

1

2012



Vedecký časopis pre potravinárstvo

Scientific Journal for Food Industry

číslo

www.potravinarstvo.com

Volume 6
Issue 1
February 2012

potravinárstvo 1 (6)
ISSN 1337-0960 (online)

Potravinárstvo

Vedecký časopis pre potravinárstvo

Šéfredaktor:

Ing. Peter Zajác, PhD.
SPU Nitra

Zástupca šéf redaktora:

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

Redaktori:

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

Predseda redakčnej rady:

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

Redakčná rada:

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

Potravinárstvo

Scientific Journal for Food Industry

Editor:

Peter Zajác
SUA Nitra

Deputy of Editor:

Jozef Golian
SUA Nitra

Sub-Editor:

Radoslav Židek,
Jozef Čapla,
Vladimír Vietoris
SUA Nitra

Chairman, Editorial Board:

Jozef Golian,
SUA Nitra

Editorial Board:

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

• **Potravinárstvo**® • **Ročník:** 6, č. 1/2012 • Vedecký časopis pre potravinárstvo • Scientific Journal for Food Industry • **Vydavateľ:** Ing. Peter Zajác, HACCP Consulting, Slivková 12, 951 01 Nitrianske Hrnčiarovce. Vydavateľ úzko spolupracuje s Katedrou hygieny a bezpečnosti potravín, FBP, SPU v Nitre • **Nakladateľ:** Združenie HACCP Consulting, Slivková 12, 951 01 Nitrianske Hrnčiarovce • **Periodicita:** vychádza 4x do roka • **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 • Časopis je indexovaný v databázach: UIUC OAI registry, OAIster, AGRIS FAO, DOAJ, Google Scholar a CrossRef • **Názov a skratka pomocou ktorých je časopis indexovaný v medzinárodných databázach:** *Potravinarstvo, Potr.*

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



Katedra hygieny a bezpečnosti
potravín

H A C C P
CONSULTING

EFFECT OF APPLE CIDER VINEGAR ON PLASMA LIPIDS (MODEL EXPERIMENT IN MICE)

László Bárdos, Balázs Bender

ABSTRACT

Model experiment was carried out to investigate the effect of apple cider vinegar (ACV) on the blood and liver cholesterol (Ch), triglycerides (TG) and one of a marker of antioxidant status of blood (FRAP) in laboratory mice. Animals consumed a basal mice diet (Control) served as the control group. The same diet was supplemented either 1% cholesterol (Ch) or 1% edible sunflower oil (SFO). All groups were duplicated and their animals were supplied drinking water containing ACV (50 mg l⁻¹)(groups: Control+ACV, Chol+ACV, SFO+ACV). The feeding and drinking was ad libitum for 21 days. At the end of experiment the animals were exterminated. Blood and liver samples were analyzed for total cholesterol (tCh), triglycerides (TG) and ferric reducing antioxidant power (FRAP). The results show that the Ch supplemented group stored higher concentration of tCh in the liver ($P < 0.01$) than SFO treated animals. The cholesterol reserves were less in ACV treated groups. The alterations of plasma tCh showed no significant changes by cholesterol or SFO supplementation and drinking ACV containing water. The concentration of plasma and liver TG remained in the same range in all groups independently by different treatments. Animals of SFO supplemented groups (SFO and SFO+ACV) got more fatten than Control and Ch groups and their liver/body mass ratio (%) decreased ($P < 0.05$). The ACV exerted a decreasing effect on the level of plasma tCh and TG markedly ($P < 0.05$) but only in that group (Control+ACV) which consumed the basal diet. This lowering effect could be demonstrated only in the case of TG in the liver. The groups receiving ACV showed decreasing FRAP values. This means a lower antioxidative capacity of plasma. The ACV can helps in the lowering of plasma lipids (tCh and TG) and can depress their liver storage in the case of normal level of lipid consumption. When the lipid input was elevated this benefit not occurred.

Keywords: apple cider vinegar, cholesterol, triglyceride, FRAP, mice

INTRODUCTION

The modern pharmaceutical industry based on synthetic chemistry severed the historical connection between plants, food and medicines. Nowadays food and feed additives of natural origin, used in natural and folk medicine with a partial predilection are coming more and more into the front. Multicomponent botanical therapeutics that comprise functional foods, dietary supplements and botanical drugs hold several advantages over conventional drugs that may earn them a more prominent place in the medicine of the future (Raskin and Ripoll, 2004). One of these natural substances known for hundred years and nowadays living its renaissance is the apple cider vinegar (ACV) which has been helping people to healthier lives. This is claimed by advertisements in different media (journals, TV, InterNet). They argue that ACV can help maintain blood sugar levels in weight management, along with a low calorie diet, by helping to lower the amount of body fat and also helps break down the cholesterol formations that build up on walls of blood vessel.

In the propagating literature can be found that ACV is an essential source for several vitamins and trace elements. It improves renal function and stops multiplication and colonilization of harmful bacteria (Vijayakumar and Wolf-hall, 2002). It has a corrective effect on circulation; it is "blood thinner", helps healing wounds, and speeds up metabolism.

Beneficial effects of ACV have been proved by several practical observations, but there are only a few scientific evidences to prove these facts right. The search for publications in scientific data base surprisingly has only a few scores about the biological experiments with ACV. Practical evidences confirmed that this substance is an outstanding fodder additive for farm animals, based on its vitamin, free amino acid and rich mineral element content. Apart from these and its vinegar (acetic acid) content the substance has other acid components too, such as: citric acid, malic acid and soluble dietary fiber: pectin (Hellmiss, 1997) and sorbose (McComb, 1975) a non-fermentable hexose too. Due to its pectin content ACV has a decreasing effect on the plasma LDL cholesterol level. Specific components in the apple juices and extracts that contributed to antioxidant activity have found that both fresh apple and juices inhibited copper-catalyzed LDL oxidation (Pearson, et al., 1999).

Based on our previous experiments with Japanese quails, which are regularly used test animals for fowls (Wilson et al, 1961), and on turkeys getting 1:100 dilutions of the ACV in drinking water we could state that total cholesterol (tCh) and triacyl-glycerols (TG) had decreased in blood (Bárdos, Kiss, 2000a, and b; Czirle and Bárdos, 2000). Since these are primary factors in applying ACV as an additive for foodstuffs or as a medicinal substance of natural origin. We decided to start a model experiment on

Table 1 Experimental set-up

Groups	Control	Ch	SFO	Control+ACV	Ch+ACV	SFO+ACV
Feed	1	2	3	1	2	3
Drinking water	Tap water		Tap water containing 1% ACV			

1. Basal mice feed, 2. Diet 1 containing 1% cholesterol, 3. Diet 1 containing 1% sunflower oil; ACV apple cider vinegar

mammals. This model experiment was carried out to investigate the effect of ACV on the blood and liver cholesterol (Ch) and triglycerides (TG) and one of a marker of antioxidant status of blood (FRAP) in laboratory mice.

MATERIAL AND METHODOLOGY

Animals and experimental set-up

CFLP inbred (Charles River Ltd, Isaszeg, Hungary) laboratory male mice were used in the experiment. Six groups were arranged with ten-ten animal (average weight: 25 g) in each. Animals were fed ad libitum with a basic and/or supplemented feed. Basal diet used for the mice was laboratory mice feed. We mixed the additives with it. After grinding this feed we mixed it with 1% cholesterol (w/w) and with sunflower oil (v/w), respectively. From the mixture we formed scones using cooking gelatin so we could apply them for feeding after dehydration. The control diet without any supplementation but it was reformulated with gelatin too. The drinking water of ACV treated groups was mixing with apple cider vinegar in the ratio of 100 (water) to 1 (ACV) resulted concentration of 500 mg.l⁻¹. The animals were fed for 21 days. Table 1 contents the experimental and feeding set-up.

Feed additives

The experimental feed was supplemented with cholesterol (Fluka, Germany), sunflower oil (purchased in pharmacy) as additives. Commercial apple cider vinegar containing 5% (v/v) acetic acid (Almaacet 5%, Buszesz Ltd., Budapest, Hungary) was added to the drinking water. The used gelatin for the making feed scones was commercial edible grade.

Sampling

Six mice from each group were picked out and lege artis sacrificed at the end of experiment. Blood samples were drawn into tubes containing heparin. The body and liver weights were measured. Blood plasma and liver samples were refrigerated (-20 oC) until the analyzes.

Analytical methods

Total cholesterol (tCh) and triglyceride (TG) concentrations of plasma were measured by enzymatic (GPO-PAP) colorimetric methods with reagents kits (Reanal Ltd., Budapest). Removing the total lipid content from the tissue (Floch et al., 1957) the Ch and TG concentrations from the homogenized liver tissue were measured using the same methods as above. The antioxidant capacity of plasma was characterized by FRAP method (ferric reducing ability of plasma) (Benzie and Strain, 1996).

Statistic

One-way ANOVA with Dunnett's post test was performed using GraphPad Prism version 5.00 for Windows, (GraphPad Software, San Diego California USA, www.graphpad.com).

RESULTS AND DISCUSSION

Our first result is that the basal diet mixed with additives and glued with gelatin results a solid nutrient (feed scones) again. Gelatin is a substantially pure protein food ingredient, obtained by the thermal denaturation of collagen, which is most common protein in the animal kingdom. This meet with our requirements that the additives (cholesterol and sunflower oil) must be dissolved uniform so they can be dosed accurately. The mice consumed this feed readily. Gelatin is not a complete protein source because it is deficient in tryptophan and low in methionine content, however the digestibility is excellent. We could not calculate with the deficiency of these amino acids because the animals were fed for three weeks only.

The literary facts and figures concerning animals reflected only production effects were presented with ACV application in the diet until now. In the present experiments we tried to find a different approach to evaluate the beneficial physiological effects of the ACV in the point of view of lipid metabolism. Mice treated with ACV (Control+ACV, Ch+ACV and SFO+ACV) and its control groups without ACV supplementation (Control, Ch and SFO) were compared.

The group of mice consuming the feed containing Ch and drinking ACV containing water had a little bit smaller bodyweight and liver weight than those of the control and Ch groups (Table 2). During dissection we found in the mice consuming feed enriched with cholesterol large quantities of deposited fat under the skin and in the abdominal cavity i.e. in the mesentery, too. This is the explanation for the smaller weight but bigger size, since fat is lighter weight than other tissues. This phenomenon is an evidence for the weight-reducing effect of ACV, since the group consuming it (Control+ACV) with normal feed had a smaller body weight than those of the control group. Acetic acid administration inhibited the accumulation of body fat and hepatic lipids without changing food consumption or skeletal muscle weight. In conclusion, Acetic acid suppresses accumulation of body fat and liver lipids by upregulation of genes for fatty-acid-oxidation-related proteins by mediation in the liver (Kondo et al. 2009).

In case of the group consuming cholesterol, we found that the mice became extensively fatty. This reflects in the weight ratio of liver/body. Animals of SFO supplemented groups (SFO and SFO+ACV) got more fatten than Control and Ch groups and their liver/body mass ratio (%) decreased compared to Control (P<0.05) (Table 2).

