok a vitamín B. Sója sa cení aj pre vysoký obsah nenasýtených mastných kyselín (Vollmannová et al., 2006)

Základom optimálnej a plnohodnotnej výživy sú potraviny, ktoré prispievajú k zdraviu obyvateľstva. Preto sa v súčasnosti čoraz viac vedeckých štúdií zameriava na identifikáciu prítomnosti a na elimináciu kontaminujúcich látok v potravinách. Z kontaminujúcich látok, ktoré najviac ohrozujú potraviny rastlinného pôvodu

patria ťažké kovy (Capcarová et al., 2009). Ekologické riziká z kumulácie ťažkých kovov v pôde sa odrážajú na schopnosti pôd poskytovať hygienicky neškodné potraviny. Zvlášť to platí pre obsahy ťažkých kovov s vysokým stupňom biotoxicity (Stanovič et al., 2006). Potravinový reťazec je od svojho primárneho článku až po finalizáciu a distribúciu potravín otvorený prenikaniu cudzorodých látok. Cudzorodé látky sú látky, ktoré nie sú prirodzenou zložkou potravín, pridávajú sa do nich zámerne ako aditívne látky, alebo sa v potravinách vyskytujú ako dôsledok ich výroby, resp. znečistenia životného prostredia (Musilová et al., 2008). Ťažké kovy sa v pôdach vyskytujú v rôznych koncentráciách a v rôznych formách. Môžu pochádzať priamo zo zvetranej materskej horniny, kedy ich koncentrácia a rozšírenie je priamo ovplyvňované prebiehajúcimi pôdotvornými procesmi, alebo vstupujú do pôdy ako priamy dôsledok ľudskej činnosti (Árvay et al., 2007). Príjem ťažkých kovov rastlinami môže byť ovplyvnený prostredníctvom interakcií aj s inými prvkami. Na možné využitie týchto vzťahov (synergické aj antagonistické) a na minimalizáciu vstupu rizikových prvkov do potravinového reťazca poukazujú viacerí autori (Lombi et al., 2000; Adiloglu, 2002; Yassen et al., 2007).

Pravidelný aj nízky príjem toxických prvkov môžeme považovať za rizikový pre jeho kumulačnú schopnosť v cieľových orgánoch a v tkanivách. Z tohto pohľadu je nevyhnutné hľadať spôsoby a postupy pre spomaľovanie migrácie ťažkých kovov ako je kadmium, olovo, arzén, chróm, meď do rastlínstva a tým do celého potravinového reťazca (Peralta-Videa, 2009).

Najčastejšími zdravotnými problémami, ktoré zapríčiňujú ťažké kovy sú alergie, precitlivosť, problémy s vysokým krvným tlakom, choroby kostí, kĺbov a chrbtice. Najčastejšou príčinou úmrtí sú srdcovocievne ochorenia (Toman et al., 2003). Niektoré ťažké kovy vykazujú karcinogénne, mutagénne a teratogénne účinky.

MATERIÁL A METODIKA

Testovaná plodina bola sója fazuľová (*Glycine max.*) odroda Korada, ktorá sa vyznačuje veľkým semenom žltej až zelenožltej farby so žltým alebo hnedým pupkom. Pokus bol realizovaný ako nádobový, varianty pozorovania A, B, C, D, E, sú uvedené v tabuľke 1.

Do plastových nádob tvaru valca s priemerom 20 cm a výškou 25 cm, s perforovaným dnom sme navážili 6 kg zeminy. Základné živiny sme aplikovali vo forme hnojiva NPK. Ťažké kovy boli pridávané vo forme empirických roztokov:

Olovo vo forme Pb(NO₃)₂.

Kadmium vo forme CdCl₂ · 2 1/2 H₂O,

Zinok vo forme ZnSO₄ · 7 H₂O.

Po aplikovaní základných živín NPK a ťažkých kovov vo forme empirických roztokov sme do zeminy vysiali osivo testovanej plodiny. Po vzídení boli rastliny vyjednotené na 7 ks rastlín sóje v jednej nádobe.

odnotili sme hmotnosť úrody sóje po zapravení ťažkých kovov do pôdy a kvalitatívne zloženie zrna z hľadiska obsahu rizikových prvkov. Obsah rizikových prvkov sme stanovili po mineralizácii suchou cestou atómovou

Tabuľka 1: Charakteristika variantov nádobového pokusu

varianty	charakteristika	Opakovania
A	NPK – kontrola	1 – 4
B	NPK + 200 mg Pb .kg ⁻¹ pôdy	5 – 8
C	NPK + 200 mg Pb + 80 mg Zn . kg ⁻¹	9 – 12
D	NPK + 10 Cd mg .kg ⁻¹ pôdy	13 – 16
E	NPK + 10 mg Cd + 80 mg Zn .kg ⁻¹	17 – 20

Tabuľka 2: Agrochemická charakteristika pôdneho substrátu v mg.kg⁻¹

Pôdna reakcia pH		c _{ox}	hum	Obsah živín (mg.kg ⁻¹)				
H ₂ O	KCl	%	%	N	P	K	Ca	Mg
5,98	4,63	1,527	2,633	2979,0	19,86	215,5	1459,5	265

Tabuľka 3: Obsah potenciálne prístupných ťažkých kovov v použitej pôde (vo výluhu HNO₃ c = 2 mol.dm⁻³) (mg.kg⁻¹)

Cu	Fe	Zn	Mn	Cr	Pb	Cd	Ni	Co
9,54	1645	51,5	398,5	2,34	13,18	0,37	7,30	4,54

absorpčnou spektrofotometriou (AAS) na prístroji VARIAN AA 240 FS.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Znečistenie životného prostredia má rôzne formy a jednou z nich je aj kontaminácia pôdy. Ťažké kovy predstavujú významnú skupinu znečistenia pôdy a sú zdrojom rizika poškodenia zdravia človeka z hľadiska teratogenity, mutagenity i karcinogenity. K rozšíreniu poznatkov a o vplyve ťažkých kovov na životné prostredie vedie aj skúmanie synergických prípadne antagonistických vzťahov medzi jednotlivými sústavami prvkov. V tejto práci sme porovnávali účinok samostatného dvojmocného kationu olova, účinok samostatného dvojmocného kationu kadmia na rast, úrodu a kumuláciu schopnosť sóje (*Glycine max.*) a zhodnotili sme vplyv, ak sa k izolovanému účinku olovnatých, resp. kademnatých

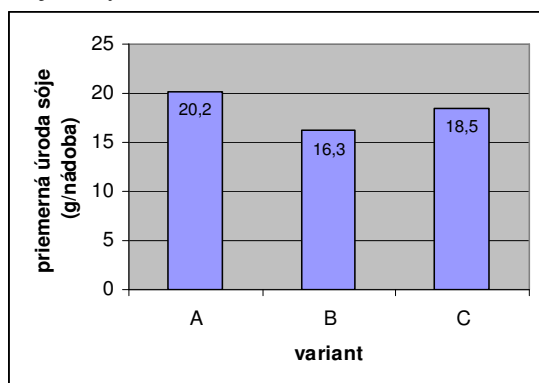
(Lombi et al., 2000) sú mechanizmy príjmu kadmia a zinku rastlinami na sebe závislé a dochádza k rovnakému príjmu oboch prvkov v podmienkach ich vysokého nahromadenia v pôde. Z našich dosiahnutých výsledkov vyplýva, že pri zapravení 10 mg kadmia na kg pôdy (variant D) klesla úroda semien sóje oproti kontrole o 35, 9 %. Spoločnou aplikáciou kadmia a zinku (variant E), síce oproti kontrole sme zaznamenali mierny pokles úrody ale v porovnaní s variantom D však nastalo zvýšenie o 39 %, čo môžeme pozitívne hodnotiť.

Zinok a kadmium môžu súťažiť o väzbové miesta v pôdnom systéme. Vďaka meniacim sa mechanizmom, v ktorých kadmium a zinok môžu pôsobiť, konečný efekt prídavku zinku v systéme pôda-rastlina sa mení, v závislosti od koncentrácie kadmia a zinku, pôdnych vlastností a druhu rastlín.

K podobným výsledkom sme sa dopracovali pri zapravení dvojmocného kationu olova do pôdy. Zapravenie samostatného kationu olova do pôdy (variant B) takisto mal negatívny vplyv na a výšku úrody sóje a zaznamenali sme pokles úrody oproti kontrolnému variantu (A) o 19,3 %. Spoločnou aplikáciou olova a zinku tento pokles voči kontrolnému variantu bol miernejší (8,4 %) čo už tiež hodnotíme kladne.

Keďže sme do pôdy aplikovali dvojmocné kationy ťažkých kovov (Pb, Cd,) a Zn²⁺ na elimináciu negatívnych účinkov olovnatých a kademnatých kationov, tak sme sledovali aj obsahy týchto ťažkých kovov v sušine rastlín sóje. Dosiahnuté výsledky znázorňuje obrázok 3 Olovo aplikované samostatne do pôdy (variant B) zvýšilo obsah tohto sledovaného prvku v sušine sóje z hodnoty 0,33 mg.kg⁻¹ na 0,74 mg.kg⁻¹. Keď sme olovo aplikovali do pôdy spolu so zinkom (variant C) tak toto zvýšenie bolo len mierne a predstavovalo to

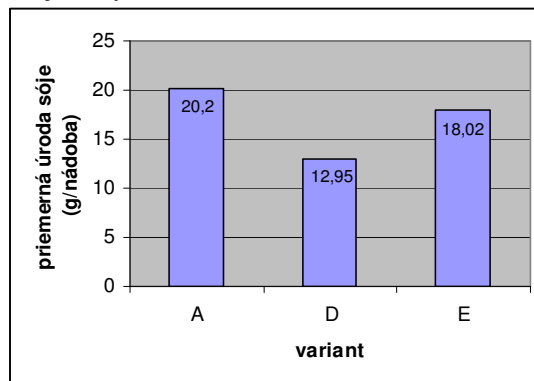
Obrázok 1: Priemerná úroda sóje po aplikácii dvojmocných kationov olova a zinku



kationov pripojí účinok dvojmocných kationov zinku.

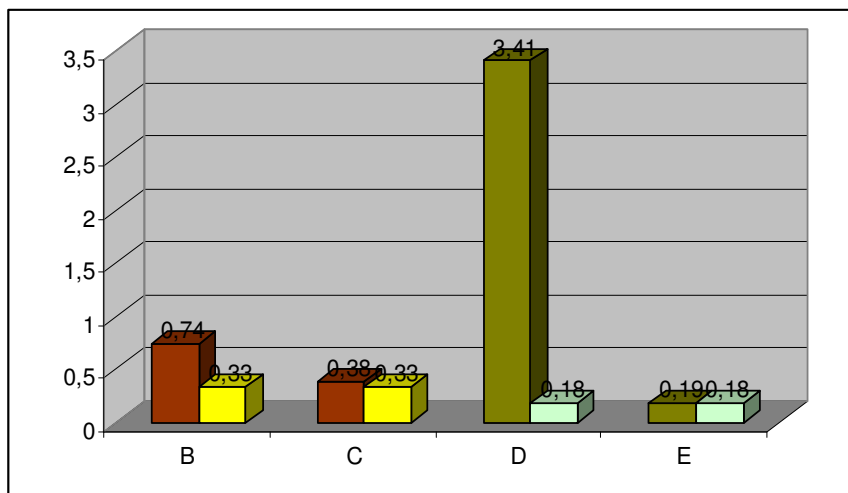
Mnoho prác bolo venovaných štúdiu interakcie medzi jednotlivými prvkami, hlavne medzi Cd –Zn a to predovšetkým vzhľadom k ich chemickej príbuznosti. Podľa niektorých autorov (Poongothai et al., 1997) prídavok zinku do životného prostredia znižuje príjem kadmia rastlinami. Podľa iných

Obrázok 2: Priemerná úroda sóje po aplikácii dvojmocných kationov kadmia a zinku



hodnotu 0,38 mg.kg⁻¹. Pravdepodobne aj tu sa prejavil pozitívny účinok dvojmocného zinku na minimalizáciu vstupu nebezpečných ťažkých kovov do potravinového reťazca. Podobné zníženie pomocou zinku sme dosiahli aj v prípade aplikácie kadmia do pôdy. Kým kadmium aplikované samostatne (variant D) zvýšilo obsah tohto prvku v sušine sóje na hodnotu 3,41 mg.kg⁻¹, spoločnou

Obrázok 3: Obsah olova a kadmia (mg.kg^{-1}) v semenách sóje (hnedá - koncentrácia Pb variant B, žltá - kontrola Pb, zelená - koncentrácia Cd, tyrkys - kontrola Cd)



aplikáciou so zinkom (variant D) sa táto hodnota znížila na $0,19 \text{ mg.kg}^{-1}$.

Zinok a jeho prístupnosť pre rastliny závisia od pôdnej reakcie. So zvyšovaním koncentrácie vodíkových iónov sa prístupnosť zinku zvyšuje. Väčšina rastlín má obsah Zn v rozpätí $25 - 100 \text{ mg.kg}^{-1}$. V našom experimente pri sledovaní tohto prvku v sušine sóje boli namerané najvyššie priemerné hodnoty $76,45 \text{ mg.kg}^{-1}$ (variant C) a $79,16 \text{ mg.kg}^{-1}$ (variant D). Zinok sa v rastlinách kumuluje predovšetkým v koreňoch, vo vyšších koncentráciách je fytotoxický. Distribúciu a adsorpciu ťažkých kovov ako je olovo, zinok a kadmium v rôznych častiach rastliny sledovali aj **Angelova et al. (2006)** a **Adiloglu (2002)**. Zinok je aktivátorom a stabilizátorom mnohých enzýmov. Pôsobí tiež na tvorbu biologicky účinných látok ako je tvorba tryptofánu.

ZÁVER

Na zamedzenie, resp. minimalizovanie vstupu cudzorodých látok, najmä ťažkých kovov do potravinového reťazca je známych niekoľko metód. V tejto práci sme sledovali samostatný účinok pôsobenia Cd^{2+} a Pb^{2+} iónov vo vzťahu k synergickému resp. antagonistickému účinku kationov zinku na úrodu a kvalitatívne parametre sóje fazuľovej. Z našich dosiahnutých výsledkov vyplýva že prídavok Zn^{2+} v dávke 80 mg.kg^{-1} pôdy (variant C, variant E) sa pozitívne prejavil aj na výške úrody sóje aj na sledovaných kvalitatívnych parametroch, čím sa do určitej miery eliminoval negatívny účinok rizikových prvkov (Cd, Pb).

Dosiahnuté výsledky nemôžeme jednoznačne pripisovať účinku dvojmocných zinočnatých kationov, lebo reakcia rastlín na prítomnosť zinku je individuálna, závisí od druhu rastlín, od obsahu olova a kadmia v pôde, od vzájomnej kombinácii uvedených rizikových prvkov so zinkom ako aj od mnohých ďalších faktorov.

LITERATÚRA

ADIOGLU, A. 2002. The effect of zinc application on uptake of cadmium in some cereal species. In *Agricultural and Forest Science*, vol. 48, no. 6, 2002, p. 553-556

ANGELOVA, V., IVANOV, K. 2006. Effect of chemical forms of lead, cadmium and zinc in polluted soils on their

uptake by peanuts. In *Geophysical Research Abstracts*, vol. 8, 01509, 2006

ÁRVAY, A., ČÉRY, J., HARANGOZO, L., TREBICHALSKÝ, P., JOBBÁGY, J. 2007. Actual situation of the agricultural land contamination on the agricultural lands with heavy metals in different environmental loaded areas of Slovak republic. In *Bioclimatology and natural hazards*. International scientific conference, 17.-20. Sept. 2007, Zvolen, p. 21, ISBN 978-80-228-1760-8

CAPCAROVA, M., KOLESAROVA, A., MASSANYI, P., ARPASOVA, H., LUKAC, N.,

KOVACIK, J. 2009. The effect of nickel peroral administration on growth, egg quality and biochemical blood parameters in laying hens. In *3rd International IUPAC Symposium on Trace Elements in Food*. Instituto Superiore di Sanita : Rome, Italy, p. 121, ISSN 0393-5620.

LOMBI, E., ZHAO, F. J., DUNHAM, S. J. 2000. Cadmium accumulation in populations of *Thlapsi caerulescen* and *Thlapsi geosinsense*. In *New Phytologist*, vol. 145, 2000, no. 1, p. 11-20

MUSILOVÁ, J., TOMÁŠ, J., JOMOVÁ, K., TIMORACKÁ, M., PELTZNEROVÁ, L. 2008. Cadmium influence on protein production and its accumulation in potatoes cultivated in soil contaminated by this element. In *Proteiny 2008*. Sborník příspěvků V. ročníku mezinárodní konference. Zlín, 2008. s. 126-130, ISBN 978-80-7318-706-4

PERALTA-VIDEA, J. R., LOPEZ, M. L., NARAYAN, M. 2009. The biochemistry of environmental heavy metal uptake by plants: Implications for the food chain. In: *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 41, 2009, p. 1665-1677

POONGOTHAI, S., MATHAN, K., KRISHNASWAMY, R. 1997. Effect of zinc and cadmium on the dry mater yield and nutrient uptake of Sorghum. In: *Madras Agricultural Journal*, vol. 84, 1997, no. 5, p. 290-293

STANOVIČ, R., MELICHÁČOVÁ, S., TREBICHALSKÝ, P. 2006. Kumulácia vybraných ťažkých kovov laskavcom. In: *Zem v pasci? Analýza zložiek životného prostredia*. (Zborník z I. vedeckej konferencie s medzinárodnou účasťou, CD). Zvolen : TU 2006, ISBN 80-228-1553-5

TOMAN, R., GOLIAN, J., MASSÁNYI, P. 2003. Toxikológia potravín. 1. vydanie, Nitra : SPU, 2003, s. 7-27, ISBN 80-8069-166-5

YASSEN, A. A., BADRAN N. M., ZAGHLOUL, S. M. 2007. Role of some organic residues as tools for reducing heavy metals hazard in plant. In: *World Journal of Agricultural Sciences* 3, 2007, 2, p. 204-209

VOLLMANNOVÁ, A., TIMORACKÁ, M., MELICHÁČOVÁ, S., HARANGOZO, L., JOMOVÁ, K.

2006. The relationship of heavy metal contents in soils to content of chemoprotective compounds in soya bean. In: *Zem v pasci? Analýza zložiek životného prostredia*. Zvolen, TU, 2006, s. 744-748, ISBN 80-228-1553-5

Pod'akovanie:

Práca vznikla vďaka finančnej podpore KEGA 3/5081/07 a VEGA 1/0030/09

Kontaktná adresa:

Ing. Judita Bystrická, PhD. Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre, FBP, Katedra chémie, Tr. Andreja Hlinku 2, tel. 0376414353, e-mail: Judita.Bystricka@centrum.sk

ANTIOXIDANT DEFENCE IN PORCINE GRANULOSA CELLS EXPOSED TO LEAD *IN VITRO*

Marcela Capcarová, Adriana Kolesárová, Norbert Lukáč, Alexander Sirotkin, László Bárdos and Shubhadeep Roychoudhury

ABSTRACT

Antioxidants play important role in preventing from free radical-induced cellular damage. In this study the activity of superoxid dismutase (SOD) and total antioxidant status (TAS) of porcine granulosa cells cultured *in vitro* after lead acetate administration were analyzed using spectrophotometer Genesys 10. Cells were cultured with lead acetate trihydrate $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ as follows: group Max (5 mg $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O} \cdot 10 \text{ ml}^{-1}$), group A (2.5 mg $\cdot 10 \text{ ml}^{-1}$), group B (0.83 mg $\cdot 10 \text{ ml}^{-1}$), group C (0.625 mg $\cdot 10 \text{ ml}^{-1}$), group D (0.455 mg $\cdot 10 \text{ ml}^{-1}$) and control group without lead addition for 18 hrs. The highest TAS was determined in control group without lead treatment in comparison with other groups (MAX, A, B, C, D). Statistical analyses showed significantly lower value ($P < 0.05$) in group B. The activity of SOD was the lowest in control group versus groups treated with lead. After various doses of lead acetate addition porcine granulosa cells were capable to survive and produce biochemical substances required for their metabolism. This may be due to activation and involvement of antioxidant mechanisms. The results of present study require further experiments to complete whole task.

Keywords: porcine granulosa cells, lead, antioxidant, biochemistry

INTRODUCTION

The unifying factor in determining toxicity and carcinogenicity for all metals is the generation of reactive oxygen and nitrogen species. The toxic manifestations of these metals are caused primarily due to imbalance between pro-oxidant and antioxidant homeostasis which is termed as oxidative stress (Flora et al., 2008). The exposure of animals and human to toxic elements is factor that could be closely related to high cancer risk (Stawarz et al., 2009). They enter the organism through soil and plants (Bystricka et al., 2007a) and increases mortality of animal and human organisms (Formicki et al., 2008).

Oxidative stress occurs as a consequence of excessive production of reactive oxygen species (ROS) or impaired antioxidant defense systems (Bystricka et al., 2007b; Sugino, 2007). Depending upon concentration, location

and intracellular conditions, ROS can cause toxicity or act as signaling molecules. The cellular levels of ROS are controlled by antioxidant enzymes and small molecule antioxidants. As major antioxidant enzymes, superoxide dismutases (SODs), including copper-zinc superoxide dismutase (Cu/ZnSOD), manganese superoxide dismutase (MnSOD) and extracellular superoxide dismutase (ECSOD), play a crucial role in scavenging $\text{O}_2^{\cdot -}$ (Miao and Cair, 2009). ROS and apoptosis are involved in a number of reproductive events including folliculogenesis, follicular atresia, ovulation, oocyte maturation, and *corpus luteum* formation (Tamura et al., 2008).

The global problem concerning contamination of the environment as a consequence of human activities is increasing. Most of the environmental contaminants are chemical by-products and heavy metals such as lead (Pb). Pb released into the environment makes its way into the air, soil and water (Paz-Alberto et al., 2007). Lead is known reproductive toxicant, which accumulates in granulosa cells of the ovary (Laxmipriya et al., 2007). From low to high doses of lead exposure, there were different responses of lead-induced oxidative stress in various target sites including lung, blood vessels, testes, sperm, liver, and brain in epidemiological as well as animal studies (Hsu and Guo, 2002). The progressive loss in cell viability shows that lead exposure induced cellular death in proximal tubular cells, depending on both the lead concentration and the exposure time (Wang et al., 2009). Data suggest that antioxidants may play an important role in abating some hazards of lead (Gurer and Ercal, 2000). The purpose of this study was to evaluate the effect of lead acetate treatment on antioxidant status of porcine granulosa cells cultured *in vitro*.

MATERIALS AND METHODS

Preparation, culture and processing of granulosa cells from ovaries

Gilts were kept under standard conditions at the Experimental Station of the Slovak Agricultural Research Centre in Nitra. Porcine ovaries at the early and mid-follicular phase of the estrous cycle were obtained at slaughter house from healthy gilts without visible reproductive abnormalities. Conditions of their care, manipulations and use did correspond with the instruction of ethic commission. Ovaries from gilts were transported to the laboratory at 4 °C and washed in sterile physiological solution. Follicular fluid was aspirated from 3-5 mm follicles, granulosa cells were isolated by

centrifugation for 10 min at 200xg followed by washing in sterile DMEM/F12 1:1 medium (BioWhittaker™, Verviers, Belgium) and resuspended in the same medium supplemented with 10 % fetal calf serum (BioWhittaker™, Verviers, Belgium) and 1 % antibiotic-antimycotic solution (Sigma, St. Louis, Mo, USA) at a final concentration of 10⁶ cells/ml of medium. Portions of the cell suspension were dispensed to 24-welled culture plates (Nunc™, Roskilde, Denmark, 1 ml.well⁻¹). The plate wells were incubated at 37.5 °C and 5 % CO₂ in humidified air until a 75 % confluent monolayer was formed (5-7 days). At this point the medium (1 ml/well) was renewed and ovarian granulosa cells were incubated with same supplements (10 % fetal calf serum, 1 % antibiotic-antimycotic solution).

Lead treatment

In this study toxic effects of lead acetate were investigated. Cells were treated with a range of lead acetate concentration (lead (II) acetate trihydrate

Table 1. The effect of lead acetate on TAS and SOD in porcine granulosa cells

groups		TAS (mmol.l ⁻¹)	SOD (U.ml ⁻¹)
Control group	minimum	1.28	226
	maximum	1.63	240
	mean	1.43±0.13	233.29±4.57
MAX	minimum	1.31	234
	maximum	1.44	242
	mean	1.35±0.05	238.5±2.78
A	minimum	1.31	218
	maximum	1.47	242
	mean	1.36±0.06	234.25±8.24
B	minimum	1.20	234
	maximum	1.34	242
	mean	1.27±0.06*	238.75±2.82
C	minimum	1.29	232
	maximum	1.55	244
	mean	1.36±0.10	238.25±4.33
D	minimum	1.25	232
	maximum	1.35	236
	mean	1.30±0.04	234.5±1.41

Control group received culture medium without lead acetate administration. Group Max received culture 5 mg lead acetate administration. 10 ml⁻¹ culture medium, group A 2.5 mg.10 ml⁻¹, group B 0.83 mg.10 ml⁻¹, group C 0.625 mg.10 ml⁻¹, group D 0.455 mg.10 ml⁻¹.

TAS – total antioxidant status, SOD – superoxide dismutase

* Denotes significant differences from control (P<0.05), other differences were not significant (P>0.05)

Pb(CH₃COO)₂.3H₂O (Slavus Bratislava, Slovak Republic) as follows: group Max (5 mg Pb.10 ml⁻¹), group A (2.5 mg.10ml⁻¹), group B (0.83 mg.10ml⁻¹), group C (0.625 mg.10ml⁻¹), group D (0.455 mg.10ml⁻¹) and control group without lead addition. Further culture was performed for 18 hrs, then culture media from plate wells were aspirated and kept at -70 °C to await spectrofotometry.

Maximum used: dose 0.5 mg Pb(CH₃COO)₂.3H₂O.ml⁻¹, 0.273 mg Pb.ml⁻¹

Antioxidant enzyme and status detection

The total antioxidant status and superoxid dismutase activity of porcine ovarian granulosa cells was assayed by spectrophotometer Genesys 10 (Thermo Fisher Scientific Inc, USA) using antioxidant RANDOX kits (Randox Labs., Crumlin, UK) according to the manufacturer's instructions.

Statistics

Each experimental group was represented by four culture wells with granulosa cells. Assays of antioxidant substances in incubation medium were performed in duplicate. The data presented concerning the effects of each substance are means of values obtained in three separate experiments performed on separate days using separate pools of ovaries obtained from 10-12 animals. The rates of antioxidant status were calculated per 10⁶ cells per day. Differences between the control (without acetate lead administration) and experimental groups (with acetate lead administration – Max, A, B, C, D) were evaluated by paired t-test or chi-square (χ²) test by using statistical software Sigma Plot 9.0 (Jandel, Corte Madera, USA). Differences from controls (P<0.05, P<0.01 and P<0.001) were considered as significant.

RESULTS AND DISCUSSION

The mechanisms of alleviating oxidative stress in porcine oocytes are very complex and supplementing maturing oocytes with anti-oxidants may enhance enzyme activities and eliminate free radicals (**Whitaker and Knight, 2008**). This study carried out investigating changes in release of antioxidants and selected biochemical parameters by porcine granulosa cells after lead acetate treatment. Lead is able to accumulate in porcine ovarian granulosa cells as it was published in previous studies in case of the rat ovary (**Nampoothiri and Gupta, 2006**) and sheep ovary (**Bires et al., 1995**). In this paper the comparison of TAS and SOD among individual groups is shown in Table 1. The highest values of TAS were determined in control group without lead treatment in comparison with other groups with lead administration. Statistical analyses showed significant lower value (P<0.05) in group B (1.27±0.05 mmol.l⁻¹) where lead in amount 0.83 mg.10 ml⁻¹ was added. Similar results were measured in other groups, but without significant differences (P>0.05). Total antioxidant status is defined as the sum total of endogenous and food derived antioxidants of the extra cellular fluids of an individual. Cooperation of all the different antioxidants provides greater protection against attack by reactive

oxygen or nitrogen radicals than any single compound alone (Miller et al., 1993). Lower values of TAS in our experiment after lead acetate treatment could indicate the presence of oxidant/antioxidant imbalance due to lead acetate addition in porcine granulosa cells. TAS seems to correlate with decreased fertilization potential (Tatone et al., 2008).

Lead insignificantly ($P > 0.05$) changed the values of SOD in porcine granulosa cells in experimental group when compared with control group, where the lowest value was found ($233.29 \pm 4.57 \text{ U} \cdot \text{ml}^{-1}$). Conformable low value was also in group A ($234.25 \pm 8.24 \text{ U} \cdot \text{ml}^{-1}$), where lead acetate in amount of $2.5 \text{ mg} \cdot 10 \text{ ml}^{-1}$ was added. The higher amounts were measured in groups B and Max ($238.75 \pm 2.82 \text{ U} \cdot \text{ml}^{-1}$ and $238.50 \pm 2.78 \text{ U} \cdot \text{ml}^{-1}$). The activity of SOD declined when smaller doses ($0.625 \text{ mg} \cdot 10 \text{ ml}^{-1}$ and $0.455 \text{ mg} \cdot 10 \text{ ml}^{-1}$) of lead acetate were used (in groups C $238.25 \pm 4.33 \text{ U} \cdot \text{ml}^{-1}$ and D $234.5 \pm 1.41 \text{ U} \cdot \text{ml}^{-1}$). Superoxide dismutase is important antioxidant enzyme responsible for the elimination of superoxide radical (Hu et al., 2005). In the present study porcine granulosa cells were capable to maintain SOD activity in good status despite various doses used in our experiment. In experiment with proximal tubular cells of rats exposed to lead the increase of SOD activity was an indication of increased ROS generation in living cells due to lead treatment or another possibility was that the enzyme activity was activated by the lead ion directly (Wang et al., 2009). The increase in this enzymatic activity could be due to an increase in the enzyme expression, since it is known that oxidative damages induce a cellular response, which tries to compensate the overload of the ROS formation (Dalton et al., 1999). In another *in vitro* experiment lead acetate exposed rat granulosa cells showed no significant change in antioxidant enzymes (Laxmipriya et al., 2007).

CONCLUSION

In conclusion, lead acetate may have negative effect on porcine granulosa cells when added to culture medium, but the impact of this heavy metal is miscellaneous according to various doses. The activity of SOD insignificantly increased and TAS decreased by virtue of lead. Results of this study provide a foundation for further analysis and researches of heavy metals impact on living cells and the system of possible protection against this effects as well as evaluation of various dose dependencies on antioxidant status of cells. After various doses of lead acetate addition porcine granulosa cells were capable to survive and produce biochemical substances required for their metabolism. This may be due to activation and involvement of antioxidant mechanisms. The research on the field of antioxidant system and protection of various cells against environmental pollution will be worthy of further investigation.

REFERENCES

- BIRES, J., MARACEK, I., BARTKO, P., BIRESOVA, M., WEISSOVA, T. 1995. Accumulation of trace elements in sheep and the effects upon qualitative and quantitative ovarian changes. In *Veterinary and Human Toxicology*, vol. 37, 1995, p. 349-356.
- BYSTRICKÁ, J., ÁRVAY, J., TÓTH, T., TOMÁŠ, J., STANOVIČ, R. 2007a. The Cd, Pb and Zn transfer in soil – plant system in condition of soil metallic contamination. In *Chemistry, Environment and Human Activity in Civilization Development*, 2007a, p. 264, ISBN 978-80-8069-860-8.
- BYSTRICKÁ, J., VOLLMANNOVÁ, A., LAHUČKÝ, L. 2007b. Antioxidants in root vegetables after application of phenolic compounds. In *Vitamins 2007, 7th International Conference*, Prague : Czech University of Agriculture, 2007, p. 131-132, ISBN 978-80-7194-937-4.
- DALTON, T. P., SHERTZER, H. G., PUGA, A. 1999. Regulation of gene expression by reactive oxygen. In *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* vol. 39, 1999, p. 67-101.
- FLORA, S. J., MITTAL, M., MEHTA, A. 2008. Heavy metal induced oxidative stress and its possible reversal by chelation therapy. In *Indian J. Med Res.*, vol. 128, 2008, no. 4, p. 501-523.
- FORMICKI, G., STAWARZ, R., LUKAC, N., PUTAŁA, A., KUCZKOWSKA, A. 2008. Combined effects of cadmium and ultraviolet radiation on mortality and mineral content in common frog (*Rana temporaria*) larvae. In *J. Environ. Sci. Health A*, vol. 43, 2008, p. 1174-1183.
- GURER, H., ERCAL, N. 2000. Can antioxidants be beneficial in the treatment of lead poisoning? In *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 29, 2009, no. 10, p. 927-945.
- HSU, P. C., GUO, Y. L. 2002. Antioxidant nutrients and lead toxicity. In *Toxicology*, vol. 180, 2002, no. 1, p. 33-44.
- HU, Y., ROSEN, D. G., ZHOU, Y., FENG, L., YANG, G., LIU, J., HUANG, P. 2005. Mitochondrial manganese-superoxide dismutase expression in ovarian cancer: role in cell proliferation and response to oxidative stress. In *J. Biol. Chem.*, vol. 280, 2005, no. 47, p. 39485-39492.
- LAXMIPRIYA, P., NAMPOOTHIRI, L. P., AGARWAL, A., GUPTA, S. 2007. Effect of co-exposure to lead and cadmium on antioxidant status in rat ovarian granulosa cells. In *Arch. Toxicol.*, vol. 81, 2007, no. 3, p. 145-150.
- MILLER, N., RICE-EVANS, C., DAVIES, M. J. 1993. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. In *Clin. Sci.*, vol. 84, 1993, p. 407-412.
- MIAO, L., CLAIR, D. K. 2009. Regulation of Superoxide Dismutase Genes: Implications in Diseases. In *Free Radic Biol Med.* 2009 May 25. [Epub ahead of print].
- NAMPOOTHIRI, L. P., GUPTA, S. 2006. Simultaneous effect of lead and cadmium on granulosa cells: a cellular model for ovarian toxicity. In *Reprod. Toxicol.*, vol. 21, 2006, no. 2, p. 179-185.
- PAZ-ALBERTO, A. M., SIGUA, G. C., BAUI, B. G., PRUDENTE, J. A. 2007. Phytoextraction of lead-contaminated soil using vetivergrass (*Vetiveria zizanioides* L.), cogongrass (*Imperata cylindrica* L.) and carabagrass (*Paspalum conjugatum* L. In *Environ Sci Pollut Res Int.*, vol. 14, 2007, no. 7, p. 498-504.
- STAWARZ, R., FORMICKI, G., ZAKRZEWSKI, M., RYS, J., ROZMUS, M. 2009. Distribution of heavy metals

and trace elements in human breast cancer tissue and in adjacent normal tissue of woman in Poland. In *Fresenius Environmental Bulletin*, vol. 18, 2009, no. 2, p. 182-188.

Sugino, N. 2007. The role of oxygen radical-mediated signaling pathways in endometrial function. In *Placenta*, vol. 28, 2007, p. 133-136.

TAMURA, H., NAKAMURA, Y., KORKMAZ, A., MANCHESTER, L. C., TAN, D. X., SUGINO, N., REITER, R. J. 2008. Melatonin and the ovary: physiological and pathophysiological implications. In *Fertil. Steril.* 2008, Sep 17. [Epub ahead of print]

TATONE, C., AMICARELLI, F., CARBONE, M. C., MONTELEONE, P., CASERTA, D., MARCI, R., ARTINI, P. G., PIOMBONI, P., FOCARELLI, R. 2008. Cellular and molecular aspects of ovarian follicle ageing. In *Hum. Reprod. Update*, vol. 14, 2008, no. 2, p. 131-142.

WANG, L., WANG, H., HU, M., CAO, J. 2009. Oxidative stress and apoptotic changes in primary cultures of rat

proximal tubular cells exposed to lead. In *Arch. Toxicol.*, vol. 83, 2009, no. 5, p. 417-427.

WHITAKER, B. D., KNIGHT, J. W. 2008. Mechanisms of oxidative stress in porcine oocytes and the role of anti-oxidants. In *Reprod. Fertil. Dev.*, vol. 20, 2008, no. 6, p. 694-702.

Acknowledgment

This work was financially supported by VEGA scientific grant 1/0696/08, APVV grant SK-HU – 0005 - 08 and APVV grant APVV 0299–06.

Contact address: Ing. Marcela Capcarová, PhD., Department of Animal Physiology, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Slovak University of Agriculture, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, tel: +421 37 641 4343, E-mail: marcela.capcarova@uniag.sk

ANTIRADIKÁLOVÁ AKTIVITA A FLAVONOIDY VO VYBRANÝCH DRUHOCH VČELIEHO PEĽU

ANTIRADICAL ACTIVITY AND FLAVONOIDS OF SELECTED BEE POLLEN

Katarína Fatrcová-Šramková, Magda Máriássyová, Janka Nôžková, Zlata Kropková, Petr Šíma

ABSTRACT

The objective of the study was to evaluate differences in antioxidant properties of selected bee pollen types: *Helianthus annuus* L., *Papaver somniferum* L. and *Brassica napus* subsp. *napus* L. Analyzed samples were dried at 35 °C until moisture reached the 9 to 11 %. Antiradical activity was determined by modified DPPH method according to Brand-Williams et al. (1995). Total content of flavonoids was determined according to Chang et al. (2002) method. Differences between selected bee pollen types in antiradical activity and total flavonoids content were specified by correlation analysis. Statistically significant differences ($P < 0.05$) within selected samples were determined in case of antiradical activity and total flavonoids content. Average value of scavenger activity was 71.39 ± 16.45 %. In the case of flavonoids content the average value reached 137.56 ± 91.22 mg.kg⁻¹. The highest value of scavenger activity was detected in *Brassica napus* subsp. *napus* L. pollen (1.92-fold higher versus *H. annuus* L. pollen), whereas *Papaver somniferum* L. pollen contained the most flavonoids (6.25-fold more versus *H. annuus* L. pollen). According to our results the antiradical

activity of *Papaver somniferum* L. and *Brassica napus* subsp. *napus* L. pollen is classified as pollen with high antiradical activity.

Keywords: antioxidant property, antiradical activity, flavonoid, bee pollen

ÚVOD

Vlastná antioxidačná obrana ľudského organizmu môže byť podporená širokou škálou antioxidantov s nízkou molekulárnou hmotnosťou, ktoré sú obsiahnuté v strave a ktoré poskytujú široké možnosti zložiek funkčných potravín (Howlett, 2008). V tabuľke 1 sú uvedené príklady možností modulovania cieľových funkcií vo vzťahu k obrane pred oxidačným stresom a zložky potravín, ktoré môžu byť použité na dosiahnutie cieľových funkcií.

Hodnotenie primárnej prooxidačnej/antioxidačnej aktivity v potravinách je dôležité pre porovnanie účinku antioxidantov v rôznych potravinárskych produktoch za rôznych podmienok. Vo viacerých štúdiách sa na hodnotenie antioxidačnej aktivity iných zložiek vrátane rastlinných extraktov často používajú ako štandardy alkyl galáty, butylhydroxylanizol, butylhydroxytoluén, trolox a α -tokoferol, ale aj mnohé nižšie uvedené metódy. Prooxidačná/antioxidačná aktivita môže byť meraná rôznymi metódami vrátane hodnotenia senzorickej kvality (farby a zápachu), spektrofotometrickým meraním 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), 2,2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline)-6-sulfonic acid (ABTS) a N,N-dimethyl-*p*-phenylenediamine radikálov, odfarbovaním β -karoténu, inhibíciou chemiluminiscencie luminolu, plynovou chromatografiou s hodnotením pomeru C18:2/C16:0 (kyselina linolová/kyselina palmitová) a obsahu voľných mastných kyselín (najmä kyseliny linolovej), jódovým, peroxidovým alebo tiobarbiturátovým číslom a inými metódami (Remis-Ramos, 2003).

Na základe mnohých štúdií sa dokázalo, že flavonoidy sú antioxidanty, schopné zhasť hydroxylové radikály, superoxidové anióny a peroxy radikály lipidov. Antioxidačná aktivita flavonoidov závisí od ich chemickej štruktúry. Sú tri základné požiadavky, aby flavonoid pôsobil ako zhasť radikálov - štruktúra catecholu na B-kruhu, dvojitá väzba C2-C3 konjuguje so 4-keto skupinou na C-kruhu a prítomnosť hydroxylovej skupiny v polohe 3 a 5. Flavonoidy, ktoré obsahujú viac -OH skupín, majú veľmi silnú antioxidačnú aktivitu voči peroxy radikálom (Amic et al., 2003, Cos et al., 1998). Flavonoidy zabráňujú pôsobeniu voľných radikálov viacerými spôsobmi - priamou elimináciou radikálov, chelatickou väzbou katiónov kovov, inhibíciou oxidačných enzýmov a regeneráciou α -tokoferolu z α -tokoferoxyl radikálu (Burda, Oleszek, 2001, Hejinen et al., 2002).

Flavonoidy sú významnou skupinou prírodných antioxidantov, ktoré sa nachádzajú v rôznych druhoch ovocia, zeleniny, v listoch a kvetoch. Vyskytujú sa najmä ako glykozidy a metylované deriváty. Najvýznamnejšou podskupinou sú bezfarebné katechíny, červeno-purpurovo sfarbené antokyanidíny, žlté flavonoly a flavóny ako aj bezfarebné proantokyanidíny (Gordon, 2003). Flavonoidy sú zložkou potravy. Jedným zo zdrojov flavonoidov je aj včelí peľ (Dudov, Starodub, 1994; Dudov et al., 1994). Silva et al. (2006) uvádzajú, že peľ *Mimosa gemmulata* môže byť dobrým zdrojom prírodných antioxidantov a jeho konzumácia môže prispieť významným množstvom antioxidantov do ľudskej stravy. Včelí (obnôžkový) peľ je produkt včiel. Je to peľ, ktorý včely pozbierali z kvetov a upravili ho výlučkami svojich žliaz a medových vačkov. Vo výžive ľudí sa používa včelí aj fermentovaný peľ. Fermentovaný peľ sa označuje aj ako včelí chlieb; je to peľ, ktorý už prešiel hydrolýzou neredukujúcich cukrov a mliečnym kvasením v plástoch. Tento je z hľadiska výživy preto najhodnotnejší, ale keďže vyberanie peľu z plástov je veľmi náročné, používa sa najviac peľ obnôžkový (Košík, 1995, Košík, 1997). Obnôžkový peľ má v porovnaní s natívnym (kvetovým) peľom v rastlinách sladšiu chuť a

nadobúda aj niektoré ďalšie cenné vlastnosti (Chlebo, Čermáková, 2001).

Cieľom práce bolo zhodnotiť rozdiely vo vybraných antioxidačných vlastnostiach troch druhov včelieho peľu.

MATERIÁL A METODIKA

Hodnotili sme včelí peľ z nasledujúcich rastlinných druhov: slnečnica ročná (*Helianthus annuus* L.), mak siaty (*Papaver somniferum* L.) a repka olejná (*Brassica napus* subsp. *napus* L.). Vzorky včelieho peľu pochádzali zo západného Slovenska a boli zozbierané v jarnom období v roku 2007. Pre jednotlivé analýzy boli vzorky upravené sušením približne 8 hodín pri maximálnej teplote 35°C až do dosiahnutia vlhkosti 9 – 11 %.

Vlhkosť bola testovaná pomocou termo-gravimetra WPS 50SX/1 by RADWAG. Proces sušenia sa realizoval tak, aby nedošlo k zmenám nutričných komponentov v analyzovaných vzorkách včelieho peľu.

Antiradikálová aktivita (schopnosť lapať radikály) bola stanovená modifikovanou metódou DPPH podľa Brand-Williamsa et al. (1995) použitím spektrofotometra Shimadzu 1601 UV/VIS (Shimadzu, Tokyo, Japan). Princípom metódy je redukcia stabilného radikálu 2,2-difenyl-1-pikrylhydrazyl (DPPH^{*}) v metanolickej roztoku v prítomnosti antioxidantov, ktorá sa prejavuje poklesom absorbancie pri 517 nm. Pokles sa zaznamenáva v stanovených časových intervaloch až do dosiahnutia reakčnej rovnováhy na spektrofotometri Shimadzu 1601 UV-VIS. Účinnosť extraktov sa vypočíta na základe vzťahu: % inhibície = $[(A_{CO} - A_{At}) / A_{CO}] \times 100$, kde A_{CO} je absorbancia kontroly v čase $t = 0$ min (roztok DPPH^{*}); A_{At} je absorbancia v prítomnosti antioxidantu v čase t min.

Celkový obsah flavonoidov bol stanovený metódou podľa Changa et al. (2002), meraním absorbancie pri 425 nm po pridaní 0,5 % vodného roztoku citrónanu sodného a metanolového roztoku chloridu hlinitého. Z kalibračnej krivky sa odčíta obsah flavonoidov v mg.l⁻¹ vyjadrených

Tabuľka 1 Príklady možností modulovania cieľových funkcií prostredníctvom zložiek potravín a možné markery súvisiace s obranou (Diplock et al., 1999)

Cieľové funkcie	Možné markery	Vhodné zložky potravín
Ochrana štruktúrálnej a funkčnej aktivity DNA	meranie poškodených častí DNA	vitamín E vitamín C karotenoidy polyfenoly vrátane flavonoidov
Ochrana štruktúrálnej a funkčnej aktivity polynenasýtených mastných kyselín	meranie lipidových hydroperoxidov alebo derivátov	vitamín E vitamín C karotenoidy polyfenoly vrátane flavonoidov
Ochrana štruktúrálnej a funkčnej aktivity lipoproteínov	meranie lipidových hydroperoxidov a oxidovaných apoproteínov	vitamín E vitamín C karotenoidy polyfenoly vrátane flavonoidov
Ochrana štruktúrálnej a funkčnej aktivity bielkovín	meranie poškodených bielkovín alebo zložiek	vitamín E vitamín C karotenoidy polyfenoly vrátane flavonoidov

ako kvercetin.

Rozdiely antioxidačnej aktivity a obsahu flavonoidov medzi jednotlivými druhmi peľu sme hodnotili použitím softvéru SAS 9.1.3.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Hodnotením rozdielov v antiradikálovej aktivite (%inhibície DPPH) sme medzi analyzovanými druhmi včelieho peľu zistili štatisticky významný rozdiel, a to medzi peľom zo slnečnice ročnej a maku siateho, ako aj medzi peľom z maku siateho a repky olejnej ($P < 0,05$). Porovnaním troch sledovaných rastlinných druhov včelieho peľu sme zistili vyššiu priemernú antiradikálovú aktivitu v prípade peľu z repky olejnej. Antiradikálová aktivita pre sledované rastlinné druhy dosahovala v jednotlivých vzorkách hodnoty 48,15 až 86,61 % inhibície DPPH^{*} radikálov. Priemerná hodnota radikálovej scavengerovej aktivity bola $71,39 \pm 16,45$ %.

DPPH radikál sa využíva na testovanie schopnosti včelích produktov (vrátane peľu) eliminovať voľné radikály (Almaraz-Abarca et al., 2004; Campos et al., 2003; Nagai et al., 2002). Je známe, že voľné radikály sú príčinou autooxidácie nenasýtených lipidov v potravinách (Kaur, Perkins, 1991). Antioxidanty na druhej strane môžu prerušiť reťazovú reakciu voľných radikálov počas oxidácie, a to poskytnutím vodíka z fenolickej hydroxylovej skupiny, čím vytvoria stabilný konečný produkt, ktorý neinicuje ďalšiu oxidáciu lipidu (Sherwin, 1978). Leja et al. (2007) skúmali radikálovú scavengerovú aktivitu včelieho peľu dvanástich rastlinných druhov (tab. 2).

Druhy včelieho peľu sú v tab. 2 zoradené podľa klesajúcej radikálovej scavengerovej aktivity. Leja et al. (2007) pozorovali veľké rozdiely v antiradikálovej aktivite (8,6-91,3 % inhibície DPPH). Analyzované druhy peľu rozdelili do troch skupín: s vysokou schopnosťou inhibície DPPH radikálu (61-91,3 %, *Lupinus polyphyllus*, *Phacelia tanacetifolia*, *Trifolium* sp., *Sinapis alba*, *Robinia pseudoacacia* a *Aesculus hippocastanum*), so strednou

schopnosťou inhibície DPPH radikálu (23,5-29,6 %, *Zea mays*, *Chamerion angustifolium*, *Pyrus communis*) a s nízkou schopnosťou inhibície DPPH radikálu (8,6-16 %, *Lamium purpureum*, *Taraxacum officinale* a *Malus domestica*).

V našom výskume sme zistili, že priemerná hodnota antiradikálovej aktivity peľu maku aj repky spadala do skupiny s vysokou antiradikálovou aktivitou vybraných druhov peľu (tzn. v rozsahu 61-91,3 %) podľa Leja et al. (2007) a peľ slnečnice sa nachádza na rozmedzí medzi skupinami s vysokou a strednou schopnosťou inhibície DPPH radikálu podľa Leja et al. (2007).

Rozdiel v obsahu flavonoidov v peľi z maku siateho a slnečnice ročnej, ako aj z maku siateho a repky olejnej bol štatisticky významný ($P < 0,05$). V porovnávaných vzorkách troch druhov včelieho peľu bol obsah celkových flavonoidov pre jednotlivé vzorky v rozpätí od 110 do 261 mg.kg⁻¹. Priemerná hodnota obsahu flavonoidov dosahovala $137,56 \pm 91,22$ mg.kg⁻¹. Peľ z maku siateho mal podobne ako v prípade antiradikálovej hodnoty aj v obsahu flavonoidov vyššie hodnoty ako peľ zo slnečnice (tab. 3). Peľ z maku siateho mal vyšší obsah flavonoidov ako peľ z repky olejnej, ale napriek tomu antiradikálová aktivita makového peľu bola nižšia (tab. 3).

Je to možné vysvetliť prítomnosťou iných látok s antioxidačnými vlastnosťami, aj zastúpením jednotlivých flavonoidov. Štruktúra flavonoidov výrazne vplýva na ich antioxidačnú aktivitu. Peľ maku a repky obsahuje najmä flavonoidy kvercetin, kampferol, luteolín a apigenín (Fatrcová-Šramková et al., 2008a; Kačániová et al., 2008; Fatrcová-Šramková et al., 2008b). Antiradikálová aktivita uvedených flavonoidov klesá v poradí kampferol > kvercetin > luteolín > apigenín (Burda, Oleszek, 2001). Peľ z repky olejnej má vyšší obsah kampferolu a kvercetinu, v peľi z maku siateho je dominantný luteolín. Antioxidačné vlastnosti prispievajú k výhodám využitia peľu vo výžive ľudí, ale aj zvierat. Použitie peľu sumarizuje Krell (1996). Peľ bol už dávnejšie pridávaný do stravy domestikovaných zvierat a laboratórneho hmyzu s následným zlepšením zdravia, rastu a miery produkcie potravín (Crane, 1990; Schmidt, Buchmann, 1992). Kurčatá vykazovali zlepšenú efektivitu produktivity s prídavkom len 2,5 % peľu do krmiva s vyváženým zložením (Costantini, Ricciardelli d'Albore, 1971), podobne ako aj ošípané (Salajan, 1970).

ZÁVER

Medzi sledovanými druhmi včelieho peľu z rastlinných druhov - peľom zo slnečnice ročnej (*Helianthus annuus* L.) a maku siateho (*Papaver somniferum* L.), ako aj medzi peľom z maku siateho a repky olejnej (*Brassica napus* subsp. *napus* L.) sme zistili štatisticky významné rozdiely v antioxidačných vlastnostiach - v antiradikálovej aktivite ako aj v obsahu flavonoidov. Zatiaľ čo najvyššiu antiradikálovú aktivitu sme pozorovali vo včelom peľi z repky olejnej, najvyšší obsah flavonoidov dosahoval obnôžkový peľ z maku siateho. Na poznanie ďalších antioxidačných vlastností sú potrebné ďalšie štúdie.

Tabuľka 2 Antiradikálová aktivita vybraných druhov včelieho peľu (Leja et al., 2007)

Druh	Schopnosť lapat' radikály* (%)
<i>Aesculus hippocastanum</i>	91,3
<i>Robinia pseudoacacia</i>	91
<i>Sinapis alba</i>	90
<i>Trifolium</i> sp.	82,2
<i>Phacelia tanacetifolia</i>	66,3
<i>Lupinus polyphyllus</i>	61,7
<i>Pyrus communis</i>	29,6
<i>Chamerion angustifolium</i>	23,7
<i>Zea mays</i>	23,5
<i>Malus domestica</i>	16
<i>Taraxacum officinale</i>	15,2
<i>Lamium purpureum</i>	8,6

* radikálová scavengerová aktivita tzn. % inhibície DPPH

Tabuľka 3 Antiradikálová aktivita a obsah flavonoidov vo včelom peľu

Druh peľu	DPPH [% inhibície]	Flavonoidy [mg.kg ⁻¹]
<i>Helianthus annuus</i> L.	48,43 ± 0,29	38,67 ± 2,05
<i>Papaver somniferum</i> L.	79,61 ± 0,45	258,67 ± 1,70
<i>Brassica napus</i> subsp. <i>napus</i>	86,12 ± 0,48	115,33 ± 8,36

LITERATÚRA

ALMARAZ-ABARCA, N., CAMPOS, M. DA G., ÁVILA-REYES, J. A., NARANJO-JIMÉNEZ, N., HERRERA-CORRAL, J., GONZÁLEZ-VALDEZ, L. S. 2004. Variability of antioxidant activity among honey-bee collected pollen of different botanical origin. In *Interciencia*, vol. 29, 2004, p. 574-578.