Table 2 Body weight and liver weight (mean $\pm$ SEM)

Groups	Control	Control+ACV	Ch	Ch+ACV	SFO	SFO+ACV
Body (g)	26,62 $\pm$ 1,22	26,19 $\pm$ 1,20	26,47 $\pm$ 2,06	26,09 $\pm$ 1,16	28,12 $\pm$ 2,04	26,53 $\pm$ 1,91
Liver (g)	1,71 $\pm$ 0,21	1,45 $\pm$ 0,23**	1,86 $\pm$ 0,46	1,44 $\pm$ 0,15**	1,82 $\pm$ 0,37	1,08 $\pm$ 0,13***
Liver %	6,45 $\pm$ 0,98	5,55 $\pm$ 0,88	7,06 $\pm$ 1,82	5,52 $\pm$ 0,60**	6,43 $\pm$ 1,10	4,09 $\pm$ 0,59**

p < 0.01; *p < 0.001 compared to control by Dunnett's Multiple Comparison Test

Table 3 Cholesterol triglyceride and FRAP values of plasma and liver (mean $\pm$ SEM)

	Groups	Control	Control+ACV	Ch	Ch+ACV	SFO	SFO+ACV
Plasma	FRAP (mmol/L)	0.64 $\pm$ 0.16	0.51 $\pm$ 0.1	0.66 $\pm$ 0.11	0.66 $\pm$ 0.11	0.47 $\pm$ 0.25	0.38 $\pm$ 0.17*
	tCh (mmol/L)	1.9 $\pm$ 0.61	1.65 $\pm$ 0.32	1.47 $\pm$ 0.19	1.86 $\pm$ 0.42	2.11 $\pm$ 0.23	1.62 $\pm$ 0.39*
	TG (mmol/L)	1.51 $\pm$ 0.5	1.19 $\pm$ 0.16	0.69 $\pm$ 0.12***	0.69 $\pm$ 0.2***	0.74 $\pm$ 0.1***	0.62 $\pm$ 0.07***
Liver	tCh (mmol/g)	6.76 $\pm$ 2.55	6.8 $\pm$ 1.26	25.8 $\pm$ 5.08***	24.49 $\pm$ 3.84***	8.36 $\pm$ 3.49	6.83 $\pm$ 4.13
	TG (mmol/g)	11.8 $\pm$ 4.26	9.02 $\pm$ 1.57	9.32 $\pm$ 2.69	10.84 $\pm$ 3.7	9.37 $\pm$ 4.16	9.67 $\pm$ 3.72

*p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001 compared to control by Dunnett's Multiple Comparison Test

The alterations of plasma tCh showed no significant changes by cholesterol or SFO supplementation and drinking ACV containing water (Table 3). The plasma Ch decreased in Control+ACV group. The results of our experiment show that the Ch supplemented groups stored higher concentration of Ch in the liver ($P < 0.01$) than Controls and SFO treated animals. The storage of Ch was somewhat less in ACV treated groups (Table 3). These findings can be explained by sorbose and pectin content of ACV. One of a non-fermentable (Tamura et al., 1991) carbohydrate constituent of ACV is the L-sorbose (McComb, 1975). Sorbose significantly reduced plasma cholesterol and VLDL by approximately 50%. Absolute and relative abdominal fat weights were and fat content in the pectoral muscle also decreased as dietary sorbose increased (Beyers and Jensen, 1993). It was concluded that dietary sorbose can be used as a potential regulator of lipid deposition in broilers (Furuse et al., 1991). The TG levels of plasma in all supplemented groups were markedly lower ($p < 0.001$) than in animals receiving basal diet (Table 3). The concentration liver TG remained in the same range in all groups independently by different treatments (Table 3). According to Aprikian et al. (2001) the lipoprotein profile was markedly altered in apple-fed rats. The reduction of cholesterol in the triglyceride rich lipoprotein fraction, together with a rise in the HDL fraction was described. This was parallel by effects of the apple on cholesterol absorption, which was markedly depressed, whereas bile acid digestive balance was unaffected. Others have demonstrated that water soluble components of fruits have influence on lipid metabolism. Sugar beet pulp and apple pomace dietary fibers hindered the rise of plasma lipids in rats fed cholesterol (Leontowicz et al., 2001). We have only information of acidity of commercial ACV which was used in our experiment. But there are data in the literature that among the main organic acidic components (acetic, propionic, malic and lactic acid) ACV contains free amino acids, non-fermentable sugar and roughage in the forms of potash and apple pectin (McComb, 1975; Hellmiss, 1997). One of the water soluble dietary fibers is the pectin (Linder 1991). The supplementation of diet with apple dietary fiber from extraction juices or alcohol-insoluble substances had

minor effects on blood serum lipids but the fecal excretion of bile acids increased (Sembries et al., 2004). The ACV which containing this materials exerted a decreasing effect on the level of plasma Ch and TG markedly ($P < 0.05$) but only in that group (Control+ACV) which consumed the basal diet in presented experiment. This lowering effect could be demonstrated only in the case of TG in the plasma. The groups receiving ACV showed decreasing FRAP values compared with the same supplementation without ACV (Table 3). This means a lower antioxidative capacity of plasma because of the direct reduction of the color-forming reagent (ferric tripyridyltriazine), so the antioxidant capacity is proportional to the reducing ability of plasma. These findings are against to others' results. According to Aprikian et al. (2001), there was a positive effect of the apple diet on parameters of oxidative stress prevention: higher FRAP plasma levels than in controls, together with a reduced MDA excretion in urine. In conclusion, their work indicates that the supply of apples elicits interesting effects on lipid and peroxidation parameters. Others found that acetic acid was considered to have an impact on the release of PUFA. For example lipid oxidation products increased in the acid-treated oyster digestive organs. PUFA and lipid oxidation products after treatment with the acid were higher than that in PBS-treated ones at 37 °C (Sajiki et al.1995). In our case presumably these effects occurred in all ACV treated and especially in the SFO+ACV and cholesterol+ACV supplemented groups.

CONCLUSION

The problem of the application of dry matter additives to laboratory mice was solved by gelatin gluing of components. The ACV can help in the lowering of plasma Ch and TG and can depress their liver storage of TG in the case of normal level of lipid consumption. When the lipid input was elevated this benefit not occurred in the blood, but a decreasing tendency of cholesterol and triglyceride contents were determined in the liver.

We hope that our experimental results will bring us nearer to understand of a better and more determined utilization of the ACV, as a natural food additive, concerning both human and animal nutrition.

REFERENCES

- APRIKIAN, O., LEVRAT-VERNY, M. A., BESSON, C., BUSSEROLLES, J., RÉMÉSY, CH., DEMIGNÉ, CH. 2001. Apple favourably affects parameters of cholesterol metabolism and of anti-oxidative protection in cholesterol-fed rats. In *Food Chemistry*, vol. 75, 2001, p. 445-452.
- BÁRDOS, L., KISS, ZS. 2000a. The model has proven too (in Hungarian). In *Kistermelők Lapja*, vol. 44, 2000, p. 15-16.
- BÁRDOS, L., KISS, ZS. 2000b. The acid of life (in Hungarian). In *Magyar Mezőgazdaság*, vol. 55, 2000, p. 28.
- BENZIE, F. F., STRAIN, J. J. 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": The FRAP assay. In *Analytical Biochemistry*, vol. 239, 1996, p. 70-76.
- BEYERS, R. S., JENSEN, L. S. 1993. Reduced plasma-cholesterol and lipoprotein in laying hens without concomitant reduction of egg cholesterol in response to dietary sorbose. In *Poultry Sci.*, vol. 72, 1993, p. 88-97.
- CZIRLE, N., BÁRDOS, L. 2000. More effective feeding of turkey by using apple cider vinegar (in Hungarian) In *Kistermelők Lapja*, vol. 45, 2000, p. 20.
- FLOCH, J. LEES, M., SLOANE-STANLEY, G. H. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. In *Journal of Biological Chemistry*, vol. 226, 1957, p. 497-509.
- FURUSE, M., ISHII, T., MIYAGAWA, S., NAKAGAWA, J., SHIMIZU, T., WATANABE, T., OKUMURA, J. I., KIMURA, J. I. 1991. Effect of dietary sorbose on lipid-metabolism in male and female broilers. In *Poultry Sci.*, vol. 70, 1991, p. 95-102.
- HELLMISS, M. 1997. Natürlich heilen mit Apfelessig. Südwest Verlag, München.
- KONDO, T., KISHI, M., FUSHIMI, T., KAGA, T. 2009. Acetic Acid Upregulates the Expression of Genes for Fatty Acid Oxidation Enzymes in Liver To Suppress Body Fat Accumulation. In *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 57, 2009, p. 5982-5986.
- LEONTOWICZ, M., GORINSTEIN, S. H., BARTNIKOWSKA, E., LEONTOWICZ, H., KULASEK, G., TRAKHTENBERG, S. 2001. Sugar beet pulp and apple pomace dietary fibers improve lipid metabolism in rats fed cholesterol. In *Food Chemistry*, vol. 72, 2001, p. 73-78.
- LINDER, M. C. (Ed.). 1991. *Nutritional biochemistry and metabolism with clinical applications*. Elsevier, New York, NY, p. 74-75.
- MARSHALL, W. J. 1988. *Clinical chemistry*. Glower Medical Publ., London, UK.
- McCOMB, E. A. 1975. Occurrence of L-sorbose in apple-cider vinegar. In *Carbohydrate Research*, vol. 42, 1975, p. 200-202.
- PEARSON, D. A., TAN, C. H., GERMAN, J. B., DAVIS, P. A., GERSHWIN, M. E. 1999. Apple juice inhibits human low density lipoprotein oxidation. In *Life Sci.*, vol. 64, 1999, p. 1913-1920.
- RASKIN, I., RIPOLL, C. 2004. Can an apple a day keep the doctor away? In *Current Pharmaceutical Design*, vol. 10, 2004, p. 3419-3429.
- SAJIKI, J., TAKAHASHI, H., TAKAHASHI, K. 1995. Impact of vinegar acetic acid on hydrolysis and oxidation of lipids in tissues of oyster *Crassostrea gigas*, at 37 °C. In *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 1995, p. 1467-1471.
- SEMBRIES, S., DONGOWSKI, G., MEHRLANDER, K., WILL, F., DIETRICH, H. 2004. Dietary fiber-rich colloids from apple pomace extraction juices do not affect food intake and blood serum lipid levels, but enhance fecal excretion of steroids in rats. In *Journal of Nutritional Biochemistry*, vol. 15, 2004, p. 296-302.
- TAMURA, Y., FURUSE, M., MATSUDA, S., SHIMIZU, T., OKUMURA, J. 1999. Energy utilization of dietary sorbose in growing rats. In *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 39, 1999, p. 1623-1626.
- VIJAYAKUMAR, C., WOLF-HALL, C. E. 2002. Evaluation of household sanitizers for reducing levels of *Escherichia coli* on iceberg lettuce. In *Journal of Food Protection*, vol. 65, 2002, p. 1646-1650.
- WILSON, W. O., ABBOTT, U. K., ABPLANALP, H. 1961. Evaluation of coturnix (Japanese quail) as pilot animal for poultry. In *Poultry Sci.*, vol. 40, 1961, p. 651-657.

Contact address:

László Bárdos, DVM, PhD., Department of Animal Physiology and Health, Szent István University, 2013 Gödöllő, Hungary, E-mail: bardos.laszlo@mkk.szie.hu, tel.: +3630-2796776,

Balázs Bender, Ing. Agr., PhD., ImmunoGenes Ltd, 2092 Budakeszi, Hungary, E-mail: benderb001@gmail.com, tel.: +3630-976-8544.

SELECTED PROPERTIES OF LACTIC ACID BACTERIA ISOLATED FROM RAW COW'S MILK

Jana Bezeková, Monika Lavová, Miroslav Kročko, Margita Čanigová

ABSTRACT

For the identification of lactic acid bacteria derived from raw cow's milk, 151 colonies were isolated. The grow conditions of lactic acid bacteria were at temperature 37 °C for 3 days on MRS medium. Based on microscopical preparation, negative catalase and Gram-positive test were 81 isolates confirmed as genus *Lactobacillus*. Out of these, 9 isolates were evaluated for acidifying activity in UHT milk at 25 °C, 30 °C and 37 °C at regular intervals during 24 hours. The average count of NSLAB lactobacilli in raw cow's milk reached the value $1.54 \cdot 10^4$ KTJ.ml⁻¹. It was found that all tested strains of lactobacilli did not cause significant changes of titratable acidity in milk at 25 °C and 30 °C. Only one strain significantly improved the titratable acidity of milk at 37 °C after 24 hours. The acidity reached the value from 7.5 °SH to 41.9 °SH. This strain was confirmed by PCR method as *Lactobacillus helveticus*.

Keywords: lactic acid bacteria, *Lactobacillus* sp., PCR, acidifying activity

ÚVOD

Mikroflóra syrov môže byť rozdelená do dvoch hlavných skupín t.j. zákvasové baktérie mliečného kysnutia tzv. LAB a sekundárna mikroflóra, ktorej súčasťou sú aj nezákvasové baktérie mliečného kysnutia – NSLAB. NSLAB tvoria zvláštnu skupinu baktérií mliečného kysnutia, ktoré sa prirodzene vyskytujú v mlieku a v prostredí. Do mlieka sa dostávajú sekundárnou kontamináciou napr. z podlahy, z kanalizácie a z povrchov zariadení používaných v mliekarenskom prostredí (Fox et al., 2004).

NSLAB komplex zahŕňa štyri hlavné skupiny baktérií, pričom najvýznamnejšie zastúpenie majú mezofilné laktobacily (Smith, 2003). V dnešnej dobe sa niektoré druhy laktobacilov používajú ako probiotiká v komerčne dostupných potravinách a sú dôležitou súčasťou črevnej mikroflóry ľudí a zvierat (Baele et al., 2002). Sánchez et al. (2006) zo 628 izolátov mliečnych baktérií zaradili do rodu *Lactobacillus* 39,5 % izolátov. Bertier et al. (2001) z celkového počtu 488 izolátov mezofilných laktobacilov zo vzoriek mlieka potvrdili prevládajúce druhy *Lactobacillus paracasei* a *Lactobacillus rhamnosus*. Rod *Lactobacillus* vyvoláva v mlieku jeho prirodzené kysnutie (Tůma, Plocková, 2007). Baktérie, ktoré majú schopnosť produkovať v mlieku pri teplote 30 – 37 °C za 6 hodín toľko kyseliny mliečnej, ktorá zníži kyslosť mlieka z pôvodného pH asi 6,8 na hodnotu pH < 5,3 sa považujú za zákvasové baktérie mliečného kysnutia (Görner, Valík, 2004). NSLAB sa môžu používať ako doplnkové kultúry v syrárstve.

Obsah NSLAB v polotvrdom syre ihneď po lisovaní je obvykle menší ako 1 KTJ.g⁻¹. Počas zrenia polotvrdých syrov sa populácia NSLAB zvyšuje a dosahuje vysoké počty, zatiaľ čo zákvasové baktérie postupne odumierajú. Na začiatku zrenia (po dvoch týždňoch) je najčastejšie obsah NSLAB $10^2 - 10^3$ KTJ.g⁻¹. Do troch mesiacov môžu

vzrásť na $10^5 - 10^7$ KTJ.g⁻¹ (Tůma, Plocková, 2007). Ich počet môže počas zrenia syrov vzrásť až na $10^7 - 10^8$ KTJ.g⁻¹ (Hoorde et al., 2010). Počty $10^7 - 10^8$ KTJ.g⁻¹ zostávajú na tejto úrovni počas zrenia syrov po dobu minimálne 5 mesiacov (Bertier et al., 2001).

V polotvrdých syroch bola dokázaná prítomnosť druhov *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus casei* subsp. *pseudoplantarum* a *Lactobacillus casei* subsp. *casei* (Wouters et al., 2002, Hoorde et al., 2008).

NSLAB majú pozitívny vplyv na senzorické vlastnosti výrobkov, prispievajú predovšetkým k rozvoju chuti syrov (Thage et al., 2005). Pri výrobe a zrení syrov zohráva dôležitú úlohu proteolýza kazeínu, počas proteolýzy z aminokyselín vznikajú prekurzory špecifických zložiek, ktoré dávajú syrom typickú chuť napr. alkoholy, aldehydy, estery, kyseliny (Kholif et al., 2011). Sledovaním vlastností laktobacilov napr. proteolytickou aktivitou, lipolytickou aktivitou, autolýzou sa zaoberali Garabal et al., (2008), Nieto-Arribas et al. (2009). Je preto snahou presne identifikovať izoláty NSLAB a preskúmať ich vlastnosti. Problematikou identifikácie sa zaoberali napr. Cagno et al. (2006) a Kaleta et al. (2009) s použitím metód PFGE (Pulse Field Gel Electrophoresis), PCR-RFLP (PCR-restriction fragment length polymorphism), RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA-analysis), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism).

Cieľom práce bolo izolovať, identifikovať mliečne baktérie a preštudovať ich vybrané vlastnosti.

MATERIÁL A METÓDY

Izolácia laktobacilov

Prítomnosť NSLAB sa zisťovala v cisternových vzorkách surového kravského mlieka a vo vzorkách

mlieka z mliečného automatu. V odobratých vzorkách mlieka sa stanovil počet laktobacilov kultiváciou na MRS agare (HiMedia Laboratories, India) pri teplote 37 ± 1 °C po dobu 72 hodín za anaeróbných podmienok.

Rodová identifikácia laktobacilov

Baktérie rodu *Lactobacillus* vytvárajú na MRS médiu charakteristické kolónie, t.j. biele, šošovkovité až hviezdicovité kolónie o priemere 1 až 3 mm. Počítateľné počty laktobacilov sa pohybujú v rozmedzí $15 - 150$ KTJ.ml⁻¹ (STN ISO 15214, 2002).

Vybrané kolónie laktobacilov vyrastené na živom médiu MRS sa preočkovali čiarovaním na platne MRS agar. Mikroskopicky sa pomocou natívneho preparátu zistila ich morfológia. Laktobacily sú grampozitívne paličky samostatné resp. vytvárajúce retiazky a sú katalázanegatívne.

Druhovú identifikáciu laktobacilov

Druhovú identifikáciu izolátu č. 62 sa vykonala pomocou komerčnej biochemickej súpravy API 50 CHL (BioMérieux, France). K identifikácii sa použila 24 hodinová kultúra, z ktorej sa pripravila suspenzia s turbiditou rovnou 2. stupňu McFarlandovej zákalovej stupnice na prístroji Densilameter (Lachema, Česká republika). Inkubácia, identifikácia a vyjadrenie výsledkov sa uskutočnilo podľa návodu testu. Tento izolát druhovo určený komerčným biochemickým testom sa potvrdil PCR metódou podľa Fortina et al. (2001). Z vyrastených kolónií mliečnych baktérií na MRS médiu sa vybrané kolónie použili na 24 hodinovú kultúru a nechali sa pomnožiť v MRS bujóne. Po odobratí sa bakteriálne bunky premyli 2-krát PBS roztokom a izolácia DNA sa uskutočnila prístrojom QuickGene-Mini80 a komerčným kitom podľa pokynov výrobcu (Fujifilm, Japan). Izolovaná DNA sa skontrolovala na 0,9 % agarózovom géle a jej množstvo a čistota sa zmerali na prístroji Nanophotometer Implen (Implen, Germany). Preinkubácia sa uskutočnila pri teplote 95 °C počas 2 min.

K 2 µl DNA sa pridal PCR mix, ktorý obsahoval 2,5 µl 10 x PCR buffru (Fermentas, Germany), 0,5 µl každého 10 mM deoxynukleozid trifosfátu (Fermentas), 2,0 µl 25 mM MgCl₂ (Fermentas), 0,25 µl 5 U DreamTaq polymerázy (Fermentas) a 0,5 µl každého 10 pmol primeru (IDT, USA). Sekvencia špecifických primerov pre *Lactobacillus helveticus* (524bp):

For CTGTTTCAATGTTGCAAGTC, Rev TTTGCCAGCATTAACAAGTCT. Amplifikácia sa uskutočnila na prístroji Thermal cycler C1000 (Biorad, USA).

V 35 cykloch sa opakovala denaturácia pri 94 °C počas 45 sekúnd, annealing pri 58 °C počas 45 sekúnd a elongácia pri 72 °C počas 1 min. Záverečný predĺžovací krok sa uskutočnil pri teplote 72 °C počas 7 min. Získané PCR fragmenty sa farbili pomocou GelRed (Biotium, USA) na 0,9 % agarózovom géle pri 120 V po dobu 15 minút a vizualizovali pod UV svetlom (Fortina et al., 2001).

Dôkaz kysacej, proteolytickej a lipolytickej aktivity

Kysacia aktivita vybraných izolátov laktobacilov sa sledovala cez zmenu titračnej kyslosti naočkovaného UHT mlieka počas 24 hodinovej kultivácie pri teplote 25 °C, 30 °C a 37 °C v pravidelných časových intervaloch. Proteolytická aktivita sa zistila diskovou difúznou metódou na mäsopeptonovom agare s 10 % prídavkom

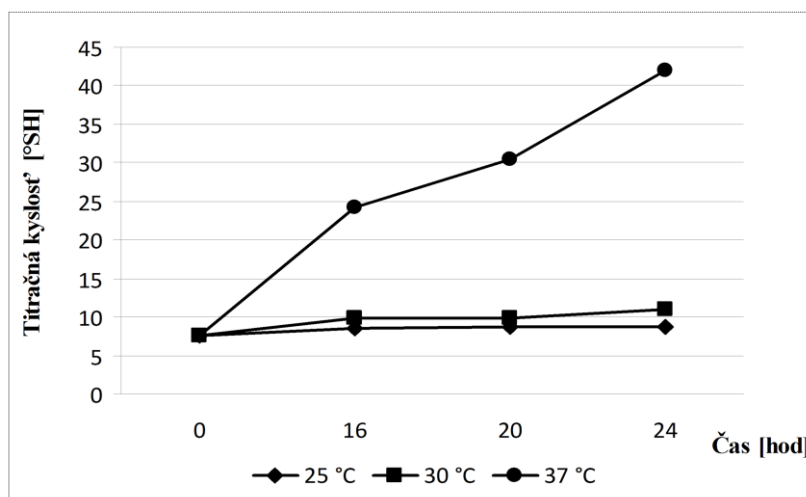
obnoveného sterilného odstredeného mlieka. Kultivácia prebehla pri teplote 37 ± 1 °C po dobu 10 dní. Lipolytická aktivita sa zistila diskovou difúznou metódou na tributyrínovom agare (HiMedia Laboratories, India) s prídavkom 1 % tributyrínu. Platne sa vyhodnotili po kultivácii pri 37 ± 1 °C po dobu 10 dní. K hodnoteniu uvedených aktivít sa použila 24 hodinová kultúra pomnožená v MRS bujóne s hustotou 0,5 stupňa McFarlandovej zákalovej stupnice.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

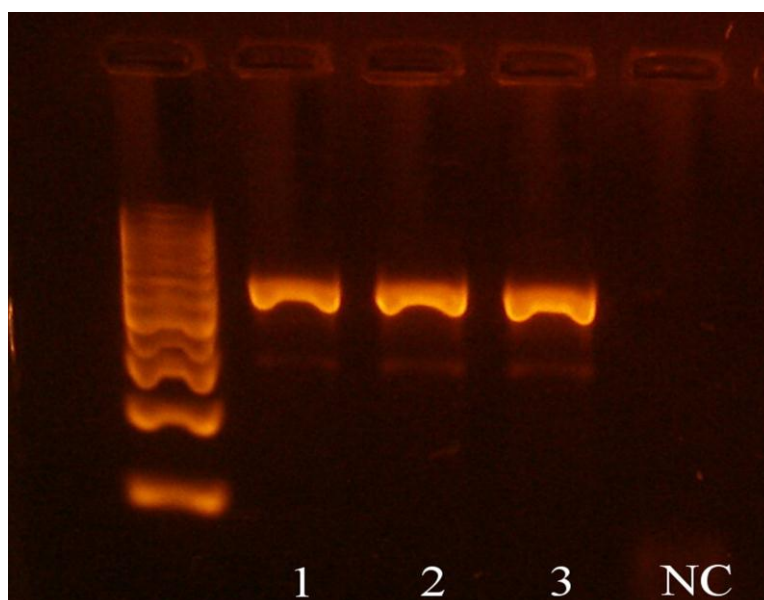
Počty laktobacilov vo vyšetrovaných vzorkách mlieka kolísali od $5,45 \cdot 10^2$ KTJ.ml⁻¹ do $1,89 \cdot 10^6$ KTJ.ml⁻¹ s priemerom $1,54 \cdot 10^4$ KTJ.ml⁻¹. Kagkli et al. (2007) uvádzajú podobné priemerné počty laktobacilov v surovom kravskom mlieku – $1,99 \cdot 10^4$ KTJ.ml⁻¹. Celkom sa izolovalo 151 izolátov z toho na základe príslušnosti podľa Grama a hodnotenia morfológického charakteru sa zistilo 81 kmeňov laktobacilov. U 9 náhodne vybraných izolátov sa hodnotila kysacia, proteolytická a lipolytická aktivita. V tabuľke 1 sú uvedené zmeny titračnej kyslosti mlieka vyvolané rôznymi kmeňmi laktobacilov v závislosti od času a teploty.