AMIC, D., AMIC-DRAĞIVIC, D., BEŠLO, D., TRINAJSTIC, N. 2003. Structure-radical scavenging relationship of flavonoids. In *Croatia Chemica Acta*, vol. 76, 2003, no. 1, p. 55-61.

BRAND-WILLIAMS, CUVÉLIER, M. E., BERSET, C. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activities. In *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*, vol. 28, 1995, no. 1, p. 25-30.

BURDA, S., OLESZEK, W. 2001. Antioxidant and antiradical activities of flavonoids. In *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, vol. 49, 2001, no. 6, p. 2774-2779.

CAMPOS, M. G., WEBBY R. F., MARKHAM K. R., MITCHELL K. A., CUNHA A. P. Da. 2003. Age-induced diminution of free radical scavenging capacity in bee pollens and the contribution of constituent flavonoids. In *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, vol. 51, 2003, no. 3, p. 742-745.

CHANG, C. C., YANG, M. H., WEN, H.-M., CHERN, J. C. 2002. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. In *Journal of Food and Drug Analysis*, vol. 10, 2002, no. 3, p.178-182

CHLEBO, R., ČERMÁKOVÁ, T. 2001. Potravinárske využitie peľu. In *Výživa a potraviny pre tretie tisícročie : zborník z vedeckej konferencie*. Nitra : SPU, 2001, s. 171-173. ISBN 80-7137-847-X

COSTANTINI, F., RICCIARDELLI D'ALBORE, G. 1971. Pollen as an additive to the chicken diet. In Proc. 23rd International Apicultural Congress, In *Apimondia*, p.539-542.

COS, P., YING, L., CALOMME, M. 1998. Structure-activity relationship and clasification of flavonoids as inhibitors of xantine oxidase and superoxide scavengers. In *Journal of Natural Product*, vol. 61, 1998, no. 1, p. 71-76.

CRANE, E. 1990. Bees and beekeeping: Science, Practice and World Resources. Ithaca : Cornstock Publischer, 1990. 593 pp. ISBN 0-8014-2429-1

DIPLOCK, A. T., AGGETT, P. J., ASHWELL, M., BORNET, F., FERN, E. B., ROBERFROID, M. B. 1999. Scientific concepts of functional foods in Europe: consensus document. In *British Journal of Nutrition*, vol. 81 (Suppl.), 1999, no. 4, p. S1-S27.

DUDOV, I. A., MORENETS, A. A., ARTINKH, V. P., STARODUB, N. F. 1994. Immunomodulatory effect of honeybee flower pollen load. In *Ukr. Biokhim. Zh.*, vol. 66, 1994, no. 6, p. 91-93.

DUDOV, I. A., STARODUB, N. F. 1994. Antioxidant system of rat erythrocytes under conditions of prolonged

intake of honeybee flower pollen load. In *Ukr. Biokhim. Zh.*, vol. 66, 1994, no. 6, p. 94-96.

FATRCOVÁ-ŠRAMKOVÁ, K., NÔŽKOVÁ, J., KAČÁNIOVÁ, M., MÁRIÁSSYOVÁ, M., KROPKOVÁ, Z. 2008b. Microbial properties, nutritional composition and antioxidant activity of *Brassica napus* subsp. *napus* L. bee pollen

used in human nutrition. In *Slovak Journal of Animal Science*, vol. 41, 2008, no. 4, p. 198-199.

FATRCOVÁ-ŠRAMKOVÁ, K., NÔŽKOVÁ, J., MÁRIÁSSYOVÁ, M., KAČÁNIOVÁ, M., DUDRIKOVÁ, E. 2008. Content of polyphenols and antiradical activity of bee pollen. In *Chemical papers*, vol. 102 (S), 2008, 15, p. 626-627.

GORDON, M. H. 2003. Natural Antioxidants. In *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*. Volume 1. Oxford : Elsevier Science, 2003. p. 261-265. ISBN 0-12-227056-8

HEJINEN, C. G., HAENEN, G. R., OOSTVEEN, R. M., STALPERS, E. M., BAST, A. 2002. Protective of flavonoids against lipid peroxidation: the structure activity relationship revisited. In *Free Radical Research*, vol. 36, 2002, no. 5, p. 575-581.

HOWLETT, J. 2008. *Functional Foods from Science to Health and Claims*. ILSI Europe, 2008. 35 pp. ISBN 9789078637110

KAČÁNIOVÁ, M., NÔŽKOVÁ, J., FATRCOVÁ-ŠRAMKOVÁ, K., KROPKOVÁ, Z., KUBINCOVÁ, J. 2008. Antioxidant, antimicrobial activity and heavy metals content in pollen of *Papaver somniferum* L. In *Slovak Journal of Animal Science*, vol. 41, 2008, no. 4, p. 204.

KAUR, H., PERKINS, J. 1991. The free radical chemistry of food additives. In Atuoma O.I., HALLIWELL B. (Eds.). *Free Radicals and Food Additives*. Taylor & Francis, London, UK, 1991, p. 17-35.

KOŠLÍK, Š. 1995. Možnosti využitia včelieho peľu v humánnej medicíne. In *Včelár*, roč. 69, 1995, č. 7-8, s. 112-113.

KOŠLÍK, Š. 1997. Úspešné použitie včelieho peľu u pacientov s akútnou vírusovou hepatitídou. In *Slovenský lekár*, roč. 7, 1997, č. 3, s. 15.

KRELL, R. 1996. Value-added products from beekeeping. In FAO Agricultural Services Bulletin, no. 144, Food and Agriculture Organization of the United Nations Rome, 1996. ISBN 92-5-103819-8

LEJA, M., MARECZEK, A., WYŻGOLIK, G. et al. 2007. Antioxidative properties of bee pollen in selected plant species. In *Food Chemistry*, vol. 100, 2007, no. 1, p. 237-240.

NAGAI, T., INOUE, R., INOUE, H., SUZUKI, N. 2002. Scavenging capacities of pollen extracts from *cistus ladaniferus* on autooxidation, superoxide radicals, hydroxyl radicals, and DPPH radicals. In *Nutrition Research*, vol. 22, 2002, no. 4, p. 519-526.

REMIS-RAMOS, G. 2003. Synthetic Antioxidants, Characterization and Analysis. In *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*. Volume 1. Oxford : Elsevier Science, 2003. p. 275-282. ISBN 0-12-227056-8

SALAJAN, G. 1970. Inst. Agron. "Dr. Petru Groza" Luc. Stut. Ser. Zootech. 26:165.

SHERWIN, E. R. 1978. Oxidation and antioxidants in fat and oil processing. In *Journal of the American Oil Chemists Society*, vol. 55, 1978, no. 3, p. 809-814.

SCHMIDT, J. O., BUCHMANN, S. L. 1992. Other products of the hive. In *The hive and the honeybee* Hamilton : Dadant&Sons, 1992, p. 927-988

SILVA T. M. S., CAMARA, C. A., LINS A. C. S., BARBOSA-FILHO J. M., SILVA E. M. S., FREITAS B. M., SANTOS F. 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, no. 6-7, p. 507-511.

STANLEY, R. G., LINSKENS, H. F. 1974. Pollen: biology, biochemistry, management. Berlin : Springer Verlag, 1974. 307 pp.

Pod'akovanie

Práca bola riešená s podporou APVT-20-026704, a AV/1121/2004.

Kontaktná adresa:

Ing. Katarína Fatrcová-Šramková, PhD., Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre, FAPZ, KVL, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, tel. 037/641 4324, katarina.sramkova@gmail.com

VPLYV APLIKÁCIE

LACTOBACILLUS FERMENTUM

CEZ VODU NA CHEMICKÉ

ZLOŽENIE MÄSA KURČIAT ROSS

308

EFFECT OF LACTOBACILLUS

FERMENTUM APPLICATION BY

WATER TO CHICKEN ROSS 308 AT

MEAT CHEMICAL COMPOSITION

Peter Haščík, Miroslava Kačániová, Juraj Čuboň, Marek Bobko, Klára Vavrišinová, Henrieta Arpášová, Michal Mihok, Simona Pavličová,

ABSTRACT

In this work the influence of the probiotic preparation application (*Lactobacillus fermentum* CCM 7158 with microorganisms content 1.10^8 cfu.g⁻¹) into the water on chemical composition of the breast muscle and thigh proportion was observed. Probiotics were applied into drink water for the chickens Ross 308 of two experimental groups (1st 6.6 ml per day in two first weeks and then 3.7 ml per day; 2nd 3.3 ml per day during all fattening). Time of feeding was 42 days. A feed-stuff was equivalent used in the control and experimental groups. The probiotic effect with his influence decreased fat content ($P \geq 0.05$) in the breast muscle in 1st group at $1.43 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ and 2nd group $1.80 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$. The protein content in 100 g breast muscle was increased ($P \geq 0.05$) at 0.46 g (1st group), resp. at 0.10 g (2nd group). The fat content in the thigh proportion was higher ($P \geq 0.05$) in the booth experimental groups ($13.00 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ - 1st group, $12.63 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ - 2nd group) against the control group. Similarly after probiotic application in the thigh proportion was increased protein content of chicken crossbred Ross 308 against control group ($P \geq 0.05$) at $0.07 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ (1st group) resp. at $0.44 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ (2nd group).

Keywords: *Lactobacillus fermentum*, breast, thigh, meat chemical composition, Ross 308

ÚVOD

Hydinové mäso má vysokú nutričnú a biologickú hodnotu, ktorá je úzko spojená aj s jeho vysoko dietetickými vlastnosťami. Po mäse rybacom zaujíma hydinové mäso z hľadiska zdravotnej nezávadnosti významné postavenie, pričom porovnaním s ostatnými druhmi mäsa má vyšší obsah bielkovín a nepostrádateľných aminokyselín (Karas, 1998).

Hydinové mäso predstavuje neodmysliteľnú súčasť potravinového reťazca človeka spojenú s jeho racionálnou výživou. Okrem produkcie hydinového mäsa pre potravinársky priemysel je dôležitá aj jeho kvalitatívna skladba, ktorú ovplyvňuje genotyp zvieratá, výživa, vek, chovateľské prostredie a rôzne ďalšie extra a intravitálne činitele (Jedlička, 1988; Haščík et al., 2005a).

Benková et al. (2005) označujú hydinové mäso ako vhodnú komoditu pre tvorbu tzv. funkčných potravín pre ľudskú výživu, čo je v súčasnosti v záujme humánneho, poľnohospodárskeho ako aj potravinárskeho výskumu.

Najdôležitejšou zložkou hydinového mäsa sú predovšetkým bielkoviny s vysokým obsahom esenciálnych aminokyselín (Straková et al., 2003), pričom bielkoviny kuracieho a morčacieho mäsa obsahujú v porovnaní s bravčovým a hovädzím mäsom viac esenciálnych aminokyselín, najmä arginínu, leucínu, izoleucínu, metionínu a valínu. Vysoký obsah esenciálnych aminokyselín ako aj ich priaznivý pomer v hydinovom mäse vytvárajú vhodné podmienky pre zdravý vývoj človeka a jeho výkonnosť. Dôležitý je v hydinovom mäse aj obsah lipidov, ktoré sú rezervoárom energie, nosičom vitamínov rozpustných v tuku a dodávateľom esenciálnych mastných kyselín (Benková et al., 2005).

Vplyv rôznych faktorov na dosahovanú kvalitu a zloženie hydinového mäsa, resp. jeho najcennejších častí vo svojich prácach popisuje viacero autorov ako Berri et al. (2007, 2008), Duclos et al. (2007), Fanatico et al. (2008), ktorí konštatujú, že na základe dosahovaných kvalitatívnych ukazovateľov hydinové mäso získava čoraz viac svojich priaznivcov a je vo väčšej miere konzumované ako tomu bolo v minulosti (Angelovičová et al., 1997; Kerekréty, 1998; Holoubek, 2001; Haščík et al., 2005b).

Jednou z možností náhrady za vyradované živočíšne múčky, antibiotické preparáty, respektíve kokcidiostatiká z výživy hydiny podľa nariadení Európskej únie od roku

Tabuľka 1 Dávkovanie pitnej vody a probiotika v pokusných skupinách.deň⁻¹

Tabuľka 1 Týždeň	Počet ks	Dávka pitnej vody (l)	Dávkovanie probiotika (ml)	
			1. pokusná skupina	2. pokusná skupina
1	60	2,5	6,6	3,3
2	60	3,5	6,6	3,3
3	60	4,6	3,7	3,3
4	60	6,7	3,7	3,3
5	60	8,6	3,7	3,3
6	60	10,6	3,7	3,3

2006 je aplikácia probiotických, prebiotických, fytobiotických preparátov a iných vhodných doplnkov, ktoré sú určené v prvom rade na potlačanie nežiaducej mikroflóry v tráviacom trakte hydiny a pre zvyšovanie imunity zvierat, s možnosťou zvýšenia ich mäsovej úžitkovosti (Cavazzoni et al., 1998; Audissio et al., 2000; Spring et al., 2000; Haščík et al., 2004a,b; Angelovičová et al. 2005a, b; 2006 a,b; Brzóska et al. 2005, 2007; Kačániová et al., 2006 a i.).

Haščík et al. (2007) zároveň konštatujú, že probiotické preparáty vytvorené z preverených a účinných mikroorganizmov okrem zlepšenia úžitkovosti môžu pre poľnohospodárske podniky zaoberajúcimi sa výrobou hydínového mäsa zvýšiť aj samotnú mieru zisku a zvýšiť rentabilitu a ekonomiku ich výroby.

V nadväznosti na vyššie uvedené poznatky sme sa v našej práci zamerali na preverenie účinku probiotického preparátu vytvoreného na báze *Lactobacillus fermentum* aplikovaného cez vodný zdroj na chemické zloženie najcennejších častí jatočného tela kurčiat hybridnej kombinácie Ross 308.

MATERIÁL A METODIKA

Problematiku sme riešili skupinovým kŕmnym pokusom rozdeleným do 3 skupín (kontrolná a dve pokusné skupiny) po 60 ks výkrmových kurčiat hybridnej

kombinácie Ross 308. Kurčatá boli odchovávané v klieťkovej technológii v podmienkach experimentálnej prevádzky KMHMZ pri SPU v Nitre. Dĺžka výkrmu kurčiat bola 42 dní. Výkrmové kurčatá experimentu boli kŕmené sypkou štartérovou komerčne vyrábanou KKZ HYD-01 do 21. dňa veku a granulovanou rastovou KKZ HYD-02 od 22. do 42. dňa veku kurčiat (koniec výkrmu) *ad libitum* rovnakého zloženia vo všetkých sledovaných skupinách. V experimente sme použili ako doplnok v pokusných skupinách probiotický preparát aplikovaný cez vodný zdroj, ktorý bol vytvorený na báze kmeňa *Lactobacillus fermentum* CCM 7158 s obsahom $1 \cdot 10^8$ KTJ v 1 g živého média s potencujúcou zložkou maltodextrínu a fruktooligosacharidu zapracovaných v probiotickom prípravku v 1 %-tnej koncentrácii. Dávkovanie probiotického preparátu v pokusných skupinách je zobrazené v tabuľke 1.

Na vyhodnotenie chemického zloženia najcennejších častí jatočne opracovaného tela kurčiat Ross 308 sme po základnej jatočnej rozrábke 30 ks z každej skupiny odobrali prsnú svalovinu bez kože a stehennú svalovinu s kožou a podkožným tukom.

Základné chemické zloženie mäsa bolo vyhodnocované pomocou prístroja INFRATEC 1265 (NSR), kde sme sledovali obsah sušiny, tuku a bielkovín v g.100 g⁻¹. Energetickú hodnotu v kJ.100 g⁻¹ sme zisťovali výpočtom

Tabuľka 2 Chemické zloženie prsnej svaloviny kurčiat hybridnej kombinácie Ross 308

Ukazovateľ	Skupina	$\bar{x}$	s	minimum	maximum	v %
Obsah sušiny g.100g ⁻¹	Kontrolná	25,40a	0,10	25,30	25,50	0,39
	1.Pokusná	25,57a	0,45	25,10	26,00	1,76
	2.Pokusná	25,30a	0,53	24,90	25,90	2,09
Obsah bielkovín g.100g ⁻¹	Kontrolná	22,67a	0,15	22,60	22,90	0,67
	1.Pokusná	23,13a	0,50	22,60	23,60	2,18
	2.Pokusná	22,77a	0,49	22,10	23,00	2,18
Obsah tuku g.100g ⁻¹	Kontrolná	1,63a	0,21	1,40	1,80	12,74
	1.Pokusná	1,43a	0,06	1,40	1,50	4,03
	2.Pokusná	1,80a	0,20	1,60	2,00	11,11
Energetická hodnota kJ.100g ⁻¹	Kontrolná	441,14a	5,69	436,32	446,37	1,28
	1.Pokusná	441,49a	6,49	435,07	448,05	1,47
	2.Pokusná	449,22a	10,60	437,99	458,93	2,37

Pozn.: Priemerné hodnoty v tom istom stĺpci, pri ktorých nasledujú rôzne písmená, sú preukazné pri $P \leq 0,05$

Tabuľka 3 Chemické zloženie stehrovej časti kurčiat hybridnej kombinácie Ross 308

Ukazovateľ	Skupina	$\bar{x}$	s	minimum	maximum	v %
Obsah sušiny g.100g ⁻¹	Kontrolná	31,93a	1,72	30,00	33,30	5,39
	1.Pokusná	32,40a	0,36	32,00	32,70	1,11
	2.Pokusná	32,40a	1,61	30,60	33,70	4,97
Obsah bielkovín g.100g ⁻¹	Kontrolná	18,33a	0,70	17,60	19,00	3,83
	1.Pokusná	18,40a	0,53	17,80	18,80	2,88
	2.Pokusná	18,77a	0,42	18,30	19,10	2,22
Obsah tuku g.100g ⁻¹	Kontrolná	12,60a	2,39	10,00	14,70	18,96
	1.Pokusná	13,00a	0,17	12,90	13,20	1,33
	2.Pokusná	12,63a	1,85	10,50	13,80	14,65
Energetická hodnota kJ.100g ⁻¹	Kontrolná	781,85a	78,75	695,05	848,70	10,07
	1.Pokusná	798,04a	2,74	795,53	800,97	0,34
	2.Pokusná	790,36a	65,37	715,56	836,55	8,27

Pozn.: Priemerné hodnoty v tom istom stĺpci, pri ktorých nasledujú rôzne písmená, sú preukazné pri $P \leq 0,05$

cez prepočítavacie koeficienty na obsah tuku a bielkovín.

Zo získaných údajov sme pomocou štatistického programu SAS vypočítali základné variačno-štatistické hodnoty (aritmetický priemer, smerodajná odchýlka, minimum, maximum, variačný koeficient) a na určenie preukaznosti rozdielov medzi skupinami sme použili analýzu variácií s následných Scheffeho testom.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Dosiahnuté hodnoty chemického zloženia prsnej svaloviny bez kože a stehennej svaloviny s kožou a podkožným tukom u hybridnej kombinácie Ross 308, ktoré boli cieľom nášho experimentu sú zobrazené v tabuľkách 2, 3.

Chemické zloženie mäsa je často v rámci ako aj medzi druhmi zvierat pomerne rozdielne a jednou z možností ovplyvnenia jeho zloženia je výživa, resp. aplikácia nových trendov vo výžive hydiny, ku ktorým patria aj preverované probiotické preparáty vytvárané na báze rôznych kmeňov mikroorganizmov. Z výsledkov experimentu vyplýva, že obsah sušiny bol v prsnej svalovine 25,30 g (2. pokusná skupina), 25,40 g (kontrolná skupina) a 25,57.100 g⁻¹ (1. pokusná skupina). Výsledky obsahu sušiny v prsnej svalovine kurčiat hybridnej kombinácie Ross 308 v nami preverovanom experimente sú porovnateľné s výsledkami Mojtu a Palanskej (1997), Simeonovovej (1999), resp. Suchého et al. (2002), ktorí zistili obsah sušiny v prsnej svalovine kurčiat rôznych hybridných kombinácií na úrovni 25,36 až 26,19 g.100 g⁻¹ a porovnateľné s výsledkami Haščíka et al. (2009), ktorí u hybridnej kombinácie Ross PM3 zistili hodnoty od 25,40 po 25,73 g.100 g⁻¹ pri rovnakom kŕmení ako aj aplikovanom probiotickom preparáte.

Obsah sušiny v prsnej svalovine nášho experimentu je mierne vyšší v porovnaní s hodnotami dosiahnutými Haščíkom et al. (2005 b) u toho istého hybridu, ktorému bol vo výžive pridávaný probiotický preparát vytvorený na báze *Bacillus subtilis* a *Bacillus licheniformis* cez

kŕmnu zmes a hodnoty obsahu sušiny boli od 24,35 po 24,64 g.100 g⁻¹.

V stehennej svalovine bol obsah sušiny vyšší vo všetkých skupinách experimentu v porovnaní s prsnou svalovinou, nakoľko bola hodnotená aj s kožou a podkožným tukom. Zistené výsledky vyššieho obsahu sušiny v stehennej oproti prsnej časti sú v súlade so závermi Suchého et al. (2002), ktorí taktiež konštatujú zvýšený obsah sušiny v stehennej oproti prsnej svalovine u hybridných kombinácií Ross 308, Cobb a Hybro, kde zistili hodnoty od 28,50 po 28,60 g.100 g⁻¹.

Aplikácia probiotického preparátu *Lactobacillus fermentum* CCM 7158 cez vodný zdroj v našom experimente zvýšila obsah sušiny u hybridnej kombinácie Ross 308 v stehennej časti v oboch pokusných skupinách o 0,47 g.100 g⁻¹ oproti kontrolnej skupine, kde bol jej obsah na úrovni 31,93 g.100 g⁻¹. Dosiahnuté hodnoty obsahu sušiny v stehennej svalovine s kožou a podkožným tukom sú porovnateľné s výsledkami Horváthovej (1989), Chudého (1994), resp. Haščíka et al. (2009), ktorí zistili vo svojich pokusoch pri tejto časti jatočného tela obsah sušiny na úrovni 30,93 až 37,66 g.100 g⁻¹ a mierne vyššie v porovnaní s Haščíkom et al. (2005b), ktorí zistili u hybridnej kombinácie Ross 308 hodnoty od 27,58 do 29,44 g.100 g⁻¹.

Zo sušiny je dôležité z chemického zloženia pre konzumenta sledovať predovšetkým obsah bielkovín a tuku v mäse zvierat, nakoľko tieto zložky sú pre človeka nepostrádateľné na základe obsahu dôležitých aminokyselín a mastných kyselín (Benková et al., 2005; Duclos et al., 2007; Berri et al. 2008) a sú taktiež dôležitým zdrojom energie.

Obsah bielkovín bol v 100 g prsnej svaloviny najnižší v kontrolnej skupine (22,67 g.100 g⁻¹), vyšší v 2. pokusnej skupine (22,77 g.100 g⁻¹) a najvyšší v 1. pokusnej skupine u hybridnej kombinácie Ross 308 (23,13 g.100 g⁻¹). Obsah bielkovín v prsnej svalovine nášho experimentu je v súlade s odporúčaniami Matušovičovej (1986), ktorá požaduje ich obsah v priemere na úrovni 23 % a vyšší pri porovnaní s hodnotami zistenými Simeonovovou (1999), Mojtom a

Zaujecom (2001), resp. **Suchým et al. (2002)**, ktorí dosiahli u hybridných kombinácii Ross 308, Cobb a Hybro obsah bielkovín od 22,00 do 22,70 g.100 g⁻¹.

Zvýšenie obsahu bielkovín v prsnej svalovine v pokusných skupinách pri aplikácii probiotického preparátu na báze *Lactobacillus fermentum* CCM 7158 cez vodný zdroj naznačuje možný vplyv probiotických preparátov aplikovaných vo výžive kurčiat na tento ukazovateľ, nakoľko podobné výsledky dosiahli aj **Haščík et al. (2005b)** pri aplikácii *Bacillus subtilis* a *Bacillus licheniformis* cez krmnu zmes, resp., **Haščík et al. (2009)** pri aplikácii *Lactobacillus fermentum* cez vodný zdroj u kurčiat Ross PM3.

Obsah bielkovín v stehnovej časti nášho experimentu bol nižší oproti prsnej svalovine, čo je v súlade s výsledkami **Simeonovovej (1999)**, **Mojta a Zaujeca (2001)**, **Suchého et al. (2002)**, resp. **Haščika et al. (2005b, 2009)** a iných.

Obsah bielkovín v stehnovej časti bol najnižší v kontrolnej skupine (18,33 g.100 g⁻¹), vyšší v 1. pokusnej skupine (18,40 g.100 g⁻¹) a najvyšší v 2. pokusnej skupine (18,77 g.100 g⁻¹). Podobne ako v prsnej svalovine sa prejavilo zvýšenie obsahu bielkovín aj v stehnovej časti vplyvom probiotického preparátu vytvoreného na báze *Lactobacillus fermentum* CCM 7158. Obsah bielkovín v stehnovej časti u kurčiat hybridnej kombinácie Ross 308 v nami preverovanom experimente je v súlade s hodnotami zistenými **Suchým et al. (2002)**, resp. **Haščikom et al. (2009)**. Pri porovnaní obsahu bielkovín s výsledkami **Simeonovovej (1999)**, resp. **Haščika et al. (2005b)** sme v našom experimente pri aplikácii *Lactobacillus fermentum* CCM 7158 cez vodný zdroj zistili mierne vyššie hodnoty obsahu bielkovín v stehennej časti.

Tuk v mäse je považovaný za hlavný rezervoár energie, ale aj ako dôležitý prvok z hľadiska senzorickej kvality mäsa, nakoľko obsahuje vysoký obsah aromatizujúcich látok (**Suchý et al., 2002**).

Hodnoty obsahu tuku v prsnej svalovine boli v pokusných skupinách od 1,43 g.100 g⁻¹ (1. pokusná skupina) až 1,80 g.100 g⁻¹ (2. pokusná skupina) a v kontrolnej skupine bol jeho obsah 1,63 g.100 g⁻¹. Hodnoty obsahu tuku v prsnej svalovine u kurčiat Ross 308 sú vyrovnané v porovnaní so zisteniami **Haščika et al. (2009)**, ale nižšie ako zistili **Chudý (1994)**, **Mojto a Zaujec (2001)**, resp. **Suchý et al. (2002)**, ktorých hodnoty boli od 2,05 do 2,50 g.100 g⁻¹.

V stehnovej časti sa vyšší obsah tuku dosiahol v pokusných skupinách a to 12,63 g.100 g⁻¹ (2. pokusná skupina) a 13,00 g (1. pokusná skupina) oproti kontrolnej skupine, kde bola hodnota tohto ukazovateľa na úrovni 12,60 g.100 g⁻¹. V pokusných skupinách vyživovaných probiotikom bol obsah tuku porovnateľný s hodnotami zistenými **Mojtom a Zaujecom (2001)**, resp. **Haščikom et al. (2009)**, ktorí zistili jeho obsah v tejto časti na úrovni 10,83 až 13,63 g.100 g⁻¹.

Energetická hodnota 100 g svaloviny, resp. mäsa je úzko spojená s obsahom tuku a bielkovín. Najvyššia energetická hodnota bola dosiahnutá v prsnej svalovine (449,22 kJ.100 g⁻¹) v 2. pokusnej skupine a v stehennej časti (798,04 kJ.100 g⁻¹) v 1. pokusnej skupine nášho

experimentu. Energetické hodnoty sledovaných skupín v prsnej svalovine u hybridnej kombinácie kurčiat Ross 308 boli vyrovnané pri porovnaní s hodnotami zistenými **Haščikom et al. (2009)** u hybridnej kombinácie Ross PM3, resp. nižšie ako zistili vo svojej práci u hybridných kombinácii kurčiat Ross 308, Cobb, resp. Hybro **Suchý et al. (2002)**.

Energetická hodnota v 100 g stehnovej časti nášho experimentu bola nižšia pri porovnaní s výsledkami **Chudého (1994)**, resp. **Mojta a Zaujeca (2001)**, resp. mierne vyššia pri porovnaní s výsledkami **Haščika et al. (2005b)**, ktorí overovali účinok probiotického preparátu vytvoreného na báze *Bacillus subtilis* a *Bacillus licheniformis* pri aplikácii cez krmnu zmes a dosiahli hodnoty od 642,13 do 715,06 kJ.100 g⁻¹.

Z hľadiska štatistického môžeme skonštatovať, že v nami preverovanom experimente pri aplikácii probiotického preparátu vytvoreného na báze *Lactobacillus fermentum* CCM 7158 s obsahom 1.10⁸ KTJ.g⁻¹ aplikovaného cez vodný zdroj v rôznych množstvách u hybridnej kombinácie Ross 308 sa medzi sledovanými skupinami nezistili štatisticky preukazné rozdiely ($P \geq 0.05$) v obsahu sušiny, bielkovín, tuku a energetickej hodnote.

ZÁVER

V pokuse sme hodnotili chemické zloženie prsnej svaloviny a stehnovej časti u výkrmových kurčiat hybridnej kombinácie Ross 308 vplyvom použitia probiotického preparátu vytvoreného na báze *Lactobacillus fermentum* CCM 7158 v množstve 1.10⁸ KTJ.g⁻¹ a aplikovaného cez vodný zdroj.

Na základe dosiahnutých výsledkov experimentu sme nezistili zásadné rozdiely v chemickom zložení prsnej svaloviny a stehennej časti ($P \geq 0.05$) medzi sledovanými skupinami kŕmených bez a s probiotickým preparátom.

Probiotický preparát svojim účinkom mierne zvýšil obsah bielkovín tak v prsnej ako aj stehennej časti a obsah tuku bol v zásade vyrovnaný ($P \geq 0.05$) u hybridnej kombinácie kurčiat Ross 308.

Probiotické preparáty, ktoré využívame pre výživu hydiny, ale aj iných zvierat, by mali byť vytvárané len z preverených mikroorganizmov, ktoré zabezpečujú nielen dobrý zdravotný stav hydiny, ničenie patogénnej mikroflóry v ich tráviacom trakte s pozitívnym využitím krmiva a následným dosiahnutím správnych parametrov jatočnej hodnoty, ale je nutné sledovať aj ich vplyv na chemické zloženie, resp. technologickú kvalitu mäsa.

Preverovaný probiotický preparát vytvorený na báze *Lactobacillus fermentum* CCM 7158 v množstve 1.10⁸ KTJ.g⁻¹ a aplikovaný cez vodný zdroj odporúčame využívať aj v praktických podmienkach hydinárskej veľkovýroby pri výrobe kuracieho mäsa, z hľadiska zvyšovania obsahu bielkovín v najcennejších častiach kuracieho mäsa, ktoré sú dôležitou súčasťou výživy a potravinového reťazca človeka.

LITERATÚRA

ANGELOVIČOVÁ, M. 1997. Vplyv nízkobielkovinových tukovaných kŕmnych zmesí na živú hmotnosť a vybrané

- ukazovatele jatočnej kvality výkrmových kurčiat. In Poľnohospodárstvo, roč. 43, č. 10, 1997, s. 764-771, ISSN 0551-3677.
- ANGELOVIČOVÁ, M. – MENDEL, J. – ANGELOVIČ, M. – KAČÁNIOVÁ, M. 2005a. Effect of enzyme addition to wheat based diets in broilers. In Trakya University Journal Science, roč. 6, č. 1 (2005), s. 29-33, ISSN 1302 647X.
- ANGELOVIČOVÁ, M. – MELEN, M. – TURIANICA, I. – ANGELOVIČ, M. 2005b. In VI. Kábrtovy dietetické dny: konferencie s mezinárodnou účasťou o zdravotní nezávadnosti a produkčnej účinnosti krmív, Brno, 2005, Veterinární a farmaceutická univerzita, s. 74-82, ISBN 80-7305-521-X.
- ANGELOVIČOVÁ, M. – BULLA, J. – KMEŤ, V. – KAČÁNIOVÁ, M. – ANGELOVIČ, M. 2006a. Použitie tymiánovej silice vo výžive výkrmových kurčiat = The use of thymy aetheroleum in nutrition of broilers. In Využití doplňkové a nekonvenční péče o zdraví zvířat, 6. vědecká konference s mezinárodní účastí, České Budějovice, 2006, Jihočeská univerzita, s. 1-9, ISBN 80-7040-868-5.
- ANGELOVIČOVÁ, M. – BULLA, J. – LADYKOVÁ, M. 2006b. Kvalita jatočného tela výkrmových kurčiat pri použití silice yzopu lekárskeho v krmných zmesiach. In Drúbež a mlieko ve výživě člověka: konference s mezinárodní účastí, Praha, Česká zemědělská univerzita, 2006, s. 71-73, ISBN 80-213-1548-2.
- AUDISIO, C. M. – OLIVER, G. – APPELLA, M. S. 2000. Protective effect of *Enterococcus faecium* J96 a potencial probiotic strain, on chicken infected with *Salmonella pullorum*. In *J. Food Protect*, 10, 2000, pp. 1333-1337.
- BENKOVÁ, J. – BAUMGARTNER, J. – HETÉNYI, L. 2005. Hydinové mäso – významná zložka racionálne výživy obyvateľstva. In: Realizácia komplexného programu ozdravenia výživy obyvateľstva SR – využitie nutričných poznatkov v primárnej a sekundárnej prevencii neinfekčných chorôb. Zborník č. 49, SAPV, Nitra, 2005, s. 31-32. ISBN 80-89162-18-5.
- BERRI, C. – LE BIHAN-DUVAL, E. – DEBUT, M. – SANTE-LHOUTELLIEN, V. – BAEZA, E. – GIGARD, V. – JEGO, Y. – DUCLOS, M. J. 2007. Corse quence of muscle hypertrophy on characteristics of *Pectoralis major* muscle and breast meat quality of broiler chickens. In *J. Anim. Sci.*, August 1, 85 (8), 2007, pp. 2005-2011.
- BERRI, C. – BESNARD, J. – RELANDEAU, C. 2008. Increasing dietary lysine increases final pH and decreases driploss of broiler breast meat. In *Poultry Sci.*, March 1, 87 (3), 2008, pp. 480-484.
- BRZÓSKA, F. – BULUCHEVSKIJ, S. B. – ŚLIWIŃSKI, B. – STECKA, K. 2005. Preliminary study of the microbial spectrum of the digestive tract in broilers fed diets with and without antibiotic supplementation. In *J. Anim. Feed Sci.*, 14, Supl. 1, 2005, pp. 431-434.
- BRZÓSKA, F. – BULUCHEVSKIJ, S. B. – STECKA, K. – ŚLIWIŃSKI, B. 2007. The effect of lactic acid bacteria and mannan oligosaccharide, with or without fumaric acid, on chicken performance, slaughter yield and digestive tract micoflora. In *Jour. Anim. and Feef Sci.*, 16, 2007, pp. 241-251.
- CARAZZONI, V. – ADAMI, A. – CASTROVILLI, C. 1998. Performance of broiler chicken supplemented with *Bacillus coagulans* as probiotic. In *Brit. Poultry Sci.*, 39, 1998, pp. 526-529.
- DUCLOS, M. J. – BERRI, C. – LE BIHAN-DUVAL, E. 2007. Muscle growth and meat quality. In *J. Appl. Poult. Res.*, January 1, 16 (1), 2007, pp. 107-112.
- FANATICO, A. C. – PILLAI, P. B. – EMMERT, J. L. – OWENS, C. M. 2008. Meat quality of slow- and fast-growing chicken genotypes fed low-nutrient or standard diets and raised indoors or with outdoor acces. In *Poult., Sci.*, October 1, 86 (10), 2007, pp. 2245-2255.
- HAŠČÍK, P. – ČUBOŇ, J. – KULÍŠEK, V. – MAKOVICKÝ, P. 2004a. Vplyv rôznych hladín probiotického preparátu v KKZ brojlerových kurčiat ROSS 308 na straty hmotnosti chladením. In *Acta fytotechnica et zootechnica*, Nitra, roč. 7, 2004, , č. 1, s. 10-13, ISSN 1335-258X.
- HAŠČÍK, P. – ČUBOŇ, J. – VAGAČ, V. 2004b. Hodnotenie senzorickej kvality hydínového mäsa vplyvom probiotického preparátu IMB 52. In *Maso*, XV, Praha, 2004, č.1, s. 62-65.
- HAŠČÍK, P. – ČUBOŇ, J. – HORNIÁKOVÁ, E. – KRIVÁNEK, L. – KULÍŠEK, V. 2005a. Vzťah medzi aplikáciou probiotického preparátu a množstvom abdominálneho tuku u výkrmových kurčiat. Im : *Agriculture* (Poľnohospodárstvo), 51, Nitra, 2005, č. 11, s. 574-579, ISSN 0551-3677.
- HAŠČÍK, P. – WEIS, J. – ČUBOŇ, J. – KULÍŠEK, V. – MAKOVICKÝ, P. – KAČÁNIOVÁ, M. 2005b. Vplyv probiotického preparátu v KKZ brojlerových kurčiat ROSS 308 na chemické zloženie mäsa. In *Acta fytotechnica et zootechnica*, Nitra, roč. 8, 2005, č. 1, s. 20-24, ISSN 1335-258X.
- HAŠČÍK, P. – ČUBOŇ, J. – KAČÁNIOVÁ, M. – UBREŽIOVÁ, I. 2007. Effect of new trends in poultry nutrition on the poultry meat production economy. In *Acta oeconomica et informatica*, Nitra, roč. 10, 2007, č. 1, s. 17-20, ISSN1335-2571.
- HAŠČÍK, P. – KAČÁNIOVÁ, M. – ČUBOŇ, J. – BOBKO, M. – NOVÁKOVÁ, I. – VAVRIŠINOVÁ, K. – ARPÁŠOVÁ, H. – MIHOK, M. 2009. Aplication of *Lactobacillus fermentum* and its effect on chemical coposition of Ross PM3 chicken meat. In *Acta fytotechnica et zootechnica*, Nitra, roč. 12, 2009, mimoriadne číslo, s. 197-205, ISSN 1335-258X.
- HOLOUBEK, J. 2001. Důvody trvalého rozširování drůbeže. In *Náš chov*, roč. 61, 2001, č. 11, s. 41-42.
- HORVÁTHOVÁ, V. 1989. Technological quality and nutritive-value of the meat of chickens of the Hybro combination. In *Živočišna výroba*, 34, 1989, no. 7, pp. 663 - 670.
- CHUDÝ, J. 1994. Vplyv živej hmotnosti a pohlavia na jatočnú kvalitu a nutričnú hodnotu mäsa brojlerových kurčiat. Habilitačná práca, VŠP, Nitra, 1994, s. 73.
- JEDLIČKA, J. 1988. Kvalita mäsa. In *Príroda*, Bratislava, 1988, s.107-125.
- KAČÁNIOVÁ, M. – PETROVÁ, J. – HAŠČÍK, P. – ČUBOŇ, J. – PAVLIČOVÁ, S. 2006. Colonization of gastrointestinal tract of turkeys after probiotics and prebiotics application. In *Slovak J. Anim. Sc.*, 39, 2006, no. 3, pp. 155-159.
- KARAS, I. 1998. Technológia krmenia hydiny chovanej v rôznych systémoch. In *Roľnícke noviny (príloha)*, 1998, (205): 4.

KEREKRÉTY, J. 1998. História, trendy a význam konzumácie hydiny a vajec. In *Výživa a zdravie*, roč. 43, 1998, č. 1, s. 14-16.

MATUŠOVIČOVÁ, E. 1986. Technology of Poultry Production (in Slovak). In *Príroda*, Bratislava, 1986, 393 pp.

MOJTO, J. – ZAUJEC, K. 2001. Aktuálne údaje o chemickom zložení a nutričnej hodnote mäsa hospodárskych a divých zvierat. In *Maso*, 2001, č. 4, s. 39-41.

SIMEONOVÁ, J. 1999. Technology of Poultry, Eggs and other Minor Animal Products (in Czech). In *MZLU Brno*, 199, 247 pp., ISBN 80-7157-405-8.

SPRING, P. – WENK, C. – DAWSON, K. A. – NEWMAN, K. E. 2000. The effects of dietary manna oligosaccharides on ceceal parameters and the concentrations of enteric bacteria in the ceca of *Salmonella*-challenged broiler chicks. In *Poultry Sci.*, 79, 2000, pp. 205-211.

STRAKOVÁ, E. – VEČEREC, V. – SUCHÝ, P. – VITULA, F. 2003. The comparison of carcass quality in fattening

chicks and pheasants. In *Současnost a perspektivy chovu drůbeže*. Sborník z mezinárodní konference, 15.-16.května 2003, Praha, s. 83-87, ISBN 80-213-1037-5.

SUCHÝ, P. – JELÍNEK, P. – STRAKOVÁ, E. – HUCL, J. 2002. Chemical composition of muscles of hybrid broiler chickens during prolonged feeding. In *Czech J. Anim. Sci.*, 47, 2002, (12), pp. 511-518.

PodĎakovanie:

Práca bola riešená v rámci projektu VEGA 1/0360/09.

Kontaktná adresa: doc. Ing. Peter Haščík, PhD. FBP, Katedra hodnotenia a spracovania živočíšnych produktov, SPU v Nitre, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, email: peter.hascik@uniag.sk,

VÝSKYT A VÝZNAM TERMOREZISTENTNÝCH HÚB NA JAHODÁCH OCCURRENCE AND IMPORTANCE OF HEAT-RESISTANT FUNGI ON THE STRAWBERRIES

*Javoreková Soňa, Labuda Roman., Kupcová
Michaela, Selešiová Zuzana, Maková Jana,*

ABSTRAKT

Occurrence of heat-resistant fungi in soil of several strawberry fields from five locations in region Nitra, Slovakia (Zobor I, Zobor II, Čermáň, Veľké Zálužie and Lehota) were investigated during this study. Heat-resistant fungi (*Eupenicillium baarnense*, *Neosartorya fischeri*, *Merimbla ingelheimense*, *Talaromyces flavus*) were present in the all soil samples. Their occurrence was confirmed in only one strawberry sample taken from the locality Veľké Zálužie (incidence 20 %). By using a soil heating method, 7 species were revealed, namely *Byssoschlamys nivea*, *Eurotium amstelodami*, *Eurotium rubrum*, *Paecilomyces bacillisporus*, *Sterilia mycelia*, *Talaromyces flavus*, and *Talaromyces trachyspermus*. The all isolated fungi were (except *Talaromyces trachyspermus*) found to be toxigenic.

Keywords: heat-resistant fungi, strawberries, soil, mycotoxins

ÚVOD

Ovocie, a to najmä tie druhy, ktoré sú v priamom kontakte so zeminou (jahody, ríbezle, maliny, čučoriedky atď.), konzumované za surova ale i konzervované predstavujú najrizikovejšiu skupinu potravín z hľadiska kontaminácie pôdnymi toxigénnymi mikroskopickými vláknitými hubami. V prípade konzervovania takéhoto ovocia teplom je preto dôležité kontrolovať prítomnosť tzv. termorezistentných mikroskopických húb, ktoré sú

schopné prežiť zahriatie na teplotu okolo 75 °C v čase 30 a viac minút. Hubové štruktúry, ktoré môžu prežiť tieto teploty sú najčastejšie askospóry, chlamydospóry, hrubostenné hubové fragmenty alebo skleróciá (Scholte et al., 2002). Výsledkom rastu mikroskopických vláknitých húb v konzervovanom ovocí a šťavách je potom ich znížená senzorická kvalita a ohrozenie zdravia spotrebiteľa, a to najmä prítomnosťou mykotoxínov (Betina, 1990; Cole et Schweikert, 2003; Cole et al., 2003). V ovocných konzervách a šťavách bola najčastejšie potvrdená prítomnosť potenciálne karcinogénneho patulínu produkovaného kmeňmi *Byssoschlamys nivea*, *B. fulva* ako i *Paecilomyces varioti* (Jesenská, 1987, Frisvad et Thrane, 2002; Samson et al., 2002). Mnohé štáty majú stanovené jeho maximálne prípustné koncentrácie v potravinách. V Slovenskej republike je podľa Potravinového kódexu i Nariadenia Komisie EÚ č.1881/2006 najvyššie prípustné množstvo patulínu v ovocných šťavách a nektároch 0,05 mg.kg⁻¹, 0,025 mg.kg⁻¹ v tuhých jablkových výrobkoch a 0,01 mg.kg⁻¹ v jablkovej šťave a jablkových výrobkoch (kompót, pyré) určených pre dojčatá a malé deti.

Nakoľko väčšina termorezistentných mikroskopických húb sa vyskytuje bežne v pôde a môžu kontaminovať ovocie, cieľom našej štúdie bolo overiť, ktorí z týchto zástupcov pôdných termorezistentných húb sa najčastejšie vyskytujú v záhradnej pôde a prežívajú na ovocí. Overovaná bola v práci aj toxigenita druhov mikroskopických húb vyizolovaných z jahôd.

MATERIÁL A METODIKA

Všetky experimentálne časti práce spojené s izoláciou a identifikáciou termorezistentných húb boli uskutočnené na katedre mikrobiológie FBP SPU v Nitre. Možná produkcia mykotoxínov bola stanovená v laboratóriách firmy Biopure Referenzsubstanzen GmbH, a v spolupráci s Analytickým centrom (IFA, Tulln) v Rakúsku.

Pôdu z jahodnísk sme odobrali v piatich lokalitách (klimaticky, v rámci SR, najvhodnejšie pre pestovanie jahôd) v blízkom okolí mesta Nitra; lokalita 1: Zobor I, lokalita 2: Zobor II, lokalita 3: Čermáň, lokalita 4: Veľké Zálužie a lokalita 5: Lehota, v období od konca mája do

Tabuľka 1 Abundancia (početnosť) termorezistentných húb v pôde jahodnísk (počet izolátov/10g pôdy)

Termorezistentné huby (izoláty)	Lokality					Frekvencia výskytu (%)
	1	2	3	4	5	
<i>Aspergillus clavatus</i> (8)	-	-	-	-	8	20
<i>Eupenicillium baarnense</i> (53)	2	32	19	-	-	60
<i>Neosartorya fischeri</i> (48)	-	33	1	-	14	60
<i>Merimbla ingelheimense</i> (16)	-	-	-	3	13	40
<i>Talaromyces flavus</i> (2)	2	-	-	-	-	20
Σ izolátov	4	65	20	3	35	100
Spolu	127 izolátov					

začiatku júna v roku 2008. Na analýzu pôdy boli odobraté vzorky len z najvrchnejšej vrstvy (1-5 cm) pôdneho profilu jahodníka. Celkovo bolo odobratých a analýze podrobených 5 vzoriek pôdy. Vzorky pôdy boli po odbere preosiate cez 2 mm sito a podrobené mykologickej analýze. Vzorky jahôd (cca 100 g) boli priamo náhodne zozbierané zo záujmových lokalít do sterilných igelitových vreciek a do času analýzy uschované pri teplote -17 °C. Zhomogenizovaný náväžok 10 g zeminy a 20 g jahôd bol zmiešaný s 250 ml rozpustenej živnej pôdy Sabouradov agar s prídavkom bengálskej červenej a následne zahriaty na teplotu 70, 80 a 90 °C 30 až 60 minút. Po tomto čase boli vzorky rozliate do 10 Petriho misiek a po stuhnutí kultivované pri teplote 25 °C, 7–14 (60) dní v tme. Vyrastené a spočítané kolónie reprezentovali ich počet zárodkov v 10 g pôdy a v 20 g jahôd.

Druhovú identifikáciu mikroskopických húb bola uskutočnená primárne na základe mikromorfologických znakov podľa Stolk et Samson (1983) a Pitt (1979).

VÝSLEDKY A DISKUSIA

V 10 gramoch pôdy sme zistili že výskyt termorezistentných húb bol priemerne 178 kolónií tvoriacich propagule, ktoré dokázali prežiť na Sabouradovom agare pri teplote 70 °C a 102 kolónií, ktoré prežili teplotu 80 °C až 60 minút. Teplotu 90 °C za 30 minút prežilo 32 kolónií tvoriacich propagule. V každej zo vzoriek pôdy bola zistená prítomnosť termorezistentného druhu (tab. 1), ale medzi lokalitami boli výrazné rozdiely. Najväčší počet izolátov bol zachytený vo vzorke z lokality Zobor II, potom nasledovali lokality Lehota, Čermáň a relatívne nízky počet izolátov bol zachytený vo vzorke Zobor I. Jesenská a Piecková (1995) uvádzajú, že vo vzorkách pôdy prežilo 32 kolónií, (vystavené 70 °C 60 minút) s najčastejším výskytom druhov *Eupenicillium baarnense*, *Neosartorya fischeri*, *Talaromyces avellaneus*, *Byssoschlamys nivea*, *Gilmaniella humicola* a *Talaromyces flavus*. Celková diverzita termorezistentných druhov nami sledovaných lokalít predstavovala 5 druhov (*Aspergillus clavatus*, *Eupenicillium baarnense*, *Neosartorya fischeri*, *Merimbla ingelheimense*, *Talaromyces flavus*). S najväčšou frekvenciou sa vyskytovali druhy *Eupenicillium baarnense* a *Neosartorya fischeri* (60 %),

s najvyššou abundanciou druhu *Eupenicillium baarnense*. Diagnostikované taxóny reprezentovali celkovo 5 rodov (*Aspergillus clavatus*, *Eupenicillium baarnense*, *Neosartorya fischeri*, *Merimbla ingelheimense*, *Talaromyces flavus*).

Podľa Labuda (2007) v pôdných vzorkách (park, vinice, pasienky, orná pôda) sa vyskytlo až 20 taxónov (10 rodov) termorezistentných húb v 10 g pôdy, pričom priemerne na každú lokalitu pripadalo 5 termorezistentných druhov, najfrekvencovanejšie druhy boli *Byssoschlamys nivea* a *Neosartorya fischeri*. V našich vzorkách sme zistili spravidla dvojnásobne nižšiu diverzitu druhov (4 druhy) v záhradných pôdach (*Aspergillus clavatus* zistený vo vzorke Lehota sa za typicky termorezistentný druh nepovažuje). V porovnaní výsledkov získaných z abundancie druhu *Eupenicillium baarnense* (53 izolátov) v našich vzorkách záhradnej pôdy s výsledkami z pôdy pasienkov (Labuda, 2007), možno konštatovať, že je to druh charakteristický pre pôdu odobratú zo záhrad (jahodnísk). Kým nami zistený druh najpočetnejší taxónom *Neosartorya fischeri* (48 izolátov) bol rovnako početný aj v pôdach odobratých z pasienkov. *Talaromyces flavus* hoci relatívne veľmi početný sa vyskytoval v pôdach pasienkov len s nízkou frekvenciou. Výskyt druhu *Merimbla ingelheimense* bol počas našej štúdie izolovaný z dvoch lokalít v celkovom počte 16 izolátov, pričom až 13 tvoril podiel z lokality Lehota. Pri porovnaní so štúdiou podľa Labuda (2007) bola zistená prítomnosť vo vrchnej relevantnej vrstve pôdy len jeden izolát. V prípade druhov *Merimbla ingelheimense*, ktorý patrí medzi často sa vyskytujúci v pôde (Jesenská et al., 1993), výskyt (40 %) sme zaznamenali len v dvoch vzorkách pôdy (Veľké Zálužie a Lehota).

Zo všetkých analyzovaných vzoriek jahôd bola prítomnosť termorezistentných druhov zaznamenaná len vo vzorke z lokality Veľké Zálužie (tab. 2). V ostatných sledovaných vzorkách sme výskyt termorezistentov nezistili. Vo vzorke Veľké Zálužie bolo prítomných celkom 7 druhov (*Byssoschlamys nivea*, *Eurotium amstelodami*, *Eurotium rubrum*, *Paecilomyces bacillisporus*, *Sterilia mycelia*, *Talaromyces flavus*, *Talaromyces trachyspermus*). Z celkového počtu 20 izolátov tvorila najväčší podiel populácia druhu *Talaromyces flavus* (10 izolátov, 50 % podiel), ďalej boli zastúpené *Eurotium rubrum* (4 izoláty, 20 %). Zaznamenaná bola aj prítomnosť

Tabuľka 2 Abundancia (početnosť) termorezistentných húb na jahodách (počet izolátov/20g jahôd)

Termorezistentné huby (izoláty)	Lokalita					Frekvencia výskytu (%)
	1	2	3	4	5	
<i>Byssoschlamys nivea</i>	-	-	-	2	-	20
<i>Eurotium amstelodami</i>	-	-	-	1	-	20
<i>Eurotium rubrum</i>	-	-	-	4	-	20
<i>Paecilomyces bacillisporus</i>	-	-	-	1	-	20
<i>Sterilia mycelia</i>	-	-	-	1	-	20
<i>Talaromyces flavus</i>	-	-	-	10	-	20
<i>Talaromyces trachyspermus</i>	-	-	-	1	-	20
Σ izolátov	-	-	-	20	-	100

termorezistentného druhu *Byssoschlamys nivea* (2 izoláty, 10 %) *Eurotium amstelodami*, *Paecilomyces bacillisporus*, *Penicillium hordei*, *Sterilia mycelia* a *Talaromyces trachyspermus* len jediným izolátom (5%).