Tabuľka 1 Zmeny titračnej kyslosti mlieka spôsobené rôznymi kmeňmi laktobacilov v závislosti od času a teploty

Číslo kmeňa	Teplota [°C]	Časové intervaly v hodinách			
		0	16	20	24
		Titračná kyslosť [°SH]			
16	25	7,15	7,55	7,55	13,10
	30		7,25	7,55	9,50
	37		7,70	8,70	8,70
21	25	7,65	7,65	7,65	7,65
	30		7,65	7,65	7,65
	37		7,65	7,85	7,85
37	25	7,55	7,55	7,60	7,90
	30		7,55	7,60	8,00
	37		7,55	7,75	8,05
41	25	7,00	7,50	7,90	8,15
	30		7,00	8,05	11,30
	37		7,75	9,45	14,15
50	25	7,50	7,50	8,35	8,40
	30		8,50	8,90	11,85
	37		10,85	12,65	13,05
59	25	7,50	7,50	7,50	8,00
	30		7,50	7,50	7,50
	37		7,50	7,80	8,50
60	25	7,50	6,90	7,50	9,25
	30		7,50	8,35	9,00
	37		8,50	9,30	10,20
62	25	7,50	8,50	8,70	8,70
	30		9,75	9,90	10,95
	37		24,25	30,35	41,90
70	25	7,50	7,50	7,70	7,90
	30		8,40	8,50	8,50
	37		7,50	8,50	8,80



Obrázok 1 Priebeh zmeny titračnej kyslosti mlieka



Obrázok 2 PCR identifikácia druhu *Lactobacillus helveticus* (524bp) 100bp ladder, 1-3 amplifikované fragmenty (524bp), NC-negatívna kontrola

Zo získaných výsledkov vyplýva, že všetky sledované izoláty laktobacilov pri teplote 25 °C a 30 °C nevykazovali takmer žiadnu schopnosť prekysávať naočkovaný substrát. V jedinom prípade u kmeňa číslo 62 sa zaznamenal výrazný nárast titračnej kyslosti z počiatočných 7,5 °SH pri teplote 37 °C po 24 hodinách kultivácie na hodnotu 41,9 °SH, čo zodpovedalo hodnote pH 4,53. Priebeh zmeny titračnej kyslosti mlieka pôsobením kmeňa číslo 62 v závislosti od času a teploty je znázornený na obrázku 1.

Smetanková et al. (2011) zaznamenali pri sledovaní kysacej aktivity druhu *Lactobacillus helveticus* pokles pH naočkovaného UHT mlieka po 52 hodinách kultivácie pri 37 °C na hodnotu 3,47. *Lactobacillus helveticus* je termofilná homofermentatívna mliečna baktéria, ktorá má schopnosť produkovať veľké množstvo kyseliny mliečnej

(Borgo et al., 2007). Podľa Cascio (2010) kmeň *Lactobacillus helveticus* by sa nemal udržiavať pri teplotách nižších ako 20 °C, pretože to môže viesť k zhoršeniu kysacích schopností tejto baktérie. Aj výsledky nášho pokusu potvrdili, že pri nižších teplotách tento kmeň vykazoval slabú schopnosť fermentovať laktózu.

Podľa Drába et al. (2008) sú veľké rozdiely medzi kmeňmi druhu *Lactobacillus helveticus* v schopnosti fermentácie sacharidov, tvorby kyseliny mliečnej a v štiepení bielkovín, preto je identifikácia druhu *Lactobacillus helveticus* v rámci rodu *Lactobacillus* niekedy náročná vzhľadom k vysokej vnútrodrohovej variabilite charakteristickej pre tento druh. Táto heterogenita má za následok veľmi náročné biochemické odlišenie druhu *Lactobacillus helveticus* od fylogeneticky

příbuzných druhů jako sú *Lactobacillus acidophilus* a *Lactobacillus delbrueckii*. Na základě výsledků druhové identifikace pomocí testu API 50 CHL sme predpokladali, že sa jedná o druh *Lactobacillus acidophilus* alebo *Lactobacillus helveticus*. PCR metódou sa potvrdilo, že ide o druh *Lactobacillus helveticus* obrázok 2.

ZÁVER

Zo získaných výsledkov je možné konštatovať, že nie všetky izolované a sledované kmeny laktobacilov mali dobrú kysiacu aktivitu. Výrazná kysacia aktivita sa prejavila len u izolátu číslo 62, kde titračná kyslosť naočkovaneho UHT mlieka po 24 hodinách kultivácie pri teplote 37 °C dosiahla hodnotu 41,90 °SH. U tohto kmeňa sa nezistila proteolytická a lipolytická aktivita. Aj napriek tomu tento kmeň ostane predmetom nášho ďalšieho štúdia s cieľom preskúmať ďalšie jeho pozitívne vlastnosti využiteľné pri spracovaní mlieka.

LITERATÚRA

- BAELE, M., VANEECHOUTTE, M., VERHELST, R., VANCANNEYT, C., DEVRIESE, L. A., HAESEBROUCK, F. 2002. Identification of *Lactobacillus* species using tDNA-PCR. In *Journal of Microbiological Methods*, vol. 50, 2002, p. 263-271.
- BERTIER, F., BEUVIER, E., DASEN, A., GRAPPIN, R. 2001. Origin and diversity of mesophilic *lactobacilli* in Comté cheese, as revealed by PCR with repetitive and species-specific primers. In *International Dairy Journal*, vol. 11, 2001, p. 293-305.
- BORGO, F., RICCI, G., MANACHINI, P. L., FORTINA, M. G. 2007. Multilocus restriction typing: A tool for studying molecular diversity within *Lactobacillus helveticus* of dairy origin. In *International Dairy Journal*, vol. 17, 2007, p. 336-342.
- CAGNO, R. D., QUINTO, M., CORSETTI, A., MININERVINI, F., GOBBETTI, M. 2006. Assessing the proteolytic and lipolytic activities of single strains of mesophilic *lactobacilli* as adjunct cultures using a Caciotta cheese model system. In *International Dairy Journal*, vol. 16, 2006, p. 119-130.
- CASCIO, A. 2010. *Lactobacillus helveticus*. [online]. 2010. [cit. 2010-10-26]. Retrieved from the web <http://web.mst.edu/~microbio/bio221_2005/L_helveticus.htm>.
- DRÁB, V., KLEČACKÁ, J., SEDLÁČEK, I., ŠVEC, P., VILÍMKOVÁ, M. 2008. Odlíšení kmenů druhu *Lactobacillus helveticus* od fylogeneticky příbuzných druhů *Lactobacillus delbrueckii* a *Lactobacillus acidophilus* pomocí biochemických testů a molekulárně genetických metod. In *Mlékařské listy zpravodaj*, vol. 108, 2008, p. 21-26.
- FORTINA, M. G., RICCI, G., MORA, D., PARINI, C., MANACHINI, P. L. 2001. Specific identification of *Lactobacillus helveticus* by PCR with *pepC*, *pepN* and *htrA* targeted primers. In *FEMS Microbiology Letters*, vol. 198, 2001, p. 85-89.
- FOX, P. F., MC SWEENEY, P. L. H., COGAN, T. M., GUINEE, T. P. 2004. *Cheese-Chemistry, Physic and Microbiology*, vol. 1, 3rd Edition. Elsevier, 2004, 617 p.
- GARABAL, J. I., RODRÍGUEZ-ALONSO, P., CENTENO, J. A. 2008. Characterization of lactic acid bacteria isolated from raw cows' milk cheeses currently produced in Galicia (NW Spain). In *LWT Food Science and Technology*, vol. 40, 2008, p. 1452-1458.

- GÖRNER, F., VALÍK, L. 2004. *Aplikovaná mikrobiológia požívatin*. 1. vyd. Bratislava: Malé centrum, 2004, 528 p.
- HOORDE, K. V., LEUVEN, I. V., DIRINCK, P., HEYNDRIKX, M., COUDIJZER, K., VANDAMME, P., HUYS, G. 2010. Selection, application and monitoring of *Lactobacillus paracasei* strains as adjunct cultures in the production of Gouda-type cheeses. In *International Journal of Food Microbiology*, vol. 144, 2010, p. 226-235.
- HOORDE, K. V., VERSTRAETE, T., VANDAMME, P., HUYS, G. 2008. Diversity of lactic acid bacteria in two Flemish artisan raw milk Gouda-type cheeses. In *Food Microbiology*, vol. 25, 2008, p. 929-935.
- KAGKLI, D. M., VANCANNEYT, M., HILL, C., VANDAMME, P., COGAN, T. M. 2007. *Enterococcus* and *Lactobacillus* contamination of raw milk in a farm dairy environment. In *International Journal of Food Microbiology*, vol. 114, 2007, p. 243-251.
- KALETA, P., CALLANAN, J., O'CALLAGHAN, J., FITZGERALD, G. F., BERESFORD, T. P., ROSS, R. P. 2009. Exploitation of the diverse insertion sequence element content of dairy *Lactobacillus helveticus* starters as a rapid method to identify different strains. In *Journal of Microbiological Methods*, vol. 79, 2009, p. 32-36.
- KHOLIF, A. M., MAHRAN, G. A., EL-NAWAWY, M. A., ISMAIL, A. A., SALEM, M. M. E., ZAKY, W. M. 2011. Evaluation of Proteolytic Activity of Some Dairy *Lactobacilli*. In *World Journal of Dairy and Food Sciences*, vol. 6, 2011, p. 21-26.
- NIETO-ARRIBAS, P., POVEDA, J. M., SESENA, S., PALOP, L., CABERAS, L. 2009. Technological characterization of *Lactobacillus* isolates from traditional Manchego cheese for potential use as adjunct starter cultures. In *Food Control*, vol. 20, 2009, p. 1092-1098.
- SÁNCHEZ, I., SESENA, S., POVEDA, J. M., CABEZAS, L., PALOP, L. 2006. Genetic diversity, dynamic, and activity of *Lactobacillus* community involved in traditional processing of artisanal Manchego cheese. In *International Journal of Food Microbiology*, vol. 107, 2006, p. 265-273.
- SMETANKOVÁ, J., HLADÍKOVÁ, Z., GREIF, G., GREIFOVÁ, M. 2011. Technologické vlastnosti vybraných laktobacilov majúcich antimikrobiálnu aktivitu. In *Zb. XIII. konferencie mladých vedeckých pracovníkov*, VFU Brno, 2011, p. 45-47.
- SMITH, G. 2003. *Dairy Processing-Improving Quality*. Woodhead Publishing, 2003, 545 p.
- STN ISO 15214. 2002. *Mikrobiológia potravín a krmív. Horizontálna metóda stanovenia mezofilných baktérií mliečného kysnutia metóda počítania kolónii kultivovaných pri 37 °C*. Bratislava: SÚTN, 2002.
- THAGE, B. V., BROE, M. L., PETERSEN, M. H., PETERSEN, M. A., BENNEDSEN, M. ARDÖ, Y. 2005. Aroma development in semi-hard reduced-fat cheese inoculated with *Lactobacillus paracasei* strains with different aminotransferase profiles. In *International Dairy Journal*, vol. 15, 2005, p. 795-805.
- TŮMA, Š., PLOCKOVÁ, M. 2007. Protektivní kultury pro výrobu polotvrdých sýrů. In *Mléko a sýry 2007* (sborník přednášek semináře), Praha, 2007, p. 31-36.
- WOUTERS, J. T. M., AYAD, E. H. E., HUGENHOLTZ, J., SMIT, G. 2002. Microbes from raw milk for fermented dairy products. In *International Dairy Journal*, vol. 12, 2002, p. 91-109.

Acknowledgments:

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

Contact address:

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

Ing. Monika Lavová, Slovak University of Agriculture, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Department of Evaluation and Processing of Animal Product, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovakia, E-mail: monika.lavova@gmail.com

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

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

ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF THYME AND ROSEMARY ESSENTIAL OIL AGAINST ENTEROCOCCI ISOLATED FROM MEAT

Viera Ducková, Margita Čanigová, Miroslav Kročko, Jana Bezeková

ABSTRACT

Traditionally enterococci are considered as part of the lactic acid bacteria. This group of bacteria contaminating mostly food of animal origin and some of them can be resistant to antibiotic. The consumers prefer safe foods free of synthetic additives and therefore interest for natural preservatives is increasing in recent years. The aim of this work was to determine antibacterial activity of essential oil from thyme and rosemary against enterococci. Strains of enterococci were isolated from poultry and pork. The isolates of enterococci were identified as *E. faecalis* and *E. mundtii* and their sensitivity to chosen antibiotic (ampicillin, erythromycin, gentamicin, tetracycline and vancomycin) was determined. Enterococci were experimentally inoculated in nutrient broth at concentration $3 - 4 \log \text{cfu.ml}^{-1}$. The influence of thyme and rosemary essential oil at different concentrations and at different temperatures (6°C and 25°C) against enterococci was tested. As more effective has proved thyme oil, which reliably inhibited both strains at concentration of 0.05 % at 6°C and 25°C . Rosemary oil at the highest tested concentrations (of 1 %, respectively 1.5 %) only reduced the number of tested strains of enterococci. The higher antibacterial activity of essential oils was determined at 25°C .

Keywords: enterococci, thyme, rosemary, antibacterial activity

ÚVOD

Enterokoky sa tradične považujú za skupinu baktérií mliečného kysnutia. Sú ubiquitné, pričom ich prirodzeným miestom výskytu je predovšetkým tráviaci trakt človeka a väčšiny zvierat. Z tohto dôvodu sú preto značne zastúpené v surovinách a potravinách živočíšneho pôvodu. Tradične sa považovali za indikátor fekálnej kontaminácie, avšak v posledných rokoch sa pridávajú niektoré kmene do potravín ako súčasť štartovacích kultúr a považujú sa za probiotiká (Franz et al., 1999; Ortigosa et al., 2008). Zdá sa, že majú značný vplyv na tvorbu a zlepšovanie senzorickej kvality potravín. Nie všetky enterokoky sa ale považujú za bezpečné mikroorganizmy (Gelsomino et al., 2001). Dôležitým faktorom pri posudzovaní enterokokov z hľadiska ich bezpečnosti je rezistencia voči antibiotikám, obzvlášť glykopeptidom ako sú vankomycin alebo teikoplanín (Van de Braak et al., 1998; Klein, 2003).

Rozšírené používanie antibiotík v humánnej medicíne, ale i vo veterinárnej praxi sa považuje za jednu z možných príčin nárastu mikroorganizmov s antibiotickou rezistenciou. V snahe obmedziť šírenie a rozvoj rezistencie na antibiotiká sa v Európskej únii zakázalo používanie antimikrobiálnych rastových promotérov (Ouwehand et al., 2010).

V posledných rokoch sa zvyšuje tlak i zo strany konzumentov, ktorí kladú dôraz na bezpečné potraviny, pričom preferujú použitie prírodných alternatív pred pridávaním syntetických aditív do potravín. Značný prísľub v možných aplikáciách v potravinárskom priemysle preto ponúkajú extrakty z rastlín (Over et al., 2009).

Esenciálne oleje (nazývané tiež ako prchavé alebo éterické oleje) sú aromatické olejovité kvapaliny získané z rôznych častí rastlín. Niektoré z nich sú dlho známe

svojimi antibakteriálnymi vlastnosťami. Okrem antibakteriálnych vlastností, esenciálne oleje alebo ich časti môžu mať aj antivirálne, antimykotické, antitoxinogénne, antiparazitické a insekticídne vlastnosti (Burt, 2004).

Hodnotia sa účinky extraktov mnohých rastlín, pričom z doteraz najviac preštudovaných možno spomenúť koriander, škoricu, oregano, rozmarín, šalviu, klinčeky, tymián a pod.

Medzi hlavné zložky esenciálnych olejov, ktoré sú zodpovedné za biologickú aktivitu aromatických i liečivých rastlín, sa radia mono- a sesquiterpény zahrňujúce karbohydráty, fenoly, alkoholy, étery, aldehydy a ketóny (Soković et al., 2010). Ako účinné antibakteriálne látky esenciálnych olejov boli identifikované napr. karvakrol, tymol, eugenol, perillaldehyd, cinnamalaldehyd, kyselina škoricová, ktoré majú MIC v rozsahu $0,05 - 5 \mu\text{l.ml}^{-1}$ v podmienkach in vitro. K dosiahnutiu rovnakého efektu v potravinách sú potrebné vyššie koncentrácie. Experimenty s čerstvým mäsom, mäsovými výrobkami, rybami, mliekom, mliečnymi výrobkami, zeleninou, ovocím a varenou ryžou dokázali, že koncentrácia k dosiahnutiu signifikantného antibakteriálneho efektu je v rozmedzí $0,5 - 20 \mu\text{l.ml}^{-1}$ v potravinách (Burt, 2004).

Cieľom práce bolo v modelových pokusoch zhodnotiť antibakteriálnu aktivitu tymiánového a rozmarínového esenciálneho oleja na enterokoky izolované z bravčového resp. kuracieho mäsa.

MATERIÁL A METÓDY

Ako cieľové bakteriálne kmene sa testovali enterokoky z kuracieho a bravčového mäsa. Vo vzorkách mäsa sa enterokoky stanovili na selektívnom diagnostickom médiu

Slanetz-Bartley (Biokar Diagnostic, Francúzsko) po 48 ± 2 hod aeróbnej kultivácie pri teplote 37 ± 1 °C. Suspektné kolónie sa preočkovali na krvný agar a na selektívne médium obsahujúce žlč, eskulín a azid (Biokar Diagnostic, Francúzsko). Po potvrdení izolátov k rodu *Enterococcus* na základe morfológických znakov a biochemických skúšok sa vykonala druhová identifikácia komerčným En-coccus testom (Pliva-Lachema, Česká republika).

U identifikovaných kmeňov sa stanovila citlivosť na antibiotiká - ampicilín 10 µg, erytromycín 15 µg, gentamicín 10 µg, tetracyklín 30 µg a vankomycín 30 µg použitím diskovej difúznej metódy (HiMedia, India) podľa odporúčaní CLSI (CLSI, 2005).

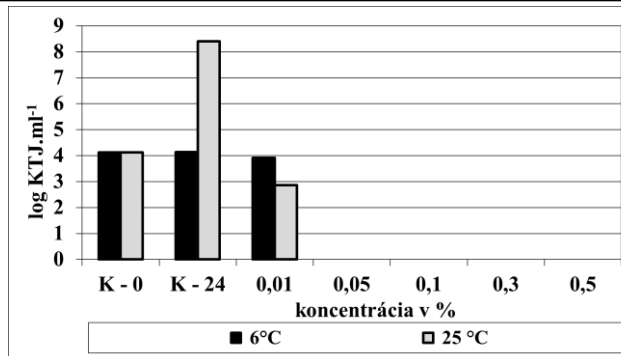
Následne sa hodnotil antibakteriálny účinok esenciálnych olejov z tymiánu a rozmarínu na vybrané kmene. Kmene enterokokov sa naočkovali na GTK agar (HiMedia, India) a kultivovali sa 24 hod pri teplote 37 ± 1 °C. Pre experiment sa pripravila čerstvá bakteriálna suspenzia v Mueller Hinton bujóne s počiatočnou hustotou bakteriálnej kultúry približne 4 až 5 log KTJ.ml⁻¹. Potrebné množstvo tymiánového alebo rozmarínového esenciálneho oleja (Hanus, Slovensko) a 0,5 ml bakteriálnej kultúry sa pridali do uzatvárateľných skúmaviek so 4,5 ml živného bujónu (HiMedia, India). Pozitívna kontrola sa pripravila so živného bujónu a bakteriálnej kultúry avšak bez esenciálneho oleja. Negatívna kontrola obsahovala živný bujón a esenciálny olej, ale bola bez naočkovanvej kultúry enterokokov. Prežívanie enterokokov sa hodnotilo po 24 hod inkubácii pri teplotách 6 a 25 °C. Počty enterokokov sa stanovili na selektívnom diagnostickom médiu Slanetz-Bartley (Biokar Diagnostic, Francúzsko) pri teplote 37 ± 1 °C po 48 ± 2 hod. Uvádzané výsledky sú vypočítané ako priemerné hodnoty z troch opakovaní.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

V modelových pokusoch sa pracovalo s kmeňom *Enterococcus faecalis* izolovaným z hydiny a s kmeňom *Enterococcus mundtii* izolovaným z bravčového mäsa. Diskovou difúznou metódou sa u kmeňa *Enterococcus faecalis* zistila rezistencia na erytromycín, gentamicín a tetracyklín, stredná rezistencia na ampicilín a citlivosť na vankomycín. U kmeňa *Enterococcus mundtii* sa dokázala pri tejto metóde rezistencia na ampicilín, stredná rezistencia na gentamicín a tetracyklín a citlivosť na erytromycín a vankomycín.

Kmene enterokokov, izolované z kuracieho a hovädzieho mäsa, rezistentné prinajmenšom na 2 rôzne druhy testovaných antibiotík zistili i Koluman et al. (2009), pričom uvádzajú, že až z 8 % vzoriek kuracieho mäsa izolovali vankomycín-rezistentné kmene enterokokov. Alarmujúce sú výsledky Jung et al. (2007), ktorí zistili vankomycín-rezistentné kmene enterokokov v 77 % vzoriek hydinného mäsa, v 38 % vzoriek hovädzieho mäsa a rovnako v 38 % vzoriek bravčového mäsa.