V izolátoch vo vzorkách jahôd Veľké Zálužie bola potvrdená schopnosť produkovať mykotoxíny (toxické sekundárne metabolity), pričom sa zistilo že až na jednu výnimku (izolát *Talaromyces trachyspermus*) boli toxigénne (tab. 3). *Byssoschlamys nivea* produkoval kyselinu mykofenolovú a patulín, *Eurotium amstelodami*, *Eurotium rubrum* a *Talaromyces flavus* produkovali emodín a fyción, *Eupenicillium baarnense* patulín, *Talaromyces bacillisporus* produkoval kyselinu penicilovú a emodín. Z celkového počtu testovaných izolátov bola najčastejšie zistená schopnosť produkovať emodín (*Eurotium amstelodami*, *Eurotium rubrum*, *Talaromyces bacillisporus*, *Talaromyces flavus*). Druhý najčastejší metabolit bol fyción (*Eurotium amstelodami*, *Eurotium rubrum*). Schopnosť produkcie patulínu bola potvrdená v dvoch prípadoch (*Byssoschlamys nivea* a *Eupenicillium baarnense*).

ZÁVER

Na základe mykologických rozborov pôdy jahodnísk a jahôd na nich dospešovaných sa nám nepotvrdila priama korelácia medzi výskytom termorezistentných húb v pôde a na jahodách. V pôde sme vyizolovali 5 druhov *Aspergillus clavatus*, *Eupenicillium baarnense*,

Neosartorya fischeri, *Merimbla ingelheimense*, *Talaromyces flavus* a na jahodách až 7 druhov *Byssoschlamys nivea*, *Eurotium amstelodami*, *Eurotium rubrum*, *Talaromyces bacillisporus*, *Sterilia mycelia*, *Talaromyces flavus*, *Talaromyces trachyspermus*. V pôde i na jahodách sa vyskytoval iba jeden spoločný druh *Talaromyces flavus*, pri ktorom bola z mykotoxínov potvrdená prítomnosť emodínu a fyciónu. Prítomnosť patulínu bola potvrdená pri dvoch druhoch *Byssoschlamys nivea* a *Eupenicillium baarnense*.

LITERATÚRA

BETINA, V. 1990. *Mykotoxíny, chémia – biológia – ekológia*. Bratislava : ALFA, 1990. 288 s., ISBN 80-05-00631-4.

COLE, R. J. – JARVIS, B. B. – SCHWEIKERT, M. A. 2003. *Handbook of Secondary Fungal Metabolites*. Volume III. United States : Academic Press, 2003. 672 p., ISBN 0-12-17943-6.

COLE, R. J. – SCHWEIKERT, M. A. 2003. *Handbook of toxic fungal metabolites*. New York : Academic Press, 2003. 136 p., ISBN 0-12-179461-X.

FRISVAD, J.C. – THRANE, U. 2002. Mycotoxin production by common filamentous fungi. In *Introduction to food- and Airborne fungi*. 6th ed. Utrecht : Centraalbureau voor schimmelcultures, R.A. Samson, E.S. Hoekstra, J.C. Frisvad - O. Filtenborg (eds.), 2002. p. 321-331, ISBN 90-70351-42-0.

JESENSKÁ, Z. 1987. *Mikroskopické huby v požívatinách a krmivách*. Bratislava : ALFA, 1987. 320 s.

Tabuľka 3 Toxinogenita izolovaných druhov termorezistentných húb z jahôd

Termorezistentné huby	Kyselina mykofenolová	Kyselina penicilová	Emodín	Fyción	Patulín
<i>Byssoschlamys nivea</i>	*1/1				1/1
<i>Eurotium amstelodami</i>			1/1	1/1	
<i>Eurotium rubrum</i>			2/2	2/2	
<i>Eupenicillium baarnense</i>					1/1
<i>Talaromyces bacillisporus</i>		1/1	1/1		
<i>Talaromyces flavus</i>			4/4	1/4	
<i>Talaromyces trachyspermus</i>					

* Počet pozitívnych / celkový počet testovaných izolátov

JESENSKÁ, Z. – PIECKOVÁ, E. – BERNÁT, D. 1993. Heat resistance of fungi from soil. In *International Journal of Food Microbiology*, Vol. 19, 1993, p. 187-192.

JESENSKÁ, Z. – PIECKOVÁ, E. 1995. Heat-resistant fungi. In *Czech Mycology*, Vol. 48, p. 73-76.

PITT, J. 1979. The genus *Penicillium* and its teleomorphic states *Eupenicillium* and *Talaromyces*. London : Academic press, 634 p.

LABUDA, R. 2007. Mykocenóza vybraných pôd Slovenska s dôrazom na termorezistentné a keratínofilné druhy: pilotná štúdia. In *Život v pôde* [CD-ROM], Brno : ES MZLU, 2007, s. 77-91, ISBN 978-80-7375-134-0.

Nariadenie (ES) komisie č. 1881/2006 Európskeho parlamentu a Rady z 19.12.2006 ktorým sa ustanovujú maximálne hodnoty obsahu niektorých kontaminantov v potravinách.

SAMSON, R. A. – HOEKSTRA, E. S. – FRISVAD, J. C – FILTENBORG, O. 2002. *Introduction to food- and Airborne fungi*. 6th ed. Utrecht : Centraalbureau voor schimmelcultures. 2002, 389 p., ISBN 90-70351-42-0.

SCHOLTE, R. P. M. – SAMSON, R. A. – DIJKSTERHUIS, J. 2002. Spoilage fungi in the industrial processing food. In *Introduction to food - and Airborne fungi*.

6th ed. Utrecht : Centraalbureau voor schimmelcultures, R.A. Samson - E.S. Hoekstra - J. C Frisvad - O. Filtenborg (eds.), 2002, p. 339-356.

STOLK, A. C. - SAMSON, R. A. 1983. The ascomyte genus *Eupenicillium* and related *Penicillium* anamorphs. In *Studies in Mycology*, 1-23 p., ISSN 0166-0616.

PodĎakovanie

Príspevok vznikol a bol prezentovaný za finančnej podpory riešených projektov MŠ SR VEGA 1/0404/09 a KEGA 3/6228/08. Autori vyjadrujú poďakovanie Dr. Michalovi Sulyokovi (Analytické centrum, IFA Tulln) za vykonanie LC-MS/MS stanovení.

Kontaktná adresa

doc. Ing. Soňa Javoreková, PhD. Katedra mikrobiológie SPU v Nitre, tr.A.Hlinku 2, 949 76 Nitra, +421/37/6414431, sona.javorekova@uniag.sk

Ing. Roman Labuda, PhD. *Biopure Referenzsubstanzen GmbH, Tulln, Rakúsko*, roman.labuda@biopure.at

OLOVOM INDUKOVANÉ ZMENY V SEKRÉCII HORMONÁLNYCH LÁTOK OVARIÁLNYMI GRANULÓZNymi BUNKAMI PRASNIČIEK *IN VITRO*

Adriana Kolesárová, Shubhadeep Roychoudhury, Jana Slivková, Peter Massányi, Alexander Sirotkin, Marcela Capcarová, Marína Medveďová, Jaroslav Kováčik

ABSTRACT

The present study was carried out to investigate possible effects of lead acetate administration on porcine ovarian granulosa cells in relation to insulin-like growth factor I (IGF-I) and progesterone (P₄) release. Ovarian granulosa cells were incubated with/without lead acetate for 18 hours: group Max (0.5 mg Pb.ml⁻¹), group A (1:1 dilution), group B (1:5), group C (1:7), group D (1:10) and the control group without Pb addition and these substances were assessed by RIA. Lead was shown to be capable of accumulation in porcine ovarian granulosa cells. Obtained data indicate Pb-induced inhibition of IGF-I release at lower concentrations by ovarian granulosa cells. However, Pb administration did not show any such effect as no differences were observed between the experimental groups and control in regards to release of P₄. These observations suggest possible involvement of lead, as a heavy metal and risk factor of environment, on release of hormonal substances by porcine ovarian cells. Our observations represent the demonstration influence of Pb on secretory activity of porcine ovarian granulosa cells.

Keywords: porcine granulosa cells, lead, IGF-I, progesterone

ÚVOD

Olovo je všadeprítomné v životnom prostredí a vyskytuje sa vo veľkých koncentráciách aj vo vode, v pôde a mosadzi sanitárnych zariadení v dôsledku industrializácie veľkomiest (Zhuang et al., 2009; Chrástný et al., 2009). Aerosóly obsahujúce olovo sa môžu prostredníctvom vzdušných prúdov presúvať na veľké vzdialenosti. Olovo patrí medzi ťažké kovy s nízkym bodom tavenia, je to kujný kov odolný voči korózii. Najvyššie prípustné množstvo olova v cereáliách je 1 mg·kg⁻¹, v objemových krmivách 15 mg·kg⁻¹ (Poláček et al., 2003). Olovo patrí medzi významnú zložku akumulátorov, ktoré po vybití a následnom vyhodení značne negatívne pôsobia na pôdny a vodný ekosystém. Zlúčeniny olova majú význam pri výrobe náterových hmôt, skla a keramiky. V niektorých keramických a krištáľových nádobách nie je vhodné uskladňovať dlhšiu dobu potraviny a iné potraviny. Ďalším významným zdrojom Pb sú produkty spaľovania benzínových motorov (Bencko et al., 1995). Olovo v pôde nepodlieha chemickej degradácii, a preto jeho koncentrácia rastie. Je veľmi imobilné, transport a vymývanie olova je v dôsledku jeho nízkej rozpustnosti veľmi malé. Hromadí sa najmä v hornej časti pôdneho profilu, na jeho povrchu. Približne 80 % olova obsiahnutého v imisiách zostáva vo vrchnej vrstve pôdy, obsah od tejto vrstvy prudko klesá (Svobodová et al., 1987; Hegedúsová, 1998). Z obsahu olova prítomného v rastlinách ¾ pochádza z ovzdušia a len ¼ rastliny prijímajú koreňmi (Poláček et al., 2003). Koncentrácie toxických kovov ako aj olova, sa zvýšili v atmosfére v dôsledku rozsiahlej industrializácie a znečisťovania životného prostredia (Fortoul et al., 1999; Wang et al., 2006). Pb akumuluje v pečeni a obličkách poľných zajačov (Kolesárová et al., 2008a; Kramárová et al., 2005; Massányi et al., 2003).

Pokrok v oblasti reprodukčnej biológie, v biotechnológiách, medicíne a poľnohospodárstve je podmienený poznatkami, ktoré sa týkajú regulátorov reprodukčných funkcií. Najvýkonnejšie regulátory dlhodobých fyziologických zmien, vrátane reprodukcie, rastu a vývinu sú hormóny a látky s nimi spojené (Kolesárová et al., 2008). Proces tvorby inzulínu-podobného rastového faktoru (IGF-I) zaznamenali Nicholson et al. (1999), Bastian et al. (2000) v periférnych tkanivách ako je pečeň, chrupka, obličky, hypofýza a v iných tkanivách, kde môže pôsobiť lokálne (autokrinný a parakrinný regulátor), alebo sa uvoľňuje do obehu (endokrinný regulátor – hormón). Oldham et al. (1999) uvádzajú, že IGF sú prítomné v krvnej plazme a v tkanivách rôznych druhov zvierat. IGF-I je produkovaný bunkami vaječníkov ošípanej (Kolesárová et al., 2008; Sirotkin et al., 2008; Budacova et al., 2001) a ľudí (Sirotkin et al., 2008b). Steroidný hormón P_4 je hlavným ovariálnym hormónom (Arnhold et al., 2009; Kolesárová et al., 2008), ktorý je popisovaný v granulóznych bunkách vaječníkov prasničiek (Kolesárová et al., 2008; Mészáros et al., 2008), v ovariálnych folikuloch ošípaných a hovädzieho dobytku (Skarzynski et al., 2008) a v žltom teliesku (Mahajan, 2008). Vplyv olova na sekrečnú činnosť ovariálnych buniek živočíchov nie sú celkom preskúmané.

Cieľom práce bolo preskúmať účasť a úlohu vybraných hormonálnych látok v granulóznych bunkách vaječníkov prasničiek po experimentálnom podaní rôznych dávok olova v podmienkach *in vitro*. Pre splnenie uvedeného cieľa sme sa v našej práci zamerali na: 1. sekrečnú schopnosť granulóznych buniek vaječníkov po aplikácii olova, 2. vplyv olova na uvoľňovanie P_4 a IGF-I ovariálnymi granulóznymi bunkami.

MATERIÁL A METODIKA

Príprava, spracovanie a kultivácia granulóznych buniek Do pokusu boli zaradené prasničky kombinovaného úžitkového až mäsového typu plemena biela ušľachtilá. Vaječníky získané pri zabíjaní zvierat sme individuálne uskladnili v termoske s fyziologickým roztokom pri izbovej teplote a spracovali maximálne do 6 hodín od zabíjania zvierat. Ovariálne granulózne bunky sme izolovali metódou aspirácie zo stredne veľkých folikulov (2–5 mm). Suspenziu granulóznych buniek sme odstreďovali (1500 ot.min⁻¹, 10 minút) za účelom oddelenia od folikulovej tekutiny s následným premývaním pomocou sterilného kultivačného média DMEM/F12 1:1 (BioWhittaker™, Verviers, Belgium) doplneného 10 % fetálnym teliacím sérom (BioWhittaker™) a antibiotikom - antimykotikom (Sigma, St. Louis, MO, USA). Pomocou hemocytometra sme počítali bunky a upravili koncentráciu buniek na potrebnú (106 buniek.ml⁻¹ média). Bunkovú suspenziu riedenú kultivačným médiom sme kultivovali (37 °C, 5 % CO₂) v kultivačných platničkách (1 ml.kultúra-1). Približne po 5-7 dňoch kultivácie, keď bunky vytvorili na 75 % súvislú monovrstvu, sme médium nahradili čerstvým s rovnakými doplnkami ako bolo pôvodné 1. bez prídania octanu olovnatého Pb(CH₃COO)₂.3H₂O (kontrola) a 2. s prídanim rôznych koncentrácií Pb(CH₃COO)₂.3H₂O (experimentálne skupiny): skupina Max (0.5 mg.ml⁻¹),

skupina A (1:1 riedenie), skupina B (1:5 riedenie), skupina C (1:7 riedenie), skupina D (1:10 riedenie) (Tab. 1). Po 18-hodinovej kultivácii sme injekčnou striekačkou odobrali médium z kultivačných platničiek a uskladnili pri teplote – 20 °C až do doby RIA analýzy.

RIA analýza

Koncentrácie IGF-I a P_4 boli stanovené metódou RIA v 25-100 µl inkubačného média. Tieto látky boli naviazané použitím RIA kitov (Immunotech SAS, Marseille Cedex, France) podľa inštrukcií výrobcu (Massányi et al., 2000; Makarevich a Sirotkin, 1999). Všetky RIA súpravy boli určené pre použitie vzoriek kultivačného média.

Štatistické analýzy

Analýzy látok v inkubačnom médiu boli vykonané duplicitne. Hodnoty týkajúce sa vplyvu rôznych dávok olova na uvoľnenie hormonálnych látok sú priemerné hodnoty získané z troch rozličných pokusov vykonaných v rozličných dňoch, použitím rozličných súborov vaječníkov získaných z 10-12 zvierat. Štatistické rozdiely medzi kontrolnou (bez pôsobenia octanu olovnatého) a pokusnými skupinami (vystavené pôsobeniu octanu olovnatého – Max, A, B, C, D) boli hodnotené t-testom alebo χ^2 -testom použitím štatistického programu Sigma Plot 9.0 (Jandel, Corte Madera, USA). Signifikantnosť rozdielov medzi kontrolnou a experimentálnymi skupinami bola určená na úrovniach $p < 0,05$.

VÝSLEDKY PRÁCE

Vplyv olova na uvoľnenie IGF-I

V súvislosti s uvoľnením IGF-I granulóznymi bunkami vaječníkov po experimentálnom podaní rôznych dávok olova boli zaznamenané preukazné rozdiely medzi kontrolnou skupinou a experimentálnymi skupinami (Tab. 2). Uvoľnenie IGF-I granulóznymi bunkami vaječníkov po experimentálnom podaní octanu olovnatého bolo v kontrolnej skupine $32,14 \pm 3,79$ ng.ml⁻¹. Podobné uvoľnenie IGF-I bolo zistené v prípade skupín Max ($32,42 \pm 7,00$ ng.ml⁻¹) a A ($32,36 \pm 6,60$ ng.ml⁻¹) s najvyššími dávkami octanu olovnatého použitého v našom experimente. Granulózne bunky všetkých ostatných skupín (B, C, D) uvoľnili nižšie koncentrácie IGF-I, ako kontrolná skupina a v prípade skupiny C ($23,92 \pm 3,13$ ng.ml⁻¹), D ($23,36 \pm 2,28$ ng.ml⁻¹) bolo zaznamenané signifikantné zníženie ($p < 0,05$) v porovnaní s kontrolnou skupinou.

Vplyv olova na uvoľnenie P_4

Po aplikácii olova sme medzi kontrolnou skupinou a experimentálnymi skupinami zaznamenali rozdiely pri uvoľňovaní P_4 (Tab. 3). Uvoľňovanie P_4 granulóznymi bunkami vaječníkov prasničiek bolo $4,04 \pm 1,35$ ng.ml⁻¹ v kontrolnej skupine bez aplikácie olova. Uvoľnenie steroidného hormónu P_4 granulóznymi bunkami všetkých experimentálnych skupín nevykazuje preukazné rozdiely v porovnaní s kontrolnou skupinou. Najvyššie množstvo uvoľneného P_4 bunkami vaječníkov bolo zaznamenané v skupine Max ($5,56 \pm 1,65$ ng.ml⁻¹) s najvyššou dávkou olova použitou v našom pokuse. Bunky vaječníkov v skupinách A ($3,88 \pm 0,81$ ng.ml⁻¹), B ($3,82 \pm 1,12$ ng.ml⁻¹), C

Tabuľka 1: Použité koncentrácie $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$

Skupina	Granulózne bunky. ml^{-1} médium	$\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	Médium (ml)	Zried'ovací pomer
kontrola	10^6	0	1	0:1
Max	10^6	1	0	1:0
A	10^6	0.5	0.5	1:1
B	10^6	0.33	0.67	1:5
C	10^6	0.17	0.83	1:7
D	10^6	0.09	0.91	1:10

Maximálna dávka (skupina Max): $0,5 \text{ mg Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O} \cdot \text{ml}^{-1}$; $0,273 \text{ mg Pb} \cdot \text{ml}^{-1}$

($3,58 \pm 0,29 \text{ ng} \cdot \text{ml}^{-1}$) a D ($3,68 \pm 0,58 \text{ ng} \cdot \text{ml}^{-1}$) uvoľnili podobné koncentrácie P_4 v porovnaní s kontrolnou skupinou.

DISKUSIA

Olovo môže vyvolať reprodukčné toxicity u myší (Shan et al., 2009; Wang et al., 2006), oviec (Bires et al., 1995) a môže mať negatívny vplyv na štruktúru a funkciu semenníkov (Massanyi et al., 2007a). Výsledky našej štúdie naznačujú priamy vplyv octanu olovnatého na sekrečnú činnosť granulóznych buniek vaječníkov ošípaných. Zistilo sa, že izolované granulózne bunky vaječníkov boli schopné prežiť v kultúre a uvoľňovať hormóny po experimentálnej aplikácii Pb. Pb sa akumulovalo v granulóznych bunkách vaječníkov prasničiek, čo je v súlade s predchádzajúcimi štúdiami v prípade granulóznych buniek vaječníkov potkanov (Nampoothiri a Gupta, 2006) a vaječníkov oviec (Bires et al., 1995).

Expozícia humánnych granulóznych buniek kadmium, ktorý je podobne rizikovým faktorom životného prostredia, boli zaznamenané morfológické zmeny v závislosti od dávky a času expozície (Paksy et al., 1997). Potvrdili sme predchádzajúce štúdie, že vplyv ťažkého kovu závisí od jeho koncentrácie. Kým $100\text{--}400 \text{ }\mu\text{M}$ Pb

nemalo žiadny vplyv na monovrstvu humánnych buniek, koncentrácia vysoká okolo $800 \text{ }\mu\text{M}$ alebo vyššia inhibovala bunkovú adhéziu a indukovala oddeľovanie buniek (Paksy et al., 2001). Aj v našom pokuse sme zaznamenali výraznú redukciu monovrstvy po pridaní Pb. Ďalšie výsledky našej práce svedčia o tom, že IGF-I bol uvoľňovaný granulóznymi bunkami vaječníkov prasničiek, čo potvrdzuje predchádzajúce správy o produkcii IGF-I bunkami vaječníkov ošípaných (Kolesárová et al., 2008), ale bez aplikácie ťažkého kovu. Naše pozorovania svedčia o vplyve olova na uvoľňovanie IGF-I granulóznymi bunkami vaječníkov prasničiek v závislosti od expozičnej dávky. Výsledky našej práce naznačujú, že aplikácia nižších koncentrácií Pb použitých v experimente, inhibuje uvoľnenie IGF-I granulóznymi bunkami vaječníkov, ale vyššie koncentrácie nemali preukazný vplyv na uvoľnenie IGF-I. Predpubertálne samičky potkanov vystavených expozícii Pb mali nižšie koncentrácie IGF-I v sére a oneskorenie puberty (Pine et al., 2006). Avšak čas nástupu puberty u myší bol výrazne ovplyvnený expozíciou olova (Iavicoli et al., 2004).

Ďalej sme zistili, že steroidný hormón P_4 bol uvoľňovaný granulóznymi bunkami vaječníkov prasničiek, čo potvrdzuje predchádzajúce štúdie o produkcii progesterónu granulóznymi bunkami vaječníkov prasničiek (Kolesárová et al., 2008; Mészáros et al., 2008). Pb môže vplývať

Tabuľka 2: Uvoľnenie IGF-I ($\text{ng} \cdot \text{ml}^{-1}$) granulóznymi bunkami po experimentálnom podaní olova

skupina	kontrola	D	C	B	A	Max
minimum	24,43	20,48	19,75	16,28	20,78	24,91
maximum	35,58	26,23	28,91	33,68	40,01	46,92
priemer	32,14	23,36*	23,92*	24,93	32,36	32,42
smerodajná odchýlka	3,79	2,28	3,13	5,28	6,60	7,00
variálny koeficient (%)	11,78	9,76	13,7	21,19	20,40	21,59

Kontrolná skupina – kultivačné médium bez octanu olovnatého. Skupina Max – kultivačné médium s octanom olovnatým v dávke $0,5 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$. Skupina A riedenie 1:1, skupina B 1:5, skupina C 1:7, skupina D 1:10. * Signifikantné rozdiely $P < 0,05$ boli hodnotené t-testom a chi-square (χ^2) testom. RIA.

Tabuľka 3: Uvoľnenie P_4 ($\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$) granulóznymi bunkami po experimentálnom podaní olova

skupina	kontrola	D	C	B	A	Max
minimum	2,49	2,94	3,13	2,70	2,92	3,28
maximum	6,53	4,80	3,95	5,66	5,16	7,79
priemer	4,04	3,68	3,58	3,82	3,88	5,56
smerodajná odchýlka	1,35	0,58	0,29	1,12	0,81	1,65
varičný koeficient (%)	33,55	15,71	8,07	29,40	20,82	29,64

Kontrolná skupina – kultivačné médium bez octanu olovnatého. Skupina Max – kultivačné médium s octanom olovnatým v dávke $0,5 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$. Skupina A riedenie 1:1, skupina B 1:5, skupina C 1:7, skupina D 1:10. Rozdiely medzi kontrolnou a experimentálnymi skupinami boli hodnotené t-testom a chi-square (χ^2) testom. RIA.

na zníženie viazania luteinizačného hormónu (LH) a folikulostimulačného hormónu (FSH), čo výrazne ovplyvní produkciu steroidov *in vitro* a môže priamo vplývať na funkcie granulóznych buniek (Priya et al., 2004). V našich experimentoch neboli zistené významné rozdiely medzi skúšanými skupinami pri uvoľňovaní steroidného hormónu P_4 granulóznymi bunkami po expozícii olovom. V ďalších záznamoch Pb priamo neovplyvňuje steroidogézu v kultivovaných granulóznych bunkách ľudí, ale v prípade dávky $1,600 \mu\text{M}$ ($331,5 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$) preukázali výrazný pokles produkcie P_4 granulóznymi bunkami (Paksy et al., 2001). V našich experimentoch najväčšie množstvo P_4 uvoľňovali bunky vaječníkov s najvyššou expozíciou Pb. Najvyššia produkcia P_4 granulóznymi bunkami vaječníkov prasničiek, po experimentálnom podaní kadmia, bola zistená v skupine s prídavkom $10 \text{ ng CdCl}_2\cdot\text{ml}^{-1}$, a keď boli dávky kadmia zvýšené na $20 \text{ ng CdCl}_2\cdot\text{ml}^{-1}$ jeho produkcia klesla (Massanyi et al., 2000).

ZÁVERY

Z pohľadu biológie a biotechnológií reprodukcie je mimoriadne dôležitý výskum endokrinných, parakrinných a autokrinných mechanizmov regulácie funkcií gonád. Údaje získané z *in vitro* štúdií naznačujú, že uvoľnenie rastového faktoru IGF-I a steroidného hormónu P_4 granulóznymi bunkami prasničiek bolo závislé od použitej dávky olova. Najnižšia koncentrácia Pb v našich štúdiách preukazne znížila uvoľňovanie IGF-I bunkami vaječníkov ošípaných. Najvyššia koncentrácia Pb použitá v našom experimente nesignifikantne stimulovala uvoľnenie P_4 granulóznymi bunkami vaječníkov prasničiek. Tieto pozorovania naznačujú možný vplyv ťažkých kovov - olova na uvoľňovanie hormonálnych látok bunkami vaječníkov ošípaných.

LITERATÚRA

ARNHOLD, I. J., LOFRANO-PORTO, A., LATRONICO, A. C. 2009. Inactivating mutations of luteinizing hormone

beta-subunit or luteinizing hormone receptor cause oligo-amenorrhea and infertility in women. In *Hormone Research*, roč. 71, 2009, s. 75-82.

BASTIAN, S. E. P. – WALTON, P. E. – BELFORD, D. A. 2000. Transport of circulating IGF-I and LR³IGF-I from blood to extracellular wound fluid sites in rats. In *Journal of Endocrinology*, roč. 164, 2000, č. 1, s. 77-86.

BENCKO, V., CIKRT, M., LENER, J. 1984. Toxické kovy v životnom a pracovnom prostredí človeka. In *Avicenum*. Praha : ZN, 1984, s. 264

BIRES, J., MARACEK, I., BARTKO, P., BIRESOVA, M., WEISSOVA, T. 1995. Accumulation of trace elements in sheep and the effects upon qualitative and quantitative ovarian changes. In *Veterinary and Human Toxicology*. roč. 37, 1995, s. 349-356.

BUDACOVA, A., SIROTKIN, A., KRAMAROVA, M., KOVACIK, J., FLORKOVICOVA, I.; SANISLO, P., 2001. Changes in function and responses of porcine ovarian granulosa cells during sexual maturation. In *Reproduction Abstract Series*, roč. 27, 2001, s. 14.

FORTOUL, T. I., SALGADO, C. R., MONCADA, S. G., SANCHEZ, I. G., LOPEZ, I. E., ESPEJEL, G., 1999. Ultrastructural findings in the murine nonciliated bronchiolar cells (NCBC) after subacute inhalation of lead acetate. In *Acta Veterinaria Brno*, roč. 68, 1999, s. 51–55.

HEGEDÜSOVÁ, A. 1998. Ťažké kovy (Cd, Pb, Hg) v pôdach v oblasti južného Slovenska a hygienická nezávadnosť pestovaných druhov zeleniny. In DDP, Nitra : SPU, 1998, s. 61.

CHRASTNÝ, V., KOMÁREK, M., HÁJEK, T., 2009. Lead contamination of an agricultural soil in the vicinity of a shooting range. *Environmental Monitoring and Assessment* Feb 20 [Epub ahead of print].

KOLESÁROVÁ, A., SIROTKIN, A., KOVÁČIK, J. 2008. Endokrinné a vnútrobunkové mechanizmy pohlavného dospievania prasničiek. Vedecká monografia. Nitra : SPU, 131 s. ISBN 978-80-552-0109-2.

KOLESAROVA, A., SLAMECKA, J., JURCIK, R., TATARUCH, F., LUKAC, N., KOVACIK, J., CAPCAROVA, M., VALENT, M., MASSANYI, P. 2008a. Environmental levels of cadmium, lead and mercury in brown hares and their relation to blood metabolic parameters. In

Journal of environmental science and health, Part A Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering, roč. 43, 2008, s. 646-650.

KRAMÁROVÁ, M., MASSÁNYI, P., SLAMECKA, J., TATARUCH, F., JANCOVÁ, A., GASPARIK, J., FABIS, M., KOVACIK, J., TOMAN, R., GALOVÁ, J., JURCIK, R. 2005. Distribution of cadmium and lead in liver and kidney of some wild animals in Slovakia. In *Journal of environmental science and health, Part A Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering*, roč. 40, 2005, s. 593-600.

MAHAJAN, D. K., 2008. Pig Model to Study Dynamics of Steroids During Ovarian Follicular Growth and Maturation. In *Sourcebook of Models for Biomedical Research*, Humana Press, s. 425-436. ISBN 978-1-58829-933-8.

MAKAREVICH, A. V., SIROTKIN, A. V., 1999. Development of sensitive radioimmunoassay for IGF-I determination in samples from blood plasma and cell-conditioned medium. In *Veterinary Medicine*, roč. 44, 1999, s. 71-78.

MASSANYI, P., LUKAC, N., MAKAREVICH, A.V., CHRENEK, P., FORGACS, Z., ZAKRZEWSKI, M., STAWARZ, R., TOMAN, R., LAZOR, P., FLESAROVA, S. 2007a. Lead-induced alterations in rat kidneys and testes in vivo. In *Journal of environmental science and health, Part A Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering*, roč. 42, 2007a, s. 671-676.

MASSANYI, P., TATARUCH, F., SLAMECKA, J., TOMAN, R., JURCIK, R. 2003. Accumulation of lead, cadmium, and mercury in liver and kidney of the brown hare (*Lepus europaeus*) in relation to the season, age, and sex in the west Slovakian lowland. In *Journal of Environmental Science and Health Part. A*, roč. 38, 2003, s. 1299-1309.

MASSANY, P., UHRIN, V., SIROTKIN, A., PAKSY, K., FORGACS, ZS., TOMAN, R., KOVACIK, J. 2000. Effect of Cadmium on Ultrastructure and Steroidogenesis in Cultured Porcine Ovarian Granulosa cells. In *Acta Veterinaria Brno*, roč. 69, 2000, s. 101-106.

MÉSZÁROSOVÁ, M., SIROTKIN, A.V., GROSSMANN, R., DARLAK, K., VALENZUELA, F. 2008. The effect of obestatin on porcine ovarian granulosa cells. In *Animal Reproduction Science*, roč. 108, 2008, s. 196-207.

NAMPOOTHIRI, L. P., GUPTA, S. 2006. Simultaneous effect of lead and cadmium on granulosa cells: a cellular model for ovarian toxicity. In *Reproductive Toxicology*, roč. 21, 2006, s. 179-185.

NICHOLSON, W. E., GE, Z., PLOTNER, D. M., FARIN, C. E., GADSBY, J. E. 1999. Insulin-like growth factor (IGF)-I, IGF-I receptor, and IGF binding protein- 3 messenger ribonucleic acids and protein in corpora lutea from prostaglandin F (2lpha)-treated gilts. In *Biology of Reproduction*, roč. 61, 1999, č. 6, s. 1527-1534.

OLDHAM, J.M., MARTYN, J.A.K., HUA, K. M., McDONALD, N. A., HODGKINSON, S. C., BASS, J. J. 1999. Nutritional regulation of IGF-II, but not IGF-I, is age dependent in sheep. In *Journal of Endocrinology*, roč. 163, 1999, s. 395-402.

PAKSY, K., GÁTI, I., NÁRAY, M., RAJCZY, K. 2001. Lead accumulation in human ovarian follicular fluid, and in vitro effect of lead on progesterone production by cultured human ovarian granulosa cells. In *Journal of Toxicology and Environmental Health Part A*, roč. 62, 2001, s. 359-366.

PAKSY, K., RAJCZY, K., FORGÁCS, Z., LÁZÁR, P., BERNARD, A., GÁTI, I., KAÁLI, G. S. 1997. Effect of cadmium on morphology and steroidogenesis of cultured human ovarian granulosa cells. In *Journal of Applied Toxicology*, roč. 17, 1997, s. 321-327.

PINE, M. D., HINEY, J. K., DEARTH, R. K., BRATTON, G. R., DEES, W. L. 2006. IGF-1 administration to prepubertal female rats can overcome delayed puberty caused by maternal Pb exposure. In *Reproductive Toxicology*, roč. 21, 2006, s. 104-109.

POLÁČEK, Š., KULICH, J., TOMÁŠ, J., VOLLMANOVÁ, A. 2003. Anorganická chémia. Nitra : SPU, 2003, 410 s. ISBN 80-8069-137-1

SHAN, G., TANG, T., ZHANG, X. 2009. The protective effect of ascorbic acid and thiamine supplementation against damage caused by lead in the testes of mice. In *Journal of Huazhong University of Science and Technology Medical Sciences*, roč. 29, 2009, s. 68-72.

SIROTKIN, A.V., BENCO, A., TANDLMAJEROVA, A., VASÍČEK, D., KOTWICA, J., DARLAK, K., VALENZUELA, F. 2008a. Transcription factor p53 can regulate proliferation, apoptosis and secretory activity of luteinizing porcine ovarian granulosa cell cultured with and without ghrelin and FSH. In *Reproduction*, roč. 136, 2008a, s. 611-618.

SIROTKIN, A. V., MLYNCEK, M., MAKAREVICH, A. V., FLORKOVICOVÁ, I., HETÉNYI, L. 2008b. Leptin affects proliferation-, apoptosis- and protein kinase A-related peptides in human ovarian granulosa cells. In *Physiological Research*, vol. 57, 2008b, p. 437-442.

SKARZYNSKI, D. J., SIEMIENIUCH, M. J., PILAWSKI, W., WOCLAWEK POTOCKA, I., BAH, M. M., MAJEWSKA, M., JAROSZEWSKI, J. J. 2008. In Vitro Assessment of Progesterone and Prostaglandin E(2) Production by the Corpus Luteum in Cattle Following Pharmacological Synchronization of Estrus. In *The Journal of Reproduction and Development*, roč. 55, 2008, s. 170-176.

SVOBODOVÁ, Z. et al. 1987. Toxikologie vodných živočíchů. Praha : SZN, 1987, 231 s.

WANG, C., ZHANG, Y., LIANG, J., SHAN, G., WANG, Y., SHI, Q. 2006. Impact of ascorbic acid and thiamine supplementation at different concentrations on lead toxicity in testis. In *Clinica Chimica Acta*, roč. 370, 2006, s. 82-88.

ZHUANG, P., ZOU, B., LI, N. Y., LI, Z. A. 2009. Heavy metal contamination in soils and food crops around Dabaoshan mine in Guangdong, China: implication for human health. *Environmental Geochemistry and Health* Feb 13 [Epub ahead of print].

Pod'akovanie

Práca bola financovaná VEGA grantom 1/0696/08 a APVV projektom 0299-06.

Kontaktná adresa: Ing. Adriana Kolesárová, PhD., Katedra fyziológie živočíchov, Fakulta biotechnológie a potravinárstva, Slovenská poľnohospodárska univerzita, 949 76 Nitra, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, tel: +421 37 641 4343, E-mail: adriana.kolesarova@yahoo.com

SLEDOVANIE RIZIKOVÝCH CHEMICKÝCH PRVKOV U KAČÍC DIVÝCH (*ANAS PLATYNRHYNCHOS*)

OBSERVATION OF RISK CHEMICAL ELEMENTS IN MALLARDS (*ANAS PLATYNRHYNCHOS*)

Beáta Koréneková, Magdaléna Skalická, Ivona
Kožárová, Ján Mačanga, Marián Korének

ABSTRAKT

The aim of the study was to determine the risk chemical elements in livers, breast and leg muscles of mallards (*Anas platynrhyngchos*). The mallards were hunted in defined locality in Easter Slovakia. Contents of cadmium (Cd), lead (Pb), nickel (Ni), copper (Cu) and zinc (Zn) were determined by atomic absorption spectrometry and expressed in mg.kg^{-1} wet weight. The highest mean levels of Cd, Pb and Cu (0.044; 0.232; 2.220) were recorded in liver of mallards. On the other hand, the highest mean levels of Ni and Zn (0.417; 212.650) were noticed in leg and breast muscles. Higher content of Pb and Ni in leg than breast muscles should be affected due to used shots. The minimal differences were observed between the content of Cd, Zn and Cu in leg and breast muscle and may be related to habitat specificity.

Keywords: mallards, cadmium, lead, nickel, copper, zinc

ÚVOD

Kačica divá (*Anas platynrhyngchos*) patrí k radu zúbkozobcov (*Anseriformes*) a k čeľadi kačicovitých. Priraduje sa medzi poľovnú pernatú zver. Mäso kačice divej svojím zložením je hodnotný dietetický doplnok vo výžive ľudí (Haščík et al., 2007). Životným prostredím kačice divej sú stojaté vody na močiaroch a vodných nádržiach, ale žije aj na tečúcich vodách, kde si vyhľadáva tichšie zátočiny.

Prítomnosť xenobiôtík v tkanivách voľne žijúcich zvierat môže byť znakom environmentálneho zaťaženia danými zložkami (Kramárová et al., 2005, Kimáková, 2008). Veľký počet druhov vodného vtáctva sú považované dnes ako vhodné bioindikátory zaťaženia životného prostredia ťažkými kovmi (Cohen et al., 2000, Congiu et al., 2000). Negatívny účinok ťažkých kovov je obzvlášť nebezpečný pre vtáctvo, ktorého metabolizmus je oveľa rýchlejší v porovnaní s inými druhmi zvierat. Sú tak preto vo väčšej miere exponované kumulatívnymi kovmi v ich organizme (Almášiová et al., 2008, Felsman, 1998).

Výber kačice divej ako objektu ekologických štúdií je spojený s viacerými faktormi. Kačica divá je dobrý bioindikátor kontaminácie prostredia rizikovými prvkami. Tento druh vtákov je kozmopolitný. Bežne sa vyskytuje v Európe, Ázii, Severnej Amerike, Novom Zélande aj v Austrálii. Cieľom práce bolo zistiť obsah vybraných rizikových chemických prvkov v prsnej svalovine,

stehennej svalovine a v pečeni kačíc divých na východnom Slovensku.

MATERIÁL A METODIKA

Voľne žijúce divé kačice boli získané odstrelom z poľovného revíru v oblasti Lemešany na východnom Slovensku. Vzorky prsnej svaloviny (6), stehennej svaloviny (6) a pečeni (6) boli mineralizované použitím mikrovlnného systému Milestone (MLS-1 200, MEGA) a analyzované na prítomnosť vybraných chemických prvkov použitím atómového absorpčného spektrofotometra (Unicam Solar, 939). Kadmium, olovo a nikel boli analyzované použitím grafitovej kyvety, kým meď a zinok na plameni (Kocourek et al., 1992). Opakovateľnosť metódy bola testovaná analýzou referenčného materiálu - hovädzia lyofylizovaná pečeň (MBH Anal Ltd., England) a bola zistená 96–98%. Reprodukovateľnosť metódy bola lepšia ako 1.0%. Koncentrácie chemických prvkov v práci je udávaná v mg.kg^{-1} pôvodnej živej hmotnosti.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

V Tabuľke 1 uvádzame nami zistený výskyt vybraných chemických prvkov v stehennej svalovine, prsnej svalovine a v pečeni kačíc divých.

Najvyšší priemerný obsah kadmia bol zaznamenaný v pečeni kačíc ($0,044 \text{ mg.kg}^{-1} \text{ ž.h.}$), pričom maximálna dosiahnutá hodnota kadmia bola $0,102 \text{ mg.kg}^{-1} \text{ ž.h.}$ Mierne zvýšený obsah kadmia bol pozorovaný v prsnej svalovine v porovnaní so stehennou svalovinou. Tieto výsledky sú v súlade s prácou (Toman et al., 2005), ktorí zaznamenali u bažantov patriacich medzi poľovnú pernatú zver v pečeni priemernú koncentráciu kadmia $0,040 \text{ mg.kg}^{-1} \text{ ž.h.}$ Na druhej strane Szymczyk a Zalewski, (2003) uvádzajú z oblasti Warmia a Mazuri v Poľsku vyššie priemerné hodnoty kadmia v pečeni ($0,139 \text{ mg.kg}^{-1} \text{ ž.h.}$). V prsnej svalovine kačíc pozorovali vyššie koncentrácie kadmia ($0,082 \text{ mg.kg}^{-1} \text{ ž.h.}$) než aké boli zaznamenané v našom prípade ($0,024 \text{ mg.kg}^{-1} \text{ ž.h.}$).

Priemerný obsah olova bol výrazne vyšší v stehennej svalovine ($0,161 \text{ mg.kg}^{-1} \text{ ž.h.}$) než prsnej svalovine ($0,054 \text{ mg.kg}^{-1} \text{ ž.h.}$) s dosiahnutým maximom ($0,650 \text{ mg.kg}^{-1} \text{ ž.h.}$), pričom v pečeni bol pozorovaný najvyšší obsah olova. Naše výsledky boli v prípade analýz pečene ($0,232 \text{ mg.kg}^{-1} \text{ ž.h.}$) v súlade s prácou Szymczyk a Zalewski, (2003), ktorí zaznamenali podobné koncentrácie olova v pečeni ($0,225 \text{ mg.kg}^{-1} \text{ ž.h.}$) kým v prsnej svalovine mierne vyššie koncentrácie olova ($0,122 \text{ mg.kg}^{-1} \text{ ž.h.}$). Podobné priemerné výsledky kadmia v pečeni ($0,2 \text{ mg.kg}^{-1} \text{ ž.h.}$) boli zaznamenané u vodného vtáctva aj Fabczakom et al., (1998).

V prípade niklu bol výrazne vyšší priemerný obsah zaznamenaný v stehennej svalovine ($0,417 \text{ mg.kg}^{-1} \text{ ž.h.}$) s dosiahnutým maximom ($0,697 \text{ mg.kg}^{-1} \text{ ž.h.}$) než v prsnej svalovine a v pečeni. Podobne Kalisinska et al., (2004) vo svojej štúdií zaznamenala v severozápadnej oblasti Poľska najvyššie koncentrácie niklu v svalovine kačíc divých ($0,09 \text{ } \mu\text{g/g} \text{ ž.h.}$), kým v pečeni a v obličkách ($0,054$; $0,051 \text{ } \mu\text{g/g} \text{ ž.h.}$) pozorovali mierne nižšie hladiny niklu. Koréneková et al., (2008) pri porovnávaní

koncentrácie kadmia, olova a niklu u strelených a klasicky zabíjaných bažantov zistili vyššie koncentrácie olova a niklu v svalovine než v pečeni strelených bažantov, kým v koncentráciách kadmia boli pozorované minimálne rozdiely medzi strelenými a zabíjanými bažantmi.

Zinok podobne ako meď je esenciálny prvok pre organizmus zvierat avšak môže byť aj škodlivý pri vysokých koncentráciách v dôsledku priemyselného znečistenia životného prostredia (Turkoglu et al., 2004). Hladiny zinku zistené v nami pozorovaných orgánoch mali pomerne vyrovnanú tendenciu a boli mierne zvýšené v prsnej svalovine než v stehennej svalovine a v pečeni.

Tabuľka 1. Koncentrácie Cd, Pb, Ni, Zn a Cu (v mg.kg⁻¹) stehennej svaloviny, prsnej svaloviny a v pečeni kačíc divých (*Anas platyrhynchos*)

Chemický prvok	Štatistické údaje	Stehenná svalovina	Prsná svalovina	Pečeň
Kadmium	N	6	6	6
	X	0,009	0,024	0,044
	Sd	0,003	0,035	0,032
	X max	0,014	0,094	0,102
Olovo	N	6	6	6
	X	0,161	0,054	0,232
	Sd	0,242	0,179	0,082
	X max	0,650	0,036	0,306
Nikel	N	6	6	6
	X	0,417	0,220	0,252
	Sd	0,271	0,228	0,207
	X max	0,697	0,518	0,480
Zinok	N	6	6	6
	X	196,180	212,650	195,150
	Sd	59,250	110,960	64,360
	X max	287,300	391,900	297,100
Meď	N	6	6	6
	X	15,030	14,530	42,220
	Sd	2,140	4,540	4,900
	X max	18,800	20,100	48,500

N= počet vyšetrených vzoriek, X= aritmetický premer, Sd = smerodajná odchýlka, X max = maximálna nameraná hodnota

Zo všetkých telových orgánov a tkanív pečeň predstavuje orgán s najvyššou koncentráciou medi, pričom sú zaznamenané rozdiely v koncentrácii chemických prvkov aj u topograficky a funkčne rozličných tkanív zvierat (Massanyi et al., 2002). To sa potvrdilo aj našimi výsledkami, ktoré poukazujú na najvyššiu kumuláciu medi v pečeni kačíc (42,220 mg.kg⁻¹ ž.h.). Priemerné hladiny medi boli mierne vyššie v stehennej než prsnej svalovine (15,030; 14,530 mg.kg⁻¹ ž.h.). Výsledky sme porovnávali s prácou Danczak et al., (1997), ktorí uvádzajú nasledovné priemerné hladiny medi v prsnej, stehennej svalovine a v pečeni (29,700; 18,600; 15,500 mg.kg⁻¹ ž.h.) v oblasti Gdanska. Naše výsledky sú výrazne vyššie v prípade pečeni kačíc divých, kým v prípade svalovín neboli nami zaznamenané až tak výrazné rozdiely v porovnaní s uvedenými autormi.

ZÁVER

Z výsledkov vyplýva, že najvyššie priemerné hladiny kadmia, olova a medi boli pozorované v pečeni kým v prípade niklu v stehennej svalovine a zinku v prsnej svalovine kačiek divých. Minimálne rozdiely boli pozorované medzi obsahom kadmia, zinku a medi v stehennej a prsnej svalovine. V prípade olova a niklu boli pozorované vyššie koncentrácie v stehennej než prsnej svalovine. Zistené hladiny chemických prvkov odrážajú jednak úroveň expozície sledovanej oblasti kovmi, ale mohli byť spôsobené aj usmrtením zvierat formou odstrelu, ktorý ovplyvnil úroveň koncentrácie vybraných chemických prvkov - kontaminantov v sledovaných tkanivách.

LITERATÚRA

- ALMÁŠIOVÁ, V., CIGÁNKOVÁ, V., HOLOVSKÁ, K., LENHARDT, L., ŠKROBÁNEK, P., MASSANYI, P., ZIBRÍN, M., 2008. Effect of hypodynamy on structure and alkaline phosphatase activity of kidney in japanese quails, *Acta Vet. Brno*, roč. 3, s. 313–320.
- DANCZAK, A., LIGOCKI, M., KALISINSKA, E., 1997. Heavy metals in the organs of Anseriform birds. In *Pol. J. Env. Stud.* roč. 5, s. 39.
- FABCZAK, J., SZAREK, J., MARKIEWICZ, J., 1998. The lead level in liver of cormorants from North – Easter Poland from 1995-1996, Lead in the environment – ecological and methodical problems. In *Zesz. Nauk. Kom.* roč. 21, s. 325.
- FELSMAN, M. Z., 1998. The level of chosen xenobiotics and morfological changes of internal organs in mallards (*Anas Platyrhynchos*) and coots (*Fulica atra* L.). Doctor thesis, ART, s. 100.
- HAŠČÍK, P., GAŠPARÍK, J., ČUBOŇ, J., VLADÁROVÁ, D., KULÍŠEK, V., KAČÁNIOVÁ, M., BOBKO, M., 2007. Mäso kačice divej (*Anas Platyrhynchos*) ako doplnok vo výžive ľudí, In *VII Rizikové faktory potravinového reťazca*, 11.10.2007, Nitra, s. 74-75. ISBN 978-80-8069-948-2.
- KALISINSKA, E., SALICKI, W., MYSLEK, P., KAVETSKA, K. M., JACKOWSI, A., 2004. Using the Mallard to biomonitor heavy metal contamination of wetlands in north –western Poland, In *Sci. Tot. Environ.*, roč. 320, s. 145-161.
- KIMÁKOVÁ, T., 2008. Niektoré informácie k výskytu ortuti na Slovensku, In *Medicínsky monitor*, roč. 4, 2008, s. 8-15.
- KOCOUREK, V., 1992. Metódy analýzy cudzorodých látok v potravinách, In *Laboratórna príručka*, Praha, s. 110.
- KORÉNEKOVÁ, B., SKALICKÁ, M., KOŽÁROVÁ, I., NAGY, J., MÁTÉ, D., NAĐ, P., 2008. Comparison of cadmium, lead and nickel accumulation in liver, breast and leg muscles of shot and killed pheasants, In *Slov. J. Anim. Sci.*, roč. 41, 2008, č.4, s.184-186.
- KRAMÁROVÁ, M., MASSANYI, P., SLAMEČKA, J., TATARUCH, F., JANCOVÁ, A., GAŠPARÍK, J., FABIS, M., KOVÁČIK, J., TOMAN, R., GALOVÁ, J., JURČÍK, 2005. Distribution of cadmium and lead in liver of some wild animals in Slovakia. In *J. Environ. Sci. Health A.*, roč. 40, 2005, 593-600.

MASSÁNYI, P., TOMAN, R., NAĎ, P.: Koncentrácia kadmia, olova, niklu, medi a zinku v topograficky a funkčne rozličných svaloch oviec. In: Infonet, roč. 9, 2002, č. 5, s. 32-33.

SZYMCZYK, K., ZALEWSKI, K., 2003. Copper, zinc, lead and cadmium content in liver and muscles of Mallards (*Anas Platyrhynchos*) and other hunting fowl species in Warmia and Mazury in 1999-2000. In *Pol. J. Env. Stud.*, roč. 12, 2003, s. 381-386.

TOMAN, R., MASSÁNYI, P., LUKÁČ, N., DUCSAY, L., GOLIAN, J., 2005. Fertility and content of cadmium on pheasant (*Phasianus colchicus*) following cadmium intake in drinking water. In *Ecotox. Environ. Saf.*, roč. 62, 2005, s. 112-117.

TURKOGLU, O., SARACOGLU, S., SOYLAK, M., ELCI, L., 2004. Monitoring copper, nickel, cobalt, lead cadmium, manganese and chromium levels in house dust samples from Kayseri, Turkey. In *Trace Elem. Electro.*, roč. 21, 2004, s.4-9.

COHEN J. B. BARCLAY J. S., MAJOR, A. J., FISHER, J.P., 2000. Wintering greater scup as biomonitors of metal contamination in Federal Wildlife Refuges in the Long Island region. *Arch. Environ. In Contam. Toxicol.*, roč. 38, 2000, 83-92.

CONGIU, L., CHICCA, M., PILASTRO, A., TURCHETTO, M., TALLANDINI, L., 2000. Effects of chronic dietary cadmium on hepatic glutathione levels and glutathione peroxidase activity in starlings (*Sturnus vulgaris*). In *Arch. Env. Contam. Toxicol.*, roč. 38, 2000, 357-361

Podakovanie: Spracovanie príspevku bolo podporené projektom: VEGA 1/0403/08.

Kontaktná adresa:

MVDr. Beáta Korénková, PhD., Univerzita Veterinárskeho Lekárstva v Košiciach, Katedra hygieny a technológie potravín, Komenského 73, Košice, Tel.: +421 915 986 732, E-mail: korenekova@uvm.sk,

COMPARISON OF MAJOR MILK COMPONENTS IN DAIRY COWS' MILK FROM MORNING AND EVENING MILKING

Lenka Kouřimská, Zuzana Pacáková, Veronika Legarová, Luboš Babička, Jozef Golian

ABSTRACT

Seventy samples of morning and evening cow milk from Holstein cows were taken to monitor the fat, proteins, casein and lactose content. The samples were analysed by MilkoScan FT 120 and statistically processed. There was a statistically significant difference between the morning and evening casein content (probability level $p = 0.047$), with a higher casein content in the evening samples than in the morning samples. Fat content and lactose content were also higher in evening samples than in morning samples for 68% of sample pairs. The test results were close to statistical significance ($p_{\text{fat}} = 0.065$, $p_{\text{lactose}} = 0.073$). A strong correlation between protein and casein content was found for evening and morning milk (protein: $r = 0.96$, $p < 0.01$, casein: $r = 0.98$, $p < 0.01$).

Keywords: cow milk, morning and evening milking, fat, protein, casein, lactose

INTRODUCTION

There are many feed, animal and environmental factors that may influence milk production (Bíro *et al.*, 1992), milk composition, its quality and technological properties (Perdrix *et al.*, 1996; Jensen, 2002; Palmquist *et al.*, 1993; Hanuš *et al.*, 1995). Breed (Pösö and Miintysaari, 1996; Windig *et al.*, 2006), calving interval, feeding and nutrition (Hanus *et al.*, 2004; Rosati and Aumaitre, 2004; Donovan *et al.*, 2000), housing conditions (Thomassen and Boer De, 2005), milking interval,

milking system and equipment, cow's age and health (Bareille *et al.*, 2003; Fourichon *et al.*, 1999), season, human factors, hygiene of milking and milk processing are among the most important ones.

Breed is one of the main factors affecting fat content (Pechová *et al.*, 2000); the milk of Jersey and Guernsey cows having the highest fat content. Fat content is the most variable milk component (Klopčič *et al.*, 2003). Teplý *et al.* (1979) determined the variability of milk yield (± 1.10 kg), fat content ($\pm 0.75\%$) and protein content ($\pm 0.20\%$) within a day under stable herd conditions.

Wiking *et al.* (2006), Dahl *et al.* (2004), Ayadi *et al.* (2003) and Hargrove (1994) studied the impact of milking frequency on the milk yield and milk composition. Increasing milking frequency increased the milk yield, but fat content and fat yield were not affected. Lower milk yield and higher milk fat and milk protein concentrations were found in milk samples of once-daily milked cows, in comparison with thrice-daily milked cows (Patton *et al.*, 2006; Remond *et al.*, 2004).

Protein and particularly casein content in milk is an important factor in cheesemaking. It may be affected by feed and nutrition and increases at the end of the lactation period (Damodaran, 2007). Auldist *et al.* (1998) and Ikonen *et al.* (2004) found a negative correlation between milk production and protein content during lactation. By Nielsen *et al.* (2005) protein content was not affected by the milking interval.

The lactose content in milk correlates closely with the health of the particular cow (Damodaran, 2007; Hanuš *et al.*, 1992) and decreases with lactation period. Feed composition and nutrition has less effect on lactose content. Nielsen *et al.* (2005) studied the effect of the milking interval on lactose content and found a higher lactose content in the first collected milk when the milking interval was 12 h than when it was 6 h.

Ayadi *et al.* (2004) studied the differences between cisternal and alveolar milk composition. The fat content in cisternal milk decreased with the milking interval and reached its minimum with a 24 h milking interval. Total

Table 1: Statistical description of the data in % (wt/wt)

	Mean	Median	Minimum	Maximum	Percentiles	
					25	75
FE % (wt/wt)	4.37	4.32	3.47	6.00	3.87	4.88
FM % (wt/wt)	4.11	3.84	3.22	5.93	3.67	4.31
PE % (wt/wt)	3.47	3.41	2.67	4.72	3.21	3.56
PM % (wt/wt)	3.44	3.31	2.62	4.56	3.20	3.53
CE % (wt/wt)	2.82	2.82	2.30	3.65	2.60	2.90
CM % (wt/wt)	2.78	2.75	2.21	3.58	2.60	2.86
LE % (wt/wt)	4.61	4.64	4.18	4.93	4.51	4.74
LM % (wt/wt)	4.57	4.64	3.98	4.81	4.46	4.70

FE = fat content in evening samples; FM = fat content in morning samples;
PE = protein content in evening samples; PM = protein content in morning samples;
CE = casein content in evening samples; CM = casein content in morning samples;
LE = lactose content in evening samples; LM = lactose content in morning samples

Table 2: Difference (Dif) between morning and evening milking time in % (wt/wt)

	Mean	Median	Minimum	Maximum
Dif FE-FM	0.26	0.25	-1.58	1.55
Dif PE-PM	0.02	0.03	-0.20	0.34
Dif CE-CM	0.04	0.06	-0.18	0.18
Dif LE-LM	0.04	0.03	-0.28	0.29

fat yield tended to increase for cisternal milk with long milking intervals, but it increased markedly for alveolar milk, showing that fat globules did not pass freely from the alveoli to the cistern between milkings. Milk protein content increased in the cisternal milk and tended to increase in the alveolar milk with longer milking intervals, but the values were similar in cisternal and alveolar fractions. Total protein yield increased with milking interval in both fractions, indicating that casein micelles passed from the alveoli to the cisternal compartment more freely than fat globules. The short-term effects of milking interval on milk composition were explained by the changes observed in alveolar and cisternal milk ratio.

The aim of this study was to find out if statistically significant differences between evening and morning samples of dairy cows milk could be evaluated. We wanted to know if the time of milking is a significant factor influencing the major milk constituents in individual milk samples.

MATERIAL AND METHODS

Individual milk samples of Holstein dairy cows were taken from the dairy farm located in the Central Bohemia during the evening and the following morning milking. The cows were kept in the box stable and they were fed by the same feed ration. The animals were without clinical symptoms. The milking interval was 12 ± 15 min. The samples were from 10 dairy cows on 1st lactation period from 100 to 200 DIM and were collected every day within two weeks in October 2007. Samples were immediately cooled to 6 – 8 °C, stored in insulated containers and transported to the laboratory, where they were analysed the same day. Samples were heated to 40 °C in a water bath before analysis.

Fat, protein, casein and lactose contents were analysed with a MilkoScan FT 120 (Foss Electric, Denmark) instrument. The apparatus was calibrated by an external accredited laboratory.

Since the experimental data were not normally distributed, nonparametric methods were used: morning and evening parameters were compared using Wilcoxon Signed Ranks Test for two related samples. The data description was made using median and interquartile ranges. A probability level of $p < 0.05$ was considered statistically significant. The results were computed using the statistical software SPSS 15.0 for Windows.

RESULTS AND DISCUSSION

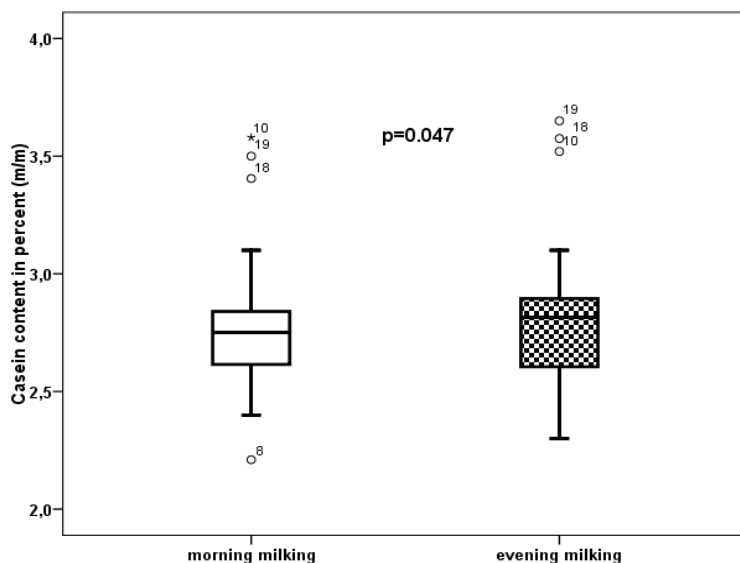
Statistical description of the results in percentage by weight (wt/wt) is given in Table 1. The differences between evening and morning samples are shown in Table 2. The biggest median difference was in the fat content (0.25). Sixty eight per cent of sample pairs had a higher fat content in the evening samples compared with 32% of the samples with a higher fat content in the morning samples. Median difference in the protein content was 0.03% (wt/wt). Fifty six per cent of sample pairs had a higher protein content in the evening samples compared with 44% of the samples with a higher protein content in the morning samples. Median difference in the casein content was 0.06% (wt/wt). Sixty per cent of sample pairs had a higher casein content in the evening samples compared with 36% of the samples with a higher casein content in the morning samples. Four per cent of the samples had similar casein contents in evening and morning samples. Median difference in the lactose content was 0.03% (wt/wt). Sixty eight per cent of samples had a higher lactose content in the evening samples comparing to 32% of the samples with a higher lactose content in the morning samples.

Wilcoxon signed ranks test was used to evaluate the significance of the differences between the evening and the morning samples. Statistically significant differences (a higher content in the evening samples) was found only for casein content ($p = 0.047$) (Fig. 1). The p-values were very close to but exceeded 0.05 in case of fat ($p = 0.065$) and lactose ($p = 0.073$). In case of proteins the p-value was 0.419. These results are in agreement with the observation of Gilbert *et al.* (1973), Hargrove (1994) and Klopčič *et al.* (2003). They found a higher fat content in the evening samples comparing to the morning samples, but not statistically significant. On the contrary Lee and Wardrop (1984) found the morning fat production slightly higher comparing to the evening samples.

The correlation between the components was studied as well by Spearman correlation coefficient. A statistically strong correlation was found between protein content and the casein content ($p < 0.05$, $r = 0.96$), which confirms the stable casein to whey proteins ratio in milk (Damodaran, 2007).

CONCLUSIONS

Figure 1: Comparison of casein content in morning and evening milk samples in % (wt/wt)



The observations evaluated the differences between evening and morning samples of cows' milk but they were mostly not statistically significant. The only statistically significant difference (with a higher content in the evening samples) was found for casein content ($p = 0.047$). This difference between evening and morning milk samples could be taken into account when individual milk samples are taken and when milk for cheesemaking production is collected and its casein content and related cheese yield are calculated.

REFERENCES

- AULDIST, M. J., WALSH, B. J., THOMSON, N. A. 1998. Seasonal and lactational influences on bovine milk composition in New Zealand. *J. Dairy Res.*, 65, 401–411.
- AYADI, M., CAJA, G., SUCH, X., KNIGHT, CH. 2003. Effect of omitting one milking weekly on lactation performances and morphological udder changes in dairy cows. *J. Dairy Sci.*, 86, 2352–2358.
- AYADI, M., CAJA, G., SUCH, X., ROVAI, M., ALBANELL, E. 2004. Effect of different milking intervals on the composition of cisternal and alveolar milk in dairy cows. *J. Dairy Res.*, 71, 304–310.
- BAREILLE, N., BEAUDEAU, F., BILLON, S., ROBERT, A., FAVERDIN, P. 2003. Effects of health disorders on feed intake and milk production in dairy cows. *Livest. Prod. Sci.* 83, 53–62.
- BÍRO, D., LABUDA, J., CABADAJOVÁ, M. 1992. Factors influencing cow milk production and fat to protein content ratio. [in Czech]. *Živoč. Vyr.*, 37, 521–528.
- DAHL, G. E., WALLACE, R. L., SHANKS, R.D., LUEKING, D. 2004. Hot topic: Effects of frequent milking in early lactation on milk yield and udder health. *J. Dairy. Sci.*, 87, 882–885.
- DAMODARAN, S., PARKIN, K.L., FENNEMA, O.R. 2007. *Fennema's Food Chemistry*. CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, London, New York, 1160 pp.
- DONOVAN, D. C., SCHINGOETHE, D. J., BAER, R. J., RYALI, J., HIPPEL, A. R., FRANKLIN, S. T. 2000. Influence of dietary fish oil on conjugated linoleic acid and other fatty acids in milk fat from lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.*, 83, 2620–2628.
- FOURICHON, C., SEEGER, H., BAREILLE, N., BEAUDEAU, F. 1999. Effects of disease on milk production in the dairy cow: a review. *Prev. Vet. Med.*, 41, 1–35.
- GILBERT, G. R., HARGROVE, G. L., KROGER, M. 1973. Diurnal-variations in milk yield, fat yield, milk-fat percentage, and milk protein percentage of Holstein-Friesian cows. *J. Dairy Sci.*, 56, 409–410.
- HANUŠ, O., ŽVÁČKOVÁ, I., GENČUROVÁ, V., GABRIEL, B. 1992. A relationship between milk lactose content and indicators of the mammary gland health in the first third of lactation. *Vet. Med.*, 37, 595–604.
- HANUŠ, O., GAJDŮŠEK, S., BEBER, K., FICNAR, J., JEDELSKÁ, R. 1995. Composition and technological properties of milk from dairy cows in the middle stage of lactation and their interrelationship. [in Czech]. *Živoč. Vyr.*, 40, 556–561.
- HANUŠ, O., VANĚK, D., FRELICH, J., POZDÍŠEK, J., BJELKA, M., VORLÍČEK, Z., ROUBAL, P., VYLETĚLOVÁ, M. 2004. The effects of later summer pasture on production, quality, composition and technological properties of raw cow's milk in model herd in the Czech Republic. [in Czech]. *Bulletin VÚCHS Rapotín, Výzkum chovu skotu*, 3, 5–19.
- HARGROVE, G. L. 1994. Bias in composite milk samples with unequal milking intervals. *J. Dairy Sci.*, 77, 1917–1921.
- IKONEN, T., MORRI, S., TYRISEVÄ, A.-M., ROUTTINEN, O., OJALA, M. 2004. Genetic and phenotypic correlations between milk coagulation properties, milk production traits, somatic cell count, casein content and pH of milk. *J. Dairy Sci.*, 87, 458–467.
- JENSEN, R. G. 2002. The composition of bovine milk lipids: January 1995 to December 2000. *J. Dairy Sci.*, 85, 295–350.
- KLOPČIČ, M., MALOVRH, Š., GORJANC, G., KOVAČ, M., OSTERC, J. 2003. Prediction of daily milk fat and protein content using alternating (AT) recording scheme. *Czech J. Anim. Sci.*, 48, 449–458.
- LEE, A. J., WARDROP, J. 1984. Predicting daily milk-yield, fat percent, and protein percent from morning or afternoon tests. *J. Dairy Sci.*, 67, 351–360.
- NIELSEN, N. I., LARSEN, T., BJERRING, M., INGVARSEN, K. L. 2005. Quarter health, milking interval, and sampling time during milking affect the concentration of milk constituents. *J. Dairy Sci.*, 88, 3186–3200.
- PALMGUIST, D. L., BEAULIEU, A. D., BARBANO, D. M. 1993. Feed and animal factors influencing milk fat composition. *J. Dairy Sci.*, 76, 1753–1771.
- PATTON, J., KENNY, D. A., MEE, J. F., O'MARA, F. P., WATHER, D. C., COOK, M., MURPHY, J. J. 2006. Effect of milking frequency and diet on milk production, energy balance, and reproduction in dairy cows. *J. Dairy Sci.*, 89, 1478–1487.
- PECHOVÁ, A., ILLEK, J., PAVLATA, L. 2000. The factors which are influencing fat concentration in cow milk. [in Czech]. *Veterinářství*, 50, 238–241.
- PERDRIX, M. F., SUTTER, F., WENK, C. 1996. Facteurs de variation de la composition en acides gras de la matière grasse du lait de vache. *Rev. Suisse Agric.*, 28, 71–76.

PÖSÖ, J., MIINTYSAARI, E. A. 1996. Genetic relationship between reproductive disorders, operational days open and milk yield. *Livest. Prod. Sci.*, 46, 41-48.

REMOND, B., POMIES, D., DUPONT, D., CHILLIARD, Y. 2004. Once-a-day milking of multiparous Holstein cows throughout the entire lactation: milk yield and composition, and nutritional status. *Anim. Res.*, 53, 201-212.

ROSATI, A., AUMAITRE, A. 2004. Organic dairy farming in Europe. *Livestock Production Science*, 90, 41-51.

TEPLÝ M. *et al.* 1979. Milk and its production for industrial processing. [in Czech]. SNTL Praha, 376 p.

THOMASSEN, M. A., BOER DE, I. J. M. 2005. Evaluation of indicators to assess the environmental impact of dairy production system. *Agriculture Ecosystems and Environment*, 111, 185-199.

WIKING, L., NIELSEN, J. H., BÅVIUS, A. K., EDVARDSSON, A., SVENNERSTEN-SJAUNJA, K. 2006. Impact of milking frequencies on the level of free fatty acids

in milk, fat globule size, and fatty acid composition. *J. Dairy Sci.*, 89, 1004-1009.

WINDIG, J. J., CALUS, M. P. L., BEERDA, B., VEERKAMP, R. F. 2006. Genetic correlations between milk production and health and fertility depending on herd environment. *J. Dairy Sci.*, 89, 1765-1775.

Supported by the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic, Project No. MSM 6046070901.

Contact address: Dr. Ing. Lenka Kouřimská, Department of Quality of Agricultural Products, Faculty of Agrobiological Sciences, Food and Natural Resources, Czech University of Life Sciences Prague, Kamýcká 129, 165 21 Praha 6 – Suchbát, Czech Republic, e-mail: kourimska@af.czu.cz

KOMPARATÍVNA ŠTÚDIA STANOVENIA PRÍTOMNOSTI REZÍDUÍ VYBRANÝCH KOKCIDIOSTATÍK V TKANIVÁCH KURČIAT A BAŽANTOV COMPARATIVE STUDY OF DETECTION OF THE PRESENCE OF SELECTED COCCIDIOSTATS IN THE TISSUES OF CHICKENS AND PHEASANTS

Ivona Kožárová, Ján Mačanga, Mária Goldová,
Peter Major, Beáta Koréneková

ABSTRAKT

The present paper deals with the detection of the presence of maduramycin and narasin/nicarbasin residues in the tissues of chickens and pheasants by the screening test for antibiotic residues (STAR) with the test strain *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* ATCC 10149. The results were evaluated according to the production of the inhibition zones around the examined samples. The samples were considered positive exhibiting an inhibition zone 4 mm and more. The obtained results were compared in terms of administered substances and animal species. Our results showed that there is a high potential for the presence of maduramycin and narasin/nicarbasin residues in the tissues of broiler chickens even after a 5-day withdrawal period has elapsed. In the case of pheasants, there is a low potential for the presence of maduramycin and narasin/nicarbasin residues in the tissues. The positive results were detected mainly in inedible giblets not intended for human consumption.

Keywords: coccidiostats, maduramycin, narasin/nicarbasin, residues, detection, STAR

ÚVOD

Kokcidiostatiká sú podľa nariadenia Európskeho parlamentu a Rady (ES) č. 1831/2003 definované ako

kýmne doplnkové látky podávané zvieratám počas životného cyklu na prevenciu kokcidiózy. Podávanie kokcidiostatík je v modernej produkcii hydiny a králikov veľmi dôležité. Táto prax významne prispieva k ochrane zdravia zvierat a starostlivosti o zvieratá prevenciou ochorenia, ktoré sa vyskytuje vo všetkých hospodárstvach. Bez kokcidiostatík by výroba za súčasných podmienok bola veľmi vážne ekonomicky ohrozená a nepoužívanie kokcidiostatík by spôsobilo, že spotrebitelia by stratili prístup k mäsu z hydiny, moriek a králika domáceho vyrábaného podľa prísnych noriem Európskej únie (EÚ) v oblasti bezpečnosti a prosperity.

V súčasnosti je vo výžive zvierat povolených 11 kokcidiostatík: dekočinát, robenidín, halofuginon, diklazuril, monenzinát sodný, salinomycinát sodný, lasalocid, maduramycín, narazín, semduramycín a narazín/nikarbazín. Podávanie kokcidiostatík však predstavuje terapeutický prístup ku kontrole kokcidiózy spojený s rizikom prítomnosti rezíduí týchto látok v potravinových maticiach. V záujme ochrany zdravia ľudí je preto potrebné rezíduá týchto látok vo všetkých potravinových maticiach povinne kontrolovať (Smernica Rady 96/23/ES).

Pre cenovo-priaznivú detekciu rezíduí farmakologicky aktívnych látok prijali členské štáty všade tam, kde to je možné, dvojvrstvový testovací systém pozostávajúci zo screeningových a konfirmačných testov. Screeningový test je definovaný ako prvý postup, ktorý sa aplikuje v rámci analýzy vzorky a ktorého účelom je určiť prítomnosť alebo neprítomnosť rezíduá a vybrať vzorku pre konfirmačnú analýzu (Rozhodnutie Komisie 2002/657/ES).

Mikrobiologické metódy agarovej difúzie sú celosvetovo využívané pre prvotný screening rezíduí antibiotík a sulfónamidov v potravinových maticiach. Ak sú však v krajinách Spoločenstva validované na kontrolné účely, musia spoľahlivo detekovať rezíduá na úrovni maximálnych limitov rezíduí (MRL) stanovených nariadením Rady (EHS) č. 2377/90 v platnom znení.

Ani jedna z úradne schválených mikrobiologických metód doposiaľ neuvádza citlivosť na antikokcidiká (kokcidiostatiká). Na základe výsledkov našich doterajších štúdií (Kožárová a Máté, 2000; Kožárová *et al.*, 2002; Kožárová, 2006; Kožárová, 2008) sme však dospeli

Tabuľka 1: Priemerné veľkosti inhibičných zón (mm ± SD) stanovené v tkanivách brojlerových kurčiat metódou STAR s testovacím kmeňom *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* ATCC 10149 po experimentálnom podávaní maduramycínu v krmive

Matrica	Deň ochrannnej lehoty						
	0	1	2	3	4	5	6
Stehno	5,53 ± 0,29	6,05 ± 0,15	6,84 ± 0,12	7,95 ± 1,05	8,04 ± 0,11	7,38 ± 0,57	6,09 ± 0,41
Prsia	4,44 ± 0,22	4,57 ± 0,28	5,62 ± 0,47	8,07 ± 0,75	7,21 ± 0,33	6,04 ± 0,44	5,00 ± 0,73
Žalúdok	5,44 ± 0,52	5,42 ± 0,37	5,02 ± 0,47	6,88 ± 1,52	5,88 ± 0,44	5,55 ± 0,24	4,09 ± 0,37
Pečeň	7,17 ± 0,34	5,92 ± 0,07	6,58 ± 0,18	7,65 ± 0,56	6,68 ± 0,17	5,45 ± 0,31	4,84 ± 0,21
Srdce	7,83 ± 1,15	6,23 ± 0,54	6,72 ± 0,80	8,91 ± 0,37	6,84 ± 0,30	6,24 ± 0,51	5,56 ± 0,54
Obličky	8,28 ± 0,35	7,62 ± 0,46	10,53 ± 1,48	10,17 ± 0,29	11,28 ± 1,33	8,41 ± 0,52	7,12 ± 0,29
Slezina	6,71 ± 1,60	6,72 ± 0,11	6,69 ± 0,06	8,64 ± 0,54	8,49 ± 0,73	7,67 ± 0,13	6,64 ± 0,62
Plúca	7,47 ± 0,27	6,59 ± 0,33	6,43 ± 0,27	6,96 ± 0,27	6,66 ± 0,29	6,44 ± 0,22	4,99 ± 0,58

k záveru, že mikrobiologické metódy sú vhodné na stanovenie rezíduí niektorých látok zo skupiny antikokcidík na požadovanej úrovni. Z pohľadu detekčnej citlivosti metód, najcitlivejším testovacím kmeňom mikrobiologických metód na antikokcidiká je testovací kmeň *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis*. Keďže nariadením (EHS) č. 2377/90 a nariadením (ES) č. 1831/2003 nie sú doposiaľ stanovené MRL pre všetky antikokcidiká, ako limitujúce kritériá vhodnosti metód na reziduálne štúdie boli použité MRL stanovené pre tieto látky v niektorých štátoch sveta (Kanada, USA, Japonsko, Nový Zéland a pod.).

Prezentovaná práca sa zaoberá mikrobiologickým stanovením rezíduí maduramycínu a narazín/nikarbazínu v tkanivách brojlerových kurčiat a bažantov. Cieľom práce bolo porovnať pretrvávajúce prítomnosti rezíduí vo vyšetrovaných matriciach počas stanovenej ochrannnej lehoty z dvoch hľadísk, a to z pohľadu podávaných látok a z pohľadu druhov zvierat.

MATERIÁL A METODIKA

V experimente boli použité dvojtypy kurčiat (brojlerové kurčatá (*Gallus gallus* – hybrid Ross) a bažanty poľovné (*Phasianus colchicus*), ktoré po adaptácii boli infikované suspenziou oocýst *Eimeria tenella* a *E. acervulina* (kurčatá) a *Eimeria colchici* (bažanty) a rozdelené do 3 skupín po 20 kusov. Zvieratám zaradeným do skupiny A bol po dobu 10 dní podávaný maduramycín (Cygro 1 %, Alpharma AS, Belgicko) zapracovaný do krmiva v dávke 5 mg.kg⁻¹. Zvieratám zaradeným do skupiny B bol po dobu 10 dní podávaný narazín/nikarbazín (Maxiban G 160, Eli Lilly a Company Ltd., USA) zapracovaný do krmiva v dávke 100 mg.kg⁻¹. Skupina C predstavovala negatívnu kontrolu.

V 0. deň OL, počas piatich dní stanovenej OL, a v prvý deň po uplynutí OL boli dva kusy z každej experimentálnej skupiny postupne zabíjané a tkanivá (prsna a stehenná svalovina, srdce, pečeň, obličky,

Tabuľka 2: Priemerné veľkosti inhibičných zón (mm ± SD) stanovené v tkanivách bažantov metódou STAR s testovacím kmeňom *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* ATCC 10149 po experimentálnom podávaní maduramycínu v krmive

Matrica	Deň ochrannnej lehoty						
	0	1	2	3	4	5	6
Stehno	3,25 ± 0,16	3,40 ± 0,29	3,06 ± 0,68	2,82 ± 0,23	2,43 ± 0,07	1,19 ± 0,07	2,57 ± 0,27
Prsia	2,21 ± 0,01	1,94 ± 0,15	2,62 ± 0,99	2,47 ± 0,61	2,22 ± 0,05	1,41 ± 0,51	1,76 ± 0,28
Žalúdok	4,66 ± 1,61	2,43 ± 1,16	4,64 ± 0,79	3,58 ± 1,00	2,76 ± 0,75	3,47 ± 0,15	3,69 ± 0,06
Pečeň	3,72 ± 0,30	3,79 ± 0,25	2,59 ± 0,23	3,65 ± 0,28	3,53 ± 0,28	2,27 ± 0,09	3,63 ± 0,30
Srdce	3,29 ± 0,36	5,85 ± 0,19	4,96 ± 0,53	3,75 ± 0,28	4,97 ± 0,02	3,00 ± 0,22	3,77 ± 0,62
Obličky	5,59 ± 0,04	4,52 ± 0,17	4,02 ± 0,06	3,59 ± 0,13	3,92 ± 0,87	2,91 ± 0,38	3,01 ± 0,27
Slezina	6,28 ± 0,21	5,62 ± 0,04	7,30 ± 0,25	5,54 ± 0,34	4,02 ± 0,11	3,01 ± 0,22	4,88 ± 0,07
Plúca	4,19 ± 0,02	3,98 ± 0,69	3,96 ± 0,36	4,17 ± 0,38	4,70 ± 0,42	3,28 ± 0,67	2,88 ± 0,38

Tabuľka 3: Priemerné veľkosti inhibičných zón (mm ± SD) stanovené v tkanivách brojlerových kurčiat metódou STAR s testovacím kmeňom *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* ATCC 10149 po experimentálnom podávaní narazín/nikarbazínu v krmive

Matrica	Deň ochrannnej lehoty						
	0	1	2	3	4	5	6
Stehno	4,94 ± 0,29	5,41 ± 0,82	4,28 ± 0,44	5,12 ± 0,23	5,86 ± 0,68	4,97 ± 0,81	6,02 ± 0,10
Prsia	4,81 ± 0,26	3,83 ± 0,57	3,98 ± 0,24	4,44 ± 0,13	5,10 ± 0,21	5,43 ± 0,26	5,13 ± 0,30
Žalúdok	3,17 ± 0,59	5,68 ± 0,60	3,72 ± 0,39	4,50 ± 0,08	4,72 ± 0,40	5,38 ± 1,32	4,87 ± 0,37
Pečeň	4,73 ± 0,18	4,98 ± 0,40	5,23 ± 0,03	5,99 ± 0,55	6,14 ± 0,26	5,93 ± 0,28	5,57 ± 0,25
Srdce	4,83 ± 0,41	4,79 ± 0,63	5,99 ± 0,20	6,82 ± 0,51	6,09 ± 0,75	5,87 ± 0,93	5,55 ± 0,50
Obličky	7,08 ± 0,45	8,32 ± 0,12	8,44 ± 0,23	8,72 ± 0,19	7,80 ± 0,62	9,24 ± 2,12	8,43 ± 0,56
Slezina	6,00 ± 0,08	6,87 ± 0,46	7,39 ± 0,54	7,17 ± 0,11	6,93 ± 0,09	6,75 ± 0,57	7,95 ± 0,33
Plúca	5,32 ± 0,95	4,23 ± 0,21	6,77 ± 0,16	8,42 ± 0,48	6,97 ± 0,18	5,24 ± 0,69	4,74 ± 0,42

Tabuľka 4: Priemerné veľkosti inhibičných zón (mm $\pm$ SD) stanovené v tkanivách bažantov metódou STAR s testovacím kmeňom *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* ATCC 10149 po experimentálnom podávaní narazín/nikarbazínu v krmive

Matrica	Deň ochrannej lehoty						
	0	1	2	3	4	5	6
Stehno	2,67 $\pm$ 0,39	2,79 $\pm$ 0,39	1,96 $\pm$ 4,05	2,27 $\pm$ 0,07	1,52 $\pm$ 0,15	1,47 $\pm$ 0,16	2,78 $\pm$ 0,18
Prsia	1,49 $\pm$ 0,15	1,61 $\pm$ 0,11	1,47 $\pm$ 0,37	1,48 $\pm$ 0,67	1,98 $\pm$ 0,38	0,89 $\pm$ 0,43	1,06 $\pm$ 0,70
Žalúdok	1,95 $\pm$ 1,01	2,89 $\pm$ 0,26	2,74 $\pm$ 0,78	3,74 $\pm$ 0,69	2,35 $\pm$ 0,38	2,00 $\pm$ 0,68	2,15 $\pm$ 0,90
Pečeň	2,90 $\pm$ 0,11	3,62 $\pm$ 0,19	4,84 $\pm$ 4,31	2,77 $\pm$ 0,16	6,91 $\pm$ 0,41	2,54 $\pm$ 0,11	3,30 $\pm$ 0,10
Srdce	3,29 $\pm$ 0,39	3,11 $\pm$ 0,84	2,80 $\pm$ 0,24	3,63 $\pm$ 0,31	3,82 $\pm$ 0,19	2,48 $\pm$ 0,09	3,72 $\pm$ 0,18
Obličky	3,44 $\pm$ 0,30	3,67 $\pm$ 0,43	3,93 $\pm$ 0,32	3,46 $\pm$ 0,41	3,84 $\pm$ 0,27	3,41 $\pm$ 0,20	3,75 $\pm$ 0,31
Slezina	6,98 $\pm$ 0,66	5,06 $\pm$ 0,10	4,80 $\pm$ 0,38	4,94 $\pm$ 0,38	6,52 $\pm$ 2,45	4,58 $\pm$ 0,56	6,53 $\pm$ 0,22
Plúca	4,22 $\pm$ 0,04	3,72 $\pm$ 0,45	4,05 $\pm$ 0,68	3,88 $\pm$ 0,73	4,87 $\pm$ 0,05	4,06 $\pm$ 0,65	4,30 $\pm$ 0,15

žalúdok, slezina a plúca) boli vyšetrované na prítomnosť rezíduí kokcidostatík úradne schválenou metódou STAR (Screeningový test na stanovenie rezíduí antibiotík s použitím piatich bakteriálnych kmeňov) s testovacím kmeňom *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* ATCC 10149 (CH 12.19., 2006). Za pozitívny výsledok bolo považované vytvorenie čirej pravidelnej zóny okolo vyšetrovaných vzoriek na jednej alebo viacerých platniach o minimálnej veľkosti 4 mm pre mäso a orgány. Overenie pracovných podmienok bolo vždy vykonávané použitím štandardu sulfamididínu.

Pokus bol vykonaný v schválenom pokusnom zariadení na Ústave parazitológie UVL v Košiciach (SK P 30006).

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Výsledky stanovenia prítomnosti rezíduí maduramycínu a narazín/nikarbazínu v tkanivách brojlerových kurčiat a bažantov počas sledovaného obdobia sú prezentované v Tabuľkách 1 – 4. Veľkosť inhibičných zón bola meraná od okraja matrice po vonkajší kraj zóny inhibície pomocou digitálneho posuvného meradla (Mitutoyo, Japonsko). Veľkosti inhibičných zón sú prezentované ako priemer $\pm$ SD štyroch meraní v mm. Pre výpočet priemeru veľkostí inhibičných zón (stredná hodnota) a odchýlky hodnôt od priemeru (smerodajná odchýlka /SD/) bol použitý program Microsoft Office Excel 2003. Tučne zvýraznené číslce predstavujú pozitívne výsledky.

Výsledky prezentované v Tabuľkách 1 – 4 poukazujú na skutočnosť, že rezíduá maduramycínu a narazín/nikarbazínu prítomné vo vyšetrovaných vzorkách brojlerových kurčiat a bažantov inhibovali rast testovacieho kmeňa *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* ATCC 10149 mikrobiologickej metódy STAR vytvorením čírych zón inhibície okolo vyšetrovaných vzoriek. Pri vyšetrovaní vzoriek tkanív brojlerových kurčiat sa veľkosť inhibičných zón po podávaní maduramycínu pohybovala v rozmedzí od 4,09 $\pm$ 0,37 do 11,28 $\pm$ 1,33 mm (Tab. 1) a po podávaní narazín/nikarbazínu od 3,17 $\pm$ 0,59 do 9,24 $\pm$ 2,12 mm (Tab. 3). Pri vyšetrovaní vzoriek tkanív bažantov sa veľkosť inhibičných zón po podávaní maduramycínu pohybovala v rozmedzí od 1,19 $\pm$ 0,07 do 7,30 $\pm$ 0,25 mm (Tab. 2) a po podávaní narazín/nikarbazínu od 0,89 $\pm$ 0,43 do 6,98 $\pm$ 0,66 mm (Tab. 4).

Veľkosť inhibičných zón závisí od koncentrácie a typu antimikrobiálnej látky prítomnej v skúšanej vzorke. Ak by sme veľkosť inhibičných zón hodnotili z hľadiska

podávaných látok, väčšie inhibičné zóny boli zaznamenané pri vyšetrovaní tkanív brojlerových kurčiat aj bažantov po podávaní maduramycínu v krmive. Ak by sme veľkosť inhibičných zón hodnotili z hľadiska druhov zvierat, podstatne väčšie inhibičné zóny boli zaznamenané pri vyšetrovaní vzoriek tkanív brojlerových kurčiat ako bažantov. Ak by sme vzájomne porovnávali veľkosti inhibičných zón po podávaní oboch látok v rámci jedného druhu zvierat, veľkosti inhibičných zón boli veľmi podobné.

Prítomnosť rezíduí maduramycínu a narazín/nikarbazínu bola vo vyšetrovaných tkanivách brojlerových kurčiat a bažantov mikrobiologickou metódou STAR s testovacím kmeňom *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* ATCC 10149 detekovaná. Metóda STAR pri testovanom kmeni *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* ATCC 10149 považuje vzorky za pozitívne, ak dávajú zónu inhibície väčšiu ako 4 mm. Vzhľadom na metódu stanovené kritérium bezpečnosti a ochrany zdravia spotrebiteľa môžeme konštatovať, že všetky tkanivá brojlerových kurčiat boli pozitívne na prítomnosť rezíduí maduramycínu a narazín/nikarbazínu nielen počas stanovenej 5-dňovej ochrannej lehoty, ale dokonca aj v prvý deň po uplynutí ochrannej lehoty. Pri vyšetrovaní tkanív bažantov bolo zaznamenaných podstatne menej pozitívnych výsledkov. Pozitívne výsledky boli stanovené predovšetkým v tkanivách (obličky, slezina, plúca), ktoré nie sú určené na spotrebu ľuďmi. Ostatné požívateľné tkanivá bažantov boli vyhodnotené ako negatívne na prítomnosť rezíduí oboch sledovaných látok s výnimkou maduramycínu (srdce) v prvý deň po uplynutí ochrannej lehoty, kedy veľkosť inhibičnej zóny (3,77 $\pm$ 0,62) nemôžeme jednoznačne považovať za pozitívnu z dôvodu rozpätia odchýlok veľkostí inhibičných zón od priemeru ($\pm$ SD). Výsledok bol zhodnotený ako dubiozný.

Bacillus stearothermophilus var. *calidolactis* je testovací kmeň, pri ktorom je zaznamenaná najvyššia možnosť poskytnutia falošne pozitívnych výsledkov. 4 mm veľkosť inhibičnej zóny má pri mikrobiologickom stanovení rezíduí v potravinových matriciach svoje opodstatnenie. Ak by sme dosiahnuté výsledky porovnávali s detekčnou citlivosťou testovacieho kmeňa *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* ATCC 10149 na maduramycín a narazín stanovenou v našich predchádzajúcich štúdiách v podmienkach *in vitro* s použitím štandardov týchto látok (Kožárová, 2006; Kožárová, 2008; Kožárová et al., 2008a; Kožárová et al., 2008b), 4 mm veľkosť inhibičnej zóny zodpovedá

reziduálnej koncentrácii maduramycínu 0,25 mg.kg⁻¹ a narazínu 0,075 mg.kg⁻¹. Vzhľadom na MRL stanovené pre tieto látky mimo Európskeho spoločenstva (maduramycín 0,4 – 0,5 mg.kg⁻¹; narazín 0,05 - 0,5 mg.kg⁻¹) a 4 mm veľkosť inhibičnej zóny môžeme konštatovať, že reziduá týchto látok sú metódou STAR s testovacím kmeňom *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* ATCC 10149 detekované na požadovanej úrovni. Do trhovej siete na účely spotreby ľuďmi by sa tak dostávali brojlerové kurčatá a bažanty bez potencionálneho rizika z prítomnosti rezíduí týchto látok v požívateľných tkanivách. Detekčná citlivosť testovacieho kmeňa na nikarbazín však bola podstatne nižšia (50 mg.kg⁻¹; MRL 0,5 - 4,0 mg.kg⁻¹). Vzhľadom na možnosť poskytnutia falošne negatívnych výsledkov je analýza vzoriek príslušnou konfirmačnou metódou nevyhnutná.

ZÁVER

Produkčný proces zvierat a prvotných produktov živočíšneho pôvodu sa kvôli zisťovaniu prítomnosti určitých látok a ich rezíduí povinne kontroluje. Povinne kontrole rezíduí podliehajú aj antikokcidiká. Vzhľadom na to, že sa niektorým druhom a vekovým skupinám zvierat podávajú ako doplnkové látky v krmivách (kokcidiostatiká) hromadne a dlhodobo, možnosť vytvárania nežiaducich rezíduí sa len zvyšuje. Azda najväčšie riziko z prítomnosti rezíduí predstavuje hydina, králiky, ale aj zver žijúca vo farmových chovoch, ako sú napr. bažanty.

Mikrobiologické metódy agarovej difúzie zaradujeme medzi screeningové metódy, ktoré sa používajú na stanovenie prítomnosti látky alebo skupiny látok na príslušnej úrovni. Princípom týchto mikrobiologických metód je inhibícia rastu testovacieho kmeňa prítomnou farmakologicky aktívnou látkou. Inhibícia rastu testovacieho kmeňa je prezentovaná tvorbou inhibičných zón.

Screeningový test na stanovenie rezíduí antibiotík s použitím piatich bakteriálnych kmeňov, označovaný aj ako STAR, je jedným z úradne schválených metód používaných na kontrolu rezíduí v potravinových komoditách. I napriek tomu, že neдекларuje citlivosť ani jedného z testovacích kmeňov na antikokcidiká, práve testovací kmeň *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* ATCC 10149 stanovuje reziduá niektorých látok zo skupiny antikokcidík na požadovanej úrovni.

Výsledky prezentované v práci potvrdzujú citlivosť testovacieho kmeňa *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* ATCC 10149 na maduramycín a narazín/nikarbazín a možnosť využitia tohto širokospektrálneho testu na stanovenie prítomnosti rezíduí týchto látok v tkanivách brojlerových kurčiat a bažantov chovaných v podmienkach súčasných produkčných systémov. Dosiahnuté výsledky zároveň poukazujú na skutočnosť, že po podávaní maduramycínu a narazín/nikarbazínu brojlerovým kurčatám a bažantom v odporúčaných množstvách 5 mg.kg⁻¹ (maduramycín) a 100 mg.kg⁻¹ (narazín/nikarbazín) krmiva boli prítomné reziduá oboch látok v tkanivách brojlerových kurčiat ešte aj po ukončení stanovenej 5-dňovej ochrannnej lehoty. Keďže potravinové produkty po uplynutí ochrannnej lehoty

musia obsahovať také koncentrácie veterinárneho lieku, ktoré sa považujú za zdravotne neškodné, podávanie maduramycínu a narazín/nikarbazínu brojlerovým kurčatám predstavuje vysoké riziko pre spotrebiteľov z prítomnosti rezíduí v ich požívateľných tkanivách.

Poživateľné tkanivá bažantov predstavujú nízke riziko pre spotrebiteľov z prítomnosti rezíduí maduramycínu a narazín/nikarbazínu. Po uplynutí stanovenej 5-dňovej ochrannnej lehoty sa môžu použiť na ľudský konzum a považovať za zdravotne neškodné. V oboch prípadoch však musí byť výsledok potvrdený príslušnou konfirmačnou metódou.

LITERATÚRA

CH 12.19, 2006. Screeningový test na stanovenie rezíduí antibiotík s použitím bakteriálnych kmeňov (STAR). In *Zoznam úradných metód laboratórnej diagnostiky potravín a krmív*. Vestník MP SR, roč. 38, Čiastka 13, 2006, s. 68-81.

KOŽÁROVÁ, I., MÁTÉ, D., 2000: Evaluation of the sensitivity of individual test organisms to residual concentrations of selected types of anticoccidial drugs. In *Bull. Vet. Inst. Pulawy*, 44, 2, 2000, s.187-192.

KOŽÁROVÁ, I., MÁTÉ, D., CABADAJ, R., RÓŽAŇSKA, H., HUSSEIN, K., LACIAKOVÁ, A., 2002: An evaluation of the microbiological diffusion methods as a tool for screening monensin residues in the tissues of broiler chickens. In *Folia Veterinaria*, 46, 1, 2002, s. 27-33.

KOŽÁROVÁ, I., 2006: Porovnávacie štúdiá detekčnej citlivosti mikrobiálnych inhibičných testov na antikokcidiká. In *Zborník z medzinárodnej konferencie „Rizikové faktory potravinového reťazca VI.“*, Nitra : SPU, 12. 10. 2006, s. 189-193. ISBN 80-8069-760-4.

KOŽÁROVÁ, I., 2008: Screening rezíduí antikokcidík metódami agarovej difúzie. Košice : UVL, 2008, 160 s. (habilitačná práca)

KOŽÁROVÁ, I., SÝKOROVÁ GOFFOVÁ Z., MÁTÉ, D., 2008a: Detection of maduramycin residues in the tissues of broiler chicken by using the Premi®Test and the STAR. In *Slovak J. Anim. Sci.*, 41, 2008, s. 206.

KOŽÁROVÁ, I., SÝKOROVÁ GOFFOVÁ Z., MÁTÉ, D., 2008b: Detection of maduramycin residues in the tissues of broiler chickens by using the Premi®Test and the STAR in combination with the solvent extraction procedure. In *Slovak J. Anim. Sci.*, 41, 2008, s. 206.

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

NARIADENIE RADY (EHS) č. 2377/90 z 26. júna 1990, ktorým sa stanovuje postup Spoločenstva na určenie maximálnych limitov rezíduí veterinárnych liečiv v potravinách živočíšneho pôvodu. In *Úradný vestník Európskej únie* L 224, 18. 8. 1990, s. 1-9.

ROZHODNUTIE KOMISIE 2002/657/ES z 12. augusta 2002, ktorým sa implementuje smernica Rady 96/23/EHS, ktorá sa týka uplatňovania analytických metód a interpretácie

výsledkov. *Úradný vestník Európskej únie* L 221, 17. 8. 2002, s. 8-36.

SMERNICA RADY (ES) č. 96/23 z 29. apríla 1996 o opatreniach na monitorovanie určitých látok a ich reziduí v živých zvieratách a živočíšnych produktoch a o zrušení smerníc 85/358/EHS a 86/469/EHS a rozhodnutí 89/187/EHS a 91/664/EHS. In *Úradný vestník Európskej únie* L 125, 23. 5. 1996, s. 10-32.

PodĎakovanie

Spracovanie príspevku bolo podporené projektmi VEGA MŠ SR č. 1/4385/07, č. 1/0403/08 a č. 1/0658/09.

Kontaktná adresa:

doc. MVDr. Ivona Kožárová, PhD. Univerzita veterinárskeho lekárstva v Košiciach, Katedra hygieny a technológie potravín, Ústav hygieny a technológie mäsa, Komenského 73. E-mail: kozarova@uvm.sk

AUTENTIFIKAČNÉ PARAMETRE VHODNÉ NA ODHALOVANIE FALŠOVANIA MEDU

AUTHENTICATION PARAMETERS SUITABLE FOR DETECTION OF HONEY ADULTERATION

Kristína Kukurová, Zlatica Kohajdová, Jolana Karovičová, Lenka Vrbiková,

ABSTRACT

Honey represents a thick, sweet, syrup-like or crystalline matter, pale yellow to dark brown in colour, with a characteristic smell and flavour, produced by *Apis mellifera* and *Apis dorsata fabricious*. It is produced from plant nectar, as well as from honeydew, which bees collect, process and store in honeycombs. Honey adulteration is a complex problem which currently has a significant economic impact and undeniable nutritional and organoleptic consequences.

The aim of work was to obtain information about chemical composition of honey (sugars, water, organic acids, amino acids) undesirable components (hydroxymethylfurfural), about its physical properties like crystallisation, electrical and about dividing honeys.

Keywords: honey, adulteration, authenticity markers

ÚVOD

Potravinový kódex SR (**PK SR**) a európska Smernice Rady 2001/110/ES definujú med ako prírodnú sladkú látku produkovanú včelami (*Apis mellifera*) z nektáru rastlín, zo sekrétov živých častí rastlín alebo z výlučkov hmyzu cicajúceho živé časti rastlín, ktorý včely zbierajú, pretvárajú a obohacujú vlastnými špecifickými látkami, ukladajú, zahusťujú, uskladňujú a ponechávajú v plástoch, aby med vyzrel (**Výnos MP SR a MZ SR č. 1188/2004 - 100, 2004, Smernica Rady 2001/110/ES, PK SR**).

Med je prevažne vysoko koncentrovaný roztok zmesi cukrov, najmä glukózy a fruktózy, v ktorom sú často suspendované aj kryštály monohydrátu glukózy. Okrem toho med obsahuje bielkoviny, aminokyseliny, enzýmy, vitamíny, acetylcholín, flavonoidy, organické kyseliny, minerálne látky, rôzne organické zlúčeniny v stopových množstvách, ktoré dávajú medu charakteristickú farbu, chuť a vôňu, zrnká peľu, čiastočky vosku z plástov a rôzne

mikroorganizmy (kvasinky, baktérie a plesne) (**Ashurst, Dennis, 1996**). Codex Alimentarius považuje med za potravinu prírodného pôvodu, ku ktorej po odobraní z úľa nesmie byť nič primiešané, ani z neho nič nesmie byť odstránené (**Codex Alimentarius, Brožek, 2007**).

ROZDELENIE MEDOV NA SLOVENSKU

Med môžeme rozdeliť do skupín podľa rôznych hľadísk, najčastejšie podľa pôvodu medu, spôsobu získavania, úpravy a uvádzania do obehu. Podľa Potravinového kódexu SR hlavnými druhmi medu podľa pôvodu sú med kvetový alebo med z nektáru a med medovicový. Na Slovensku je veľmi často získavaný med zmiešaný (pochádzajúci z nektáru aj medovice), ktorý však legislatíva nerozlišuje. Najvyššiu hodnotu na trhu získavajú medy jednodruhové a medovicové. Škála farby medov je široká, od bielych priesvitných cez žlté a najrôznejšie odtiene farby jantárovej, svetlo hnedej až k najtmavšej hnedej, v závislosti od daného druhu medu (**Přidal, 2003a**).

Rozšírené druhy kvetových medov:

- lipový (zlatožltej farby, číry, ťažko kryštalizuje)
- agátový (bezfarebný až žltkastý s nazelenalým odtieňom, ťažšie kryštalizuje, zo všetkých našich medov ostáva v tekutom stave najdlhšie)
- slnečnicový (žltý, veľmi rýchlo kryštalizuje do žltá na hrubé kryštály, ako keby bol do neho nasýpaný kryštálový cukor)
- repkový (svetlej bleďožltej až citrónovej farby, veľmi rýchlo kryštalizuje na bielu farbu, veľmi jemnej kryštalizácie, ale pevnej a veľmi tvrdej konzistencie)
- med z ovocných stromov (svetlej farby, ľahko kryštalizuje na bielu farbu veľmi jemnej kryštalizácie)
- ďatelinový (žltkastý až žltý, ľahko kryštalizuje v suchobielu tuhú látku)
- čistcový (žltkastý až belavý, kryštalizuje v celej hmote)
- pohánkový (tmavohnedý, čiastočne kryštalizuje, kašovitá konzistencia, obsahuje vyššie množstvo bielkovín a železa ako iné medy)
- lúčny (žltý až tmavožltý až do červena, zmes medov, ostáva dlho kvapalný, kryštalizuje na šedo až do hneda) (**Hajdákova, 1989**)

Hlavnými druhmi medu podľa spôsobu získavania, úpravy a uvádzania do obehu sú med vytočený, lisovaný, plastický, odkvapkaný, kusový alebo rezaný plásty

v mede a med filtrovaný (**PK SR**). Väčšina medu v súčasnej dobe je získavaná vytáčaním, t.j. spôsobom odstredivej sily na med v plastoch. Filtrovaný med sa vyznačuje zníženým obsahom peľových zŕn. Špeciálnym druhom medu obľúbeným na Slovensku je med pastový, ktorého kryštalizácia bola technologicky ovplyvnená s cieľom zabezpečiť jemnú roztierateľnú konzistenciu. Vo svete rozšírený je tiež med tzv. plastikový, ktorý je predávaný najčastejšie v priehľadných plastových obaloch. Výrazné preferencie u spotrebiteľov si získava hlavne z dôvodu, že vzbudzuje dojem pravosti a nefalšovanosti (**Přidal, 2003a**).

FALŠOVANIE MEDU A AUTENTIFIKAČNÉ PARAMETRE

Do medu uvádzaného do obehu alebo medu použitého v akomkoľvek výrobku určenom na ľudskú spotrebu nemožno pridávať žiadne látky. Ak je to možné, med nesmie obsahovať organické nečistoty ani anorganické nečistoty, ako sú plesne, zvyšky plástov, zvyšky hmyzu a lariev a zrnká piesku (**Výnos MP SR a MZ SR č. 1188/2004 - 100, 2004; Council Directive 2001/110/EC, 2001**). V posledných rokoch sa stále viac môžeme stretnúť s medmi nepravými alebo falšovanými. Toto porušenie pravosti býva vo väčšine prípadov zo strany výrobcov (do medu sa nesmú pridávať látky, meniace jeho prirodzené zloženie prídavkom aditív, sacharidových, dextrínových, škrobových a iných látok, upravovaná kyslosť alebo obsah vody) (**Smernica Rady 2001/110/ES, PK SR**), veľkým problémom sa stali nekvalitné medy z Číny (**Dračková et al., 2008**). Čína sa v roku 1984 stala náhle vedúcou exportnou krajinou, hoci predtým bola úplne nevýznamnou krajinou z hľadiska obchodovania s medom. Tento náhly nárast bol veľmi podozrivý a naviac med mal celú radu zvláštnych vlastností napr. mimoriadne vysoký počet mŕtvych kvasiniek, abnormálna aktivita diastázy, vysoký obsah oxidov železa, rezídua chemických produktov, med bol dodávaný v nehygienických obaloch. Predovšetkým šlo najskôr o porušenie trstinovým sirupom, ktorý obsahuje veľké množstvo fruktózy, bolo vylúčené pozitívne konvenčných analytických metód stanovujúcich obsah redukujúcich cukrov. Postupnou analýzou sa zistilo, že falzifikát medu bol vyrobený touto cestou - med bol vytočený s 25 – 30 % obsahom vody a skladovaný v hrdzavejúcich obaloch až do výkupu (vznikali oxidy železa) (**Přidal, 2003b**).