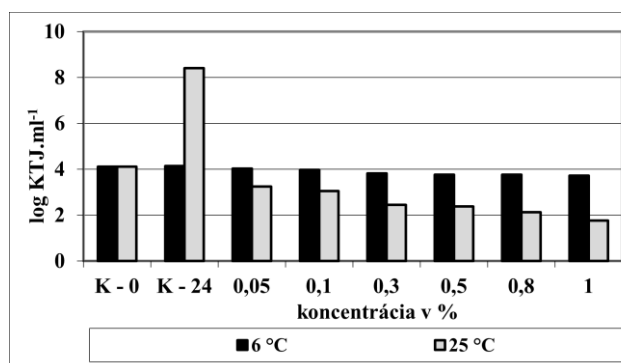
Hlavným cieľom práce bolo otestovať antibakteriálnu aktivitu esenciálnych olejov voči enterokokom. Pre modelové pokusy sa vybrala tymiánová a rozmarínová silica. Z literatúry vyplýva, že účinnými látkami rozmarínu sú α - pinen (2 - 25 %), bornylacetát (0 - 17 %), gáfor (2 - 14 %), 1,8 - cineol (3 - 89 %) a v tymiáne sú to tymol (10 - 64 %), karvakrol (2 - 11 %), γ - terpinen (2 - 31 %) a p - cymen (10 - 56 %) (Burt, 2004).



Obr. 1 Antibakteriálna aktivita tymiánového oleja na *Enterococcus faecalis*

K - 0 - počty enterokokov na začiatku pokusu

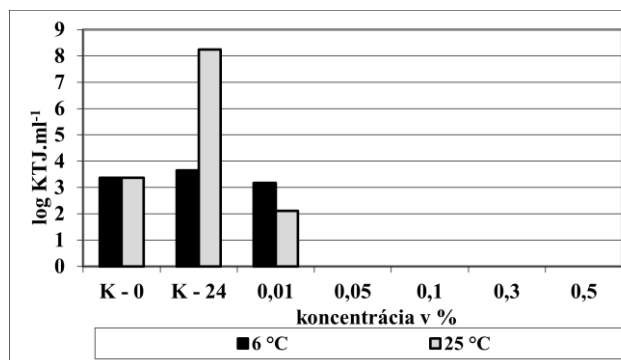
K - 24 - počty enterokokov po 24 hodinách kultivácie



Obr. 2 Antibakteriálna aktivita rozmarínového oleja na *Enterococcus faecalis*

K - 0 - počty enterokokov na začiatku pokusu

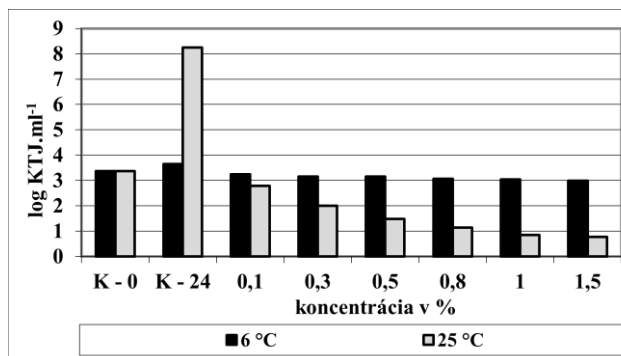
K - 24 - počty enterokokov po 24 hodinách kultivácie



Obr. 3 Antibakteriálna aktivita tymiánového oleja na *Enterococcus mundtii*

K - 0 - počty enterokokov na začiatku pokusu

K - 24 - počty enterokokov po 24 hodinách kultivácie



Obr. 4 Antibakteriálna aktivita rozmarínového oleja na *Enterococcus mundtii*

K - 0 - počty enterokokov na začiatku pokusu

K - 24 - počty enterokokov po 24 hodinách kultivácie

Doteraz nie je štandardný test pre hodnotenie antibakteriálnej aktivity látok voči mikroorganizmom izolovaným z potravín. **Marques et al. (2008)** konštatujú, že väčšina uskutočnených štúdií hodnotí antimikrobiálnu aktivitu esenciálnych olejov v in vitro podmienkach pri teplotách okolo 30 - 37 °C, zatiaľ čo skladovanie potravín sa realizuje bežne aj pri chladiacich teplotách. Rovnako upozorňujú aj na fakt, že vo väčšine štúdií sa uskutočňujú pokusy s vysokou koncentráciou štartovacieho bakteriálneho inokula (väčšinou 6 - 10 log KTJ.ml⁻¹). Z týchto dôvodov sa naše modelové pokusy realizovali pri teplotách 6 °C a 25 °C so štartovacou počiatočnou koncentráciou enterokokov na úrovni 3 - 4 log KTJ.ml⁻¹, v snahe čo najviac sa priblížiť podmienkam v potravinách.

Výsledky antibakteriálnej aktivity tymiánového a rozmarínového esenciálneho oleja na testované kmene enterokokov sú znázornené na obrázkoch 1 až 4.

Ako vyplýva z výsledkov na obr. 1 až 4 esenciálny olej z tymiánu preukázal v porovnaní s rozmarínom vyššiu antibakteriálnu aktivitu voči oboom testovaným kmeňom enterokokov pri oboch teplotách. Tymiánový esenciálny olej pri koncentrácii 0,01 % redukoval počty enterokokov a pri koncentrácii 0,05 % spoľahlivo inhiboval testované enterokoky. V prípade rozmarínového esenciálneho oleja sa tiež zaznamenala redukcia počtu enterokokov, avšak ani 1 % koncentrácia aplikovaná v prípade kmeňa *E. faecalis* a 1,5 % koncentrácia použitá v prípade kmeňa *E. mundtii* neboli dostatočné na úplnú inaktiváciu prítomnej populácie enterokokov. Z výsledkov na obr. 2 a 4 (K - 24) zároveň vyplýva, že rozvoj enterokokov značne obmedzuje aj nízka kultivačná teplota (6 °C). Pri tejto teplote sa zároveň zistil nižší antibakteriálny efekt rozmarínového esenciálneho oleja v porovnaní s teplotou 25 °C, čo mohlo zrejme súvisieť s horším uvoľňovaním účinných látok do prostredia.

Porovnávanie výsledkov s publikovanými údajmi je komplikované, pretože výsledky modelových pokusov sú ovplyvňované množstvom rôznych faktorov a sú testované rôzne skupiny mikroorganizmov. **Selim (2011)** hodnotil antibakteriálnu aktivitu 11 esenciálnych olejov voči 13 kmeňom vankomycín-rezistentných enterokokov. Z výsledkov jeho štúdie vyplýva, že tymiánový olej bol najúčinnější a MIC 90 a MBC 90 bola 0,25 a 0,5 %. Podľa **Jiang et al. (2011)** MIC rozmarínového oleja kolíše v závislosti od testovaných kmeňov baktérií od 0,03 do 0,1 objemových % a MBC od 0,1 do 0,5 objemových %. Antibakteriálnu aktivitu uvedení autori sledovali pri teplote 37 °C voči kmeňom baktérií r. *Staphylococcus*, *Escherichia*, *Bacillus*, *Proteus* a *Pseudomonas*.

Zaouali et al. (2010) porovnávali účinnosť rozmarínového esenciálneho oleja v závislosti od variety rozmarínu. Z ich výsledkov vyplýva, že MIC pre *Enterococcus faecalis* bola na úrovni 10 µl.ml⁻¹ pre extrakt z *Rosmarinus officinalis* var. *typicus* a 5 µl.ml⁻¹ pre *Rosmarinus officinalis* L. var. *troglodytorum*.

Bubonja-Sonje et al. (2011) sledovali antibakteriálnu aktivitu extraktov polyfenolov izolovaných z olivového oleja, kakaa a z rozmarínu voči *Listeria monocytogenes* a *Listeria innocua*. Najsilnejšiu antilisteriálnu aktivitu v rámci testovaných extraktov preukázal extrakt z rozmarínu. MIC komerčného rozmarínového extraktu bola 0,0830 ± 0,023 mg.ml⁻¹ napríklad v porovnaní s MIC extraktu polyfenolov z olivového oleja 0,400 ± 0,096 mg.ml⁻¹.

Okrem pokusov in vitro sa zisťujú antimikrobiálne účinky esenciálnych olejov na mikroorganizmy aj v modelových potravinových systémoch. **Vegera et al. (2011)** sledovali baktericidnú aktivitu hlavných zložiek izolovaných okrem iných aj z rozmarínu a tymiánu voči patogénnym baktériám *Escherichia coli* a *Staphylococcus aureus* v mrkvovom nápoji. Kyselina rozmarínová izolovaná z tymiánu a zmesi tymián – šalvia – rozmarín nebola dostatočne účinná na inhibíciu oboch testovaných kmeňov použitých v uvádzanej práci.

Piskernik et al. (2011) testovali antimikrobiálnu účinnosť rozmarínového extraktu aplikovaného do šľavy uvoľnenej z rozmrazených kurčiat a do živného bujónu voči druhu *Campylobacter jejuni*. Zistili, že účinnosť extraktu aplikovaného do šľavy je 4- krát nižšia. Zároveň dokázali, že prežívanie druhu *Campylobacter jejuni* podporuje aj nižšia teplota.

Účinok prírodných antibakteriálnych látok voči typickej kaziacej mikroflóre mäsa v podmienkach in vitro a na bravčovom vákuovo balenom mäse sledovali **Schirmer a Langsrud (2010)**. MIC thymolu, cinnamaldehydu, allylisothiokyanátu, rozmarínového extraktu a extraktu z grapefruitových semienok zisťovali skúškou na mikrotitračných doštičkách. Z ich experimentov vyplýva, že ani 10-násobok MIC zistenej in vitro nebol efektívny na rast mikroorganizmov vo vákuovo balenom bravčovom mäse. Na základe toho konštatujú, že výsledky skúšok na mikrotitračných doštičkách nemôžu byť priamo aplikované v potravinách.

ZÁVER

Na základe získaných výsledkov možno konštatovať, že tymiánový esenciálny olej preukázal lepšiu antibakteriálnu aktivitu voči testovaným kmeňom enterokokov v porovnaní s rozmarínovým olejom. Koncentrácia tymiánového oleja 0,05 % spoľahlivo inaktivovala populáciu testovaných enterokokov.

Rozmarínový olej aj pri koncentráciách 1 % resp. 1,5 % iba redukoval počty enterokokov a nepôsobil na enterokoky letálne. Z výsledkov zároveň vyplýva, že vyššiu antibakteriálnu aktivitu mali esenciálne oleje pri teplote 25 °C než pri teplote 6 °C. Rastlinné esenciálne oleje majú potenciál, aby sa využívali v potravinárstve na inhibíciu patogénnej i kaziacej mikroflóry, je však potrebné, aby sa okrem modelových pokusov in vitro hodnotil aj ich účinok priamo v potravinovej matici.

LITERATÚRA

- BUBONJA-SONJE, M., GIACOMETTI, J., ABRAM, M. 2011. Antioxidant and antilisterial activity of olive oil, cocoa and rosemary extract polyphenols. In *Food Chemistry*, vol. 127, 2011, p. 1821-1827.
- BURT, S. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods - a review. In *International Journal of Food Microbiology*, vol. 94, 2004, p. 223-253.
- CLSI. 2005. *Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Test for Bacteria Isolated from Animals*. Wayne: National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2005. 86 p.
- FRANZ, C. M. A. P., HOLZAPFEL, W. H., STILES, M. E. 1999. *Enterococci at the crossroads of food safety?* In *International Journal of Food Microbiology*, vol. 47, 1999, p. 1-24.