Dochádza tak k zmene fyzikálnych a chemických parametrov, ktoré medu dávajú jeho charakteristické vlastnosti a k zníženiu dietetickej hodnoty, pre ktorú je tak cenený (**Dračková et al., 2008**). Objavujú sa v ňom antibiotiká a tiež glycerín, ktorý je indikátorom kvasenia medu (nezrelosť produktu pri medobraní) (**Textl, 2007**). Čínsky med nestraší včelárov, ale jeho predajom aj v SR rozšíril sa sortiment lacných druhových medov, ktoré nie sú kompatibilné so ES medmi čo do kvality a aj zdravotnej bezpečnosti. Nie sú to iba rezídua antibiotík streptomycin, čo sa našlo, v mede pôvodom z Vietnamu a predtým v čínskom mede boli zistené rezídua chloramfenikolu. Med pôvodom z iného svetadielu prispieva konzumentom k vzniku šírenia sa nebezpečných a neprijemných alergií (**Hájek, 2005**).

Med označený nezodpovedajúcim druhom medu sa považuje za klamne označený (**Jendreják, 2005**). Boli

zaznamenané niektoré prípady, keď bol kvetový med zafarbený a predávaný ako med lesný (**Kukurová et al., 2008**). Označenie „med“ možno používať len na pomenovanie medu podľa § 2 ods. 1 a možno ho používať v rámci obchodovania na označenie predmetného produktu. Názvy produktov uvedené v § 2 ods. 11 a v § 3 sa môžu používať len na označovanie produktov, ktoré sú uvedené v § 2 a ktoré sa budú používať v rámci obchodovania na ich označovanie. Tieto názvy môžu byť nahradené jednoduchým názvom „med“, okrem filtrovaného medu, plastikového medu, kusového medu alebo rezaného plástu v mede a pekárskoho medu. Ak ide o pekársky med, musia sa slová „určený len na pečenie“ uviesť v označení v bezprostrednej blízkosti názvu produktu. Názvy produktov, okrem filtrovaného medu a pekárskoho medu, možno doplniť informáciou o tom, že ide o:

- kvetový alebo rastlinný pôvod, ak produkt pochádza len alebo hlavne, z označeného zdroja a vyznačuje sa organoleptickými, fyzikálno-chemickými a mikroskopickými charakteristikami zdroja
- regionálny, teritoriálny alebo zemepisný pôvod, ak produkt pochádza výhradne z označeného zdroja
- špecifické kvalitatívne kritériá

Tam, kde sa pekársky med použil ako súčasť viaczložkovej potraviny, výraz „med“ sa môže použiť v názve produktu viaczložkovej potraviny namiesto výrazu „pekársky med“. V zozname zložiek sa musí používať výraz uvedený v § 2 ods. 11. (**Výnos MP SR a MZ SR č. 1188/2004 - 100, 2004**). Za pravý med sa nepovažuje ani med, ktorý sa získa prikrmovaním včiel roztokmi sacharózy alebo sirupov (chýbajú mu výživové látky ako bielkoviny, minerálne látky, vitamíny; farbivá, éterické látky; dochádza k zmene fyzikálno – chemických vlastnostiach napr. vôňa, chuť, viskozita, kryštalizácia) (**Ashurst, Dennis, 1996**).

Dôležité je sledovať nielen zámerné falšovanie, ale aj nevyhovujúce kvalitatívne kritériá. Med sa posudzuje ako na ľudský konzum nevhodný:

- ak sú v mede nečistoty vzbudzujúce odpor (časti tela včiel a iného hmyzu, vlasy), alebo sú škodlivé zdraviu (rezídua antibiotík),
- med je skvasený (obyčajne ako dôsledok zvýšeného obsahu vody),
- má výrazné zmeny vône a chuti (najčastejšie po nesprávnom skladovaní).
- ak med obsahuje rezíduá cudzorodých látok (ťažké kovy, liečivá, alkaloidy, insekticídy, glykozidy jedovatých látok, nad povolený limit)
- ak obsahuje patogénne, podmienené patogénne a toxínogénne baktérie napr. spóry bakteriálnych nákaz včelieho plodu, či *Clostridium botulinum* (**Chlebo, 2002**) a plesne (najmä ako dôsledok sekundárneho znečistenia pri manipulácii s medom)
- pri nákazách včiel – mór včelieho plodu (pre človeka je síce pôvodca neškodný, opatrením sa znižuje riziko prenosu nákazy medom na iné včelstvá)

- ak je med falšovaný

Pre dlhodobé skladovanie medu je podstatná správna teplota skladovania. Teda, čím nižšia teplota, tým pomalšie sú biochemické reakcie, ktoré v mede nastávajú. Dôležité je, aby bol med držaný v tesne uzavretých nádobách, aby nemohol prijímať vlhkosť z okolitého prostredia. Nevystavovať ho zbytočne svetlu a samozrejme držať v nádobách, ktoré s medom nijak nereagujú. Najvhodnejšie sú sklené obaly, nerezové nádoby, prípadne potravinárske plastové nádoby.

Kvalita medov sa posudzuje podľa nasledujúcich fyzikálno – chemických parametrov.

ELEKTRICKÁ VODIVOSŤ

Stanovenie elektrickej vodivosti medu patrí medzi rutinné a rýchle metódy, na základe ktorých je možné odlíšiť najmä kvetový a medovicový med. Vodivosť medovicového medu je vyššia oproti kvetovému z dôvodu vyššieho obsahu minerálnych látok a organických kyselín (Suhaj, Kováč, 1999). Potravinový kódex SR (Výnos MP SR a MZ SR č. 1188/2004 - 100, 2004) a Európska smernica týkajúca sa medu (Council Directive 2001/110/EC, 2001) uvádzajú, že kvetový med vykazuje elektrickú vodivosť najviac $0,8 \text{ mS.cm}^{-1}$. Medovicové medy sa vyznačujú vyššou elektrickou vodivosťou (minimálne $0,8 - 1,4 \text{ mS.cm}^{-1}$, výnimočne aj viac), najmä v dôsledku vyššieho obsahu minerálnych látok, kým kvetové medy majú výrazne nižšiu elektrickú vodivosť (agátový $0,15 - 0,2 \text{ mS.cm}^{-1}$, malinový $0,3 - 0,4 \text{ mS.cm}^{-1}$, lipový $0,4 - 0,5 \text{ mS.cm}^{-1}$). Výnimkou je gaštanový med, ktorého elektrická vodivosť – hoci patrí medzi kvetové medy, býva $1,0 - 1,3 \text{ mS.cm}^{-1}$ (Mačička, 2007). Elektrická vodivosť je zároveň vhodným parametrom pre charakteristiku botanického pôvodu medu.

VODA

Obsah vody je limitujúci pre skladovanie medu (Přidal, 2003a). Voda je v medoch obsiahnutá v množstve 15 – 21 %. Obsah vody je základným kritériom kvality medu a zisťuje sa refraktometricky. Pre kvalitu medu je optimálny obsah vody 17 – 18 % (Ptáček, 2003). Povolené množstvo vody podľa PK SR a Európskej smernice týkajúcej sa medu je najviac 20 hmot. % (Suhaj, Kováč, 1999). Množstvo vody závisí od druhu kvetov, z ktorých med pochádza, od sezóny a včelstva (Kňazovická et al., 2008). Med má tú vlastnosť, že za určitých podmienok vodu zvonku prijíma alebo ju naopak do okolia vydáva. Tieto procesy závisia na teplote medu a relatívnej vlhkosti okolitého vzduchu (Ptáček, 2003). Obsah vody je charakterizovaný ako indikátor starnutia a schopnosti udržať stabilitu počas skladovania (Kňazovická et al., 2008). Med musíme skladovať tak, aby nič neovplyvnilo jeho kvalitu – teda v chladnom, suchom a tmavom prostredí bez aromatických vôní alebo pachov. Pri teplote 25°C sa v mede znižuje hodnota enzýmov už po 8 – 10 mesiacoch. Dlhodobé skladovanie medu si preto v každom prípade vyžaduje priestor chladnejší ako 20°C . Ak nie je med vo vzduchotesne uzavretých nádobách, v príliš vlhkom prostredí absorbuje do seba vzdušnú vlhkosť, čo môže viesť až k jeho skvaseniu. V skladovacej miestnosti má byť preto vlhkosť vzduchu pod 60 % (Bizub, 2007). Bežne v prírode

skladujú včelstvá med v oblasti plodišťa, kde je produkt nad plodom zaviečkovaný. Je tak chránený proti akýmkoľvek vplyvom vlhkosti okolitého vzduchu (Ptáček, 2003). Rovnako ako vzdušnú vlhkosť absorbuje med aj rôzne pachy. Správne vytočený a uskladnený med sa dá bez ujmy na jeho kvalite skladovať až 4 roky (Bizub, 2007). Dá sa teda povedať, že čím je vody v mede menej, tým je med kvalitnejší (Bednář, 2007).

Falšovanie medu prídavkom vody nie je bežné z dôvodu rizika nežiaducej fermentácie a tiež preto, že jej nadbytok by sa prejavil na výslednej konzistencii medu. K zvýšenému obsahu vody môže dochádzať pri skoršom medobraní (Suhaj, Kováč, 1999, Bogdanov, Martin, 2002, Costa et al., 1999). Med s vyšším obsahom vody je náchylný na nežiaducu fermentáciu, kazenie a stratu arómy (Costa et al., 1999).

KRYŠTALIZAČNÉ CHARAKTERISTIKY

Kryštalizačné charakteristiky medov môžu slúžiť ako autentifikačné ukazovatele pôvodu medu. Napríklad med z repky a púpavy má vysoký obsah glukózy a rýchlo kryštalizuje, kým med z agátu má veľmi vysoký obsah fruktózy a nekryštalizuje niekoľko rokov. Vôbec nekryštalizuje med z nysa a vysoký obsah fruktózy má aj med z kvetov šalvie a gaštanu.

Niektoré medy vresovitých rastlín majú tixotropné vlastnosti (trepaním sa stekujú) a podľa toho ich možno identifikovať (Haeusler, Montag, 1989).

SACHARIDY

Sacharidy tvoria 95 – 99 % sušiny medu a sú jeho majoritnou zložkou (Přidal, 2003a). Už v antických dobách sa med falšoval najmä prídavkom koncentrátov hroznových štiav, neskôr prídavkami cukrových roztokov do takej miery, že pôvodný obsah medu nepresiahol ani 15 % (Ashurst, Dennis, 1996).

Objem výrobku možno nepoctivo zväčšovať prídavkom lacnejších roztokov cukrov alebo sirupov, prikrmovaním včiel takýmito roztokmi alebo tuhým cukrom, alebo prípravou umelých medov, napríklad zahrievaním roztoku sacharózy s kyselinou mliečnou, pričom sa hydrolyzuje sacharóza na glukózu a fruktózu a pridáva sa vodný extrakt kukuričného peľu za účelom získania chuti a vône medu. Prikrmovanie včiel cukrom alebo sirupmi v mnohých krajinách nie je povolené. Med vzniknutý týmto spôsobom je bledej farby a má nedefinovanú chuť. Hoci má med vzniknutý z prikrmovania včiel vyšší obsah sacharózy ako normálny med, profil sacharidov je porovnateľný ako v pravom mede. Med získaný v čase prikrmovania včiel má deficitné minoritné komponenty, ktoré pochádzajú z rastlinných zdrojov, z ktorých včely med pripravujú. Dochádza najmä k zníženiu aktivity kyslej fosfatázy a obsahu aminokyselín (okrem prolínu, ktorý pochádza od včiel), oligosacharidov, minerálnych látok a vitamínov (Haeusler, Montag, 1989).

Medová chuť sa dá modelovať aj zahrievaním roztoku monosacharidu s fenylalanínom, keďže takmer všetky fenylloctové estery sú známe medovou chuťou. Niektoré postupy prípravy umelých medov sú patentované (Ashurst, Dennis, 1996). Vo všeobecnosti sú známe receptúry prípravy umelých medov, ktoré vychádzajú z prípravy príslušného vodného extraktu kvetov a

rozpustení sacharózy v tomto extrakte po krátkom povarení.

Pri falšovaní medu glukózovými sirupmi dochádza k celkovému zvýšeniu obsahu glukózy a tým aj k vyššej náchylnosti medu vykryštalizovať. Ak obsah glukózy presiahne 40 %, vzorka medu sa považuje za falšovanú (FAO Food and Nutrition Paper 14/8 1986).

Pomer fruktózy a glukózy má byť 1 a vyšší (do 1,2).

Prídavok sacharózy možno identifikovať zistením profilu sacharidov v mede a podľa zvýšeného obsahu sacharózy nad 5 % (limit Codex Alimentarius a Potravinového kódexu SR), v niektorých typoch medu je však dovolený obsah sacharózy 10 % napr. agát biely (*Robinia pseudoacacia*), lucerna siata (*Medicago sativa*), a 15 % levandule (*Lavandula spp.*) a borák lekársky (*Borago officinalis*). Nepovolený prídavok sacharózy do medu možno stanoviť aj nepriamo na základe zníženia obsahu minoritných zložiek medu (markerov: acetylcholínu, kyseliny glukónovej, bielkovín, minerálie, vitamínov, aminokyselín a enzýmov glukózooxidázy, diastázy a invertázy), alebo na základe zvýšenia obsahu HMF, ktorý sa v invertných cukroch vyskytuje ako výsledok reakcie fruktózy s kyselinami, ktoré sa podieľajú na hydrolýze sacharózy. (White et al., 1986). Veľmi často sa na falšovanie medu používa fruktózový sirup, ktorý sa pripravuje enzymaticky izomerizáciou glukózy na fruktózu v kukuričnom sirupe. Tento produkt je komerčne dostupný, lacný a svojim zložením sa veľmi podobá zloženiu sacharidov v mede. Detekcia prídavku fruktózového sirupu a ostatných enzymaticky pripravených sirupov do medu je pomerne obtiažna, pretože pri tomto procese hydrolýzy sacharózy nedochádza k zvýšenej tvorbe HMF ako v prípade sirupov pripravených kyslou hydrolýzou. Možnosti identifikácie prídavku enzymaticky pripravených invertných cukrov spočívajú v mikroskopickom prešetrení produktov enzymatickej činnosti, polarografickom stanovení invertných cukrov v mede, alebo štúdiom obsahu disacharidov (izomaltóza) a trisacharidov v mede. Pomer maltózy a izomaltózy v normálnych medoch býva od 0,11 do 0,57, kým v medoch s fruktózovými sirupmi je vyšší v intervale od 0,98 do 3,22. Pomer nad 0,51 možno považovať za indikáciu pre med falšovaný fruktózovými sirupmi (Lipp et al., 1988). Preukázateľným markerom prídavku škrobových ako aj invertných sirupov je anhydrid difruktózy, pseudodisacharid produkovaný kondenzáciou dvoch molekúl fruktózy pri zvýšenej teplote (Montilla, 2006, Ruiz-Matute, 2007). Prídavok sacharózy z cukrovej repy v súčasnej dobe nie je veľmi rozšírený najmä pre vysokú cenu repného cukru, ale aj pre menej obtiažnu detekciu. Prídavok sacharózy v mede sa môže detegovať podľa jej zvýšeného obsahu, prípadne aj podľa obsahu rafinózy a niektorých galaktózu obsahujúcich oligosacharidov. Podobne táto analýza umožňuje aj rozlíšenie medu z kvetov a medovice. Väčšina dostupných metód však umožňuje detekciu prídavku sirupov do medu nad 10 %. Na základe stanovenia oligosacharidov pochádzajúcich z fruktózových sirupov, hydrolyzátoz škrobu z kukurice, zemiakov obilia a ryže možno identifikovať až 1 % prídavok uvedených sirupov do medu (Lipp et al., 1988, Morales, 2008).

Analýza profilu sacharidov je aplikovateľná aj na charakterizáciu botanického pôvodu medu. Pre

slnečnicový med je narp. charakteristický nižší obsah disacharidov oproti ostatným medom, agátový med sa vyznačuje dominantným obsahom fruktózy (Kukurová, 2004, Consonni, 2008). Pre niektoré medovicové medy je charakteristická vyššia koncentrácia minoritných sacharidov, napr. rafinózy, (Prodoliet, Hischenhuber, 1998), melezitózy, erlózy alebo l-kestózy (Singhal, Kulkarni, Rege, 1997). Melezitóza a erlóza sú pravotočivé cukry, kým ostatné sacharidy v pravom nektárovom mede sú ľavotočivé. Tým je možná polarimetrická identifikácia medovicového medu. Melezitóza sa nenachádza v iných medoch, ale v malom množstve ju možno zistiť v gaštanovom mede (Corradini, 1997) alebo v medoch z ovocných stromov (Prodoliet, Hischenhuber, 1998), ale aj v medovicom mede z červeného smreku, no závisí to aj od druhu producenta a pravdepodobne i na teplotných a vlhkostných podmienkach (Vesely et al., 2003). Rafinóza nebola identifikovaná v medoch z kvetov ovocných stromov. Vyššie koncentrácie erlózy a gentiobiózy boli zistené v medoch z lucerny a ďateliny (Prodoliet, Hischenhuber, 1998). Medovicový med obsahuje oproti kvetovému medu menej glukózy a fruktózy a viac izomaltózy a oligosacharidov, titrovateľných kyselín, minerálnych látok (popola) a dusíka (Tomka, 1997).

ORGANICKÉ KYSELINY

Organické kyseliny sú obsiahnuté vo všetkých druhoch medov a spôsobujú kyslú chuť. Celkovú kyslosť medu môžeme vyjadriť hodnotou pH. Medy majú priemerné pH od 3,9 do 4,0, pričom nektárové medy sú kyslejšie a medovicové môžu dosahovať až pH 6,1 (Vesely et al., 2003). Kyslosť medu sa vyjadruje v miliekvivalentoch (mekv) na 1 kg medu, ktoré udáva smernica EU a PK SR a podľa sústavy SI predstavuje mmol.kg⁻¹ medu. PK SR a Európska smernica týkajúca sa medu povoľuje maximálny obsah kyselín do 50 mekv.kg⁻¹ a 80 mekv.kg⁻¹ pre pekársky med (Výnos MP SR a MZ SR č. 1188/2004 - 100, 2004; Council Directive 2001/110/EC, 2001). K zmene pH dochádza pokiaľ je med zriedený telovými tekutinami, ktoré obsahujú veľké množstvo pufrov (Bittner 2007; Bíreš et al., 2007). Medzi hodnotou pH a obsahom kyselín neexistuje významná korelácia z dôvodu rôznej tlmovej schopnosti prítomných organických kyselín a minerálnych látok (Singhal et al., 1997).

AMINOKYSELINY

V mede nachádzame až 13 druhov aminokyselín vrátane esenciálnych (Demeter, 2007) ako sú fenylalanín, lyzín, leucín, alanín, valín, arginín, treonín, serín, glycín, cystín, metionín, kys. asparagová, kys. glutámová a ďalšie kyseliny (Prídal, 2003a). Najviac aminokyselín sa nachádza v zmiešaných medoch. Najviac zastúpenou aminokyselinou je prolín, vyskytuje sa v medoch v koncentrácii 200 – 500 mg.kg⁻¹ (Vesely et al., 2003). Obsah prolínu v mede súvisí so stupňom spracovania nektáru včelami. Z tohto dôvodu sa prolín často používa ako indikátor falšovania medu (Ruoff et al., 2007). Vyššie obsahy prolínu možno nájsť najmä v slnečnicovom mede, nižšie obsahy v agátovom a eukalyptovom mede. Pravý med by mal obsahovať viac ako 180 mg.kg⁻¹ prolínu. Nižší

obsah prolínu môže znamenať, že med bol falšovaný sacharidmi (**Bogdanov, Martin, 2002**).

Na zistenie botanického pôvodu medonosných rastlín sa využila aj identifikácia medu podľa zloženia aminokyselín a niektoré ich pomery (kyselina asparágová/ prolín, prolín/ fenylalanín a pod.), alebo aj pomery amidov k fenylalanínu (**Singhal, Kulkarni, Rege, 1997**). Na základe analýzy aminokyselín je možné taktiež rozlíšenie medov podľa geografického pôvodu (**Consonni, 2008**). Pre pomerne malé rozdiely v zložení aminokyselín v jednotlivých druhoch medu je táto metóda problematická, spoľahlivejšie výsledky sa však získajú po spracovaní výsledkov vhodnými štatistickými metódami (napr. analýza kanonických korelácií). (**Corradini, 1997**).

5 – HYDROXYMETYLFURFURAL (HMF)

Šetrnosť tepelného ošetrenia medu je možné overiť prešetrením aktivity enzýmov medu alebo na základe stanovenia vzniknutého množstva HMF (**Tosi et al., 2008**). Normálna úroveň HMF v mede je pomerne nízka (prevažne pod $10 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) a zahrňuje aj hodnoty spôsobené vplyvom teploty pri získavaní medu z plástov, zahrievania potrebnom pri filtrácii a pasterizácii medu a skladovaní medu počas 1 roka. Vyššie hodnoty HMF indikujú použitie vyšších teplôt pri spracovaní a skladovaní medu. (**FAO Food and Nutrition Paper 14/8 1986**).

HMF je cyklický aldehyd, ktorý sa tvorí kyslým rozkladom monosacharidov, predovšetkým fruktózy. Podľa odbornej literatúry zloženie a chemické vlastnosti medu ovplyvňujú výsledné hodnoty HMF (pH, obsah fruktózy a kyselín) (**Bartalis, 2008**). Výrazný nárast HMF je spojený so zahrievaním medu na teplotu prevyšujúcu 30°C (**Prídal, 2003a**). Počas ohrievania sa menia nielen fyzikálne, ale aj chemické vlastnosti medu (**Bartalis, 2008**). Tepelným spracovaním medu sa môžu degradovať vitamíny, bionutriká, nastáva súbežne pokles v aktivite diastázy a zvýši sa obsah HMF. Zahrievanie medu sa uskutočňuje dvomi rôznymi spôsobmi: v odvodušených komorách pri teplote $45 - 50^\circ\text{C}$ počas 4 – 7 dní alebo ponáraním sudov s medom do horúcej vody. Hoci druhá ohrevná metóda je viac účinná, prvá je najbežnejšia (**Kukurová et al., 2006**). Zasadou má byť, že tepelné ošetrenie medu nesmie spôsobiť zmeny v kvalite. Proces ohrievania medu treba mať pod kontrolou, aby sa zachovali všetky biologické vlastnosti a celková kvalita medu (**Bartalis, 2008**).

Podľa EU Directive 110/2001 obsah HMF by nemal byť viac ako $40 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ s výnimkou medov pochádzajúcich z krajín alebo oblastí s tropickou teplotou okolia, kedy obsah HMF nesmie prevyšovať $80 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ (**Výnos MP SR a MZ SR č. 1188/2004 - 100, 2004**). Vyššie hodnoty HMF môžu poukazovať tiež na falšovanie medu invertným sirupom z cukrovej repy alebo trstiny. Za nezvratný dôkaz prídavku invertného sirupu sa považujú hodnoty HMF vyššie ako $500 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ (**Singhal, Kulkarni, Rege, 1997**).

STABILNÉ ISOTOPY UHLÍKA

Analýza stabilného pomeru izotopov uhlíka je osvedčenou a spoľahlivou metódou odhaľovania falšovania medu prídavkom kukuričného alebo trstinového sirupu (**Elfein, 2008, Brookes et al., 1991**). Princípom metódy je rozdielna schopnosť rastlín metabolizovať vzdušný $^{13}\text{C}_2$, preto sa C4 rastliny, kam patrí kukurica aj trstina, odlišujú

výrazne nižšími hodnotami pomeru stabilných izotopov uhlíka $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ od skupiny rastlín C3, kam patria všetky rastliny produkujúce nektár. Pomer stabilných izotopov uhlíka sa vyjadruje ako hodnota $\delta^{13}\text{C}$. V nefalšovaných medoch $\delta^{13}\text{C}$ dosahuje hodnoty v priemere $-25,4\text{‰}$, kým v medoch upravovaných trstinovým alebo kukuričným sirupom hodnota $\delta^{13}\text{C}$ proporcionálne rastie podľa prídavku sirupu až k hodnotám samotného kukuričného sirupu $-0,7\text{‰}$ alebo trstinového cukru $-11,47\text{‰}$. Niektoré druhy medov, ako napr. citrusové medy, sa však vyznačujú nižšími hodnotami $\delta^{13}\text{C}$ ako je uvedený priemer tohto ukazovateľa. Z tohto dôvodu sa percento prídavku škrobových sirupov počíta z bielkovinovej frakcie medu. Uvedený spôsob identifikácie prídavku kukuričného sirupu je oficiálnou AOAC metódou (**Metóda 991.41 a 978-17**).

AROMATICKÉ LÁTKY

Autentifikácia botanického, resp. aj geografického pôvodu medu je možná na základe stanovenia charakteristických aromatických zložiek (prchavých látok) ako sú napríklad aldehydy (oktanal, nonanal, dekanal), estery (etylheptanoát, etyloktanoát, etylnonanoát, etyldekanoát), sulfidy (dimetyltrisulfid), alkoholy (heptanol, oktanol, nonanol, dekanol), kyslíkaté aromatické látky (benzaldehyd), étery, či ketóny (izoforón) (**Čajka et al., 2009**). Pre med z kvetov pomarančovníka je typické zastúpenie metylantranilátu, pre jedlý gaštan 3 – aminoacetofenónu, lipový med éter 3,9-epoxy-1,4-[8]-p- menthadiende, cis-rose oxid a terpén trans-8-p-mentén-1,2-diol, pre vresový med dehydrovomifoliol, eukalyptový med hexenylbutyrát a acetoin (**FAO Food and Nutrition Paper 14/8 1986**), tymiánový med fenylacetaldehyd, 1-fenyl-2,3-butándión, 3-hydroxy-4-fenyl-2-butanón, 3-hydroxy-1-fenyl-2-butanón, fenylacetónitril a karvakrol (**Alissandrakis et al., 2007**) a podobne. Na základe obsahu kyseliny salicylovej je možné rozlíšiť medovicový a nektárový med (**Daher, Gulaçar, 2009**). V súčasnosti sa preferujú komplexné stanovenia prchavých látok metódou plynovej chromatografie a štatistické spracovanie nameraných výsledkov.

MIKROSKOPICKÁ ANALÝZA

Identifikáciu botanického pôvodu medu a krajiny pôvodu možno vykonať mikroskopickým prešetrením peľových zrníček obsiahnutých v mede. Metódy hodnotenia a charakteristiky peľu v rôznych druhoch medu vydala Medzinárodná komisia biologických vied (**Loveaux, Mauriyo, Vorwohl, 1978**).

Rozlíšenie medovicového medu od nektárového je možné taktiež mikroskopicky identifikáciou charakteristických zložiek medovicového medu. Medovicový med obsahuje spóry čiernych plesní, huby, bunky rias a vyšší počet peľových zŕn z divo opelených druhov rastlín (**Prodoliet, Hischenhuber, 1998**).

ZÁVER

Falšovanie takmer vo všetkých prípadoch predstavuje pridávanie bezpečnej avšak menej hodnotnej zložky do výrobku. Med patrí k často falšovaným potravinám, pretože ide o prírodný produkt s limitovanou produkciou a

relatívne vysokou cenou. V posledných rokoch sa stále viac môžeme stretnúť s medmi nepravými alebo falšovanými (**Dračková et al., 2008**). Preto je problematika vývoja spoľahlivých metód autentifikácie medu a hľadania nových analytických parametrov na preukazovanie falšovania medu stále vysoko aktuálna.

LITERATÚRA

- ALISSANDRAKIS, E., TARANTILIS, P. A., HARIZANIS, P. C., POLISSIOU, M. 2007. Comparison of the Volatile Composition in Thyme Honeys from Several Origins in Greece. In *Journal of Agricultural and Food Chemistry Journal of Agricultural and Food Chemistry*, roč. 55, 2007, č. 20, s. 8152–8157.
- AOAC No. 44.4.18 Official Method 978.17. 2005. Corn and cane sugar products in honey, carbon isotope ratio mass spectrometric method, alternative II – continuous- flow method, First Action 1993. In: Horwitz, W. – Latimer, G. (Ed.): Official methods of analysis of AOAC International. 18th Ed.. Gaithersburg *AOAC International*, 2005, s. 33.
- AOAC No. 44.4.18, Official Method 991.41. 2005 C-4 Plant sugars in honey, internal standard stable carbon isotope ratio method, First Action 1991. In: Horwitz, W. – Latimer, G. (Ed.): Official methods of analysis of AOAC International. 18th Ed. Gaithersburg : *AOAC International*, 2005, s. 33.
- ASHURST, P. R., DENNIS, M. J. 1996. Food Authentication, Blackie Academic & Professional. London, Weinheim, New York, Tokyo, Melbourne, Madras, 399 s.
- BARTALIS, M. 2008. Vplyv tepla na kvalitu medu, In *Včelár*, roč. 82, 2008, č. 11, s. 164 – 166.
- BEDNÁŘ, M. 2007. Obsah vody v medu. In *Moderní včelař*, roč. 3, 2007, s. 19 – 20.
- BÍŘEŠ, J., BITTNER, L., ČIŽMÁRIK, J., GÁL, Ľ., KANTÍKOVÁ, M., KOPERNICKÝ, J., KRAJČÍ, M., MAČIČKA, M. 2007. Med je témou dňa. In *Včelár*, roč. 81, 2007, č. 9, s. 138 – 141.
- BITTNER, L. 2007. Použití medu při léčbě infikovaných ran. In *Včelařství*, roč. 60, 2007, č. 6, s. 150 – 151.
- BIZUB, F. 2007. Včelie produkty – med. In *Včelár*, roč. 81, 2007, č. 10, s. 146 – 147.
- BOGDANOV, S., MARTIN, P. 2002. Honey authenticity, In *Mitteilungen aus Lebensmittelunter-suchung und Hygiene*. roč. 93, 2002, č. 3, s. 232-254.
- BROOKES, S. T., BARRIE, A., DAVIES, J. E. 1991. A rapid $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ test for determination of corn syrups in honey. In *JAOAC*, roč. 74, 1991, č. 4, s. 627 – 629.
- BROŽEK, J. 2007. Včelí produkty III.. In *Moderní včelař*. roč. 1, 2007, č. 4, s. 18 – 19.
- CONSONNI, R., CAGLIANI, L. R. 2008. Geographical Characterization of Polyfloral and Acacia Honeys by Nuclear Magnetic Resonance and Chemometrics. In *JAFc*, roč. 56, 2008, s. 6873–6880.
- CORRADINI, C. et al.. 1997. Determination of honey authenticity and its botanical origin by micellar electrokinetic chromatography and HPLC. In *Proceedings of Euro food Chem IX, V3, Swiss Society of food and Environmental Chemistry, Interlaken*, 1997, s. 664 – 670.
- COSTA, L. S. M., ALBUQUERQUE, M. L. S., TRUGO, L. C., QUINTEIRO, L. M. C., BARTH, O. M., RIBEIRO, M., MARIA, C. A. B. 1999. Determination of non-volatile compounds of different botanical origin Brazilian honeys. In *Food Chemistry*. roč. 65, 1999, s. 347-352.
- COUNCIL DIRECTIVE 2001/110/EC of 20 December 2001 on the harmonization of the laws of the Member States relating to honey. Official Journal of the European Communities, 12.1.2002, L 10, s. 47-52.
- ČAJKA, T., HAJŠLOVÁ, J., PUDIL, F., RIDDELLOVÁ, K. 2009. Traceability of honey origin based on volatiles pattern processing by artificial neural networks. In *Journal of Chromatography A*, 1216, 2009, s. 1458-1462.
- DAHER, S., GÜLAÇAR, F. O. Analysis of Phenolic and Other Aromatic Compounds in Honeys by Solid-Phase Microextraction Followed by Gas Chromatography–Mass Spectrometry. In *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, roč. 56, 2008, č. 14, s. 5775-5780.
- DEMETER, Š. 2007. Prečo med? In *Včelár*, roč. 81, 2007, č. 4, s. 58 -59.
- DRAČKOVÁ, M., BENEŠOVÁ, J., BARTÁKOVÁ, K., VORLOVÁ, L. 2008. Využití blízké infračervené transflektční spektroskopie pro sledování parametrů jakosti medu. Bezpečnost a kvalita surovin a potravin. In *III. vědecká konference s mezinárodní účastí*, Nitra, s. 122 - 127.
- ELFEIN, L., RAEZKE, K. P. 2008. Improved detection of honey adulteration by measuring differences between $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ stable carbon isotope ratios of protein and sugar compounds with a combination of elemental analyzer – isotope ratio mass spectrometry and liquid chromatography – isotope ratio mass spectrometry ($\delta^{13}\text{C}$ -EA/LC-IRMS). In *Apidologie*, roč. 39, 2008, s. 574-587.
- FAO FOOD AND NUTRITION PAPER 14/8, Manuals of food quality control, 8. Food analysis: quality, adulteration, and tests of identity, FAO, Rome, 1986, s. 326.
- HAEUSLER, M., MONTAG, A. 1989. Isolation, identifikation and quantitative determination of the norisoprenoid (S)-(+)–dehydrovomifoliol. In *Zeitschrift fuer Lebensm. Unters. Forsch.*, roč. 189, 1989, č. 2, s. 113 – 115.
- HAJDÁKOVÁ, M. 1989. Med, In *Čítanie o správnej výžive*, SSPRV, Bratislava, 1989, s. 35.
- HÁJEK, J. 2005. Čínsky med nie je strašiak. Dostupné na internete. [14. február 2009] <<http://www.vcely.sk/index.php?name=News&file=article&s id=66>>
- CHLEBO, R. 2002. Mikroorganizmy v mede, In *Včelár*, roč. 76, 2002, č. 11, s. 170.
- JENDREJÁK, R. 2005. Včelársko – zdravotný rok – Júl. In *Včelár*, roč. 79, 2005, č. 7, s. 100 – 101.
- KŇAZOVICKÁ, V., KAČÁNIOVÁ, M., FIKSELOVÁ, M., SUDZINA, M., TRAKOVICKÁ, A., HAŠČÍK, P., PAVLIČOVÁ, S. 2008. Med vo vzťahu k bezpečnosti potravín. Bezpečnosť a kvalita surovín a potravín, In *III. vědecká konference s mezinárodní účastí*, Nitra, s. 278 – 283.
- KUKUROVÁ, K., KAROVIČOVÁ, J., GREIF, G., KOHAJDOVÁ, Z., LEHKOŽIVOVÁ, J. 2006. Determination of 5-Hydroxymethylfurfural after Winkler and by the HPLC Method for Authentication of Honey. In *Chemical paper*, roč. 60, 2006, s. 186 – 191.
- KUKUROVÁ, K., KAROVIČOVÁ, J., KOHAJDOVÁ, Z., BÍLIKOVÁ, K. 2008. Authentication of honey by

multivariate analysis of its physico-chemical parameters. In *Journal of Food and Nutrition Research*, roč. 47, 2008, s. 170-180.

KUKUROVÁ, K., KAROVIČOVÁ, J., KOHAJDOVÁ, Z., KOSTIČOVÁ, M., MASTIHUBA, V., KUKLIŠOVÁ, J. 2004. Analýza fyzikálno – chemických parametrov v mede z hľadiska kvality a autenticity. In *Bulletin potravinárskeho výskumu*, roč. 43, 2004, č. 3-4, s. 201-217.

LIPP, J., ZIEGLER, H., CONRADY, E. 1988. Detection of high fructose and other syrups in honey using HPLC. In *Zeitschrift fuer Lebensmittel Unters. Forsch.*, roč. 187, 1988, č. 4, s. 334 – 338.

LOVEAUX, J., MAURIYIO, A., VORWOHL, G. 1978. Methods of melissopalynology. In *Bee World*, roč. 59, 1978, č. 4, s. 139 – 157.

MAČIČKA, M. 2007. Cesty k lepšiemu odbytu medu, In *Včelár*, roč. 81, 2007, č. 10, s. 150-151.

MONTILLA, A., RUIZ-MATUTE, A. I., SANZ, M. I., MARTINEZ – CASTRO, I. – del CASTILLO. 2006. Diffructose anhydrides as quality markers of honey and coffee. In *Food Research International*, roč. 39, 2006, č. 7, s. 801-806.

MORALES, V., CORZO, N., SANZ, M. L. 2008. HPAEC-PAD oligosaccharide analysis to detect adulterations of honey with sugar syrups. In *Food Chemistry*, roč. 107, 2008, s. 922-928.

PIŠKULOVÁ, J. 2003. Organické kyseliny v medu. In *Včelařství*, roč. 56, 2003, č. 11, s. 286 – 287.

POTRAVINOVÝ KÓDEX SLOVENSKEJ REPUBLIKY, 3. časť, hlava č. 9 týkajúca sa medu: Výnos č.1188/2004-100 z 28. apríl 2004. Dostupné na internete.[14. február 2009] <http://www.svssr.sk/sk/legislativa/kodex/kodex.asp>

PRODOLJET, P., HISCHENHUBER, C. 1998. Food authentication by carbohydrate chromatography, *Z. Lebensm. Unters. Forsch. A*, roč. 207, 1998, s. 1 – 12.

PŘIDAL, A. 2003. Včelí produkty a. Brno: Mendelova zemědělská lesnická univerzita, 120 s.

PŘIDAL, A. 2003. Včelí produkty-cvičení b. Brno: Mendelova zemědělská lesnická univerzita, 60 s.

PTÁČEK, V. 2003. Vliv vlhkosti vzduchu na kvalitu medu. In *Včelařství*, roč. 56, 2003, č. 10, s. 237.

RUIZ – MATUTE, A. I. – SORRIA, A. C. – MARTINEZ – CASTRO, I. – SANZ, M. I. 2007. A New Methodology Based on GC-MS To Detect Honey Adulteration with Commercial Syrups. In *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, roč. 55, 2007, č. 18, s. 7264-7269.

RUOFF, K., LUGINBÜHL, W., BOGDANOV, S., BOSSET, J. O., ESTERMANN, B., ZIOLKO, T., KHERADMANDAN, S., AMADÓ, R. 2007. Quantitative determination of physical and chemical measurands in honey by nesr – infrared spectrometry. In *Original paper*, roč. 225, 2007, s. 415 – 423.

SINGHAL, R. K., KULKARNI, P. R. – REGE, D. V. 1997. Handbook of indices of food quality and authenticity, Woodhead Publishing Limited, Cambridge, 1997, 561 s.

SINGHAL, R. S., KULKARNI, P. R., REGE, D.V. 1997. Handbook of indices of food quality and authenticity. In *Woodhead Publishing Ltd*, Cambridge, 1997, s. 358-385.

SMERNICA RADY 2001/110/ES z 20. decembra 2001 o mede, In *Úradný vestník Európskej únie*, s. 179 – 184.

Dostupné na internete.[14. február 2009] <http://www.vcelari.sk/legislativa/smernica2001L110SK.pdf>

SUHAJ, M., KOVÁČ, M. 1999. Metódy identifikácie falšovania a autentifikácie potravín. In *Metodologická príručka v elektronickej forme*, Bratislava: VÚP, 227 s.

TEXTL, F. 2007. V čínskem medu jsou stále antibiotika, zaznelo na 10. valné hromadě EPBA, In *Včelařství*, roč. 60, 2007, č. 8, s. 210.

TOMKA, K. 1997. Včelí med. In *Potraviny v praxi*, roč. 3, 1997, s. 10 – 13.

TOSI, E., MARTINER, R., ORTEGA, M., LUCERO, H., RÉ, E. 2008. Honey diastase activity modified by heating. In *Food Chemistry*, roč. 106, 2008, s. 883 – 887.

VESELÝ, V., BACÍLEK, J., ČERMÁK, K., DROBNÍKOVÁ, V., HARAGSIM, O., KAMLER, F., KRIEG, P., KUBIŠOVÁ, S., PEROUTKA, M., PTÁČEK, V., ŠKROBAL, D., TITĚRA, D. 2003. In *Včelařství*. Praha: Nakladatelství Brázda, s.r.o., 2003, 272 s.

VÝNOS č. 1188/2004-100: Výnos Ministerstva pôdohospodárstva Slovenskej republiky a Ministerstva zdravotníctva Slovenskej republiky z 28. apríla 2004 č. 1188/2004-100, ktorým sa vydáva 9. hlava Potravinového kódexu Slovenskej republiky upravujúca med, s. 43-48.

WHITE, J. W. et al.. 1986. Detection of beet sugar adulteration of honey, In *JAOAC*, roč. 69, 1989, č. 4, s. 652 – 654.

Kontaktná adresa:

Ing. Kristína Kukurová, STU, FCHPT, Ústav biotechnológie a potravín, Radlinského 9, 812 37 Bratislava

ALERGÉNY A BEZPEČNOSŤ DEHYDROVANÝCH POTRAVÍN ALLERGENS AND SAFETY OF DEHYDRATED FOOD

*Lubomír Lopašovský, Martina Čičmancová,
Jaroslav Žiak, Alica Bobková, Lucia
Zeleňáková, Jozef Golian, Radoslav Židek*

ABSTRACT

The work was carried out in the food company in the territory of the Slovak Republic, which focuses on the production of dehydrated culinary products. The object of the work was to monitor the incidence of mandatory legislative declarable allergenic food ingredients processed in the company, to examine the extent of probability and the risk of cross-contamination of produced dehydrated products by allergenic ingredients in the production process on the same production line, to apply possible procedures to eliminate cross-contamination and then

determine which food allergens the company is obliged to declare on the packaging of products. The cross-contamination by allergenic ingredients in the process of production of dehydrated products was evaluated through the validation of cleaning process manufacturing facilities. Based on the detected information the producer is always obliged to declare on the packaging of dehydrated products the food allergens that are present in the raw materials involved in the composition of the product. In order to protect the health of allergic consumers, we recommend the attention of all of products and the possible cross-contamination by allergens in the production process through prevention indications: „the product may contain traces of ... “ following allergens: gluten, milk including lactose, eggs, celery, soya, crustaceans and in the case of hard stock also fish.

Key words: food allergy, food intolerance, food allergens, cross-contamination, labelling of allergenic food ingredients, dehydrated food.

ÚVOD

Alergia na potraviny sa stáva fenoménom, význam ktorého v poslednej dobe stále narastá. V porovnaní s toxickými látkami, ktoré ohrozujú všetkých konzumentov potravín, sú alergény rizikové len pre určitú skupinu konzumentov. Preto nemožno potraviny s obsahom alergénnych zložiek považovať za zdravú škodlivé. Je však vhodné, a v mnohých prípadoch i povinné, na prítomnosť alergénu v potravine spotrebiteľov upozorniť. Netoxické reakcie spôsobujú imunitné alebo neimunitné mechanizmy (potravinová alergia – hypersenzitívnosť alebo intolerancia) (Kayserová, 2004). Všetky ťažkosti spojené s požitím potravy sa laicky označujú ako „alergie na potraviny“ (Bartůňková, 1998).

Prvýkrát použil pojem alergia viedenský pediater Clemens von Pirquet v roku 1906. U svojich pacientov si totiž všimol zvláštne reakcie na látky, medzi ktoré zaradil prach, peľ a niektoré potraviny (Vido et al., 2007).

Medzi bežné potravinové alergény patria alergény kravského mlieka, ovocia (citrusy, kivi, jahody a i.), strukovín (predovšetkým arašidy – podzemnica olejná a sójové bôby), vajec, kôrovcov, orechov (mandle, lieskové orechy, vlašské orechy, kešu, pistácie), rýb, zeleniny (napr. zeler), pšenice a iných obilnín. Medzi ďalšie alergénne zložky potravín patrí oxid siričitý a siričitany, niektoré enzýmy, ale aj farbivá (syntetické i prírodné), konzervačné látky, antioxidanty, zahusťovadlá, a i.

Ferenčík et al. (2006) definujú alergén ako antigén, ktorý je schopný u precitlivenejších ľudí navodiť alergickú (hypersenzitívnu) odpoveď. Potravinové alergény môžu byť rastlinného alebo živočíšneho pôvodu. Potravinová intolerancia vzniká v dôsledku abnormálnej neimunologickej reakcie po požití potravy (Novotná, 2005). Pri falošnej potravinovej alergii (pseudoalergii) sú klinické prejavy ako pri pravej potravinovej alergii vyvolané vysokým obsahom biogénnych amínov (histamín, kadaverín, katecholamíny, putrescín, tyramín) (Kayserová, 2004). Histamín je biogénny amín, ktorý sa v určitom množstve prirodzene vyskytuje v ľudskom organizme, ale vzniká aj v potravinách bohatých na

proteíny, a to bakteriálnym rozkladom (Sabolová et al., 2007).

Psychogénna intolerancia potravín (vracanie, ale i kožné prejavy) nie je podložená imunitným mechanizmom, v závažných prejavoch môže vyjadriť spojenie nervového (CNS) a imunitného systému (Hrubíško et al., 2003). Podľa prieskumu vykonaného vo Veľkej Británii (Robinson, 2002) 20 % ľudí pozoruje na sebe prejavy intolerancie alebo alergie na potraviny alebo skupinu potravín. Podľa Lehrera (2004) potravinovou alergiou na celom svete trpí 6-8 % detí do 3 rokov a 2-8 % dospelých. Až 30-40 % ľudí udáva „alergickú“ reakciu na niektorú z potravín, avšak výskyt skutočnej potravinovej precitlivenejosti je podstatne nižší (Holt, 1998). Výskyt skutočnej potravinovej alergie teda nie je mimoriadne vysoký, závažná je však úmrtnosť: napríklad v Dánsku je to až 5 %, vo Francúzsku zomiera na potravinovú anafylaxiu až 150 ľudí ročne (Björkstén, 2001). Nárast výskytu alergických ochorení je daný rýchlou zmenou nášho životného prostredia v posledných desaťročiach (Kayserová, 2000).

Pre strednú Európu je typická alergia na mlieko, vajcia, plody mierneho pásma, hlavne orechy, v USA majú najväčšie problémy s alergiou na arašidy (Keleová, 2005). Orechy sú častou príčinou potravinovej alergie, ktorá ovplyvňuje približne 1 % všeobecnej populácie vo Veľkej Británii a v USA (Crespo et al., 2006). Za posledných 5 rokov sa zdvojnásobila prevalencia alergie na arašidy u amerických detí mladších ako 5 rokov (Novotná, 2005). Nad 90 % IgE – sprostredkovaných potravinových alergií v detstve je spôsobených 8 potravinami: kravské mlieko, slepačie vajcia, sója, arašidy (podzemnica olejná), vlašské orechy, pšenica, ryby a mäkkýše (Allen et al., 2006). V našej zemepisnej oblasti strednej Európy, ale aj Škandinávie, sú veľmi časté skrížené alergie medzi peľom a potravinami rastlinného pôvodu. Postihnutých tu je približne 50 % dospelých peľových alergikov (Ettlerová, 2004).

Častou príčinou potravinovej alergie sú orechy (Crespo et al., 2006). Zistilo sa ale (Drápal et al., 2005), že alergenicita lieskových orechov sa dá zredukovať pražením.

Medzi potraviny s významným alergizujúcim účinkom patrí aj sója. Obsahuje alergény stabilné voči tepelnému spracovaniu, voči enzymatickej degradácii (alergény I. triedy) a alergény II. triedy, ktoré skrížene reagujú s peľovými alergénmi. Tepelne upravené sójové výrobky sa všeobecne považujú za hypoalergénne (Strážnická et al., 2000). Hlavným alergénom je Gly m 1, ktorý je obsiahnutý v 7S globulínovej frakcii (Renčová, 2006). Priama alergia na sójovú bielkovinu je veľmi zriedkavá. V drvivej väčšine prípadov sa alergia na sóju vyskytuje u detí a sprevádza alergiu na proteíny kravského mlieka alebo atopickú dermatitídu (Sabolová a Šesták, 2004).

Zeler je široko používaný surový aj varený. Obsahuje alergény labilné voči teplu (Bet v 1 homológny alergén), ako aj alergény tepelne odolnejšie (profilín). Štúdie preukázali, že varením alebo mikrovlnným ohrevom si zeler ponecháva určitú alergenicitu (Drápal et al., 2005).

Bežné semená obilnín sú známymi alergénmi. Zараďujeme medzi ne jačmeň, pšenicu, raž, kukuricu,

ryžu, ovos, proso. Bezpečná prahová hranica pre obsah lepku v bezpečných potravinách je stále predmetom vedeckých diskusií (**Rimárová a Lovayová, 2007**). Od klasických alergických reakcií treba odlišiť tzv. celiakiu, pri ktorej organizmus reaguje na bielkoviny jačmeňa, pšenice a raže – glutén a gliadin. Toto ochorenie je dané vrodennou poruchou metabolizmu (**Pružinec, 2002**).

Kravske mlieko je príčinou potravinových alergií viazaných zvlášť na detský vek. Hlavnými alergénmi kravskeho mlieka sú kazeíny obsiahnuté v mliečnej zrazenine a α -laktalbumín a β -laktoglobulín (**Drápal et al., 2005**). Alergia na kozie mlieko alebo súčasne aj na ovčie mlieko u detí, ktoré nie sú alergické na kravske mlieko, má stúpajúcu tendenciu (**Bidat et al., 2003**). S vrodenným deficitom laktázy sa môžeme stretnúť u novorodencov (**Čierna, 2007**).

Vajce patrí k významným zdrojom alergénov. Hlavnými alergénmi vaječného bielka sú ovomukoid, ktorý je relatívne rezistentný voči teplu a tráviacim enzýmom, a ovoalbumín, ovotransferín a lyzozým, ktoré sú relatívne citlivé voči týmto vplyvom (**Leibold, 1993**).

Ryby a ostatné vodné živočíchy patria k významným príčinám závažných alergických reakcií. Hlavné alergény rýb (parvalbumín), kôrovce a mäkkýšov (tropomyozín) sú prevažne termostabilné a odolné voči enzymatickej degradácii. Pri tepelnej úprave nedochádza k strate alergenicity (**Kvasničková et al., 2005**). Hlavný alergénny proteín mäkkýšov, tropomyozín, je rovnaký ako u kôrovce a prípady skríženej alergie mäkkýše/kôrovce sú časté (Smernica Komisie 2006/142/ES).

Ak u konzumenta vznikne alergická reakcia na potravinu, ktorá obsahovala konkrétny alergén a pritom ho nemala uvedený na obale, výrobca nesie trestnoprávnú zodpovednosť za ublíženie na zdraví (**Kayserová, 1999**).

Podľa smernice Európskeho parlamentu a Rady 2003/89/ES musia byť na označení potravín uvedené všetky zložky, aj tie, ktoré boli použité v procese výroby. Väčšina alergických jedincov reaguje na obmedzený počet typov potravín. Je nutné však brať do úvahy tiež krížové reakcie medzi príbuznými a nepříbuznými skupinami potravín (**Kvasničková, 1998**).

Podľa smernice Európskeho parlamentu a Rady 2003/89/ES sa každá látka použitá pri výrobe potravín, prítomná v hotovom výrobku hoci aj v zmenenej forme, ktorá pochádza zo zložiek uvedených v prílohe IIIa, bude považovať za zložku a bude zreteľne vyznačená na etikete s jednoznačným odkazom na názov zložky, z ktorej pochádza.

Výnos Ministerstva pôdohospodárstva Slovenskej republiky a Ministerstva zdravotníctva Slovenskej republiky zo 7. januára 2008 č. 2319/2007-100 v zhode so smernicou Komisie 2007/68/ES (vychádzajúcou zo smernice 2000/13/ES) obsahuje zoznam potravinových zložiek, ktoré musia byť vždy deklarované na obale.

Cieľom našej práce bolo zhodnotiť výskyt alergénnych potravinových zložiek vo vybranom potravinárskom podniku, zameranom na výrobu dehydrovaných výrobkov, a aplikáciou platnej legislatívy určiť, ktoré alergény zo zoznamu alergénnych potravinových zložiek uverejnených v prílohe IIIa k smernici 2000/13/ES, v znení neskorších predpisov, je výrobca povinný deklarovať na obale potravín, a navrhnúť spôsob riešenia eliminácie, respektíve minimalizácie, krížovej kontaminácie alergénymi

zložkami spracovávaných surovín na prijateľnú (povolenú) koncentráciu (limity podľa EÚ a podnikových noriem) v procese výroby dehydrovaných výrobkov.

MATERIÁL A METODIKA

Praktická časť práce bola realizovaná v priestoroch potravinárskeho podniku na území Slovenskej republiky, ktorý sa zameriava na výrobu dehydrovaných výrobkov.

Na základe deklarácie alergénov (obilniny s obsahom lepku, kôrovce, vajcia, ryby, arašidy, sójové zrná, mlieko vrátane laktózy, orechy, zeler, horčica, sezamové semená, oxid siričitý, vlní bôb, mäkkýše) obsiahnutých v jednotlivých surovinách nakupovaných od jednotlivých dodávateľov, aktualizovať zoznam dodávaných surovín podľa obsahu alergénnej zložky, ktorú dodávateľ uvádza v zaslanom formulári (MAD – Major Allergen Declaration) a zistené skutočnosti spracovať vo forme tabuliek.

Prostredníctvom internej databázy zistiť, do ktorých hotových výrobkov vstupuje surovina obsahujúca daný alergénny zložku, pretože tieto výrobky budú obsahovať daný alergén. Takto zistiť, ktoré výrobky obsahujú prirodzené daný alergénny zložku, a ktoré výrobky prirodzené alergény neobsahujú.

Po oboznámení sa s technologickým procesom výroby dehydrovaných výrobkov v podniku určiť miesta a zariadenia vo výrobnom procese, ktoré predstavujú možné riziko vzniku krížovej kontaminácie alergénymi zložkami. Vzorky výrobkov, ktoré sa spracovávajú po alergénnom výrobku, odoberať za štandardných podmienok prostredia (teplota, vlhkosť vzduchu, prašnosť prostredia) vo výrobných priestoroch. Odoberať prvé dávky výrobkov z plniacich liniek, respektíve prvé dávky polovýrobkov z miešačky. Vzorky označiť a v podnikovom laboratóriu vykonať kvalitatívny dôkaz a kvantitatívne stanovenie alergénov pomocou analytickej metódy ELISA, na zistenie potenciálneho výskytu alergénov pochádzajúcich z krížovej kontaminácie po predchádzajúcom výrobku.

Následne vyhodnotiť množstvá zistených alergénov a navrhnúť možné riešenia na elimináciu krížovej kontaminácie alergénymi zložkami.

VÝSLEDKY

Suroviny

V sledovanom potravinárskom podniku sa používajú v prevažnej miere sypké a suché suroviny, predstavujúce základný zdroj alergénnej zložky. Dodávané suroviny sme rozdelili na dve skupiny (tabuľka 1): na „bezalergénne“ a na suroviny obsahujúce aspoň jednu alergizujúcu zložku. Táto druhá skupina je rozčlenená na jedenásť podskupín podľa obsahu konkrétnej alergizujúcej zložky (glutén, mlieko, vajcia, sója, ryby, kôrovce, sezam, zeler, arašidy, horčičné semeno, mäkkýše, vlní bôb a suroviny ošetrované SO₂).

Výrobky

Z hľadiska alergénnosti môžeme výrobky rozdeliť na dve skupiny. Prvú skupinu tvoria výrobky, na výrobu ktorých sa používajú len suroviny, ktoré neobsahujú žiadnu alergizujúcu zložku („bezalergénové“ výrobky), ostatné výrobky sa vyrábajú spracovávaním surovín, ktoré sú

Tabuľka 1 Rozdelenie surovín podľa obsahu alergénnej zložky

Bezalergénové suroviny	Suroviny obsahujúce glutén	Suroviny obsahujúce mlieko	Suroviny obsahujúce vajcia	Suroviny obsahujúce sóju	Suroviny obsahujúce ryby
Paprika koreňová mletá	Bielkovina textúrovaná pšeničná	Suchý kvas	Cestovina špirálky špeciál	Sójový púder odtučnený	Sladkovodná ryba 1
Rajčiny sušené	Cestovina fliačky vlnité	Mlieko sušené	Cestovina rezance vrúbkované	Aróma pečenej cibule	Sladkovodná ryba 2
Bazalka list sušená	Suchý kvas	Aróma syrová	Aróma slepačia	Bielkovina sójová textúrovaná	Rybaci prášok z morských rýb
Kôpor list sušený	Mäta extrakt prášok	Aróma jogurtová	Aróma sezam	Pasta cibulová	Aróma rybacia
Pór miešaný granulovaný sušený	Aróma syrová	Smotanový prášok 75%	Cestovina džungla	Sója polená	Losos granulovaný
Hrachová múka zelená	Strúhanka červená jemná	Bryndza sušená	Cestovina niťovky	Aróma citrón	Aróma losos prášok
Cukor krupica	Aróma ligurček	Syrový prášok	Fritované rezance	Lecitín sójový prášok	Aróma rybacia
Karotka sušená	Cestovina fliačky vlnité	Rastlinná smotana	Aróma slepačia	Fritované rezance	
Špargľová múka zelená	Cestovina rezance vlnité	Frittaten rezance	Cestovina ryža vaječná		
Hrachová múka žltá	Aróma slepačia	Laktóza sušená	Cestovina ravioli		
Cicerová múka	Strúhanka	Slepačia aróma	Žltok vaječný sušený		
Aróma šunky	Cestovina detské tvary	Kyselina mliečna prášok	Zmes vaječná sušená		
Soľ	Cestovina korbáčiky	Syr tehla	Bielok vaječný sušený		
Škrob modifikovaný	Zelerový koreň sušený	Aróma pór	Krevetový prášok	Sezamové semeno	Aróma citrón
Aróma majorán	Zelerová vňať sušená	Aróma sezam	Krabia aróma	Aróma pečený cesnak	
Aróma nové korenie	Zeler koreň granulovaný sušený	Aróma citrón	Extrakt z raka		
Aróma petržlen	Aróma zeler	Mleté horčičné semeno			
Zemiaková kaša vločky	Kapusta biela sušená				
Farba cukor pálený	Zeler koreň prášok sušený				
Bielkovina textúrovaná pšeničná	Aróma čínska polievka				
Aróma zeleninová prášok	Aróma pažítka				
Brokolicová aróma	Aróma bokolica				
Aróma citrón					
Aróma biele víno					
Maltodextrín					
Kukuricičný škrob					
Fazuľové struky zelené sušené					

zdrojom určitého alergénu, v dôsledku čoho aj finálny produkt je nositeľom tohto alergénu.

Deklarácia vybraných alergénnych potravinových zložiek a ich eliminácia v podniku

Vajcia, sójové zrná a zeler

Uvedené alergény sú zložkou viacerých spracovávaných surovín. Keďže sa tieto suroviny vo veľkej miere využívajú v podniku, je potrebné tieto alergény deklarovať nielen na výrobkoch, ktoré obsahujú tieto suroviny, ale aj na ostatných výrobkoch v podobe preventívneho označenia: „výrobok môže obsahovať stopy vajec, sóje a zeleru“, ako dôsledok možnej prítomnosti týchto alergénov z krížovej kontaminácie v procese výroby.

Obilniny obsahujúce lepok/glutén (t. j. pšenica, raž, jačmeň, ovos a i.)

Glutén predstavuje najviac zastúpený alergén v podniku, lebo je súčasťou 63 surovín. Obsahujú ho napr. cestoviny, ktoré sú prítomné takmer v každej dehydrovanej polievke, taktiež je prítomný aj v múke, ktorá tvorí základ mnohých výrobkov. U všetkých produktov s obsahom lepku je potrebné deklarovať tento alergén na obale. Riziko krížovej kontaminácie hrozí najmä v miešacích a plničkách, kde sa nachádza viacero miest, ktoré nie sú dostupné pre čistenie suchým spôsobom. Krížovú kontamináciu gluténom sme potvrdili aj laboratórne tak, že po plnení týchto výrobkov sme urobili štandardné čistenie

výrobného plniaceho zariadenia suchým spôsobom a plnili sme výrobky neobsahujúce glutén. Prvé vzorky výrobkov sme zaslali na analýzu, ktorá potvrdila prítomnosť gluténu pomocou ELISA testov (tabuľka 2).

Výsledky ELISA testov potvrdili, že vzorky výrobkov obsahujú určitú koncentráciu gluténu. Maximálna prípustná hranica vo výrobkoch obsahujúcich glutén je podľa podnikovej normy 20 mg.kg⁻¹. My sme obsah gluténu vo vzorkách stanovili v rozmedzí 15 až 2 700 mg.kg⁻¹. Jeho množstvo vo výrobkoch, ktoré nemali obsahovať glutén, sa zvyšovalo úmerne s množstvom

pravdepodobné, že sa čiastočky rýb zachytia v zariadení a kontaminujú následne vyrábaný tvrdý bujón. Preto je potrebné upozorňovať na prípadnú krížovú kontamináciu tvrdých bujónov prostredníctvom preventívneho označenia „výrobok môže obsahovať stopy rýb“.

Výroba mäkkých rybácich bujónov je plánovaná tak, že sa vyrábajú posledný deň v týždni na konci poslednej smeny, aby sa predišlo kontaminácii. Po výrobe rybácich bujónov nasleduje efektívne mokré čistenie celej výrobnéj linky, čím sa zamedzuje vzniku krížovej kontaminácie. Z tohto dôvodu nie je potrebné uvádzať preventívne označenie prítomnosti rýb na obaloch mäkkých bujónov.

Tabuľka 2 Výsledky analýz krížovej kontaminácie gluténom

Č. vz.	Druhý výrobok	Potenciálny výskyt alergénov	Prvý výrobok	Nameraná hodnota v mg. kg ⁻¹
1	Hovädzí bujón	Glutén	Zeleninový bujón	189
2	Hovädzí bujón	Glutén	Zeleninový bujón	140
3	Fix 1	Glutén	Hubový bujón	65
4	Korenistý bujón	Glutén	Zeleninový bujón	15
5	Hovädzí bujón	Glutén	Zlatý zeleninový bujón	110
6	Bujón silný	Glutén	Rybácí bujón	51
7	Fix 2	Glutén	Polievka s cestovinou	189
8	Gulášová šťava	Glutén	Perkelt	54
9	Boloňské špagety	Glutén	Francúzska polievka	11
10	Hovädzí bujón	Glutén	Slepačí bujón	26
11	Hovädzí bujón	Glutén	Slepačí bujón	260
12	Hovädzí bujón	Glutén	Slepačí bujón	64
13	Fix Milánsky	Glutén	Držková polievka	2700

gluténu v predchádzajúcom výrobku, z čoho vyplýva, že došlo ku krížovej kontaminácii. Teda u všetkých výrobkov, u ktorých môže potenciálne dôjsť ku krížovej kontaminácii, sa musí deklarovať: že „výrobok môže obsahovať stopy gluténu“.

Mlieko a výrobky z neho (vrátane laktózy)

Mlieko sa deklaruje na všetkých výrobkoch obsahujúcich mliečnu zložku a taktiež aj na ostatných výrobkoch kvôli možnej krížovej kontaminácii. Vo výrobkoch, ktoré prirodzene neobsahujú mliečnu zložku, sme stanovili stopu kazeínu v množstve 1,60 až 21,3 mg.kg⁻¹. Maximálna tolerančná hranica pre obsah kazeínu vo výrobkoch, ktoré prirodzene neobsahujú mliečnu zložku, je 3 mg.kg⁻¹. Z toho vyplýva, že čistenie suchým spôsobom nie je dostačujúce na odstránenie krížovej kontaminácie mliekom v procese výroby dehydrovaných produktov v podniku. Preto je potrebné deklarovať mlieko ako alergén nielen na výrobkoch, ktoré prirodzene obsahujú mliečny komponent, ale aj na ostatných výrobkoch formou preventívneho označenia „výrobok môže obsahovať mlieko (vrátane laktózy)“.

Ryby a výrobky z nich

Ryby sú súčasťou tvrdých i mäkkých bujónov. Keďže pri výrobe tvrdých bujónov sa nepoužíva mokré čistenie, je

ZÁVER

V práci sme sa zaoberali problematikou vstupu potravinových alergénov do výrobku v dôsledku krížovej kontaminácie v procese výroby. Zmapovali sme výskyt potravinových alergénov v potravinárskom podniku na území Slovenskej republiky.

Kvôli lepšej prehľadnosti sme zostavili zoznam dodávaných surovín vstupujúcich do výroby, v ktorom je zaznamenaná prítomnosť legislatívne povinne deklarovaných alergénov: lepok (glutén), kôrovce, vajcia, ryby, arašidy, sójové zrná, mlieko vrátane laktózy, orechy, zeler, horčica, sezamové semená, oxid siričitý, vlní bôb, mäkkýše. Na základe vstupujúcich surovín do výrobného procesu jednotlivých výrobkov sme rozdelili výrobky na bezalergénové – neobsahujú žiaden z povinne deklarovaných alergénov, bezgluténové – neobsahujú glutén a bezmliečne výrobky - neobsahujú mlieko vrátane laktózy (tabuľka 1).

Miesta krížovej kontaminácie výrobku „kontaminovaného“ stopami alergénov z predchádzajúceho výrobku počas výrobného procesu sú predovšetkým v miešacej časti (miešačka) a plniacej časti výroby (plniaca linka). Stopy alergénov nachádzajúcich sa vo výrobku, ktorý sa spracováva na danej výrobnéj linke, sa zachytávajú vo výrobných zariadeniach, predovšetkým v miešacom stroji. Nedôkladným suchým čistením týchto

zariadení, pretože mokré čistenie nie je možné pri suchej výrobe použiť, sa stopy alergénov dostávajú do výrobku následne spracovávaného na tom istom výrobnom zariadení. Množstvá alergénov, ktoré sa do výrobku môžu dostať krížovou kontamináciou (z predchádzajúceho produktu), nesmú prekračovať maximálne prípustné limity stanovené podnikovou normou.

Na vylúčenie, resp. elimináciu, krížovej kontaminácie alergénmi v procese výroby, sme použili niekoľko postupov. Na prípadnú krížovú kontamináciu je potrebné upozorňovať prostredníctvom preventívneho označovania na obale všetkých výrobkov, v prípade alergénov - lepok, mlieko vrátane laktózy, vajcia, zeler, sója, kôrovce a v prípade mäkkých bujónov aj ryby. Navrhnutý spôsob riešenia eliminácie krížovej kontaminácie, aby sa po inkriminovanej receptúre vždy vyrábal jeden výrobok, u ktorého by sa deklarovala krížová kontaminácia daným alergénom a na ostatných výrobkoch by sa tak nemusela, sa nám v praxi v prípade krížovej kontaminácie laktózou neosvedčil. Myslíme si, že tento spôsob riešenia krížovej kontaminácie by mohol byť efektívny v prípade alergénov, ktoré nie sú v podniku používané v takej veľkej koncentrácii ako je mlieko. Napríklad by sa tento spôsob mohol dať využiť na elimináciu krížovej kontaminácie kôrovcami v procese výroby.

Na zamedzenie vstupu stôp akýchkoľvek alergénov do potravín krížovou kontamináciou pri výrobe odporúčame:

1. zmapovať zdroje alergénov,
2. určiť miesta vo výrobnom procese, v ktorých existuje riziko krížovej kontaminácie,
3. zaistiť zodpovedajúcu kontrolu tak, aby sa zamedzilo vstupu alergénov do potravín,
4. obmedziť použitie alergénnych komponentov do výrobkov, v ktorých ich obsah nie je nutný,
5. plánovať výrobu tak, aby výrobky obsahujúce alergény boli na konci výrobnej smeny,
6. zaistiť dôkladné čistenie výrobnej linky po výrobe potraviny obsahujúcej alergény,
7. validovať čistiaci proces,
8. používať oddelenú výrobnú linku na výrobu potravín obsahujúcich alergénne zložky.

Z hľadiska lepšej informovanosti, predovšetkým alergických spotrebiteľov, odporúčame:

- uvádzať úplný zoznam surovín,
- doplniť názov suroviny o špecifikáciu jeho pôvodu: napr. namiesto „lecitín“ uviesť v zložení „vaječný lecitín“, namiesto „rastlinný olej“ uviesť „sójový rastlinný olej“
- pod zloženie výrobku doplniť alergény nachádzajúce sa vo výrobku: „Výrobok obsahuje lepok, mlieko, ...“.
- uvádzať tzv. preventívne označenie: „môže obsahovať stopy...“ alebo pod., ak výrobok alergén normálne neobsahuje, ale jeho prítomnosť sa nedá vylúčiť správnou výrobnou praxou. Preventívne označenie sa uvádza na poslednom mieste v zložení výrobku alebo v samostatnom odseku v blízkosti zloženia výrobku.

LITERATÚRA

- ALLEN, K. J., HILL, D. J., HEINE, R. G. 2006. Food allergy in childhood. In *Medical Journal of Australia*, 185, 2006, p. 394-400.
- BARTŮŇKOVÁ, J., VERNEROVÁ, E. 2002. *Imunologie a alergologie*. Praha: TRITON, 83 s. ISBN 80-7254-289-3.
- BIDAT, E., RANCÉ, F., BARANES, T., GOILAMHOUSSEN, S. 2003. L'Allergie au lait de chevre ou de brebis chez l'enfant, sans allergie au lait de vache. In *Revue Francais d'Allergologie et d'Immunologie Clinique*, vol. 43, 2003, no. 6, p. 273-277.
- ČIERNA, I. 2007. *Intolerancia laktózy*. [online]. 2007 [cit. 2007-03-23]. Dostupné na internete: <<http://www.ktl.elf.stuba.sk/~sindler/laktoza.html>>.
- CRESPO, J. F., JAMES, J. M., FERNANDEZ-RODRIGUES, C., RODRIGUEZ, J. 2006. Food allergy: nuts and tree nuts. *British Journal of Nutrition*, 96, 2006, p. 95-102.
- DRÁPAL, J., ETTLEROVÁ, K., HAJŠLOVÁ, J. et al. 2005. Vliv zpracování potravin na alergenicitu [online]. 2005, [cit. 2007-02-10]. Dostupné na internete: <<http://www.chpr.szu.cz/vedvybor/vvp.htm>>.
7. ETTLEROVÁ, K. 2004. Potravinová anafylaxe a označování balených potravin. In *Alergie*, roč. 4, 2004, č. 6, s. 248-252.
- FERENČÍK, M., ROVENSKÝ, J., MAŤHA, V., JENSEN-JAROLIM, E. 2006. *Imunológia a alergológia*. Bratislava : Slovak Academic Press, 425 s. ISBN 80-89104-82-7.
- HOLT, P. G. 1998. Mucosal immunity in relation to the development of oral tolerance/ sensitisation. In *Allergy*, vol. 53, 1998, no. 45, p. 16-19.
- HRUBÍŠKO, M. et al. 2003. *Alergológia*. Martin : Osveta, 2003, 518 s. ISBN 80-8063-110-7.
- KAYSEROVÁ, H. 1999. Provokatóri na tanieri. In *Zdravie*, roč. 55, 1999, č. 4, s. 10-12.
- KAYSEROVÁ, H. 2000. Potravinová alergia. In *Alergo*, roč. 1, 2000, č. 1, s. 16-17.
- KAYSEROVÁ, H. 2004. Potravinová alergia. In *Via practica*, roč. 1, 2004, č. 2, s. 90-94.
- KELEOVÁ, A. 2005. Alergie na potraviny – diagnostické možnosti. In *Klinická imunológia a alergológia*, roč. 14, 2005, č. 3, s. 37-42.
- KVASNIČKOVÁ, A., PIVOŇKA J., VOLDŘICH, M. 2005. Alergény v potravinách. In *Kvalita potravín*, roč. 5, 2005, č. 3, s. 30-33.
- LEHRER, S. 2004. Genetic modification of food allergens. In *An Allergy Asthma Immunol*, vol. 93, 2004, no. 3, p. 19-25.
- LEIBOLD, G. 1993. *Alergie*. Praha : Svoboda – Lebertas, 1993, 133 s. ISBN 80-205-0315-3.
- NOVOTNÁ, B. 2005. Alergie zažívacieho traktu. In *Interní medicína pro praxi*, roč. 7, 2005, č. 11, s. 492-495.
- PRUŽINEC, P. 2002. *Moja alergia*. Bratislava: Bonus, 2002, 148 s. ISBN 80-968491-3-1.
- RENČOVÁ, E. 2006. Potravinové alergeny a vhodné metody pro jejich stanovení. In XXXVI. LENFELDOVY A HÖKLOVY DNY. *Konference o hygieně a technologii potravin*. Brno : Veterinární a farmaceutická univerzita, 2006, s. 32-35. ISBN 80-7305-570-8.
- RIMÁROVÁ, K., LOVAYOVÁ, V. 2007. Alergény a lepok v potravinách, prístupy k ich detekcii a označovaniu v EÚ. In *Hygiena alimentorum XXVIII: "Bezpečnosť a kvalita mlieka a*

mliečnych výrobkov" – medzinárodná vedecká konferencia, Štrbské Pleso – Vysoké Tatry, 2007, s. 165-169.

SABOLOVÁ, G. 2007. Nutričné riziká diéty vylučujúcej konzumáciu mlieka a mliečnych výrobkov. In *Hygiena alimentorum XXVIII: "Bezpečnosť a kvalita mlieka a mliečnych výrobkov" – medzinárodná vedecká konferencia, Štrbské Pleso – Vysoké Tatry, 2007, s. 155-159.*

SABOLOVÁ, G., ŠESTÁK, Ľ. 2004. Je sója prínosom alebo hrozbou v potravinovom reťazci? In *Slovenský veterinársky časopis*, roč. 29, 2004, č. 2, s. 18-20.

SABOLOVÁ, G., SOKOL, J., FAŠIANGOVÁ, K. et al. 2007. Konzumácia rýb – nutričné benefity verzus (pseudo)alergologické a toxikologické riziká. In *Slovenský veterinársky časopis*, roč. 32, 2007, č. 3, s. 152-153.

ŠINKOVÁ, T., JANEKOVÁ, K., KOVÁČIKOVÁ, E. 2004. Prídavné látky v našej strave - siričitany. In *Trendy v potravinárstve*, roč. 11, 2004, č. 6, s. 3-4.

SMERNICA EURÓPSKEHO PARLAMENTU A RADY 2003/89/ES z 10. novembra 2003, ktorou sa mení a dopĺňa smernica 2000/13/ES o označovaní zložiek prítomných v potravinách.

SMERNICA KOMISIE 2005/26/ES z 21. marca 2005, ktorou sa ustanovuje zoznam zložiek potravín alebo látok dočasne vylúčených z prílohy IIIa k smernici 2000/13/ES.

STRÁŽNICKÁ, H. et al. 2000. Alergény v sóji a sójových výrobkoch ako ukazovatele použitej technológie. In *Agrochémia*, roč. 4 (40), 2000, č. 2, s. 4-6.

VIDO, Ľ., GUĽOVIČ, J., JURIS, P. 2007. Výsledky cieľených kontrol potravinových alergénov v košickom kraji. In *Slovenský veterinársky časopis*, roč. 32, 2007, č. 1, s. 9-10.

VÝNOS Ministerstva pôdohospodárstva Slovenskej republiky a Ministerstva zdravotníctva Slovenskej republiky zo 7. januára 2008 č. 2319/2007-100, ktorým sa mení a dopĺňa výnos Ministerstva pôdohospodárstva Slovenskej republiky a Ministerstva zdravotníctva Slovenskej republiky z 28. apríla 2004 č. 1187/2004 – 100, ktorým sa vydáva hlava Potravinového kódexu Slovenskej republiky upravujúca označovanie potravín v znení neskorších predpisov.

Kontaktná adresa:

MVDr. Lubomír Lopašovský PhD., Katedra hygieny a bezpečnosti potravín, Fakulta biotechnológie a potravinárstva, Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre, Tr. A. Hlinku 949 76 Nitra.

VYUŽITIE RASTLINNÝCH EXTRAKTOV PRI VÝROBE TEPELNE OPRACOVANÝCH MÄSOVÝCH VÝROBKOV

USE OF PLANTS EXTRACTS FOR PRODUCING OF THERMAL TREATED MEAT PRODUCTS

Slavomír Marcinčák, Pavlína Jevinová, Lýdia Mesarčová, Peter Popelka

ABSTRACT

Antioxidative and antibacterial effects of water extracts derived from agrimony (*Agrimonia eupatoria* L.), lemon balm (*Melissa officinalis* L.) and clove (*Syzygium aromaticum* L.) added to thermal treated meat products were observed in our experiment. Water extract of lemon balm and agrimony were added into meat in dose 20 ml.kg⁻¹; and clove in doses 20 and 30 ml.kg⁻¹, respectively. Antioxidative effect was recorded in all tested extracts and it was proved in reduced production of oxidation products in comparison with control. The most significant antioxidative effect was determined in extract of clove (30 ml.kg⁻¹) during the whole period of storage. All tested plant extracts showed antibacterial effect, however the highest antibacterial effect was recorded in extract of clove (30 ml.kg⁻¹).

Keywords: lipid oxidation, plant extracts, antibacterial effect, pork meat

ÚVOD

Antioxidanty sú látky, ktoré obmedzujú aktivitu kyslíkatých molekúl, znižujú pravdepodobnosť ich vzniku alebo ich odvádzajú do menej reaktívneho alebo neaktívneho stavu. Týmto obmedzujú proces oxidácie v organizme alebo v zmesiach, v ktorých sa vyskytujú (Bystrický et Dičáková, 1998). Z tohto dôvodu sa pridávajú do potravín, ktoré by mohli byť oxidáciou poškodené (mäsové výrobky, rastlinné oleje, rastlinné tuky) z dôvodu vyššieho obsahu polyneenasýtených mastných kyselín. Významným zdrojom prírodných antioxidantov je rastlinný materiál, lebo okrem toho, že jeho zložky zabraňujú oxidácii tukov, majú aj antimikrobiálnu aktivitu a zlepšujú chuť potravín svojimi senzorickými vlastnosťami (Turek et al., 2000; Gülcin et al., 2004). Za prírodné antioxidanty možno považovať tie látky, ktoré sú prirodzenou súčasťou potravín. Najčastejšie používanými sú vitamíny rozpustné v tukoch, vitamín E, vitamín A, prípadne ich analógy (Labuza, 1971; Smith et al., 1996). Vitamín A je aplikovaný zvyčajne vo forme provitamínu, β- karoténu, ktorý je schopný vychytávať singletový kyslík. Vitamín E je súčasťou bunkových membrán a jeho schopnosť zabraňovať oxidácii nenasýtených mastných kyselín, je považovaná za jeho prvoradú úlohu v tele. Jeho nedostatok spôsobuje abnormálnu štruktúru a funkciu bunkových organel a bunkových membrán (McBride et Kraemer, 1999).

Medzi prírodné antioxidanty môžeme ďalej zaradiť vitamín C, karotenoidy, koenzým Q 10 (ubichinón), kyselinu močovú, kyselinu alfa - lipovú, nikotínamid, látky trieslovínovej povahy, najmä deriváty kyseliny kávovej (3,4-dihydroxyškoricovej). Existuje veľká skupina korenín a bylín, ktoré obsahujú množstvo zlúčenín, ktorým sa pripisujú antioxidačné vlastnosti (Madsen et Bertelsen, 1995; Lopez-Bote, 1998, Marcinčák et al., 2008). Po celé stáročia sa za účelom predĺženia trvanlivosti potravín

používajú rôzne bylinky a korenie. Obzvlášť účinné sú rozmarín, šalvia, oregano, tymián, klinček, kurkuma a í. (Korimová et al., 2000; Martinez-Tome et al., 2001).

Medovka lekárska (*Melissa officinalis* L) patrí do čeľade Lamiaceae. U medovky bol zistený antioxidačný účinok, porovnateľný s α -tokoferolom. Je to stará liečivá bylina, používaná ako prísada do likérov, octov, ako korenina do šalátov a v kozmetickom priemysle. Známe sú jej sedatívne, spazmolytické, antibakteriálne, antivírusové a antifungálne účinky. U medovky bol objavený aj antioxidačný účinok, porovnateľný s α -tokoferolom (Jančovičová, 2003). Zo silice sa získava *Oleum mellisae*.

Repík lekársky (*Agrimonia eupatoria* L) patrí do čeľade Rosaceae. Obsahuje tanín, silicu, triesloviny, amid kyseliny nikotínovej, kyselinu kremičitú, organické kyseliny, saponíny, minerálne soli, glykozidicky viazanú horčinu, flavónové farbivá, cholin a fytoncidy pôsobiace na mykobaktérie. Známe sú jeho zvieravé, sťahujúce, žlčopudné, adstringentné, bakteriostatické a antiflogistické účinky (Kresánek et Krejča, 1982).

Klinčekovec voňavý (*Eugenia caryophyllata*, L) patrí do čeľade Myrtaceae. Hlavnú obsahovú látku tvorí silica, ktorej podstatnú zložku predstavuje eugenol a aceteugenol (Kresánek et Dugas, 1985).

V našej práci sme sledovali účinok vodných extraktov (Medovka lekárska, Repík lekársky a Klinčekovec voňavý), pridaných do mäsového diela, na oxidačnú stabilitu tukovej zložky tepelne opracovaného mäsového výrobku, skladovaného po dobu 21 dní v chladničke pri 4 °C. Tiež sme sledovali účinok pridaných vodných extraktov na potlačenie rastu mikroorganizmov.

MATERIÁL A METODIKA

Príprava vodných extraktov rastlín. Extrakcia vysušených rastlín (3 g) vodou bola vykonaná podľa Heilerovej et al. (2003). Po ochladení bol extrakt prefiltrovaný a do 100 ml doplnený destilovanou vodou.

Výroba tepelne opracovaných mäsových výrobkov a skladovanie. Vyrobili sme 5 šarží výrobkov z bravčového mäsa. Pri každej šarži sme k bravčovému mäsu (priemerný obsah tuku 4,08 %) do kutra pridali dusitanovú soliacu zmes (2 %), vodu (10 %) a pripravené extrakty nasledovne: Prvá šarža (kontrola), bola pripravená bez prídavku rastlinných extraktov. K ďalším trom šaržám (repík, medovka, klinček 20) sme k bravčovému mäsu pridali rastlinné extrakty Medovky lekárskej, Repíka lekárskeho a Klinčekovca voňavého, jednotlivo, v dávke 20 ml.kg⁻¹. V poslednej šarži (klinček 30) sme k bravčovému mäsu pridali extrakt klinčekovca voňavého v dávke 30 ml.kg⁻¹.

Pripravenú surovinu sme kútrovali asi 5 minút pri teplote do max. 11 °C. Po vykútrovaní sme vypracované dielo naplnili do nepriepustných polyamidových obalov (200-300 g) a tepelne opracovali (70 °C, 10 min.) Vzorok boli ochladené a skladované v chladničke pri 4 °C po dobu 21 dní. Odber vzoriek na laboratórne vyšetrenie bol vykonaný na 1., 7., 14. a 21. deň skladovania.

Stanovenie peroxidového čísla. Peroxidové číslo vyjadruje mieru primárneho oxidatívneho poškodenia

tukov. Postupovali sme podľa výnosu Ministerstva pôdohospodárstva Slovenskej republiky č. 149/2/2003-100.

Stanovenie tiobarbiturového čísla. Stanovenie tiobarbiturového čísla (TBA) – ako miera sekundárneho poškodenia tukov, podmienená oxidáciou nenasýtených mastných kyselín, bola vykonaná podľa Marcinčák et al. (2004). Extinkcia (absorbancia) vzoriek bola meraná na UV-spektrofotometri Helios γ v 4.6 (Thermospectronic, Veľká Británia) pri vlnovej dĺžke 532 nm, s prepočtom výsledkov na množstvo malondialdehydu (MDA) v 1 g vzorky.

Mikrobiologické stanovenia. Stanovenie celkového počtu mikroorganizmov bolo vykonané podľa STN ISO 4833. Stanovenie počtu baktérii čeľade *Enterobacteriaceae* bez resuscitácie bolo vykonané podľa STN ISO 7402. Stanovenie koagulázo pozitívnych stafylokokov bolo vykonané podľa STN ISO 6888-1.

Štatistické spracovanie výsledkov. Štatistické spracovanie výsledkov bolo vykonané štatistickým programom Graph Pad Prism 3.0 (1999) podľa Snedecor et Cochran (1967). Jednotlivé výsledky medzi skupinami boli navzájom štatisticky porovnané jednocestným ANOVA testom. Pre zistenie štatistických rozdielov medzi hodnotami pokusných skupín oproti kontrole bol použitý Dunnettov porovnávací test a $P < 0,05$ bolo považované za štatistický významný rozdiel.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Peroxidové číslo predstavuje údaj o množstve peroxidov vo forme peroxidicky viazaného kyslíka v 1 g tuku. Je ukazovateľom primárneho oxidatívneho poškodenia lipidov v iniciačnom a propagačnom štádiu oxidácie. Na stanovenie peroxidového čísla sa používajú metódy založené na reakciách peroxilových a karboxylových skupín. Samotné stanovenie peroxidového čísla sa spravidla robí po extrakcii lipidov zo vzorky a následnom rozpustení v organických rozpúšťadlách (Bystrický et Dičáková, 1998).

Výsledky stanovenia peroxidového čísla vo vzorkách tepelne opracovaného výrobku z bravčového mäsa skladovaného pri 4 °C sú uvedené v tabuľke 1. Už 24 hodín po tepelnom opracovaní sme u všetkých vzoriek s prídavkom extraktov zaznamenali štatistický významný rozdiel oproti vzorkám kontroly. Následné skladovanie vzoriek v chladničke (4 °C) spôsobilo nárast hodnôt peroxidového čísla u všetkých vzoriek. Najvýraznejší nárast bol zaznamenaný vo vzorkách kontroly.

Lee et Hendricks (1997) konštatujú, že peroxidácia lipidov, ktorá je najväčšou príčinou zhoršovania kvality mäsa, je závažným problémom pri mletých a tepelne opracovaných výrobkoch, pričom sa mení chuť, farba, textúra a nutričná hodnota mäsa a produktov z mäsa. Na hľadiskom homogenáte sledovali ochranný účinok vo vode rozpustných antioxidantov, a zistili, že prírodné antioxidanty pôsobia proti peroxidácii lipidov.

Tab. 1 Výsledky stanovenia peroxidového čísla ($\mu\text{g.g}^{-1}$).

	1. deň	7. deň	14. deň	21. deň
Kontrola	66,5 $\pm$ 4,8	49,4 $\pm$ 4,9	44,3 $\pm$ 6,2	47,7 $\pm$ 5,8
Medovka	40,9 $\pm$ 3,8*	39,5 $\pm$ 3,8	39,3 $\pm$ 4,2	33,0 $\pm$ 5,4*
Repík	26,7 $\pm$ 2,4*	27,7 $\pm$ 3,0*	21,2 $\pm$ 2,8*	25,9 $\pm$ 4,7*
Klinček 20	39,8 $\pm$ 2,3*	39,7 $\pm$ 3,7	28,2 $\pm$ 3,6*	35,0 $\pm$ 4,2*
Klinček 30	39,2 $\pm$ 3,7*	46,2 $\pm$ 1,8	29,4 $\pm$ 2,7*	23,3 $\pm$ 3,8*

* – štatisticky významný rozdiel oproti hodnotám kontroly ($P < 0,05$)

Podľa Zegarskej et al. (1996) koreniny, patriace do čeľade *Lamiaceae*, majú schopnosť ochraňovať tuky pred autooxidáciou. Sledovanie antioxidačného účinku nami testovanej medovky lekárskej, patriacej do tejto čeľade, Zegarskej et al. (1996) závery potvrdzujú.

Heilerová et al. (2003) vo svojej práci porovnávala vodné extrakty bylín z hľadiska ich antioxidačnej aktivity a použitia v praxi, s odôvodnením, že práve vodné extrakty sú bežne používané v medicíne a v gastronómii. Dospela k záveru, že najlepšie antioxidačné vlastnosti z rastlín ktoré sledovala, má oregano, potom medovka lekárska, repík lekárske. To korešponduje aj s výsledkami nášho pokusu, kde sme dospeli k rovnakému záveru porovnaním antioxidačných aktivít medovky a repíka. Ak antioxidačnú aktivitu a obsah celkových fenolov týchto bylín porovnáваме s výsledkami iných autorov (Marcinčák et al., 2008) výsledky sa takmer zhodujú.

Stanovenie TBA čísla je pre svoju jednoduchosť a rýchlosť stanovenia jednou z najviac používaných metód na stanovenie oxidačných produktov v potravinách živočíšneho pôvodu. Výsledky stanovenia TBA opracovaného bravčového mäsa skladovaného pri 4 °C sú uvedené v tabuľke 2. Prvý deň po výrobe mäsového výrobku sme u získaných hodnôt TBA čísla nezaznamenali štatisticky významné rozdiely. Hodnoty kontroly však boli vyššie ako hodnoty vzoriek s prídavkom rastlinných extraktov. Pozitívny účinok pridaných antioxidantov sa prejavil po 7 dňoch skladovania. Najvyššia oxidačná stabilita a najnižšie množstvá malondialdehydu boli zistené vo vzorke, do ktorej sa pridal vodný extrakt Klinčekovca voňavého v dávke 30 ml.kg^{-1} ($P < 0,05$). Aj ostatné vzorky s prídavkom extraktov repíka, klinčeka 20 a medovky vykazovali nižšie oxidačné poškodenie tukov oproti kontrole ($P < 0,05$). Pozitívny účinok pridaných extraktov na oxidačnú stabilitu tukov sa ešte viac prejavil ďalším skladovaním vzoriek (14 a 21 dní). Tieto výsledky sú v zhode s doteraz publikovanými prácami (Lopez-Bote et al., 1998; Pokorný et al., 1998; Heilerová et al., 2003). Karpinská et al., (2000) uvádza, že ak sa pred deštrukciou svaloviny (mletie, kutrovanie, separácia) pridá dostatočné množstvo vhodného antioxidantu (rozmarín) účinne sa zníži stupeň

oxidácie na prijateľnú mieru, čím sa predídne nežiaducim senzorickým zmenám a tvorbe oxidačných produktov, čo je zjavné aj z prehľadu našich výsledkov, kde pozorujeme výrazné vyšší stupeň oxidatívneho poškodenia tukov u vzorky kontroly.

V poslednom období sa venuje zvýšená pozornosť výberu a výskumu fytoncídov korenia, ktorých antimikrobiálny účinok by sa mohol vo zvýšenej miere uplatniť pri konzervácii potravín (Takacsová et al., 1990). Sledovali sa fytoncídové korenín ale aj esenciálne oleje niektorých liečivých rastlín, medzi inými aj medovka lekárska (Uzun et al., 2004).

Viaceri autori skúmali popri antioxidačných účinkoch rastlinných extaktov aj ich antimikrobiálne, či dokonca mikrobicídne vlastnosti (Alzoreky et al., 2003; Manthabe et al., 2006). Pri stanovení celkového počtu mikroorganizmov (CPM) sme zaznamenali u všetkých pridaných rastlinných extraktov žiaduci pokles počtu mikroorganizmov vo vzorkách oproti kontrole. To korešponduje s výsledkami Biavati et al. (1996) a Burt (2004), ktorí taktiež zaznamenali antibakteriálne vlastnosti vybraných rastlinných extraktov. Zistili dobrý inhibičný vplyv všetkých prírodných extraktov, najviac klinčeka a oregana. Smith-Palmer et al. (1998) pripisujú antibakteriálny účinok klinčeka obsahom niektorých účinných zložiek, a to najmä eugenolu a acetugenolu. Ich výsledky dokázali výborný antibakteriálny účinok klinčeka proti salmonelám, *E. coli*, listériám aj stafylokokom. Podobne aj v našom pokuse bol najvýraznejší antibakteriálny účinok zaznamenaný u extraktov klinčeka, kde počas celej doby skladovania došlo len k miernemu nárastu CPM.

Výsledky mikrobiologického stanovenia vzoriek poukazujú na antibakteriálnu aktivitu všetkých piatich vzoriek voči čeľadi *Enterobacteriaceae* a veľmi malý až negatívny výskyt stafylokokov. Svedčí to o dobrej hygiene opracovania a správnom tepelnom režime opracovania (70 °C, 10 min.). Pri stanovení celkového počtu mikroorganizmov (CPM) sme zaznamenali u všetkých pridaných rastlinných extraktov účinok na zníženie počtu mikroorganizmov vo vzorkách oproti kontrole.

Tab. 2 Výsledky stanovenia TBA vyjadrené ako množstvo malondialdehydu (mg.kg^{-1}).

	1. deň	7. deň	14. deň	21. deň
Kontrola	0,32 $\pm$ 0,02	0,38 $\pm$ 0,11	0,36 $\pm$ 0,13	0,57 $\pm$ 0,09
Medovka	0,23 $\pm$ 0,07	0,26 $\pm$ 0,06*	0,19 $\pm$ 0,03*	0,44 $\pm$ 0,08
Repík	0,23 $\pm$ 0,04	0,16 $\pm$ 0,07*	0,18 $\pm$ 0,04*	0,35 $\pm$ 0,04*
Klinček 20	0,18 $\pm$ 0,02*	0,12 $\pm$ 0,03*	0,14 $\pm$ 0,03*	0,28 $\pm$ 0,06*
Klinček 30	0,21 $\pm$ 0,05	0,17 $\pm$ 0,02*	0,18 $\pm$ 0,03*	0,23 $\pm$ 0,05*

* – štatisticky významný rozdiel oproti hodnotám kontroly ($P < 0,05$)

Tab. 3 Výsledky mikrobiologického stanovenia vzoriek

Doba skladovania	Vzorka	CPM KTJ.g ⁻¹	Enterobacteriaceae KTJ.g ⁻¹	stafylokoky KTJ.g ⁻¹
	Kontrola	3,8.10 ³	negat.	< 1,0.10 ²
	Medovka	2,8.10 ³	negat.	< 1,0.10 ²
1. deň	Repík	2,0.10 ³	negat.	< 1,0.10 ²
	Klinček 20	1,3.10 ³	negat.	< 1,0.10 ²
	Klinček 30	2,6.10 ³	negat.	< 1,0.10 ²
	Kontrola	4,8.10 ³	negat.	2,0.10 ²
	Medovka	3,4.10 ³	negat.	8,0.10 ²
7. deň	Repík	2,3.10 ³	negat.	4,0.10 ²
	Klinček 20	3,0.10 ³	negat.	6,0.10 ²
	Klinček 30	2,7.10 ³	negat.	5,0.10 ²
	Kontrola	5,4.10 ³	negat.	< 1,0.10 ²
	Medovka	2,8.10 ³	negat.	< 1,0.10 ²
14. deň	Repík	2,4.10 ³	negat.	< 1,0.10 ²
	Klinček 20	2,4.10 ³	negat.	2,0.10 ²
	Klinček 30	2,1.10 ³	negat.	3,0.10 ²
	Kontrola	5,4.10 ³	negat.	< 1,0.10 ²
	Medovka	3,1.10 ³	negat.	1,0.10 ²
21. deň	Repík	2,5.10 ³	negat.	1,0.10 ²
	Klinček 20	2,6.10 ³	negat.	< 1,0.10 ²
	Klinček 30	2,2.10 ³	negat.	< 1,0.10 ²

Najvýraznejší antibakteriálny účinok bol zaznamenaný v extraktach klinčeka, kde počas celej doby skladovania došlo len k miernemu nárastu CPM. To korešponduje s výsledkami Agaoglu et al. (2007), ktorý taktiež zaznamenali antibakteriálne vlastnosti rastlinných extraktov.

ZÁVER

Získané výsledky poukázali na antioxidačný účinok u všetkých pridaných extraktov (Medovka lekárska, Repík lekársky a Klinčekovec voňavý), čo sa prejavilo zníženou tvorbou oxidačných produktov oproti kontrole počas celej doby skladovania. Najvýraznejší antioxidačný účinok bol stanovený v extraktach Klinčekovca voňavého pridaného do mäsového diela v dávke 30 ml.kg⁻¹. Pridané extrakty mali výrazný vplyv aj na zníženie počtu mikroorganizmov vo vzorkách. Vo všetkých vzorkách s prídavkom rastlinných extraktov bolo celkové množstvo mikroorganizmov nižšie ako vo vzorkách kontroly. Najvýraznejší účinok na zníženie počtu mikroorganizmov zo všetkých extraktov vykazoval extrakt Klinčekovca voňavého pridaného do mäsového diela v dávke 30 ml.kg⁻¹.

LITERATÚRA

- AGAOGU, S., DOSTBIL, N., ALEMDAR, S., 2007. Antimicrobial activity of some species used in the meat industry. In *Bulletin of the Veterinary Institute of Pulawy*, roč. 51, 2007, č. 1, s. 53-57.
- ALZOREKY N. S., NAKAHARA K., 2003 Antibacterial activity of extracts from some edible plants commonly consumed in Asia. In *International Journal of Food Microbiology*, roč. 80, 2003, s. 223-230.
- BIAVATI B., FRANZONI Z., GHAZVINIZADEH H., PICCAGLIA R., 1996, Antimicrobial and antioxidant

properties of plant essential oils. In 27th International Symposium on Essential Oils, Vienna, Austria, 1996.

BURT S., 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods - a review. In *International Journal of Food Microbiology*, roč. 94, 2004, s. 223-253.

BYSTRICKÝ P., DIČÁKOVÁ Z., 1998. Živočíšne tuky v potravinách. In *Slovenský veterinársky časopis Suplementum1*, roč. 23, 1998, s. 1-45.

GÜLCIN I., SAT G. I., BEYDEMİR S., ELMAS M., KÜFREVIÖGLÜ O. I., 2004. Comparison of antioxidant activity of clove (*Eugenia caryophyllata* Thunb) buds and lavender (*Levandula stoechas* L.). In *Food Chemistry*, roč. 87, 2004, s. 393-400.

HEILEROVÁ Ľ., BUČKOVÁ M., TARAPČÍK P., ŠILHÁR S. A LABUDA J., 2003. Comparison of Antioxidative Activity Data for Aqueous Extracts of Lemon Balm, Oregano, thyme and Agrimony obtained by conventional methods and the DNA- Based Biosensor. In *Czech Journal of Food Science*, roč. 21, 2003, č. 2, s. 78-84.

JANČOVIČOVÁ, A., 2003. Liečivé rastliny v lekárni. In *Lekárnické listy*, roč. 7, 2003, s. 41-42.

KARPINSKA M., BOROWSKI J., DANOWSKA M., 2000. Antioxidative activity of rosemary extract in lipid fraction of minced meat balls during storage in freezer. In *Nahrung*, roč. 44, 2000, s. 38-41.

KORIMOVÁ Ľ., MÁTÉ D., TUREK P., 2000. Influence of natural antioxidants on heat-untreated meat products quality. In *Czech Journal of Food Science*, roč. 18, 2000, s. 124-128.

KRESÁNEK J., DUGAS, D., 1985. Príručný atlas liečivých rastlín. ISBN 80-217-0147-1 Osveta, Martin, 1985.

KRESÁNEK J., KREJČA J., 1982. Atlas liečivých rastlín a lesných plodov. Martin, Osveta, 1982.

ABUZA, T. P., 1971. Kinetics of lipid oxidation in foods. In *Critical Reviews in Food Technology*, roč. 11, 1971, č. 2, s. 355-405.

LEE B. J., HENDRICKS D. G., 1997. Antioxidant effects of L-carnosine of liposomes and beef homogenates. In *Journal of Food Science*, 1997, s. 931-934.

LOPEZ-BOTE C. J., GRAY J. I., GOMAA E.A., FLEGAL C. J., 1998. Effect of dietary administration of oil extract from rosemary and sage on lipid oxidation in broiler meat. In *British Poultry Science*, roč. 39, 1998, s. 235-240.

MADSEN H. L., BERTELSEN G., 1995. Spices as antioxidants. In *Trends in Food Science and Technology*, roč. 8, 1995, č. 6, s. 271- 276.

MANTHABE M. C., NIKOLOVA R. V., LALL N., NYAZEMA N. Z., 2006. Antibacterial activities of medicinal plants used for the treatment of diarrhoea in Limpopo Province, South Africa. In *Journal of Ethnopharmacology*, roč. 105, 2006, s. 286-293.

MARCINČÁK S., SOKOL J., BYSTRICKÝ P., POPELKA P., TUREK P., BHIDE M., MÁTÉ D., 2004. Determination of lipid oxidation level in broiler meat by liquid chromatography. In *Journal of AOAC International*, roč. 87, 2004, č.5, s. 1148-1152.

MARCINČÁK, S., CABADAJ, R., POPELKA, P., ŠOLTÝSOVÁ, L.: Antioxidative effect of oregano supplemented to broilers on oxidative stability of poultry meat. In *Slovak Veterinary Research*, roč. 45, 2008, č. 2, s. 61-66.

MARTINEZ-TOME M., JIMENEZ A. M., RUGGIERI S., FREGA S., STRABBIOLI R., MURCIA M.A., 2001. Antioxidant properties of mediterranean spices compared with common food additives. In *Journal of Food Science*, roč. 64, 2001, č. 9, s. 1412-1419.

MC BRIDE J. M., KRAEMER W. J., 1999. Free radicals, exercise, and antioxidants. In *Journal of Strength and Conditioning Research*, roč. 13, 1999, č. 2, s. 175-183.

POKORNÝ J., RÉBLOVÁ Z., JANITZ W., 1998. Extracts from rosemary and sage as natural antioxidants for fats and oils. In *Czech Journal of Food Science*, roč. 16, 1998, s. 227-234.

SMITH G. C., MORGAN J. B., SOFOS J. N., TATUM J. D., 1996. Supplemental vitamin E in beef cattle diets to improve shelf-life of beef. In *Animal Science and Technology*, roč. 59, 1996, s. 207-214.

Smith-Palmer A., Stewart J., Fyfe L., 1998. Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens. In *Letters in Applied Microbiology*, roč. 26, 1998, s. 118-122.

SNEDECOR, G.W., COCHRAN, W.G., 1967. Statistical methods. Iowa: 6th ed. Iowa State University Press, 1967.

STN ISO 4833 Mikrobiológia. Všeobecné pokyny na stanovenie celkového počtu mikroorganizmov. Metóda počítania kolónií kultivovaných pri 30°C. SÚTN Bratislava, 1998.

STN ISO 6888-1. Mikrobiológia potravín a krmív. Horizontálna metóda stanovenia počtu koagulázopozitívnych stafylokokov. Časť 1: Metóda s použitím Bairdovho-Parkerovho agarového média, SÚTN Bratislava, 2001.

STN ISO 7402 Mikrobiológia. Všeobecné pokyny na stanovenie počtu baktérií čeľade Enterobacteriaceae bez resuscitácie. Metóda najpravdepodobnejšieho počtu a metóda počítania kolónií. SÚTN Bratislava, 1998.

TAKÁCSOVÁ M., DRDÁK M., ŠIMEK I., SZALAI P., 1990. Sledovanie antioxidačných účinkov cesnakového extraktu v rastlinnom oleji. In *Potravinárske Vědy*, roč. 8, 1990, s. 141-147.

TUREK P., KORIMOVÁ Ľ., NAGY J., MÁTÉ D., 2000. Využitie prírodných antioxidantov v mäsovej výrobe. In Zborník referátových a posterových príspevkov z konferencie „Výživa – potraviny - legislatíva“, 13. – 15. jún 2000 v Detve, Bratislava, 2000, s. 71-75, ISBN 80-227- 1440-2.

Uzun E., SARIYAR G., ADSERSEN A., KARAKOC B., OTUK G., OKTAYOGLU E., PIRILDAR S.2004. Traditional medicine in Sakarya province (Turkey) and antimicrobial activities of selected species. In *Journal of Ethnopharmacology*, roč. 95, 2004, s. 287-296.

Výnos Ministerstva pôdohospodárstva Slovenskej republiky z 12. februára 2003 č. 149/2/2003-100, ktorým sa mení a dopĺňa výnos Ministerstva pôdohospodárstva Slovenskej republiky zo 7. októbra 1997 č. 1497/4/1997-100 o úradnom odbere vzoriek a o laboratórnom skúšaní a hodnotení krmív.

ZEGARSKA Z., AMAROWICZ, R., KARMAC, M., RAFALOWSKI, R. 1996. Antioxidative effect of rosemary ethanolic extract on butter, In *Milchwissenschaft*, roč. 51, 1996, s. 195-198.

PodĎakovanie: Práca bola vykonaná vďaka finančnej podpore z grantovej úlohy VEGA č. 1/0235/08.

Kontaktná adresa: MVDr. Slavomír Marcinčák, PhD., Univerzita veterinárskeho lekárstva, Komenského 73, 041 81, Košice, Slovakia, marcincak@uvm.sk

POLYFENOLY A ANTIOXIDAČNÁ AKTIVITA VČELIEHO PEĽU POLYPHENOLS AND ANTIOXIDANT ACTIVITY OF BEE POLLEN

Janka Nôžková, Katarína Fatrcová-Šramková,
Magda Máriássyová, Zlata Kropková

ABSTRACT

The objective of the study was to evaluate correlation between polyphenols content and antioxidant activity of selected bee pollen species: *Brassica napus* subsp. *napus* L., *Helianthus annuus* L. and *Papaver somniferum* L. The bee pollen samples were freeze-dried by table laboratory lyophilizator LYOVAC GT 2 by Amsco/Finn-Aqua. The process of lyophilization lasts until the samples reached 2

% moisture. Antioxidant activity was evaluated by DNA-Based biosensor, according to Heilerova et al. (2003). The polyphenols content was determined by spectrophotometer Folin-Ciocalteu agent with the tannin as reference standard (Singleton et al., 1999). The correlation analysis was evaluated by software SAS 9.1.3. Statistically significant correlation ($P < 0.05$) between polyphenol content and antioxidant activity was determined. Higher values of contained polyphenol and antioxidant activity were detected in *B. napus* pollen versus *H. annuus* L. pollen (1.92-fold and 6.25-fold) and versus *P. somniferum* L. pollen (1.17-fold and 3.2-fold). The polyphenols content in studied samples was in the range from 799 to 1550 mg.kg⁻¹. The antioxidant activity of bee pollen samples occurred in the range from 0.2 to 1.28. The antioxidant activity significantly differs in different plant species.