- GELSOMINO, R., VANCANNEYT, M., CONDON, S., SWINGS, J., COGAN, T. M. 2001. Enterococcal diversity in the environment of an Irish Cheddar-type cheese making factory. In *International Journal of Food Microbiology*, vol. 71, 2001, p. 177-188.
- JIANG, Y., WU, N., FU, Y., WANG, W., LUO, M., ZHAO, CH., ZU, Y., LIU, X. 2011. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of Rosemary. In *Environmental Toxicology and Pharmacology*, vol. 32, 2011, p. 63-68.
- JUNG, W. K., LIM, J. Y., KWON, N. H., KIM, J. M., HONG, S. K., KOO, H. CH., KIM, S. H., PARK, J. H. 2007. Vancomycin-resistant *enterococci* from animal sources in Korea. In *International Journal of Food Microbiology*, vol. 113, 2007, p. 102-107.
- KLEIN, G. 2003. Taxonomy, ecology and antibiotic resistance of *enterococci* from food and gastro-intestinal tract. In *International Journal of Food Microbiology*, vol. 88, 2003, p. 123-131.
- KOLUMAN, A., AKAN, L. S., ÇAKIROĞLU, F. P. 2009. Occurrence and antimicrobial resistance of *enterococci* in retail foods. In *Food Control*, vol. 20, 2009, p. 281-283.
- MARQUES, A., ENCARNACAO, S., PEDRO, S., NUNES, M. L. 2008. In vitro antibacterial activity of garlic, oregano and chitosan against *Salmonella enteritica*. In *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, vol. 24, 2008, p. 2357-2360.
- ORTIGOSA, M., IRIGOYEN, A., URDIN, M., GARCÍA, S., IBAÑEZ, F. C., TORRE, P. 2008. Identification of *enterococci* and isolation of vancomycin-resistant strains in Spanish cheeses. In *Milchwissenschaft*, vol. 63, 2008, no. 2, p. 164-167.
- OUWEHAND, A. C., TIIHONEN, K., KETTUNEN, H., PEURANEN, S., SCHULZE, H., RAUTONEN, N. 2010. In vitro effects of essential oils on potential pathogens and beneficial members of the normal microbiota. In *Veterinari Medicina*, vol. 55, 2010, no. 2, p. 71-78.
- OVER, K. F., HETTIARACHCHY, N., JOHNSON, M. G., DAVIS, B. 2009. Effect of Organic Acids and Plant Extracts on *Escherichia coli* O 157: H7, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella typhimurium* in Broth Culture Model and Chicken Meat Systems. In *Journal of Food Science*, vol. 74, 2009, no. 9, p. M515-M521.
- PISKERNIK, S., KLANČNIK, A., RIEDEL, CH. T., BRØNDSTED, L., MOŽINA, S. S. 2011. Reduction of *Campylobacter jejuni* by natural antibiotics in chicken meat-related conditions. In *Food Control*, vol. 22, 2011, p. 718-724.
- SELIM, S. 2011. Antibacterial activity of essential oil against vancomycin resistant enterococci (VRE) and *Escherichia coli* O157:H7 in Feta cheese and minced beef meat. In *Brazilian Journal of Microbiology*, vol. 42, 2011, p. 187-196.
- SCHIRMER, B. CH., LANGSRUD, S. 2010. Evaluation of Natural Antimicrobials on Typical Meat Spoilage Bacteria *In Vitro* and in Vacuum-Packed pork Meat. In *Journal of Food Science*, vol. 75, 2010, no. 2, p. M98-M102.
- SOKOVIĆ, M., GLAMOČLIJA, J., MARIN, P. D., BRKIĆ, D., VAN GRIENSVEN, L. J. L. D. 2010. Antibacterial Effects of the Essential Oils of Commonly Consumed Medicinal Herbs Using *In Vitro* Model. In *Molecules*, vol. 15, 2010, p. 7532-7546.
- VAN DE BRAAK, N., VAN BELKUM, A., VAN KEULEN, M., VLIEGENTHART, J., VERBRUGH, H., ENDTZ, H. P. 1998. Molecular characterization of vancomycin-resistant *enterococci* from hospitalized patients and poultry products in the Netherlands. In *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 36, 1998, p. 1927-1932.
- VEGERA, S., FUNES, L., MARTÍ, N., SAURA, D., MICOL, V., VALERO, M. 2011. Bactericidal activities against pathogenic bacteria by selected constituents of plant extracts in carrot broth. In *Food Chemistry*, vol. 128, 2011, p. 872-877.
- ZAOUALI, Y., BOUZAIN, T., BOUSSAID, M. 2010. Essential oils composition in two *Rosmarinus officinalis* L. varieties and incidence for antimicrobial and antioxidant activities. In *Food and Chemical Toxicology*, vol. 48, 2010, p. 3144-3152.

Acknowledgments:

This work was supported by grant VEGA No. 1/0897/11.

Contact address:

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

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

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

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

SENSORY EVALUATION OF MEAT CHICKENS ROSS 308 AFTER APPLICATION OF PROPOLIS IN THEIR NUTRITION

Peter Haščík, Jozef Garlík ml., Miroslava Kačániová, Juraj Čuboň, Martin Mellen, Michal Mihok, Ibrahim Omer Eliman Elimam

ABSTRACT

The objective of the experiment was to verify the effect of propolis extract in Ross 308 broiler on the sensory quality of breast and thigh muscle modified by baking at temperature 200 °C for 60 minutes and finish baking for a period of 10-15 minutes. In the experiment were used 180 chickens divided into 2 groups (control and experimental group) with 90 chickens (45 ♂ and 45 ♀). Fattening lasted 40 days. The chickens were fed ad libitum with the same starter feed mixtures to 21 days and from 22 days of age through 40 days of age with the grower feed mixtures in the both followed groups. Feed mixtures were made without antibiotics and coccidiostats. The feed mixtures used in experimental group were enriched with the feed extract of propolis in a dose of 0.2 g.kg⁻¹. After heat treatment of breast and thigh muscle 60 pieces chickens (30 pieces ♀, ♂ 30 pieces) of each group samples were sensory analyzed (smell, taste, juiciness, softness). Statistically significant differences were found by sex ($P \leq 0.05$ to 0.001) in aroma and taste of cocks in the thigh muscle (+0.290 points, +0.300 points) and hens ($P \leq 0.01$) in flavor (+0.250 points) and softness (+0.372 points) in breast muscle. Sensory assessment of the individual characters of either gender had significant differences ($P \leq 0.05$ to 0.001) in favor of the experimental group achieved only in the evaluation of the smell in the breast (+0.207 points) as well as thigh muscle (+0.207 points). In the final evaluation the most valuable parts of Ross 308 chickens carcass were found a positive effect of propolis extract on their sensory properties, but significant differences ($P \leq 0.01$) were observed only in chickens in the breast muscle (+0.917 points) compared with control group. The results have confirmed that propolis extract in a dose of 0.2 g.kg⁻¹ feed mixture can be applied in the diet of chickens, as it positively affects the sensory quality of Ross 308 chickens meat, which is one of the most important parts of chicken meat for use in human food chain.

Keywords: Ross 308 chicken, propolis extract, sensory evaluation, breast and thigh muscle

ÚVOD

Racionálna výživa obyvateľstva sa v súčasnosti zameriava na vysoko stráviteľné živočíšne produkty. Z nich je za najvýznamnejší zdroj považované hydinné mäso, ktoré má vysokú nutričnú a biologickú hodnotu a jeho skladbu ovplyvňuje genotyp, výživa, vek, chovateľské prostredie a rôzne ďalšie extravitálne a intravitálne činitele (Jedlička, 1988; Karas, 1998; Holoubek, 2001; Haščík et al., 2005a).

Benková et al. (2005) označujú hydinné mäso ako vhodnú komoditu pre tvorbu tzv. funkčných potravín pre ľudskú výživu, čo je v súčasnosti v centre záujmu humánneho, poľnohospodárskeho ako aj potravinárskeho výskumu. Produkcia hydinného mäsa pre ľudskú populáciu predstavuje dôležitý systém dodávky vysoko kvalitných proteínov, ktoré sú najdôležitejšou zložkou hydinného mäsa s vysokým obsahom esenciálnych aminokyselín (Straková et al., 2003; Gueye, 2009). Bielkoviny kuracieho a morčacieho mäsa majú v porovnaní s bravčovým a hovädzím mäsom viac a v priaznivejšom pomere esenciálnych aminokyselín, najmä arginínu, leucínu, izoleucínu, metionínu a valínu, pričom hydinné mäso je aj zdrojom lipidov, ktoré sú rezervoárom energie, vitamínov rozpustných v tuku a dodávateľom esenciálnych mastných kyselín (Benková et al., 2005).

Ľudská populácia vytvára tlak na potrebu a tvorbu vysoko kvalitných univerzálnych potravín, ktoré sú zdrojom najmä bielkovín a preto sa v osttanom období neustále zvyšuje dopyt po hydinných výrobkoch (FAO, 2002). Pre tvorbu výrobkov z hydiny sú najpočetnejším chovaným živočíšnym druhom na svete brojlerové kurčatá (Perry et al., 2002; Moreki et al., 2010).

Mnoho autorov okrem selekcie a tvorby nových hybridných kombinácií kurčiat uskutočnilo experimenty aj za účelom návrhu zloženia nových kŕmnych zmesí a vytvorili rôzne modely pre dosiahnutie maximálnej úžitkovosti kurčiat (McDonald and Evans, 1977; Greig et al., 1977; Allison et al., 1978; Pesti et al., 1986; Gonzalez-Alcorta et al., 1994). Základom návrhu na tvorbu a zloženie používaných kŕmnych zmesí s ich správnym obsahom a pomerom živín a energie je dosiahnutie maximálnej úžitkovosti vyjadrenej prírastkom telesnej hmotnosti pri najekonomickejšom využití krmiva a dosiahnutom čo najvyššom zisku, pričom súbor požiadaviek na živiny a ich obmedzenia vytváraných špeciálne pre jednotlivé hybridné kombinácie kurčiat a kvalita ich jatočného tela sú ovplyvnené cenou surovín tvoriacich kŕmnu zmes a taktiež požiadavkami na nutričné zloženie mäsa kurčiat (Donaldson et al., 1957; Combs a Nicholson, 1964; Saleh et al., 2004; Cerrate a Waldrup, 2009).

Nové legislatívne obmedzenia a zákazy EÚ pri využití živočíšnych múčok, klasických antibiotických stimulátorov rastu a antimikrobiálnych látok v krmivárstve pre výživu polygastrických a monogastrických zvierat vedú tak vo vede ako aj praxi k alternatíve aplikovania nových biotechnologických možných doplnkov a produktov (Haščík et al., 2006, 2007; Bobko et al., 2009).

Vo výžive kurčiat sa už bežne používajú kompletné krmné zmesi, ktoré sú často obohacované v ostatnom období o prídavok rôznych doplnkov vrátane rastlinných silíc, probiotických, prebiotických a enzymatických preparátov (Berri, 2000; Lee et al., 2003, 2004; Angelovičová et al., 2006, 2008; Khojasteh a Shivazad, 2006; Haščík et al., 2006, 2007; Angelovičová a Angelovič, 2009).

Ako alternatívy sa využívajú aj včelie produkty (peľ, propolis, resp. ich extrakty), ktoré v konečnom dôsledku môžu mať tiež pozitívny vplyv na zdravotný stav, hospodárske využitie krmiva, nutričnú a senzorickú kvalitu produktu, ako aj ekonomiku výroby v hydinnárskom priemysle (Chrappa et al., 1991; Kováč et al., 1993; Výmola et al., 1995; Kimoto et al., 1999; Mojto a Zaujec 2001; Prytzky et al., 2003; Haščík et al. 2004; Wang et al., 2004; Haščík et al., 2005ab, 2007; Shalmany a Shivazad, 2006; Seven et al., 2008; a i.). Zloženie včelích produktov často závisí od ich času získavania a rastlinného zdroja (Greenaway et al., 1991; Markham et al., 1996).