Key words: antioxidant activity, polyphenol, bee pollen, *Brassica napus* subsp. *napus* L., *Helianthus annuus* L., *Papaver somniferum* L.

ÚVOD

Včelami zbieraný peľ je považovaný za potenciálny zdroj energie pre humánnu výživu. Peľ obsahuje nutričné zložky ako sacharidy, bielkoviny, aminokyseliny, lipidy, vitamíny, minerálne látky a stopové prvky (Bonvehí, Jordá, 1997). Peľ obsahuje aj významné množstvo polyfenolických zložiek, najmä flavonoidov (Almeida-Muradian et al., 2005). Odlišovať rastlinný peľ od včelieho je potrebné z praktického medicínskeho hľadiska (Košík, 1995, Košík, 1997). Včelí peľ je považovaný za nutrične hodnotnú potravinu a využíva sa aj v apiterapii (Bogdanov, 2004). Tento včelí produkt má viaceré farmakologické účinky ako antibiotické, antineoplastické, antidiarhoické a pôsobí ako antioxidačný činidlo (Campos, 1997).

Prírodné antioxidanty sú v centre záujmu už mnoho rokov. Avšak záujem o tieto zložky sa zvýšil v posledných rokoch

s redoxnými vlastnosťami, ktoré im umožňujú pôsobiť ako redukčné činidlá, donátory vodíka a zhášače („quenchers“) singletového kyslíka (Caldwell, 2003). Epidemiologické štúdie dokázali závislosť medzi zvýšeným príjmom fenolických antioxidantov a zníženým rizikom kardiovaskulárnych chorôb a určitých typov rakoviny (Cook, Samman, 1996). Extrakty peľu môžu byť používané ako funkčná potravina alebo potravinový doplnok. Obsahujú množstvo fenolických zložiek schopných blokovať voľné radikály, ktoré sú zodpovedné okrem iného aj za karcinogézu (Tang et al., 2005).

Problematikou peľu sa začali vedci vážne zaoberať v roku 1974, pokusy sa opakovali aj na zvieratách aj klinicky. Rozšíril sa počet prípravkov obsahujúcich peľ. Do apiterapeutických prípravkov, dovtedy obyčajne s materskou kašičkou, prípadne s propolisom, medom a extraktom rastlín, sa začali dostávať aj peľové substancie (Neuschlová, 1995).

Cieľom práce bolo vyhodnotiť závislosť medzi obsahom polyfenolov a antioxidačnou aktivitou lyofilizovaného včelieho peľu.

Tabuľka 1 Antioxidačná aktivita a obsah polyfenolov vo včelom peľi (priemer $\pm$ SD)

Druh peľu	Polyfenoly (mg.kg ⁻¹)	Antioxidačná aktivita (I)
<i>Helianthus annuus</i> L.	803,33 $\pm$ 3,30	0,20 $\pm$ 0,02
<i>Papaver somniferum</i> L.	938,67 $\pm$ 3,09	0,64 $\pm$ 0,02
<i>Brassica napus</i> subsp. <i>napus</i> L.	1545,33 $\pm$ 3,68	1,25 $\pm$ 0,02

kvôli ich významu v prevencii voľnoradikálových chorôb *in vivo*. Nástup rôznych závažných zdravotných problémov, ako je rakovina, ateroskleróza, reumatoidná artritída, zápalové črevné choroby, zníženie funkcie imunitného systému, mozgová dysfunkcia, katarakta a malária, môže byť spomalený prírodnými antioxidantami (Langseth, 1995, Ashwell, 2002).

Prírodné antioxidanty sú primárne rastlinné fenolické zložky, ktoré sa môžu nachádzať vo všetkých častiach rastliny. Nefenolické zahŕňajú karotenoidy a fosfolipidy, ktoré za určitých podmienok môžu tiež vykazovať antioxidačnú aktivitu. Rastlinné fenolické zložky sú multifunkčné. Môžu pôsobiť ako vychytávače (scavengery) radikálov, chelátory kovov, zhášače singletového kyslíka alebo ako redukujúce činidlá. Prírodné antioxidanty sa môžu vyskytovať v rôznych potravinových materiáloch (Gordon, 2003; Howlett, 2008; Diplock et al., 1999).

Viaceré chemické, biochemické a mikrobiologické štúdie boli zamerané na štúdium rôznych zložiek peľu, avšak až nedávno bola pozornosť zameraná na špeciálnu skupinu látok, konkrétne na fenolické zložky (Markham, Campos, 1996, Tomas-Lorente et al., 1992, Campos et al., 1997, 2002, 2003).

Včelí peľ je produkt včiel, ktorý je zložený z nutrične hodnotných zložiek a obsahuje značné množstvo polyfenolových zložiek, ktoré pôsobia ako účinné antioxidanty (Aliyazicioglu et al., 2005). Viacerí výskumníci zistili, že polyfenoly sú antioxidanty

MATERIÁL A METODIKA

Vzorky včelieho peľu pochádzali zo západného Slovenska a boli zberané na jar 2007. Lyofilizácia vzoriek sa uskutočnila na stolovom laboratórnom lyofilizátore LYOVAC GT 2 by Amsco/Finn-Aqua. Samotný proces lyofilizácie trval 80 hodín bez ohrevu až do dosiahnutia vlhkosti vzoriek 2 %. V rámci analýzy antioxidačných vlastností bolo 10 g vzorky rozpustenej v 100 ml 90 % etanolu. Hodnotila sa aktivita takto pripravených roztokov. Antioxidačná aktivita lyofilizovaného včelieho peľu bola hodnotená DNA biosenzorom (Heilerovej et al., 2003), pričom sa sledovalo poškodenie DNA a antioxidačný efekt. Obsah polyfenolov bol stanovený spektrofotometricky Folin-Ciocalteu činidlom s použitím tanínu ako referenčného štandardu (Singleton et al., 1999). Výsledky boli vyjadrené ako miligramy ekvivalentu tanínu na kilogram peľu.

Antioxidačná účinnosť bola hodnotená na základe stupňa poškodenia deoxyribonukleovej kyseliny (DNA) imobilizovanej na povrchu screen-printed elektródy (SPE). Poškodenie DNA sa uskutočňuje účinkom generovaných hydroxylových radikálov pomocou tzv. štiepnej zmesi, zmes Cu(II), kyseliny askorbovej a peroxidu vodíka. Miera poškodenia DNA sa hodnotila na základe dosiahnutej prúdovej odozvy elektrochemického interkalného indikátora [Co(phen)3]³⁺. Mierou antioxidačnej účinnosti testovaných vzoriek bolo porovnanie dosiahnutej prúdovej

odzvy indikátora po ponorení do štiepnej zmesi s testovanou vzorkou (I) k odozve indikátora bez pôsobenia reakčnej zmesi (I_0). Vzorky pri ktorých sa dosiahla vyššia hodnota pomeru I/I_0 ako hodnota odpovedajúca štiepnej zmesi bez prídavku antioxidantu k nepoškodenej DNA (0,27) sa prejavili ako antioxidantne pôsobiace vzorky. Vzorky preukazujúce nižšie hodnoty pomeru ako uvedená hodnota sa správali prooxidatívne v danom reakčnom systéme. Vyššia hodnota I aj pomeru I/I_0 je mierou vyššej antioxidantnej účinnosti vzorky. Zisťovali sme koreláciu medzi obsahom polyfenolov a antioxidantnou aktivitou lyofilizovaných vzoriek včelieho peľu z troch rastlinných druhov: slnečnice ročnej (*Helianthus annuus* L.), z maku siateho (*Papaver*

Antioxidatívne vlastnosti všetkých troch druhov peľu sú uvedené v tab. 1 a pre rôzne druhy peľu boli hodnotené vo viacerých štúdiách (Fatrcová-Šramková, Nôžková, 2008; Fatrcová-Šramková et al., 2008, Nôžková et al., 2009a,b; Fatrcová-Šramková et al., 2009a,b).

Leja et al. (2007), ktorí skúmali antioxidantnú schopnosť včelieho peľu dvanástich rastlinných druhov, zistili, že celková antioxidantná aktivita (tab. 2) sa významne odlišovala pri jednotlivých druhoch (6,8-86,4 % inhibície lipidovej peroxidácie). Pri väčšine (pri siedmich z dvanástich) druhov (*Pyrus communis*, *Malus domestica*, *Taraxacum officinale*, *Aesculus hippocastanum*, *Robinia pseudoacacia*, *Phacelia tanacetifolia* a *Sinapis alba*) antioxidantná aktivita presahovala 60 % (bola v rozsahu 60-90 %). Strednú schopnosť inhibície lipidovej peroxidácie (27,2-55,1 % inhibície lipidovej peroxidácie) zistili pri štyroch druhoch: *Chamerion angustifolium*, *Lupinus polyphyllus*, *Lamium purpureum* a *Trifolium* sp., zatiaľ čo nízka schopnosť bola stanovená pri peli *Zea mays* (6,8 %). Druhy včelieho peľu sú v tabuľke 2 zoradené do troch skupín podľa klesajúcej celkovej antioxidantnej aktivity.

Analýzy antioxidantnej aktivity včelieho peľu poukazujú na veľké rozdiely medzi druhmi.

ZÁVER

Zistili sme závislosť medzi obsahom polyfenolov a antioxidantnou aktivitou pri hodnotení peľu z repky olejnej, maku siateho a slnečnice ročnej. V peli z repky olejnej bol obsah polyfenolov takmer dvojnásobne vyšší ako v peli zo slnečnice ročnej a antioxidantná aktivita bola až cca 6-krát vyššia. Menej výrazné rozdiely sme zaznamenali pri makovom peli, ale obsah polyfenolov ako aj antioxidantná aktivita dosahovali vyššie hodnoty ako pri peli slnečnicovom. V nasledujúcich štúdiách je potrebné sa zamerať na hodnotenie ďalších antioxidantných a nutričných vlastností včelieho peľu vrátane porovnania medzi skúmanými rastlinnými druhmi.

LITERATÚRA

- ALIYAZICIOGLU, Y., DEGER, O., OVALI, E., BARLAK, Y., HOSVER, I., TEKELIOGLU, Y., KARAHAN, S.C. 2005. Effects of Turkish pollen and propolis extracts on respiratory burst for K-562 cell lines. In *International Immunopharmacology*, vol. 5, 2005, no. 11, p. 1652-1657.
- ALMEIDA-MURADIAN L. B., PAMPLONA L. C., COIMBRA S., BARTH, O.M. 2005. Chemical composition and botanical evaluation of dried bee pollen pellets. In *Journal Food Composition and Analysis*, vol. 18, 2005, no. 1, p. 105-111.
- ASHWELL, M. 2002. Concepts of Functional Foods. ILSI Europe, 2002. 37 pp.
- BOGDANOV, S. 2004. Quality and standards of pollen and beeswax. In *Apiacta*, vol. 38, 2004, p. 334-341.
- BONVEHÍ, J. S., JORDÀ, R. E. 1997. Nutrient composition and microbiological quality of honeybee-collected pollen in Spain. In *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 1997, no. 3, p. 725-732.

Tabuľka 2 Antioxidatívna aktivita vybraných druhov včelieho peľu (Leja et al., 2007)

Druh peľu	Celková antioxidantná aktivita (%)
<i>Sinapis alba</i>	86,4
<i>Phacelia tanacetifolia</i>	85,9
<i>Robinia pseudoacacia</i>	84,4
<i>Aesculus hippocastanum</i>	81,9
<i>Taraxacum officinale</i>	77,3
<i>Malus domestica</i>	76,5
<i>Pyrus communis</i>	66,4
<i>Trifolium</i> sp.	55,1
<i>Lamium purpureum</i>	51,1
<i>Lupinus polyphyllus</i>	38,5
<i>Chamerion angustifolium</i>	27,2
<i>Zea mays</i>	6,8

somniferum L.) a z repky olejnej (*Brassica napus* subsp. *napus* L.). Závislosť medzi vybranými ukazovateľmi sme hodnotili použitím softvéru SAS 9.1.3.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Hodnotením korelácie medzi obsahom polyfenolov a antioxidantnou aktivitou včelieho peľu sme zistili štatisticky významnú závislosť ($P < 0,05$), pričom ide o silnú závislosť ($r > 0,66$). Vyššia hodnota obsahu polyfenolov ako aj antioxidantnej aktivity bola zistená v prípade repkového peľu v porovnaní s peľom slnečnicovým ako aj makovým. Obsah polyfenolov bol v peli z repky olejnej 1,92-krát vyšší a v peli z maku siateho 1,17-krát vyšší ako v peli zo slnečnice ročnej a antioxidantná aktivita bola v repkovom peli vyššia až 6,25-násobne a v makovom 3,2-násobne ako v slnečnicovom peli.

Obsah polyfenolov vo včelom peli sledovaných rastlinných druhov bol v jednotlivých vzorkách od 799 do 1550 mg.kg⁻¹. Priemerný obsah polyfenolov dosahoval hodnotu 1090,11 ± 325,51 mg.kg⁻¹. Vo vzorkách včelieho peľu bola antioxidantná aktivita v rozsahu 0,2 až 1,28. Priemerná zistená hodnota antioxidantnej aktivity bola 0,70 ± 0,43.

- CALDWELL, C. R. 2003. Alkylperoxyl radical scavenging activity of red leaf lettuce (*Lactuca sativa* L.) phenolics. In *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, vol. 51, 2003, no. 16, p. 4589-4595.
- CAMPOS, R. M. G. 1997. Caracterização do pollen apícola pelo seu perfil em compostos fenólicos e pesquisa de algumas actividades biológicas. Thesis. School of Pharmacy. Universidade de Coimbra. Portugal, 1997. 318 pp.
- CAMPOS, M. G., MITCHEL, K., CUNHA, A., MARKHAM, K. R. 1997. A systematic approach to the characterization of bee pollens via their Flavonoid/Phenolic profiles. In *Phytochemical Analysis*, vol. 8, 1997, no. 4, p. 181-185.
- CAMPOS, M. G., WEBBY, R. F., MARKHAM, K. R. 2002. The unique occurrence of the flavone aglycone tricetin in myrtaceae pollen. In *Zeitschrift für Naturforschung*, vol. 57, 2002, p. 944-946.
- CAMPOS, M. G., WEBBY, R. F., MARKHAM, K. R., MITCHELL, K. A., CUNHA, A. P. Da. 2003. Age-induced diminution of free radical scavenging capacity in bee pollens and the contribution of constituent flavonoids. In *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, vol. 51, 2003, no. 3, p. 742-745.
- COOK, N. C., SAMMAN, S. 1996. Flavonoids: chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. In *Journal Nutrition Biochemistry*, vol. 7, 1996, no. 2, p. 66-76.
- DIPLOCK, A. T., AGGETT, P. J., ASHWELL, M., BORNET, F., FERN, E. B., ROBERFROID, M. B. 1999. Scientific concepts of functional foods in Europe: consensus document. In *British Journal of Nutrition*, vol. 81 (Suppl.), 1999, no. 4, p. S1-S27.
- FATRCOVÁ-ŠRAMKOVÁ, K., NŮŽKOVÁ, J. 2008. Antiradical activity and content of polyphenols of bee pollen. In *Acta Biochimica Polonica*, vol. 55, 2008, Supplement 4, p. 109.
- FATRCOVÁ-ŠRAMKOVÁ, K., NŮŽKOVÁ, J., KAČÁNIOVÁ, M., MÁRIÁSSYOVÁ, M., KROPKOVÁ, Z. 2008. Microbial properties, nutritional composition and antioxidant activity of *Brassica napus* subsp. *napus* L. bee pollen used in human nutrition. In *Slovak Journal of Animal Science*, vol. 41, 2008, no. 4, p. 198-199.
- FATRCOVÁ-ŠRAMKOVÁ, K., MÁRIÁSSYOVÁ, M., NŮŽKOVÁ, J., KROPKOVÁ, Z. 2009a. Flavonoidy a antiradikálová aktivita vo vybraných druhoch včelieho peľu. In *Antioxidanty 2009*. Zborník recenzovaných prác z I. ročníka vedeckej konferencie s medzinárodnou účasťou. Nitra : SPU, 2009. s. 64-69. ISBN 978-80-552-0209-9
- FATRCOVÁ-ŠRAMKOVÁ, K., MÁRIÁSSYOVÁ, M., NŮŽKOVÁ, J., KROPKOVÁ, Z. 2009b. Rozdiely v antioxidačných vlastnostiach vybraných druhov včelieho peľu. In *Bezpečnosť a kontrola potravín* : Zborník prác z medzinárodnej vedeckej konferencie. Nitra : Slovenská poľnohospodárska univerzita, 2009. s. 99-104. ISBN 978-80-552-0193-1
- GORDON, M. H. 2003. Natural Antioxidants. In *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*. Volume 1. Oxford : Elsevier Science, 2003. p. 261-265. ISBN 0-12-227056-8
- HEILEROVÁ, Ľ., BUČKOVÁ, M., TARAPČÍK, P., ŠILHÁR, S., LABUDA, J. 2003. In *Czech Journal of Food Science*, vol. 21, 2003, no. 2, p. 78-84.
- HOWLETT, J. 2008. Functional Foods from Science to Health and Claims. ILSI Europe, 2008. 35 pp. ISBN 9789078637110
- KOŠLÍK, Š. 1995. Možnosti využitia včelieho peľu v humánnej medicíne. In *Včelár*, roč. 69, 1995, č. 7-8, s. 112-113
- KOŠLÍK, Š. 1997. Úspešné použitie včelieho peľu u pacientov s akútnou vírusovou hepatitídou. In *Slovenský lekár*, roč. 7, 1997, č. 3, s. 15
- LANGSETH, L. 1995. Oxidants, Antioxidants, and Disease Prevention. ILSI Europe, 2002. 37 pp.
- LEJA, M., MARECZEK, A., WYŻGOLIK, G. et al. 2007. Antioxidative properties of bee pollen in selected plant species. In *Food Chemistry*, vol. 100, 2007, no. 1, p. 237-240.
- MARKHAM, K. R., CAMPOS, M. G. 1996. 7- and 8-O-Methylherbacetin-3-O-sophorosides from bee pollens and some structure/activity observations. In *Phytochemistry*, vol. 43, 1996, no. 4, p. 763-767.
- NEUSCHLOVÁ, J. 1995. Peľ ako potravina i liek. In *Výživa a zdravie*, roč. 40, 1995, č. 10, s. 220.
- NŮŽKOVÁ, J., FATRCOVÁ-ŠRAMKOVÁ, K., MÁRIÁSSYOVÁ, M., KROPKOVÁ, Z. 2009a. Antioxidačná aktivita a polyfenoly včelieho peľu. In *Antioxidanty 2009*. Zborník recenzovaných prác z I. ročníka vedeckej konferencie s medzinárodnou účasťou. Nitra : SPU, 2009. s. 189-193. ISBN 978-80-552-0209-9
- NŮŽKOVÁ, J., FATRCOVÁ-ŠRAMKOVÁ, K., MÁRIÁSSYOVÁ, M., KROPKOVÁ, Z. 2009b. Korelačná závislosť medzi obsahom polyfenolov a antioxidačnou aktivitou vo včelom peľi. In *Bezpečnosť a kontrola potravín* : Zborník prác z medzinárodnej vedeckej konferencie. Nitra : Slovenská poľnohospodárska univerzita, 2009. s. 105-108. ISBN 978-80-552-0193-1
- SINGLETON, V. L., ORTHOFER, R., LAMUELA-RAVENTOS, R.M. 1999. Analysis of total polyphenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. In *Methods in Enzymology*, vol. 299, 1999, p. 152-178.
- TANG, B., ZHANG, L., GENG, Y. 2005. Determination of the antioxidant capacity of different food natural products with a new developed flow injection spectrofluorimetry detecting hydroxyl radicals. In *Talanta*, vol. 65, 2005, no. 3, p. 769-775.
- TOMAS-LORENTE, F., GARCIAGRAU, M. M., NIETO, J. L., TOMAS-BARBERAN, F. A. 1992. Flavonoids from *Cistus-Ladanifer* bee pollen. In *Phytochemistry*, 31, 1992, p. 2027-2029.

Podakovanie:

Práca bola riešená s podporou APVT-20-026704, aAV/1121/2004.

Kontaktná adresa:

Ing. Janka Nôžková, PhD., Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre, FAPZ, IOBBB, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, tel. 037/641 4778, janka.nozkova@uniag.sk

POROVNÁVANIE HLADÍN ZINKU A MEDI U STRELENÝCH A ZABITÝCH BAŽANTOV.

COMPARISON OF ZINC AND COPPER IN SHOT AND KILLED PHEASANTS

*Magdaléna Skalická, Beáta Koréneková,
Ivona Kožárová*

ABSTRACT

Zinc and copper have been determined in muscle and livers of pheasants (*Phasianus colchicus*). The samples of muscle and liver were analysed using atomic absorption spectrometry method (AAS) and expressed on a wet weight. The pheasants (n=7) were shot by hunters in the defined area in Eastern Slovakia or killed (n=6) without shooting. The shot pheasants had highest mean concentration of zinc and copper in liver, breast and leg muscle in comparison to killed pheasants. The highest mean values of zinc (236.91 mg.kg⁻¹) and copper (15.70 mg.kg⁻¹) were detected in liver of shot pheasants. On the other hand, the killed pheasants had lower mean concentrations of zinc (190.50 mg.kg⁻¹) and copper (13.38 mg.kg⁻¹) in liver.

Keywords: pheasant, zinc, copper, AAS

ÚVOD

Bažant poľovný alebo bažant obyčajný (*Phasianus colchicus*) je kura z čeľade bažantovitých. Kurovitý vták bažant má v našich lesoch a na poliach výborné podmienky. Ideálnymi miestami sú lužné lesy, najmä pozdĺž väčších riek. Bažant vyniká žravosťou, je zberateľom hmyzu, najviac škodlivého, ale chytá i mladé hraboše a myši (Hell et al., 2004). Ako dôsledok akumulácie rôznych kontaminantov sa v svalovine a orgánoch bažantov môžu vyskytovať niektoré reziduá, ktoré prenikajú do organizmu z potravy alebo z prostredia a tak sa sekundárne môže kontaminovať konečný konzument. Výskyt kontaminantov je závislý od koncentrácie v pôde a dostupnosti rastlinám. Pravidelný aj keď nie vysoký príjem potravou je považovaný za rizikový, pre ich kumuláciu v cieľových orgánoch a tkanivách. Medzi jednotlivými chemickými prvkami existujú interakcie (Andreji et al., 2005), vzájomný vzťah sa prejavuje synergicky alebo antagonisticky, ktorý prebieha v krmive, v tráviacom trakte, ako aj v procese tkanivového a bunkového metabolizmu (Massanyi et al., 2000; Kolesárová et al., 2008; Capcarová et al., 2008). Antagonizmus môže byť jednostranný – vápnik inhibuje absorpciu zinku a mangánu, opačné pôsobenie však neprebieha, obojstranný – fosfor a horčík, zinok a meď, brzdia si navzájom absorpciu. Zinok ako esenciálny prvok má v organizme mnohostrannú funkciu. Vyskytuje sa vo všetkých bunkách organizmu. Voľná forma zinku tvorí metaloproteínový komplex. Viazaný zinok tvorí zlúčeninu s globulínom. Zinok sa viaže na špecifický proteín v enterocytoch a potom prestupuje do lymfy a krvi. Resorpcia zinku prebieha v tenkom čreve a je závislá od množstvo obsahu zinku v natrávenom krmive, potrebou

organizmu, chemickej formy a rozpustnosti zinku v doudene. Meď je esenciálnym prvkom, ktorá sa vyskytuje v organizme vo forme zložitých komplexov, ako napr. hemokyanin, hemokuprein, hepatokuprein a proteidy medi s enzymatickou aktivitou. Resorpcia medi prebieha v tenkom čreve aktívnym spôsobom, kde dôležitú úlohu zohrávajú aminokyseliny a špecifická bielkovina, ktorá obsahuje sulfhydrylové skupiny. Po absorpcii v tráviacej sústave sa meď viaže na albumín a transportuje sa do pečene. Toxicita oboch prvkov je zriedkavá (Cigánková et al., 2008; Kottferová 1996). Cieľom práce bolo zistiť o aktuálnosti výskytu zinku a medi vo vybraných orgánoch bažanta obyčajného (*Phasianus colchicus*).

MATERIÁL A METODIKA

Vzorky biologického materiálu (stehenná svalovina, prsná svalovina a pečeň) pochádzajú z bažantov (*Phasianus colchicus*), ktoré boli zabitú z farmového chovu (6ks) z Účelového zariadenia pre chov rýb, včiel a zveri v Rozhanovciach. 7 ks bažantov pochádzali z Lemešian v rámci riadneho odstrelu. Spolu bolo analyzovaných 39 vzoriek na prítomnosť množstva Cu a Zn v nasledovných tkanivách a orgánoch (13 ks prsnej svaloviny, 13 ks stehennej svaloviny a 13 ks pečene). Vzorky boli spracované mineralizačným systémom (MLS-1 200 MEGA) Milestone, s technológiou mikrovlnného rozkladu vzoriek, za pomoci použitia nízko vriacich kyselín a následne analyzované na atómovom absorpčnom spektrometri firmy Unicam Solar 939 (UK) na prítomnosť Cu a Zn (pri vlnovej dĺžke 324.8; 213.9 nm). K stanoveniu bola použitá metodika, ktorú uvádza Kocourek et al. (1992).

VÝSLEDKY A DISKUSIA

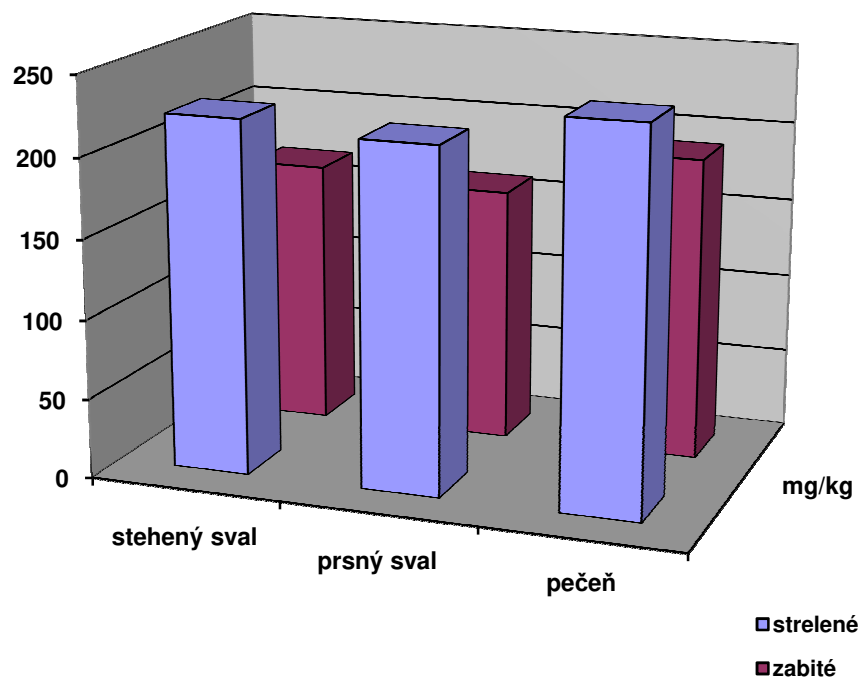
Získané výsledky sú prezentované v príslušných orgánoch a v tkanivách v grafoch 1 a 2.

Najvyššie priemerné hladiny zinku (graf č. 1) sme zistili v pečeni odstrelených bažantov 236,91 mg.kg⁻¹ ž.h. Priemerné hladiny zinku v pečeni zabitých bažantov boli nižšie (190,50 mg.kg⁻¹ ž.h). V stehennej svalovine (222,20 mg.kg⁻¹ ž.h.) a v prsnej svalovine (215,30 mg.kg⁻¹ ž.h.) boli pozorované vyššie priemerné hodnoty zinku v porovnaní so stehennou (167,30 mg.kg⁻¹ ž.h) a prsnou (160,37mg.kg⁻¹ ž.h) svalovinou zabitých bažantov. Podobne ako v prípade hodnôt zinku, boli priemerné hladiny medi vyššie hodnoty v pečeni odstrelených a zabitých bažantov (graf č.2). Priemerné hladiny medi v pečeni odstrelených bažantov (15,70 mg.kg⁻¹ ž.h) boli vyššie ako v pečeni zabitých bažantov (13,38 mg.kg⁻¹ ž.h). Hladiny medi v stehennej (11,34 mg.kg⁻¹ ž.h) a v prsnej (11,48 mg.kg⁻¹ ž.h) svalovine odstrelených bažantov boli vyrovnané, ale nižšie hladiny sme zaznamenali vo svalovinách zabitých bažantov (stehenná 10,22 mg.kg⁻¹ ž.h a prsná svalovina 9,63 mg.kg⁻¹ ž.h).

Výsledky analýz poukazujú na vyššie hladiny Cu a Zn v orgánoch a tkanivách nami analyzovaných vzoriek odstrelených bažantov žijúcich vo voľnej prírode v porovnaní s výskytom týchto stopových prvkov zabitých bažantov pochádzajúcich z farmového chovu.

Voľne žijúce živočíchy sú vhodným bioindikátorom znečistenia ekosystémov. Vzájomná interakcia stopových prvkov (Zn, Cu, Pb, Cd) je zložitý komplex vzájomných biotických vzťahov podmienených ich výskytom

Graf 1 Hladiny zinku strelených a zabitých bažantov v stehennej, prsnej svalovine a v pečeni v mg.kg^{-1} .



v prostredí a následným kolobehom v potravinovom reťazci: pôda – rastlina – zverina (Beňová et al., 2007).

Podľa Sterenborga et al. (2003) práve v oblastiach zaťažených polutantmi kovov, nachádzajú sa aj vyššie koncentrácie kovov, ako sú Zn, Cu, Cd a Pb. Podobne Szymczyk a Zalewski (2003) udávajú vyššie koncentrácie Cu a Zn v pečeni než vo svalovine u kačiek divých z oblasti Slask v Poľsku. Viacerí autori poukazujú na kumuláciu Zn a Cu vo vnútorných orgánoch zvierat (Magali et al., 2008; Skrivan et al., 2005; Jevsnik a Doganoc, 2003). U Japonských získaných z chovu prepelíc, boli nižšie priemerné hladiny Zn a Cu vo svalovine (51,08; 4,82 mg.kg^{-1} ž.h.) a v pečeni (50,61; 9,35

mg.kg^{-1} ž.h.) v porovnaní so zistenými hladinami Zn a Cu u bažantov (Skalická et al., 2008).

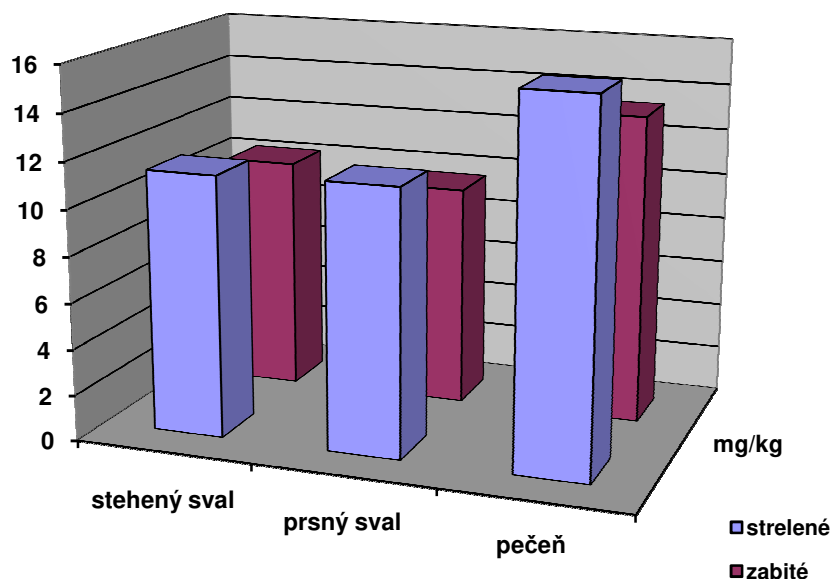
ZÁVER

Zverina nie je podstatnou zložkou potravinového spektra a k znehodnocovaniu nutričných hodnôt mäsa dochádza zmenou obsahu mikroelementov následným vyšším výskytom v prírodnom prostredí. Nami zistené výsledky poukazujú na vyššie hladiny zinku a medi v orgánoch a tkanivách strelených bažantov. Pravdepodobnosť zvýšeného výskytu mohla byť ovplyvnená vzájomnými interakciami s inými prvkami.

LITERATÚRA

ANDREJI, J. – STRÁŇAI, I. – MASSANYI, P. –

Graf 2 Hladiny medi strelených a zabitých bažantov v stehennej, prsnej svalovine a v pečeni v mg.kg^{-1} .



VALENT, M. 2005. Concentration of selected metals in muscle of various fish species. In: *Journal of Environmental Science and Health, part A: Toxic/Hazardous Substances & Environmental Engineering*, 40, 2005, 899-912

BENOVA, K. – DVOŘÁK, P. – FÁLIS, M. – SKLENÁŘ, Z. 2007. Interaction of low doses of ionising radiation potassium dichromate and cadmium chloride in *Artemia franciscana* Biotest. *Acta Vet Brno*, 76, 2007, 35-40.

CAPCAROVA, M., KOLESAROVA, A., ARPASOVA, H., MASSANYI, P., LUKAC, N., KOVACIK, J., KALAFOVA, A., SCHNEIDGENOVA, M. 2008. Blood biochemical dynamics and correlations in laying hens after experimental nickel administration. In *International Journal of Poultry Science*, vol. 7, 2008, no. 6, p. 538-547.

CIGÁNKOVÁ, V. – MESÁROŠ, P. – ALMAŠIOVÁ, V. – BÍREŠ, J. 2008. Morphological achanges of testes in zinc deficient boars, *Acta Veterinaria Beograd*, 58, 2008, 89-97

HELL, P. – GAŠPARÍK, J. – KRAJNIAK, D. – SLAMEČKA J. 2004. Chov malej zveri na Slovensku: *Zborník Nitra: VÚŽV*, s.39-47.

JEVŠNIK, M. – DOGANOC, D.Z. 2003: Trace elements in Slovenia poultry tissues *J Food Prot*, 66: 686-690.

KOCOUREK, V. 1992: Metódy analýzy cudzorodých látok v potravinách, Praha, 55.

KOLESAROVA, A., CAPCAROVA, M., ARPASOVA, H., KALAFOVA, A., MASSANYI, P., LUKAC, N., KOVACIK, J., SCHNEIDGENOVA, M. 2008. Nickel-induced blood biochemistry alterations in hens after an experimental peroral administration. In *Journal of environmental science and health; Part B*, vol. 43, 2008, no. 7, p. 625-632.

KOTTTEROVÁ, J.: 1996: Residual contaminants of cadmium in relation to environmental protection, health and quality of food products. *Disertation work, Košice*, pp 130.

MAGALI, L. – ANDRE, J. M. – BERNADET, M. D. – GONTIER, K. – GERARD, G. – DAVAIL, S. 2008: Concentrations of metals (Zn, Cu, Cd, Hg) in three domestic

ducks in France: Pekin, Muscovy and Mule ducks. *J Agric Food Chem*, 56, 2008, 281-288

MASSANYI, P. – TRANDZIK, J. – LUKÁČ, N. – STRAPÁK, P. – KOVÁČIK J. – TOMAN, R. 2000: The contamination of bovine semen with Cd, Pb, Cu and Zn and its relation to the quality of spermatozoa used for insemination, *Folia Vet* 44, 2000, 150-153

SKALICKÁ, M. – KORÉNEKOVÁ, B. – NAĎ, P. 2008: Distribution of trace elements in liver and muscle of Japanese quails. *Slovak Journal Animal Sci.*, 4, 2008, 187-189

STERENBORG, I. – VORK, N. A. – VERKADE, S. K. – CORNELIS, A.M. – VAN GESTEL – VAN STRAALLEN, N. M. 2003: Dietary zinc reduces uptake but not metallothionein binding and elimination of cadmium in the springtail, *Orchesella cincta*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 22, 5: 1167–1171

SZYMCZYK, K. – ZALEWSKI, K. 2003: Copper, zinc, lead and cadmium content in liver and muscle of mallards and other hunting fowl species in Warmia and Mazury in 1999-2000. *Polish Journal of Environmental Studies*, 12, 2003, 381-386.

SKŘIVAN, M. – SKŘIVANOVA, V. – MAROUNEK, M. 2005 Effect of dietary zinc, iron and copper in layer feed on distribution of these elements in eggs, liver, excreta, soil and herbage. *Poultry Sci.* 84, 2005, 1570-1575

Práca bola realizovaná v rámci projektu VEGA 1/0403/08

Kontaktná adresa:

MVDr. Magdaléna Skalická, PhD. Ústav výživy, dietetiky a krmovinarstva, Univerzita veterinárskeho lekárstva v Košiciach, Komenského 73, 041 81 Košice. skalicka@uvm.sk

POLYPHENOLS IN CRANBERRIES IN RELATIONSHIP TO STORAGE DURATION IN FREEZING BOX

Alena Vollmannová

ABSTRACT

The determination of polyphenols content relation to storage duration at -18°C in freezing box in fruits of 6 cranberry cultivars (Koralle, Ida, Sussi, Sanna, Linnea, Runo Bielawskie) is the aim of this study. In ethanolic cranberry extracts total polyphenols contents were during the time of 6 months at period of 3 months spectrophotometrically determined. Significant differences of total polyphenol (TP) contents ($P < 0,01$) among the observed cultivars were confirmed. With exception of cv. Sussi in all observed cultivars of cranberries 6% - 30% increased TP contents in relationship to the first measurement after first 3 months of the storage in freezing box were confirmed. After 6 months of cranberry storage in freezing box in all observed cultivars the increase of TP contents in relationship to the first measurement were determined. The changes of TP contents were statistically significant ($P\text{-value} < 0,01$) in all cultivars with exception of cv. Ida. The enhancing was in interval 7%– 29%, the average increase was 17%. Our results confirmed, that

fresh as well as frozen cranberry fruits are rich source of bioactive compounds.

Keywords: cranberry, cultivar, polyphenol, freezing box

INTRODUCTION

Phenolic compounds are secondary metabolites of plants with important role in their growth and reproduction and protection against pathogens. Phenolic compounds exhibit positive influences on the human organism including antioxidant activity, anti-allergenic, anti-atherogenic, anti-inflammatory, anti-microbial and cardioprotective effects. But phenolic compounds can have also antinutritional effects demonstrated by many researchers (Stavric and Matula, 1988). These effects include interference with pancreatic digestion and methionine deficiency (Singleton and Kratzer, 1969). According to Morton (1989) there is even a significant correlation between the incidence of cancer in some parts of the world and excessive drinking of tea and apple-based drinks because of high contents of polyphenols. Salunkhe et al. (1989) have also associated the possibility of high risk of cancer incidence to the chronic ingestion of high quantities of tannins in diet. However, they suggested, that regular consumption of tannins may induce the development of defensive mechanism by animals and human beings to lower the risk of cancer. High consumption of polyphenols may also increase the risk of iron depletion or affect drug bioavailability and pharmacokinetics. On the other hand

Table 1 Contents of selected macro- and microelements (mg.kg⁻¹) in cranberry cultivars

Cultivar	Mg	K	Fe	Na
Koralle	505.3	5860	15.7	9.1
Ida	478.3	5760	14.2	traces
Sussi	521.5	5930	29.3	traces
Sanna	489.9	5860	22.8	7.4
Linnea	555.2	5690	19.9	4.3
Runo Bielawskie	491.9	7690	10.7	2.9

polyphenol intake from human diet is usually lower than the risk amount and polyphenol bioavailability is also very low.

Small fruits e.g. blueberries, cranberries, black currants, crowberries, chokeberries and lingonberries are known as sources of phenolic compounds like flavonoids and phenolic acids with positive effects on human health. Cranberries contain low level of sodium, high amounts of potassium, low sugar content, high content of polyphenols as flavonols and tannis, high level of antioxidants (Sikora et al., 2008) and are absent of cholesterol. Because of high levels of beneficial bioactive components and their synergistic effects cranberries can prevent the adhesion of certain bacteria including *E. coli* and so help in prevention of urinary tract infection, have a beneficial effect on the cardiovascular system, can reduce oxidation of LDL-cholesterol and help against heart diseases and cancer. Cranberries contain no cholesterol, no fat and are low in sodium. Various cranberry products may contain substantial levels of dietary fiber and certain vitamins, as well as a variety of photochemical that may be beneficial to health. On a fresh weight basis, cranberry had the highest total phenols from 20 fruits commonly consumed in the American diet, and was distantly followed by red grape (Vinson et al., 2001). Because of high content of oxalates in cranberries (Howe and Bates, 1987) it has been suggested that intake of cranberry juice be limited to no more than one liter per day to avoid possible aggravation in patients with urinary stones.

The determination of polyphenols content relation to storage duration at -18°C in freezing box in fruits of 6 cranberry cultivars is the aim of this study.

MATERIAL AND METHODS

The samples of 6 cranberry cultivars Sussi, Sanna, Ida, Koralle (middle early), Linnea, Runo Bielawskie (middle late,) were obtained from the research breed station in Kriva on Orava. From manually collected cranberries 100g samples were weighted and stored in PE bags in freezing box at temperature – 18 °C. From cranberry samples 50 g were homogenised and extracted by 100 ml 80% ethanol during 12 hours. In obtained extracts total polyphenols contents were during the time of 6 months at period of 3 months spectrophotometrically determined (Shimadzu UV/VIS – 1240). Total phenolics content were determined with using of Folin-Ciocalteu agens. Absorbance was measured at 765 nm against blank sample.

RESULTS AND DISCUSSION

The influence of cultivars on macro- and microelements content is evident. Middle late cultivars of observed cranberries have higher Mg and K, (7 and 14% respectively) and lower Fe (25%) and Na (13%) contents than middle early cultivars. All cultivars are low in sodium (table 1).

Statistically significant differences (P-value < 0,01). of total polyphenols (TP) contents only between cv. Koralle – cv. Sanna and cv. Koralle – cv. Sussi were confirmed (Figure 1). The determined average TP contents in observed cranberry cultivars are in interval 1076.29 mg.kg⁻¹ (cv. Koralle) – 1414.98 mg.kg⁻¹ (cv. Sanna). Borowska et al. (2009) determined higher TP contents in 6 American cranberry cultivars (1921 mg.kg⁻¹ - 3747 mg.kg⁻¹) and in wild cranberries (2885 mg.kg⁻¹) and also confirmed the

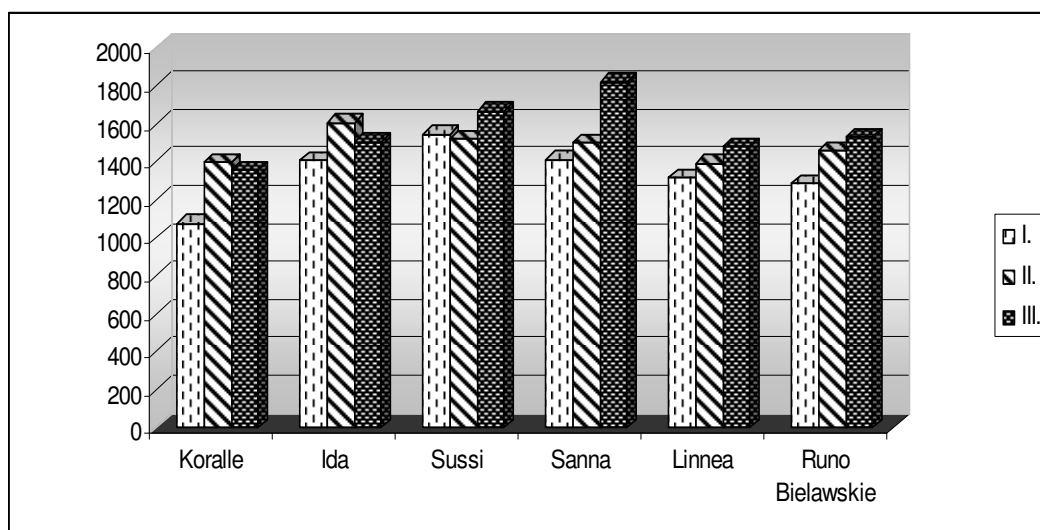


Figure 1 Total polyphenols content in cultivars of cranberries (mg.kg⁻¹)

significant differences of TP among the cultivars. Even higher TP contents (7990 mg.kg^{-1} - 4745 mg.kg^{-1}) of cranberry (cv. Pilgrim) in four different maturity stages (light green, blush, light red and dark red) were determined by **Çelik et al. (2008)**. On the other hand **Wang and Stretch (2001)** determined lower TP contents in 3 cranberry cultivars (1200 mg.kg^{-1} - 1375 mg.kg^{-1}). These results are similar to our ones.

According to **Häkkinen et al. (1999)** concentrations of phytochemicals in berries are influenced by many factors including environmental conditions, degree of ripeness, cultivar, cultivation site, processing and storage of the fruit.

With exception of cv. Sussi in all observed cultivars of cranberries 6% (cvs. Linnea, Sanna) - 30% (cv. Koralle) increased TP contents in relationship to the first measurement after first 3 months of the storage in freezing box were confirmed (Figures 2 – 7). In cv. Sussi the slightly decreased TP content (2%) was determined. After 3 months of storage in freezing box 40% statistically

significant differences ($P\text{-value} < 0,01$) of TP contents among observed cranberry cultivars were confirmed.

After 6 months of cranberry storage in freezing box in all observed cultivars the increase of TP contents in relationship to the first measurement were determined. The changes of TP contents were statistically significant ($P\text{-value} < 0,01$) in all cultivars with exception of cv. Ida. The enhancing was in interval 7% (cv. Ida) – 29% (cv. Sanna), the average increase was 17%. After 6 months of storage in freezing box 87% statistically significant differences ($P\text{-value} < 0,01$) of TP contents among observed cranberry cultivars were confirmed. At the end of long-term frozen storage during 12 months, **Ancos et al. (2000)** observed no significant change of total phenolic content in fruits of raspberries. For the first 6 months of storage a slight lowering (no significant) of phenolics in cultivars of blueberries was observed by **Skupień (2006)**. But after 12 months of storage in freezing box the increase of total polyphenol in interval 0.2% - 22 % was confirmed.

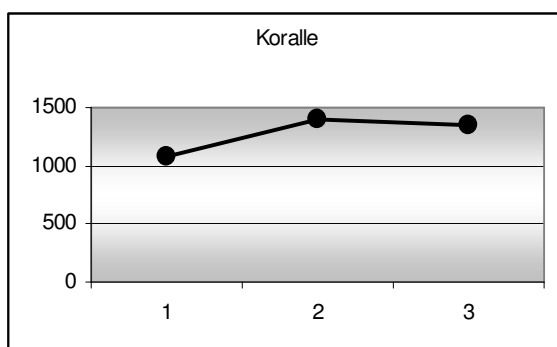


Figure 2 Changes of TP content in cv. Koralle

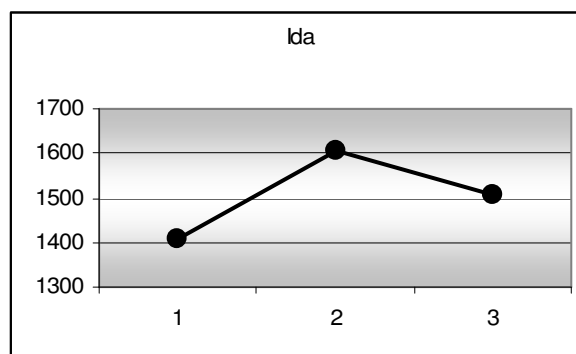


Figure 3 Changes of TP content in cv. Ida

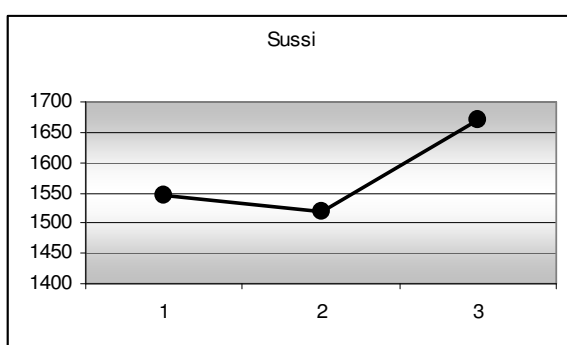


Figure 4 Changes of TP content in cv. Sussi

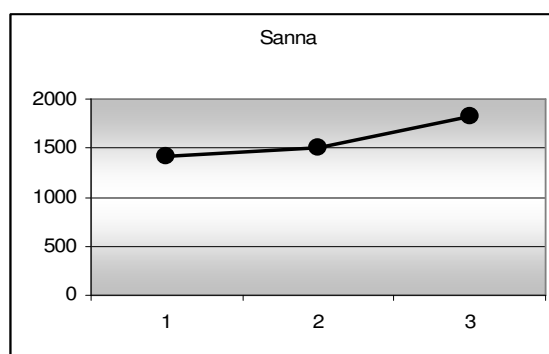


Figure 5 Changes of TP content in cv. Sanna

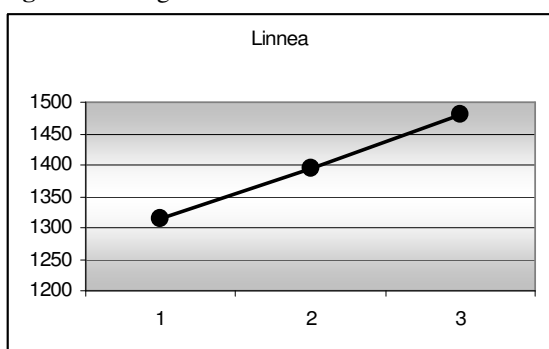


Figure 6 Changes of TP content in cv. Linnea

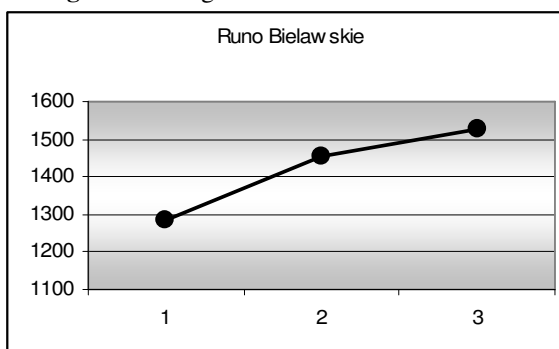


Figure 7 Changes of TP content in cv. Runo Bielawskie

CONCLUSIONS

Our results confirmed, that the amount of bioactive compounds (total phenolics) in the frozen cranberries was higher than that in the fresh fruits. Nevertheless the amount of polyphenols in cranberries is from the point of their potentially risk effects low and safe. On the contrary cranberries are associated with many positive health benefits because of optimal polyphenol content. Long-term frozen storage is the suitable method for preservation of total phenolic and total anthocyanin content and antioxidant activity of cranberry fruits. Our results also confirmed, that fresh as well as frozen cranberry fruits are rich source of bioactive compounds

REFERENCES

- ANCOS B. et al. 2000. Ellagic acid, vitamin C, and total phenolic contents and radical scavenging capacity affected by freezing and frozen storage in raspberry fruit. In *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 2000, 4565-4570
- BOROWSKA, E.J. et al. 2009. Polyphenol, anthocyanin and resveratrol mass fractions and antioxidant properties of cranberry cultivars. In *Food Technol. Biotechnol.* 47 (1), 2009, 56-61
- ČELIK, H. et al.. 2008. Phytochemical accumulation and antioxidant capacity at four maturity stages of cranberry fruit. In *Scientia Horticulturae*, 117 (4), 345-348
- HÄKKINEN, S. et al.. http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_ud=i=B6T6V-3XDHHG-4&_user=3838281&_rdoc=1&_fmt=&_orig=search&_sort=d&_view=c&_acct=C000061504&_version=1&_urlVersion=0&_userid=3838281&md5=5b7a29f6aa9045e1d8c54ebdfa34cb4 - affd#affd 1999: Screening of selected flavonoids and phenolic acids in 19 berries. In *Food Research International*, 32, 345 – 353
- HOWE, S. M., BATES, F. 1987. The cranberry juice cure: Fact or fiction? In *AUAA Journal* (July-September): 13-16
- MORTON, J. F. 1989. Tannin as carcinogen in bush-tea: tea, mate, and khat. In *Chemistry and Significance of Condensed Tannins*. New York, 1989, 403-416
- SALUNKHE, D. K. et al.. 1989. *Dietary Tannins: Consequences and Remedies*. CRC Press, Boca Raton, FL.
- SIKORA, E. et al.. 2008: The sources of natural antioxidants. In *Acta Sci. Pol., Technol. Aliment.*, 7(1), 1989, 5-17
- SINGLETON, V. L., KRATZER, F. H. 1969. Toxicity and related physiological activity of phenolic substances of plant origin. In *J. Agric. Food Chem.*, 17, 1969, 497-512
- SKUPIEŃ, K. 2006. Evaluation of chemical composition of fresh and frozen blueberry fruit. In *Acta Sci. Pol., Hortorum Cultus*, 5(1): 19-25
- STAVRIC, B., MATULA, T. I. 1988. Biological significance of flavonoids in foods: a review of some recent issues and problems. In *Bull. Liaison Groupe Polyphenols*, 14, 1988, 95-104
- VINSON, J. A. et al.. 2001. Phenol antioxidant quantity and quality in foods: fruits. In *J. Agric. Food Chem.*, 2001, 49 (11), 5315-5321
- WANG, S. Y. , STRETCH, A. W. 2001. Antioxidant capacity in cranberry is influenced by cultivar and storage temperature. In *J. Agric. Food Chem.* 49, 2001, 969-974

Acknowledgments:

The work was supported by grants KEGA 3/5081/07, VEGA 1/0030/09, APVV SK-SI-0008-08

Contact address:

doc. RNDr. Alena Vollmannová, PhD., Dept. of Chemistry, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Slovak University of Agriculture, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra; Slovak Republic. Tel. +421376414374; e-mail: alena.vollmannova@uniag.sk

MONITORING FALŠOVANIA OVČIEHO MLIEKA A VÝROBKOV Z NEHO NA SPOLOČNOM EURÓPSKOM TRHU S POTRAVINAMI MONITORING OF SHEEP MILK AND MILK PRODUCTS ADULTERATION ON COMMON EUROPEAN FOOD MARKET

*Zeleňáková Lucia, Šesták Miroslav, Židek
Radoslav*

ABSTRACT

The goal of our work was to assess the current situation in counterfeiting of the sheep milk and sheep milk products from Slovakia as well as from some countries in the EU. We evaluated the achievements according to the

requirements of the valid legal standards. In the years 2007 - 2009, we realized laboratory analysis aimed to monitor the counterfeiting of sheep milk and its products. We collected samples of the sheep's milk, cheese and sheep cheese (70 samples together) during that period from producers and processors of the milk from various regions of Slovakia, as well as from a trade network in Slovakia and selected countries of the EU. We used PCR for detection. From the total number (20) of the analyzed sheep's milk samples, cow's milk occurrence was detected in 8 samples. From the 30 samples of sheep cheese 12 samples contained a mixture of the cow's milk. The exception was samples of sheep cheese, such as traditional dairy products, which are composed of several kinds of milk (min 50 % sheep's milk, which is declared on the label. We used PCR, so the exact quantities could not be detected.

Keywords: PCR, sheep milk, cheese, adulteration, detection

ÚVOD

Slovensko má bohaté tradície s ovčím i kozím mliekarstvom a má aj veľké predpoklady na ich ďalší

rozvoj. Podmienkou však je, aby sa na každej úrovni riadenia (či už v priemyselnom alebo farmárskom spracovaní) sa urobili dostupné opatrenia tak, aby sa dosiahla konkurencieschopnosť našich výrobkov so zahraničnými, aby sa zvýšila produktivita práce pri získavaní a spracovaní mlieka, aby sa zabezpečila správna výrobná prax, dobrá kvalita a zdravotná bezpečnosť. Dôležitou požiadavkou je, aby naši chovatelia i spracovatelia mali rovnocenné podmienky a podporu, aké sú bežné v krajinách EÚ (Herian, 2008). Bielkoviny ovčieho mlieka a výrobkov z neho sa vyznačujú vysokou biologickou hodnotou a ich obsah a zloženie sú považované za hlavné faktory determinujúce výťažnosť syrov a kvalitu konečných výrobkov (Boroš, 2005). Ovčie mlieko má v porovnaní s kravským mliekom približne o 65 – 75 % vyšší obsah bielkovín, z ktorých kazeín tvorí 80 až 85 %. Pri analýze tuku v kravskom a ovčom mlieku potvrdili viacerí autori bohatšie zastúpenie mastných kyselín v ovčom mlieku, čo mu dáva osobitné vlastnosti, prejavujúce sa najmä charakteristickou chuťou a vôňou ovčích syrov (Kontová, 2003). Mliečny cukor (laktóza) je relatívne v ovčom mlieku menej zastúpený (43 – 45 g.l-1) ako v kravskom mlieku (47 – 52 g.l-1) (Herian, 2001). Základnou technologickou vlastnosťou mlieka je jeho syriteľnosť. Syriteľnosť mlieka je kombináciou iniciačnej enzýmovej hydrolýzy a následne enzýmovej nezávislej agregáčnej reakcie proteínov. Dobrá syriteľnosť mlieka závisí na jeho neporušenom zložení, na obsahu kazeínových bielkovín, ich zložení a genetickom type, na obsahu minerálnych látok a na prirodzenom pH mlieka, ktoré s týmito faktormi súvisia (Legarová, Kouřinská, 2007).

Dôvody na falšovanie ovčieho mlieka

Množstvo mlieka u oviec sa mení počas dňa, v priebehu laktácie i s poradím laktácie. Na produkciu mlieka vplyva plemeno, rodičia, početnosť vrhu, výživa, klimatické podmienky, ako i mnohé ďalšie činitele. Je isté, že dedičné založenie je prvotným faktorom, ale vplyv ostatných činiteľov je v niektorej laktácii taký silný, že ovce s vysokou produkciou mlieka v jednej laktácii majú v inej pomerne nízku produkciu. To nabáda spracovateľov ovčieho mlieka k jeho falšovaniu. Dôvody na falšovanie mlieka sú v prvom rade ekonomické. Základným cieľom väčšiny falšovateľov je predávať lacnejší produkt, surovinu, či výrobok drahšie (Calvo et al., 2002; www.agroporadenstvo.sk).

Preto je dôležité chrániť spotrebiteľa zaistením adekvátnej kontroly a použitím vhodných testovacích metód pri odhaľovaní falšováním znehodnoteného mlieka (Sawyer et al., 2003; Hurley et al., 2004).

Dôvody, prečo je odhalenie falšovania mlieka dôležité pre spotrebiteľa:

- Pri miešaní drahšieho mlieka ovčieho a kozieho s kravským dochádza k redukcii výrobných nákladov a zníženiu produkcie kvalitných výrobkov (Maudet, Taberlet, 2001).
- Chrániť konzumentov, ktorí si neprajú konzumovať mlieko iných druhov. Isté percento obyvateľstva sa vyznačuje alergiou na zložky niektorých druhov mliek (Halken, 2003).

Konzumácii niektorých druhov mliek sa spotrebiteľia snažia vyhnúť aj z náboženských, etických alebo kultúrnych dôvodov (Shatenstein, Ghadirian, 1998).

V mnohých krajinách má detekcia falšovania syrov mimoriadny význam najmä z hľadiska zachovania tradícií ich výroby. Z uvedeného dôvodu získali mnohé syry tzv. ochrannú značku originality (PDO), čo znamená, že sú vyrobené z jedného druhu mlieka a v označení je táto skutočnosť deklarovaná (Bottero et al., 2002; Herman, 2001). V Portugalsku sú typy syrov považované za tradičné výrobky s vysokou ekonomickou hodnotou. „Transmontano“ kozí syr je produkt s ochrannou značkou originality, pričom sa na jeho výrobu používa iba mlieko jedného plemena kozy „Serrana Transmontana“ (De La Fuente, Juárez, 2005).

Tab. 1 Prehľad krajín produkujúcich ovčie syry (Harbutt, 1999)

Krajina	Syr
Francúzsko	Roquefort, Abbaye de Belloc, Peral
Taliansko	Canestrato Pugliese, Fiore Sardo, Pecorino Romano
Anglicko	Friesla, Olde York
Írsko	Orla
Španielsko	Castellano, Idiazabal, Manchego, Roncal, Zamorano
Portugalsko	Serra da Estrela
Grécko	Kefalotiri, Myzithra, Feta
Turecko	Beyaz Peynir, Mihalic Peynir
Slovensko	Bryndza
Bulharsko	Katschkawalj
Maďarsko	Liptoi

V ostatných rokoch sa do popredia dostávajú metódy založené na DNA identifikácii, ktoré majú na rozdiel od iných metód význam aj pri analýzach vyzretých syrov, či tepelne ošetrovaných mliečnych výrobkov. Pozitívom je vysoká citlivosť a nenáročnosť na stav použitej makromolekuly, čo umožňuje jej využitie vo výskume (Dalmasso, 2004). PCR umožňuje selektívne naamplifikovať požadovaný úsek DNA v skúmvke in vitro do miliónového počtu kópií. Metóda napodobňuje replikačný systém, ktorý existuje v každej bunke a realizuje sa pred bunkovým delením, keď dochádza ku zdvojeniu genetického materiálu (Bauerová, Turčáni, Omelka, 2004). Bottero et al. (2003) vyvinuli multiplexnú PCR na identifikáciu kravských, kozích a ovčích mliek v syroch. Rea et al. (2001) tiež testovali PCR metódu pri odhalení nedeklarovaného 1 % prídavku kravského mlieka do mlieka bizónieho a syrov typu Mozzarella a Maudet a Taberlet (2001) vyvinuli PCR metódu založenú na odhaľovaní kravského mlieka v kozích syroch. Naviac, metódy založené na DNA identifikácii, majú na rozdiel od iných metód význam pri analýzach vyzretých syrov (Mayer, 2005) či tepelne ošetrovaných mliečnych výrobkov (López-Calleja et al., 2004). Piknová, Krahulcová, Kuchta (2002) použili na dôkaz kravskej mliečnej zložky v ovčích a kozích syroch jednoduchý druhovo špecifický detekčný PCR systém

orientovaný na mitochondriálny gén kódujúci cytochróm b, ktorý sa v predchádzajúcom výskume osvedčil na dôkaz hovädzieho podielu v mäsových výrobkoch. **Mafrá et al. (2004)** vyvinuli inú techniku s cieľom kvantifikovať prídavok kravského mlieka vo vzorkách ovčích syrov prostredníctvom dvojitej PCR techniky, ktorá používa normalizovanú kalibračnú krivku na kontrolu problému spojeného s DNA extrakciou a prípravou gélu. **Mafrá et al. (2007)** aplikovali duplex PCR na amplifikáciu druhovo špecifických fragmentov mitochondriálnych 12S rRNA génov na detekciu a kvantifikáciu prídania kravského mlieka do kozích syrov použitím normalizovanej kalibračnej krivky. Technika je vhodná aj na detekciu falšovania komerčne vyrábaných syrov, pričom je možné kvantifikovať množstvo kravského mlieka v rozpätí 1 – 60 %. Táto technika umožňuje detektovať už 0,1 % kravského mlieka v kozích syroch použitím 35 cyklónov duplex PCR. **Lopéz-Calleja et al. (2007)** autentifikovali kozie mlieko v ovčom mlieku pomocou real-time PCR techniky. Tá je založená na amplifikácii fragmentov mitochondriálneho 12S ribozomálneho RNA génu. Metóda kombinuje použitie kozích špecifických primerov, ktoré amplifikujú 171 bázových párov (bp) fragmentu z kože DNA, a špecifických fragmentov cicavcov amplifikujúcich 119 bp fragmentu z DNA cicavcov, ktoré sú použité ako endogénna kontrola. **Lopéz-Calleja et al. (2004)** techniku PCR aplikovali na tepelne neupravené, pasterizované a sterilizované zmesi mlieka kravského a ovčieho a kravského a kozieho, s cieľom odhaliť prídavok kravského mlieka s prahom citlivosti 0,1 %. **Klotz, Einspanier (2001)** popísali DNA techniku v kombinácii s PCR, LCR a EIA zameranú na zisťovanie prítomnosti kravského mlieka v ovčom, kozom a byvolom mlieku a zodpovedajúcich výrobkoch. Je založená na analýze jedného rozdielného nukleotidu medzi kravskými druhmi a ovčiami, kozími a byvolmi druhmi. Táto technika využíva čisté mlieko alebo rôzne zmesi kravského, ovčieho, kozieho a byvolieho mlieka. **Bobková et al. (2009)** sa zamerali na stanovenie detekčných limitov PCR metódy určenej na determináciu úmyselného falšovania ovčieho mlieka. Zvolenou metódou stanovili 0,01 % prídavku kravského mlieka do mlieka ovčieho. V súčasnosti možno využívať rôzne modifikácie PCR protokolu, tzn. zloženia reakčnej zmesi a nastavenia PCR programu, ktoré sú pre konkrétne účely lepšie ako štandardná PCR (hot-start PCR, touchdown PCR, multiplex PCR, real-time PCR (kvantitatívna PCR), RT-PCR, alelovo-špecifická PCR, mutagenéza prostredníctvom PCR (www.bioweb.sk/pcr).

MATERIÁL A METODIKA

Výber biologického materiálu

Vzorky ovčieho mlieka a výrobkov z neho (20 vzoriek ovčieho mlieka, 30 ovčích syrov, 20 vzoriek bryndze) boli v rokoch 2007 – 2009 náhodne odoberané z prvovýroby a obchodnej siete z rôznych oblastí Slovenska a vybraných krajín EÚ. Následné boli analyzované v Laboratóriu PCR

metód na Katedre hygieny a bezpečnosti potravín za účelom detekcie ich falšovania kravským mliekom. Na detekciu bola použitá klasická PCR metóda.

Vzorky boli uchovávané vo vzorkovniciach (30 ml v mrazničke po dobu max 8 mesiacov).

Izolácia DNA z ovčieho mlieka

- genómová DNA bola extrahovaná pomocou centrifugácie, 11 000 rpm počas 6 min,
- odstredený sediment bol zmiešaný s lyzačným roztokom (lyzačný tlmivý roztok, TWEEN, proteináza K) o množstve 200 µl,
- 1. záhrev – termostát 66°C, 80 minút, 2. záhrev – termostát 96°C, 20 minút,
- vzorky boli scentrifugované pri 13 000 rpm počas 1,5 min.

Izolácia DNA zo syrov a bryndze

- úprava vzorky pre analýzu (požadované množstvo a konzistencia),
- prídavok Lysis pufor + proteináza K (100 µm),
- 1. záhrev - termostát 66°C, 80 minút, 2. záhrev - termostát 96°C, 20 minút.

Komponenty reakčnej zmesi

1. PCR H₂O
2. pufor (Go Taq green pufor 5x)
3. tlmivý roztok (Go Taq MgCl₂ 25 mM)

Tab. 2 Použité teplotné profily

	Teplota	Čas
„Štart“	95 °C	4 min.
Denaturácia	95 °C	45 sek.
Annealing	61 °C	45 sek.
Polymerizácia	72 °C	90 sek.
Elongácia	72 °C	7 min.
Schlazdovanie	20 °C	0,01 sek.

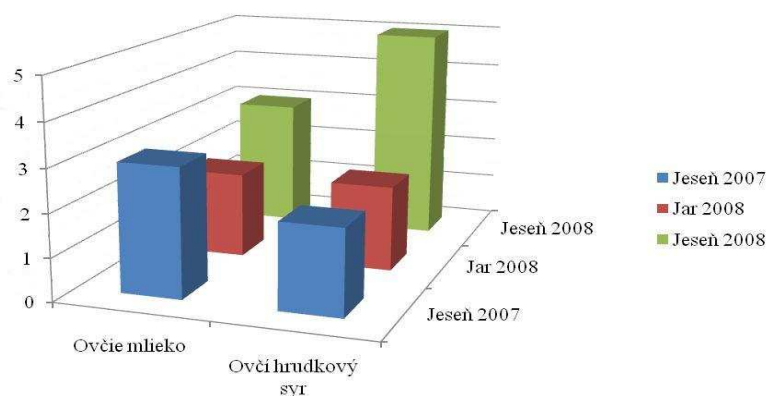
4. deoxynukleozidtrifosfáty (AB dNTP mix 10 mM)
5. priméry (AdulHD-F 5' - GCCATATACTCTCCTTGGTGACA - 3', AdulHD-R 5' - GTAGGCTTGGAATAGTAGGA - 3')
6. polymeráza (Go Taq Hot Start Polymerase)

Teplotný a časový režim pre PCR

Amplifikácia DNA bola realizovaná s využitím vyhrievaného viečka termocykléra.

V ďalšej fáze bola pripravená zmes agarózového gélu (1,2 %): 90 ml destilovaná voda, 10 ml TBE Buffer 10x, 1,2 g agarózy. Zmes nebola miešaná, napučiavala počas 5 minút. Po uplynutí tejto doby bola zmes počas 2 minút zahrievaná (mikrovlna rúra). Nasledovalo premiešanie a opätovný 1 minútový záhrev. Keď bola kvapalina číra, pod prúdom tečúcej vody na teplotu cca 50 °C bola následne ochladená. Vzniknutá zmes a prídavok 10 µl etídiumbromidu bol naliaty do elektroforetickej nádoby. Konečná fáza prípravy agarózového gélu pozostávala z vloženia hrebeňa do gélu, pričom prebehlo tuhnutie zmesi. Po stuhnutí gélu (cca 20 minút) sa hrebene opatrne vytiahli.

Aplikácia vzoriek a elektroforéza



Obr. 1 Porovnanie falšovania ovčieho mlieka a ovčích syrov za jednotlivé obdobia

Elektroforetická nádoba zaliata elektroforetickým pufrom (1xTBE) bola nastavená do polohy, v akej prebiehala elektroforéza. Pufor pokrýval gél vrstvou priemerne 2 – 3 mm. Do každej jamky, ktorá vznikla hrebeňom, bolo aplikovaných 20 µm vzorky vyizolovanej DNA. Elektroforezačný tank sa uzavrel a elektroforéza prebiehala pri konštantnom napätí 125 V počas 30 minút. Po uplynutí času sa gél opatrne vybral, tekutina z neho odtiekla a bola prenesená na transilluminátor, kde nasledovala vizualizácia fragmentov DNA v géle pod UV svetlom a vyhotovenie digitálnej fotografie. Analyzovanie výsledkov PCR pomocou digitálnej fotografie

Analyzovanie pomocou dát je nerozlučne spojené s používaním výpočtovej techniky a zároveň softvérového a hardvérového vybavenia počítača potrebného na prenos údajov z fotografie alebo gélu vo formáte toku dát. Získaná digitálna fotografia sa môže analyzovať rôznymi spôsobmi, ktoré umožňujú interaktívnu úpravu sledovaného záberu.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Detekcia falšovania ovčieho mlieka vo vybraných regiónoch Slovenska pomocou PCR metódy

V rokoch 2007 – 2009 boli uskutočnené laboratórne analýzy zamerané na sledovanie aktuálnej situácie vo falšovaní ovčieho mlieka na Slovensku. Pomocou PCR

metódy bolo analyzovaných 20 vzoriek ovčieho mlieka z rôznych oblastí Slovenska. Porušenie ovčieho mlieka mliekom kravským bolo zaznamenané vo 8 prípadoch. Situáciu na trhu s ovčím mliekom hodnotíme ako menej uspokojivú.

Detekcia falšovania ovčieho hrudkového syra a iných syrov vyrobených z ovčieho mlieka

Väčšina syrov sa vyrába z kravského mlieka, kým ovčie a kozie syry sa považujú za špeciality s charakteristickou chuťou a vôňou. Pretože ovčie a kozie mlieko je výrazne drahšie ako kravské mlieko a ich produkcia je sezónna, rozšírilo sa falšovanie ovčích a kozích syrov nedeklarovanou prísadou kravského mliečnej zložky. Z celkového počtu 30 vzoriek ovčích hrudkových syrov a syrov vyrobených výlučne z ovčieho mlieka, ktoré boli odoberané z prvovýroby a obchodnej siete na Slovensku a v niektorých krajinách EÚ, bolo porušených kravským mliekom 12 vzoriek. V zmysle platných právnych noriem ovčie, kozie a byvolie mlieko, ako aj syry vyrobené z ovčieho, kozieho mlieka a byvolieho mlieka a zmesi ovčieho kozieho a byvolieho mlieka nesmú obsahovať kravské mlieko. Výnimku tvoria tradičné mliečne výrobky – najmä syrové špeciality, ktoré sú zložené z viacerých druhov mlieka, pričom táto skutočnosť je v označení deklarovaná.

Detekcia falšovania bryndze vo vybraných regiónoch

Tab. 3 Popis dráh

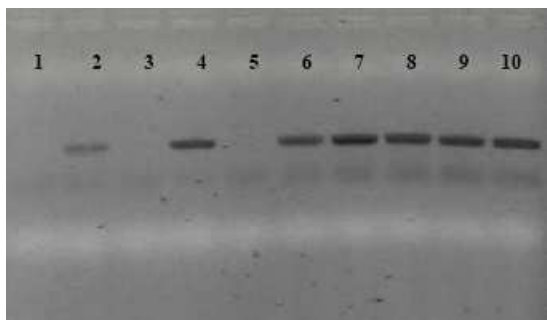
Číslo dráhy	Číslo vzorky	Charakteristika vzorky	Prítomnosť kravského mlieka vo vzorke
1	16 C	Schafs gupferl – čerstvý syr z pasterizovaného ovčieho mlieka	negatívna
2	17 C	Schafs gupferl – čerstvý syr z pasterizovaného ovčieho mlieka	pozitívna
3	18 C	Kysuce	negatívna
4	19 C	Manouri – syr vyrobený zo srvátky ovčieho mlieka	pozitívna
5	20 C	Feta - Kalos – vyrobená z ovčieho a kozieho mlieka	negatívna
6	21 C	Φέτα – Greek feta – originálna grécka feta	pozitívna
7	1 B	Bryndza plnotučná – TAMI	pozitívna
8	2 B	Plnotučná zimná bryndza – Clever	pozitívna
9	3 B	Bryndza plnotučná – CBA	pozitívna
10	4 B	Plnotučná bryndza – Liptovská mliekareň	pozitívna

Slovenska pomocou PCR metódy

V rámci riešenej problematiky boli analyzované aj vzorky bryndze z rôznych oblastí Slovenska. Vzorky boli odobraté z obchodnej siete, ako aj od predajcov špecializujúcich sa výhradne na výrobu a predaj ovčích syrov a výrobkov z ovčieho mlieka.

Nariadenie Rady (ES) č. 510/2006 definuje pojem „Slovenská bryndza“ ako prírodný biely jemne roztierateľný zrejúci syr s ojedinelými krupičkami, vyrobený tradičným spôsobom – mletím vyzretého ovčieho hrudkového syra alebo zmesi ovčieho a kravského hrudkového syra. Podiel ovčieho hrudkového syra je väčší ako 50 %.

Príklady vizualizácie



Obr. 2 Amplifikácia DNA

Najnovší trend u prvovýrobcov a spracovateľov ovčieho mlieka je znižovať legislatívou stanovené podiely ovčej hrudky na rozdiel od hrudky kravskej. Situácia je neuspokojivá hlavne v prípade bryndze. Tá disponuje PGI označením – chránené zemepisné označenie. Takýto výrobok musí spĺňať požiadavky v zmysle stanovených kritérií. Pomer ovčej a kravskej zložky často „balansuje“ na hranici únosnosti, pretože v prípade zníženia obsahu ovčej zložky o 1 % by finálny výrobok nemohol niesť označenie „Slovenská bryndza“.

Metódy založené na DNA identifikácii majú na rozdiel od iných metód význam aj pri analýzach vyzretých syrov, či tepelne ošetrovaných mliečnych výrobkov, pretože DNA je tepelne stabilnejšia ako proteíny. Pozitívom je vysoká citlivosť a nenáročnosť na stav použitej makromolekuly, čo umožnilo jej využitie vo výskume. Nevýhodou, ktorá v značnej miere bráni aplikácii PCR techník v mliekarenských podmienkach, je vysoká cena prístrojového vybavenia i pomerne vysoké ceny komponentov reakčnej zmesi, potrebných pre vykonanie PCR analýzy. Nevýhodou je, že amplifikácia je v priamej korelácii s obsahom somatických buniek v kravskom mlieku. Keďže pri autentifikácii nebol známy počet somatických buniek kravského mlieka, nebolo možné presne stanoviť obsah kravskej zložky v rámci skúmanej vzorky.

ZÁVER

Séria analýz, ktoré boli realizované v Laboratóriu PCR metód na Katedre hygieny a bezpečnosti potravín, bola zameraná na monitoring aktuálnej situácie vo falšovaní ovčieho mlieka a ovčích syrov na Slovensku a vo vybraných štátoch EÚ. Pri detekcii prídavku kravského mlieka do ovčieho hrudkového syra a ostatných syrov

vyrobených výlučne z ovčieho mlieka bolo falšovanie kravským mliekom preukázané u 12 vzoriek z celkového počtu 30 vzoriek. Pri testovaní surového ovčieho mlieka určeného na ďalšie spracovanie bol zistený nedeklarovaný prídavok kravského mlieka u 8 vzoriek z celkového počtu 20 vzoriek. Pri analýzach bola použitá klasická PCR, ktorá slúži na kvalitatívnu detekciu. Z hľadiska kvantitatívneho skúšania plánujeme aplikovať real – time PCR, pomocou ktorej by sme chceli kvantifikovať prídavok nedeklarovanej zložky.

LITERATÚRA

- BAUEROVÁ, M. – TURČANI, M. – OMELKA, R. 2004. Polymerázová reťazová reakcia. Vysokoškolský učebný text [CD-ROM] Nitra : FPV UKF, 2004.
- BOBKOVÁ, A. – ŽIDEK, R. – FLIMELOVÁ, E. et al. 2009. Využitie PCR metódy na dôkaz falšovania mlieka a mliečnych výrobkov. In *Potravinárstvo*, roč. 3, 2009, č. 1, s. 1–3, ISSN 1337-0960.
- BOROŠ, V. 2005. Použitie ovčieho a kozieho mlieka pri výrobe netradičných mliečnych výrobkov. In *Mliekarstvo*, roč. 36, 2005, č. 3, s. 24–27, ISSN 1210-3144.
- BOTTERO, M. – CIVERA, T. – AVAMTASO, A. et al. 2002. Identification of cows milk in „buffalo“ cheese by duplex polymerase chain reaction. In *Journal of Food Protection*, 65, 2002, p. 362–366.
- BOTTERO, M. T. – CIVERA, T. – NUCERA, D. et al. 2003. A multiplex polymerase chain reaction for the identification of cows, goats and sheeps milk in dairy products. In *Int. Dairy J.*, 13, 2003, p. 277–282.
- CALVO, J. H. – OSTA, R. – ZARAGOZA, P. 2002. Species-specific amplification for detection of bovine, ovine and caprine cheese. In *Milchwissenschaft*, 57, 2002, p. 444–446.
- DALMASSO, A. 2004. A multiplex PCR assay for the identification of animal species in feedstuffs. In *Celular Probes*, 18, 2004, p. 81–87.
- DE LA FUENTE, M. A. – M. JUÁREZ, M. 2005. Authenticity assessment of dairy products. In *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 45, 2005, p. 563–585.
- HALKEN, S. 2003. Early sensitisation and development of allergic airway disease—risk factors and predictors. In *Paediatr. Respir. Rev.*, č. 4, s. 128–134.
- HARBUTT, J. 1999. A Complete Illustrated Guide to the Cheeses of the World, In: Anness Publishing Inc., New York.
- HERIAN, K. 2001. Smerný technologický postup výroby ovčieho hrudkového syra. In: Zásady správnej výroby ovčích hrudkových syrov v salašníckych podmienkach. Výskumný ústav mliekarsky a.s. Žilina, 2001, s. 13–15.
- HERIAN, K. 2008. Ovčie a kozie mliekarstvo na Slovensku. In *Mliekarstvo*, roč. 39, 2008, č. 2, s. 6–8, ISSN 1210-3144.
- HERMAN, L. 2001. Determination of the animal origin of raw food by species-specific PCR. In *Journal of Dairy Research*, 68, p. 420–436.
- HURLEY, I. P. – COLEMAN, R. C. – IRELAND, H. E. et al. 2004. Measurement of Bovine IgG by Indirect Competitive ELISA as a Means of Detecting Milk Adulteration. In *J. Dairy Sci.*, 87, p. 543–549.
- KLOTZ, A. – EINSPANIER, R. 2001. Development of a DNA-based screening method to detect cow milk in ewe, goat and buffalo milk and dairy products using PCR-LCR-EIA-technique. In *Milchwissenschaft*, 56, 2001, p. 67–70.

KONTOVÁ, M. 2003. Uplatnenie predností ovčieho mlieka na spracovanie syrov roquefortového typu. In *Mliekarstvo*, roč. 34, 2003, č. 4, s.16–19, ISSN 1210-3144.

LEGAROVÁ, V. – KOUŘINSKÁ, L. 2007. Vplyv genetických variant kapa kazeínu na technologické vlastnosti mlieka. In *Bezpečnosť a kontrola potravín, II diel (Zborník prác z medzinárodnej vedeckej konferencie)*. Nitra, 2007, s. 248–251.

LOPÉZ-CALLEJA, I. – GONZALES, I. – FAJARDO, V. 2004. Rapid detection of cows milk in sheeps and goats milk by a species-specific polymerase chain reaction technique. In *J. Dairy Sci.*, 87, 2004, p. 2839–2845.

LÓPEZ-Calleja, I. – GONZALES, I. – FAJARDO, V. et al. 2007. Quantitative detection of goats' milk in sheeps' milk by real-time PCR. In *Food control*, 18, 2007, p. 1466–173.

MAFRA, I. – ROXO, A. – RERREIRA, I.M. et al. 2004. A novel approach to the quantification of bovine milk in ovine cheeses using a duplex polymerase chain reaction method. In *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 2004, p. 4943–4947.

MAFRA, I. – ROXO, A. – FERREIRA, I.M. et al. 2007. A duplex polymerase chain reaction for the quantitative detection of cows milk in goats milk cheese. In *Int. Dairy J.*, 2007, 9, p. 1132–1138.

MAUDET, C. – TABERLET, P. 2001. Detection of cows' milk in goats' cheeses inferred from mitochondrial DNA polymorphism. In *J. Dairy Res.*, 68, p. 229–235.

MAYER, H. K. 2005. Milk species identification in cheese varieties using electrophoretic, chromatographic and PCR techniques. In *Int. Dairy J.*, 15, 2005, p. 594–604.

Nariadenie Rady (ES) č. 510/2006 Štandardný súhrn.

SAWYER, J. – WOOD, C. – SHANAHAN, D. – GOUT, S. – McDOWELL, D. 2003. Real-time PCR for quantitative meat species testing. In *Food Control*, 14, p. 579–583.

PIKNOVÁ, L. – KRAHULCOVÁ, J. – KUCHTA, T. 2002. Dôkaz kravskej mliečnej zložky v ovčích a kozích syroch polymerázovou reťazovou reakciou. In *Bulletin potravinárskeho výskumu*, roč. 41, č. 3, s. 163–167, ISSN 0231-9950.

REA, S. – CHIKUNI, K. – BRANCIARI, R. et al. 2001. Use of duplex polymerase chain reaction (duplex PCR) technique to identify bovine and water buffalo milk used in making mozzarella cheese. In *Journal of Dairy Research*, 68, p. 689–698.

SHATENSTEIN, B. – GHADIRIAN, P. 1998. Influences on diet, health behaviours and their outcome in select ethnocultural and religious groups. In *Nutrition*, 14, p. 223–230.

www.agroporadenstvo.sk/zv/ovce/ovce_gyarmovce/ovce_gy_6_4.htm

www.bioweb.genezis.eu/index.php?cat=11&file=pcr

Kontaktná adresa:

Ing. Lucia Zeleňáková, PhD., Katedra hygieny a bezpečnosti potravín, Fakulta biotechnológie a potravinárstva, Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre, Tr. A. Hlinku 949 76 Nitra.

email: Lucia.Zelenakova@uniag.sk

POUŽITIE ZHLUKOVEJ ANALÝZY PRI VYSLEDOVATEĽNOSTI PRODUKTOV Z JELEŇA USING OF CLUSTER ANALYSIS IN TRACEABILITY OF RED DEER PRODUCTS

Radoslav Židek, Lenka Maršálková, Jaroslav Pokorádi, Luboš Bandry

ABSTRACT:

Deer (*Cervidae*) are, today as well as in ancient times, among the most important species. Thus, not unexpectedly, people have been translocating deer all over the world. Population genetic analysis has been performed on deer population originated from New Zealand and Hungary. The allele frequencies of 6 microsatellite loci were analyzed in 99 deer from two sources. To represent geometric relationships among the deer population, a cluster analysis was applied using gene frequencies of all variable loci by POWERMARKER software package. We can affirm, selected microsatellite markers are polymorphic and suitable for traceability evaluation.

Keywords: red deer, traceability, microsatellite markers

ÚVOD

V súčasnosti sa zvyšuje neustále požiadavka po dosledovateľnosti produktov živočíšnej výroby, ktorá je motivovaná možnosťou kontaminácie mäsových

produktov choroboplodnými zárodkami, ako je napríklad BSE u hovädzieho dobytku, alebo obdobného ochorenia „Blue tongue“ u jeleňovitých. V niektorých špecifických prípadoch môže byť spochybnená legálnosť nadobudnutia mäsa. V takýchto situáciách je potrebný nástroj schopný overiť či zviera pochádzalo s farmového chovu, alebo z voľnej prírody. Výhodou všetkých biologických materiálov je, že úplne prirodzene obsahujú jedinečný identifikátor (DNA), ktorý nie je zatiaľ možné sfalšovať, a ktorý môže byť potenciálne použitý na overenie pôvodu. Hodnota DNA ako jedinečného identifikátora produktov živočíšneho pôvodu je daná tým, že iba klonované jedince, prípadne jedince z izogénnych línií môžu mať rovnaké DNA profily. Vysledovateľnosť v mäsovom priemysle na báze DNA bola popísaná v práci **Cunningham a Meghen (2001)** a neskôr aj **Smith et al. (2008)**. DNA markéry môžu byť rovnako použité na ochranu obchodnej značky, alebo na detekciu falšovania (**Arana et al., 2002**). Problém pri identifikácii produktov potravinárskeho priemyslu je, že sú spracované (**Asensio et al., 2008**). Produkty potravinárskeho priemyslu sú bežne vystavované tepelnému opracovaniu, vysokému tlaku, rôznym hodnotám pH, ožarovaniu, sušeniu a podobne. Napríklad mnohé produkty sú zohrievané na 100 °C po dobu 10-60 minút a vystavované nízkemu pH. Výhodou DNA oproti proteínom, je že nenedaturujú, ale sa pri dlhodobom tepelnom opracovaní fragmentujú na úseky dĺžky okolo 300 bp. Vzhľadom, k tomuto faktoru je vhodné použitie mikrosatelitných markérov, ktoré ponúkajú širokú paletu vysoko variabilných frakcií v dĺžke od 70 do 350 bp (**Shackell et al., 2005; Teletchea, Maudet a Hanni, 2005**). Vysledovateľnosť produktov v prostredí Slovenskej

Tabuľka 1: Sekvencia mikrosatelitných lokusov použitých pre identifikáciu jeleňovitých

Primery	Značenie	Farba	Sekvencia Primerov (5'-3')
T156	FAM	Modrá	F:ATGAATACCCAGTCTTGTCTG R:TCTTCCTGACCTGTGTCTTG
OarFCB5	FAM	Modrá	F:AAGTTAATTTTCTGGCTGGAAAACCCAG R:ACCTGACCCCTACTCTCTTCACTC
BM888	VIC	Zelená	F:ACTAGGAGGCCATATAGGAGGC R:AGCTCAAAAACGAGGGACAGGG
RT1	VIC	Zelená	F:CATATGGCTAACTACCTAGCTTGCC R:GAGTCCCAAGATTTCAGCCCTAC
RT13	NED	Čierna	F:GCCCAGTGTAGGAAAGAAGA R:CATCCAGAACAGGAGTGAG
T501	PET	Červená	F:CTCCTCATTATTACCCTGTGA R:ACATGCTTTGACCAAGACCC

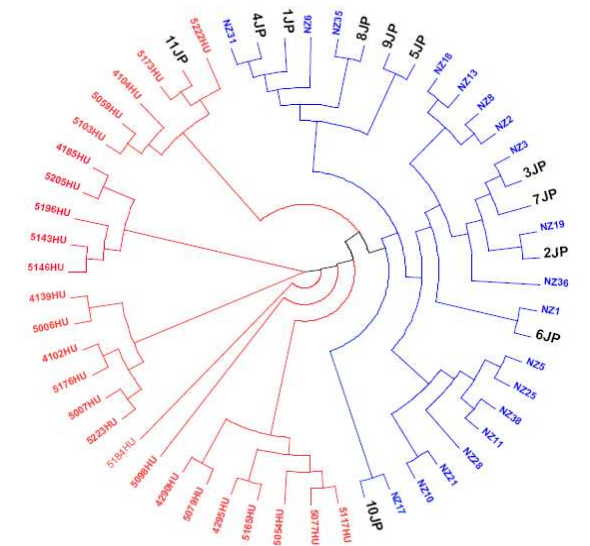
republiky má svoje špecifiká, ktoré sú v dostatočnej miere popísané v práci **Golian et al. (2008)**, a rovnako aj v ostatných prácach zameraných na dosledovateľnosť krmív (**Čapla, Zajác a Golian, 2008**) a výrobu obalových materiálov (**Čapla, Zajác a Vietoris, 2007**). V našej práci sme testovali schopnosť deviatich mikrosatelitných markérov identifikovať zvieratá a priradiť ich určitým rodičom. Túto metodiku sme zvolili hlavne preto, že nemusí byť reálne aby každé zviera malo vykonaný DNA profil, ktorý by bol uložený v databáze za účelom dohľadania. Je však možné archivovať rodičovské zvieratá, ktorých je menej a ktoré sú základom novej generácie jatočných zvierat.

MATERIÁL A METÓDA

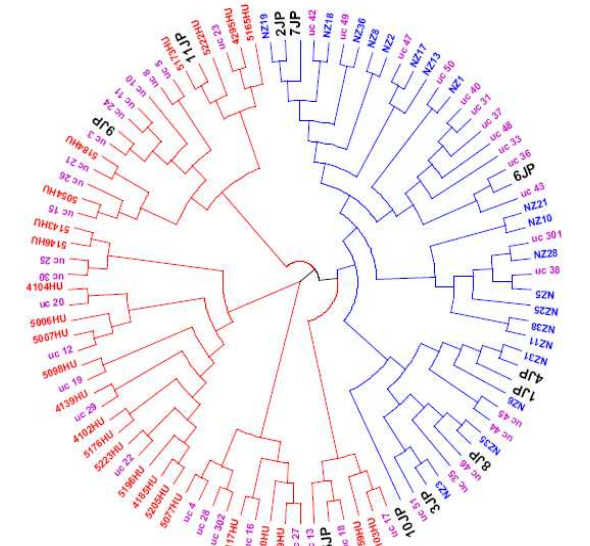
Na populačno-genetickú analýzu sa použili vzorky DNA zvierat pochádzajúcich s farmy Xcell breeding services Slovakia. Na analýzu bolo použité kmeňové stádo v počte 99 kusov (11 samcov, 44 samíc a 44 vzájomných mláďat). DNA bola izolovaná s chlpuvých cibuliek podľa priloženého izolačného postupu firmy Promega (Wizard Genomic DNA Purification Kit). Na amplifikáciu jednotlivých lokusov použijeme Multiplex PCR (Polymerase Chain Reaction). Pripravíme si Multiplex

Mastermix: nukleotidy (10mM AB dNTP mix), DNA-polymerázy (**AmplitaqGold, Applied Biosystems**), horčík (25 mM MgCl₂), pufru (10xAB pufr 1), forward a reverse primery sú definované v tabuľke 1 (OarFCB5-F, OarFCB5-R, T156-F, T156-R, BM888-F, BM888-R, RT1-F, RT1-R, RT13-F, RT13-R, T501-F, T501-R) a pridáme rededilovanú H₂O. Po rozdávku Mastermixu do jednotlivých stripov pridáme rôzne vzorky vyizolovanej DNA. Polymerázová reťazová reakcia prebieha v termocykleri (PTC-150 Minicycler™, MJ Research). Počiatková fáza denaturácie prebieha pri 95°C (10min), Následne prebieha 30 cyklov pozostávajúcich z troch krokov: denaturácia pri 95°C (30 sek.), annealing 59°C (90 sek.), extenzia 72°C (90 sek.). Po prebehnutí cyklov nasledovala elongácia pri 72°C (60 min.). Posledným krokom je schladenia na 25°C (1 sek.). PCR produkt bol testovaný pomocou ABI 310 PRIZM a získané fragmenty boli identifikované použitím programu POWERMARKER 3.25 (**Liu and Muse, 2003**). Genetická vzdialenosť bola vypočítaná podľa **Nei (1983)** a na vytvorenie zhlukovej analýzy bola použitá metóda neváženého párovania skupín s aritmetickým priemerom - UPGMA popísaná autormi **Sneath a Sokal (1973)**

Obrázok 1. Grafické znázornenie variability v sledovanej skupine rodičov



Obrázok 2. Grafické znázornenie variability v sledovanej skupine rodičov a potomkov



VÝSLEDKY A DISKUSIA

Analýza bola vykonaná v dvoch krokoch. Najskôr bola vytvorená zhluková analýza skupiny rodičov (obrázok 1) a následne bola vytvorená zhluková analýza celej zmiešanej populácie (obrázok 2). Ako vyplýva z obrázku 1 zhluková analýza vychádzajúca z genetickej vzdialenosti jednotlivých zvierat zapojených do testu bola schopná vytvoriť vetvy, ktoré predstavujú zvieratá s najväčšou genetickou podobnosťou. Zvieratá so zväčšenou veľkosťou písma predstavujú samce. Keďže zvieratá pochádzali s dvoch odlišných regiónov bolo možné pozorovať aj variabilitu determinovanú iným životným prostredím, ktorá je znázornená farebne. Obrázok 2 predstavuje rovnakú populáciu rodičov obohatenú o ich vzájomných potomkov. Po pridaní potomkov do testovanej skupiny sa zohľadnili automaticky genetické podobnosti medzi rodičmi a potomkami a dendrogram nadobudol novú štruktúru. Samčie jedince sa zaradili k populácii v ktorej pôsobili a medzi jednotlivé vetvy matiek sa priradili ich potomkovia.

Použitá analýza poukazuje na schopnosť genetických markerov analyzovať populáciu ako celok a zhodnotiť celkovo vzťahy v skupine zvierat. Zároveň poukazuje na možnosť identifikovať krajinu alebo oblasť pôvodu jedinca. Nevyhnutnosťou pre spomenuté metódy je kvalitná génová banka, ktorá bude uchovávať informáciu o populácii jedincov a ku ktorej sa sledovaný jedinec bude porovnávať.

ZÁVER

Záverom môžeme konštatovať, že použité mikrosatelitné priméry sú vhodným nástrojom na identifikáciu jeleňovitých zvierat. Ich využitie je možné pri dosledovateľnosti mäsových produktov a pri nezameniteľnej identifikácii zvierat. Zvolené priméry sú dostatočne polymorfné aby identifikovali odlišnosti medzi jednotlivými jedincami, ktorý je možné následne schématicky a prehľadne vyjadriť graficky pomocou zhlukovej analýzy.

LITERATÚRA

CUNNINGHAM, E. P., MEGHEN, C. M. 2001. Biological identification systems: Genetic markers. In *OIE Scientific and Technical Review*. roč. 20, 2001, č. 2, s. 491–499.

ARANA, A., SORET, B., LASA, I., ALFONSO, L. 2002. Meat traceability using DNA markers: Application to the beef industry. In *Meat Science*, roč. 61, 2002, s. 357–373.

BELKHIR, K. - BORSA, P. - CHICHI, L. - RAUFASTE, N. - BONHOMME, F. 1996. NEI, M. 1973. Analysis of gene diversity in subdivided population. *Proc. Nat Acad. Sci.*, 70: 3321–3323.

ČAPLA, J. – ZAJÁC, P. – GOLIAN, J. 2008. Požiadavky na systém sledovateľnosti potravín a krmív. In *Potravinárstvo* [online]. 8. február 2008, roč. 2, č. 1 [cit. 2008-02-08]. s. 13 - 17. Dostupné na internete: <http://www.potravinarstvo.com/dokumenty/potravinarstvo_n_o1_2008.pdf>. ISSN 1337-0960.

ČAPLA, J. - ZAJÁC, P. - VIETORIS, V. 2008. Požiadavky na výrobu obalových materiálov určených pre potravinársky priemysel. In *Potravinárstvo*. Roč. 2, 2008, č. 3, s. 19-26. ISSN 1337-0960.

GOLIAN, J. – ČAPLA, J. – ZAJÁC, P. – SOKOL, J. – CHOVANEC, M. 2008. Legislatíva a kontrola potravín. 1. vyd. Nitra : Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre, 2008. 143 s. ISBN 978-80-552-0077-4

SMITH, G. C. - PENDELL, D. L. - TATUM, J. D. - BELK, K. E.- SOFOS, J. N. 2008. Post-slaughter traceability. In *Meat Science*, roč. 80, 2008, s. 66-74

SNEATH, P. H. A. - SOKAL, R. R. 1973. Numerical Taxonomy. W.H. Freeman, San Francisco, CA, 230–234.

SHACKELL, G. H. - MATHIAS, H. C. - CAVE, V. M. - DODDS, K. G. 2005. Evaluation of microsatellites as a potential tool for product tracing of ground beef mixtures. In *Meat Science*. roč. 70, 2005, s. 337-345

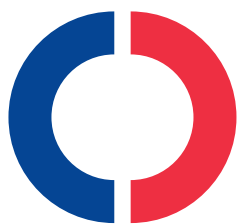
TELETCHÉA, F. - MAUDET, C. - HANNI, C. 2005. Food and forensic molecular identification: update and challenges. In *Trends in Biotechnology*. roč. 23, 2005, č. 7, s. 359-366

ASENSIO, L. - GONZÁLEZ, I. - GARCÍA, T. - MARTÍN R. 2008. Determination of food authenticity by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). In *Food Control*. roč. 19, 2008, s. 1-8

Kontaktná adresa:

Ing. Radoslav Židek, PhD., Katedra hygieny a bezpečnosti potravín, Fakulta biotechnológie a potravinárstva, Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre, Tr. A. Hlinku 949 76 Nitra.
email: radoslav.zidek@uniag.sk

JOZEF BÍREŠ, MIROSLAV HÚSKA, MILAN VASIČ ANTIMIKROBIÁLNA REZISTENCIA- AKTUÁLNY PROBLÉM VO VETERINÁRNEJ MEDICÍNE A VO VEREJNOM ZDRAVÍ 1	BEÁTA KORÉNEKOVÁ, MAGDALÉNA SKALICKÁ, IVONA KOŽÁROVÁ, JÁN MAČANGA, MARIÁN KORÉNEK SLEDOVANIE RIZIKOVÝCH CHEMICKÝCH PRVKOV U KAČÍC DIVÝCH (ANAS PLATYNRHYNCHOS) 33
MAREK.BOBKO, LADISLAV LAGIN, MÁRIA ANGELOVIČOVÁ, ALICA BOBKOVÁ, PETER HAŠČÍK VPLYV PRÍDAVKU FYTOADITÍV NA KVALITU KURACIEHO MÄSA 4	LENKA KOUŘIMSKÁ, ZUZANA PACÁKOVÁ, VERONIKA LEGAROVÁ, LUBOŠ BABIČKA, JOZEF GOLIAN COMPARISON OF MAJOR MILK COMPONENTS IN DAIRY COWS' MILK FROM MORNING AND EVENING MILKING 35
LEONA BUŇKOVÁ, FRANTIŠEK BUŇKA, PAVLÍNA LUKEŠOVÁ, VLADIMÍR MRKVIČKA, MAGDA DOLEŽALOVÁ, STANISLAV KRÁČMAR PRODUKCE BIOGENNÍCH AMINŮ BAKTERIEMI IZOLOVANÝMI Z POVRCHU DRŮBEŽE 3	IVONA KOŽÁROVÁ, JÁN MAČANGA, MÁRIA GOLDOVÁ, PETER MAJOR, BEÁTA KORÉNEKOVÁ KOMPARATÍVNA ŠTÚDIA STANOVENIA PRÍTOMNOSTI REZÍDUÍ VYBRANÝCH KOKCIDIOSTATÍK V TKANIVÁCH KURČIAT A BAŽANTOV 38
JUDITA BYSTRICKÁ, JÁN TOMÁŠ, JÚLIUS ÁRVAY, MÁRIA TIMORACKÁ INHIBIČNÝ VPLYV KATIÓNŮV RIZIKOVÝCH PRVKOV NA ÚRODU SÓJE 10	KRISTÍNA KUKUROVÁ, ZLATICA KOHAJDOVÁ, JOLANA KAROVIČOVÁ, LENKA VRBIKOVÁ, AUTENTIFIKAČNÉ PARAMETRE VHODNÉ NA ODHAĽOVANIE FALŠOVANIA MEDU 42
MARCELA CAPCAROVÁ, ADRIANA KOLESÁROVÁ, NORBERT LUKÁČ, ALEXANDER SIROTKIN, LÁSZLO BÁRDOS AND SHUBHADEEP ROYCHOUDHURY ANTIOXIDANT DEFENCE IN PORCINE GRANULOSA CELLS EXPOSED TO LEAD IN VITRO 13	ĽUBOMÍR LOPAŠOVSKÝ, MARTINA ČIČMANCOVÁ, JAROSLAV ŽIAK, ALICA BOBKOVÁ, LUCIA ZELENÁKOVÁ, JOZEF GOLIAN, RADOSLAV ŽIDEK ALERGÉNY A BEZPEČNOSŤ DEHYDROVANÝCH POTRAVIN 48
KATARÍNA FATRCOVÁ-ŠRAMKOVÁ, MAGDA MÁRIÁSSYOVÁ, JANKA NŮŽKOVÁ, ZLATA KROPKOVÁ, PETR ŠÍMA ANTIRADIKÁLOVÁ AKTIVITA A FLAVONOIDY VO VYBRANÝCH DRUHOCH VČELIEHO PEĽU 16	SLAVOMÍR MARCINČÁK, PAVLÍNA JEVINOVÁ, LÝDIA MESARČOVÁ, PETER POPELKA VYUŽITIE RASTLINNÝCH EXTRAKTOV PRI VÝROBE TEPELNE OPRACOVANÝCH MÄSOVÝCH VÝROBKOV 54
PETER HAŠČÍK, MIROSLAVA KAČÁNIOVÁ, JURAJ ČUBOŇ, MAREK BOBKO, KLÁRA VAVRIŠINOVÁ, HENRIETA ARPÁŠOVÁ, MICHAL MIHOK, SIMONA PAVLIČOVÁ, VPLYV APLIKÁCIE LACTOBACILLUS FERMENTUM CEZ VODU NA CHEMICKÉ ZLOŽENIE MÄSA KURČIAT ROSS 308 20	JANKA NŮŽKOVÁ, KATARÍNA FATRCOVÁ-ŠRAMKOVÁ, MAGDA MÁRIÁSSYOVÁ, ZLATA KROPKOVÁ POLYFENOLY A ANTIOXIDAČNÁ AKTIVITA VČELIEHO PEĽU 58
SOŇA JAVOREKOVÁ, ROMAN LABUDA, MICHAELA KUPCOVÁ, ZUZANA SELEŠIOVÁ, JANA MAKOVÁ VÝSKYT A VÝZNAM TERMOREZISTENTNÝCH HÚB NA JAHODÁCH 25	MAGDALÉNA SKALICKÁ, BEÁTA KORÉNEKOVÁ, IVONA KOŽÁROVÁ POROVNÁVANIE HLADÍN ZINKU A MEDI U STRELENÝCH A ZABITÝCH BAŽANTOV. 64
ADRIANA KOLESÁROVÁ, SHUBHADEEP ROYCHOUDHURY, JANA SLIVKOVÁ, PETER MASSÁNYI, ALEXANDER SIROTKIN, MARCELA CAPCAROVÁ, MARÍNA MEDVEĐOVÁ, JAROSLAV KOVÁČIK OLOVOM INDUKOVANÉ ZMENY V SEKRÉCII HORMONÁLNYCH LÁTOK OVARIÁLNYMI GRANULÓZNymi BUNKAMI PRASNIČIEK IN VITRO 28	ALENA VOLLMANNOVÁ POLYPHENOLS IN CRANBERRIES IN RELATIONSHIP TO STORAGE DURATION IN FREEZING BOX 66
	LUCIA ZELENÁKOVÁ, MIROSLAV ŠESTÁK, RADOSLAV ŽIDEK MONITORING FALŠOVANIA OVČIEHO Mlieka A VÝROBKOV Z NEHO NA SPOLOČNOM EURÓPSKOM TRHU S POTRAVINAMI 69
	RADOSLAV ŽIDEK, LENKA MARŠÁLKOVÁ, JAROSLAV POKORÁDI, LUBOŠ BANDRY. POUŽITIE ZHLUKOVEJ ANALÝZY PRI VYSLEDovATEĽNOSTI PRODUKTOV Z JELEŇA 74



United Bakeries

Prvá Bratislavská
~~Pekárenská~~