Neoddeliteľnou súčasťou hodnotenia hydinnového mäsa je posudzovanie jeho senzorickej kvality, ktorá patrí medzi najstaršie, aj keď menej objektívne metódy (Jedlička, 1988). Naopak Guárdia et al. (2010) považujú senzorickú analýzu za vedeckú disciplínu, ktorá nám umožňuje stanovovať charakteristiky výrobu objektívne a reprodukovateľne prostredníctvom zmyslov človeka, ale variabilitu medzi posudzovateľmi a rozdiely medzi vzorkami môžu značne zvýšiť aspekty ako je nejednotnosť v teplote vzoriek počas degustácie alebo poradie pri hodnotení.

Jedlička (1988), Uhrín et al. (1993) a Haščík et al. (2004) charakterizujú zmyslové posúdenie kvality hydinnového mäsa ako subjektívne hodnotenie, pretože schopnosť vnímania predovšetkým chute a vône u ľudí je značne variabilná, ale chuť a čuch ako najdôležitejšie zmysly človeka zatiaľ nie je možné nahradiť žiadnou aparatívnu metódou. Ďalšie senzorické vlastnosti mäsa, ku ktorým patrí aj jemnosť (textúra, tuhosť, tvrdosť, mäkkosť) mäsa, resp. šľavnosť mäsa, je možné okrem senzorického posúdenia vyhodnotiť aj napríklad za pomoci penetrometra, konzistometra, resp. stanovením obsahu vody vo vzorke mäsa. Senzorické hodnotenie sa najčastejšie vykonáva po tepelnej úprave, pričom pre každú sledovanú vlastnosť, t.j. vôňu, chuť, šľavnosť a jemnosť sa používa 5-bodová stupnica, t.j. za komplexné posúdenie kvality mäsa je maximálny počet 20 bodov.

Sledované senzorické vlastnosti závisia podľa Augustina a Fischera (1999), Brestenského (2002), Mojta a Zaujeca (2003), Haščika et al. (2004) od druhu použitého krmiva, intramuskulárneho tuku, množstva extraktívnych látok, spôsobu prípravy, výživy, genetiky a ďalších intravitálnych a extravitálnych činiteľov. Steinhäuser et al. (1995) zároveň konštatujú, že senzorické posúdenie mäsa patrí do komplexu hodnôt, ktoré spolu so zdravotnou

neškodnosťou a cenou sú rozhodujúcimi kritériami pre jeho úspešnosť na trhu.

Civille a Szczesniack (1973) ako jednu z najdôležitejších častí metodického postupu senzorickej analýzy považujú výber kandidátov v závislosti od ich psychologických alebo fyziologických schopností. Odborník na senzorickú analýzu musí mať predovšetkým správne zmyslové schopnosti, má určenie zmyslovej citlivosti, vnímania a komunikáciu (Meilgaard et al., 1987).

Na základe vyššie uvedených skutočností bolo cieľom našej práce preveriť využitie bežne vyrábaných komerčných krmných zmesí s doplnkom propolisu na senzorické hodnotenie prsnej a stehennej časti jatočne opracovaného tela kurčiat Ross 308 po ich tepelnej úprave pečením.

MATERIÁL A METÓDY

Experiment bol realizovaný v testovacej stanici hydiny Katedry hydinnárstva a malých hospodárskych zvierat pri FAPZ SPU v Nitre na výkrmových kurčatách hybridnej kombinácie Ross 308. Do pokusu bolo zaradených 180 ks jednodňových kurčiat, z ktorých boli vytvorené 2 skupiny: kontrolná (K) a pokusná (P) po 90 ks kurčiat (45 ♂ a 45 ♀). Vlastný výkrm trval 40 dní. Kurčatá boli kŕmené systémom ad libitum rovnakou štartérovou kŕmnom zmesou HYD-01 (sypká štruktúra) do 21. dňa veku a od 22. dňa do 40. dňa rastovou kŕmnom zmesou HYD-02 (sypká štruktúra) v oboch sledovaných skupinách. Skrmované kŕmne zmesi HYD-01 a HYD-02 boli vyrobené bez antibiotických preparátov a kokcidostatík. Priemerná výživná hodnota podávaných kŕmnych zmesí počas experimentu bola rovnaká v oboch skupinách, ale v pokusnej skupine bol navyše do kŕmnych zmesí HYD-01 a HYD-02 pridávaný extrakt propolisu v dávke 0,2 g.kg⁻¹. Propolisový extrakt bol pripravený z rozomletého propolisu. Navážka propolisu bola 150 g a objem použitého 80 %-ného etanolu 500 cm³. Extrakcia prebiehala vo vodnom kúpeli pri 80 °C pod spätným chladičom po dobu 1 hodiny. Zmes bola po extrakcii a ochladení centrifugovaná. Získaný supernatant bol odparený na rotačnej vákuovej odparke pri teplote kúpeľa 40-50 °C a následne odvážený. Odparok v množstve 20 g bol rozpustený v 1000 cm³ 80 %-ného etanolu a aplikovaný do 100 kg kŕmnej zmesi.

Na konci experimentu (40. deň výkrmu) bolo z každej skupiny vybraných po 60 ks kurčiat na jatočný rozbor (30 ks sliepočiek a 30 ks kohútikov), ktorý sa uskutočnil na Katedre hodnotenia a spracovania živočíšnych produktov pri FBP SPU Nitra s následným zhodnotením senzorických (kulinárskych) vlastností prsnej a stehennej časti jatočného tela kurčiat po tepelnej úprave pri 200 °C počas doby 60 minút a dopečení v trvaní 10 až 15 minút. Senzorické posúdenie anonymných vzoriek bolo uskutočnené 6-člennou komisiou, kde pre vlastné vyhodnotenie sa použila metóda hodnotenia 5-bodovou stupnicou. Z hľadiska senzorickej analýzy sme sledovali vôňu, chuť, šľavnosť a jemnosť mäsa.

Výsledky experimentu (aritmetický priemer, smerodajná odchýlka, minimum, maximum, variačný koeficient) sme spracovali v štatistickom programe Statgraphics 5.0 a na určenie preukaznosti rozdielov medzi skupinami experimentu bol použitý F-test s následným t-testom.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Výsledky zmyslového posúdenia jednotlivých senzoričských vlastností cenných častí jatočného tela kurčiat (prsá a stehenná svalovina) po úprave pečením

(tabuľka 1-6), ako aj celkové senzoričské hodnotenie prsnej a stehennej svaloviny (tabuľka 7-8) bez a po aplikácii propolisového extraktu v kŕmnych zmesiach výkrmových kurčiat Ross 308 sú uvedené v tabuľke 1-8.

Tabuľka 1 Senzorické hodnotenie stehien (sliepky)

Ukazovateľ	Vôňa		Chuť		Šťavnatosť		Jemnosť	
	kontrola	pokus	kontrola	pokus	kontrola	pokus	kontrola	pokus
n	30	30	30	30	30	30	30	30
$\bar{x}$ (body)	4,25	4,375	4,293	4,25	4,378	4,375	4,503	4,583
s_x	0,0913	0,0913	0,1463	0,1581	0,001	0,0791	0,078	0,0697
min.	4,0	4,125	4,0	3,75	4,375	4,25	4,38	4,375
max.	4,5	4,625	4,75	4,5	4,38	4,625	4,78	4,75
v_k	5,26	5,11	8,35	9,11	0,06	4,42	4,24	3,73
t-test (P value)	0,356		0,845		0,967		0,462	

Poznámka: n – počet vzoriek, $\bar{x}$ – aritmetický priemer, s_x – stredná chyba aritmetického priemeru, min. – minimum, max. – maximum, v_k – variačný koeficient, t-test = $P \geq 0,05$ – štatisticky nepreukazná hodnota, $P \leq 0,05^+$ štatisticky preukazná hodnota, $P \leq 0,01^{++}$ štatisticky stredne preukazná hodnota, $P \leq 0,001^{+++}$ štatisticky vysoko preukazná hodnota

Tabuľka 2 Senzorické hodnotenie stehien (kohúty)

Ukazovateľ	Vôňa		Chuť		Šťavnatosť		Jemnosť	
	kontrola	pokus	kontrola	pokus	kontrola	pokus	kontrola	pokus
n	30	30	30	30	30	30	30	30
$\bar{x}$ (body)	4,002	4,292	4,17	4,417	4,377	4,208	4,5	4,542
s_x	0,0466	0,0264	0,0705	0,0527	0,078	0,0697	0,0913	0,095
min.	3,875	4,25	4,0	4,25	4,13	4,0	4,25	4,25
max.	4,13	4,375	4,38	4,5	4,5	4,375	4,75	4,75
v_k	2,85	1,50	4,14	2,92	4,36	4,06	4,97	5,12
t-test (P value)	0,0003		0,019		0,139		0,758	

Tabuľka 3 Senzorické hodnotenie prs (sliepky)

Ukazovateľ	Vôňa		Chuť		Šťavnatosť		Jemnosť	
	kontrola	pokus	kontrola	pokus	kontrola	pokus	kontrola	pokus
n	30	30	30	30	30	30	30	30
$\bar{x}$ (body)	4,167	4,417	4,167	4,25	3,792	3,958	4,045	4,417
s_x	0,0527	0,0264	0,0527	0	0,095	0,0697	0,1044	0,0264
min.	4,0	4,375	4,0	4,25	3,5	3,75	3,88	4,375
max.	4,25	4,5	4,25	4,25	4,0	4,125	4,375	4,5
v_k	3,10	1,46	3,10	0	6,14	4,31	6,32	1,46
t-test (P value)	0,002		0,999		0,188		0,006	

Tabuľka 4 Senzorické hodnotenie prs (kohúty)

Ukazovateľ	Vôňa		Chuť		Šťavnatosť		Jemnosť	
	kontrola	pokus	kontrola	pokus	kontrola	pokus	kontrola	pokus
n	30	30	30	30	30	30	30	30
$\bar{x}$ (body)	4,127	4,292	4,21	4,25	3,958	3,958	4,293	4,25
s_x	0,0457	0,0697	0,0253	0,0456	0,0697	0,095	0,0689	0,1208
min.	4,0	4,125	4,13	4,125	3,75	3,75	4,13	4,0
max.	4,25	4,5	4,25	4,375	4,125	4,25	4,5	4,625
v_k	2,71	3,98	1,47	2,63	4,31	5,88	3,93	6,96
t-test (P value)	0,076		0,461		1,00		0,762	

Tabuľka 5 Senzorické hodnotenie prs (bez ohľadu na pohlavie)

Ukazovateľ	Vôňa		Chuť		Šťavnatosť		Jemnosť	
	kontrola	pokus	kontrola	pokus	kontrola	pokus	kontrola	pokus
n	60	60	60	60	60	60	60	60
$\bar{x}$ (body)	4,147	4,354	4,188	4,25	3,875	3,958	4,169	4,333
s_x	0,0338	0,0402	0,0286	0,0218	0,0615	0,0562	0,0704	0,0641
min.	4,0	4,125	4,0	4,125	3,5	3,75	3,88	4,0
max.	4,25	4,5	4,25	4,375	4,125	4,25	4,5	4,625
	2,82	3,20	2,37	1,77	5,50	4,92	5,85	5,12
t-test (P value)	0,0007		0,100		1,328		0,099	

Tabuľka 6 Senzorické hodnotenie stehien (bez ohľadu na pohlavie)

Ukazovateľ	Vôňa		Chuť		Šťavnatosť		Jemnosť	
	kontrola	pokus	kontrola	pokus	kontrola	pokus	kontrola	pokus
n	60	60	60	60	60	60	60	60
$\bar{x}$ (body)	4,126	4,333	4,232	4,333	4,377	4,297	4,502	4,563
s_x	0,0615	0,047	0,0796	0,0833	0,0372	0,0562	0,0572	0,0565
min.	3,875	4,125	4,0	3,75	4,13	4,0	4,25	4,25
max.	4,5	4,625	4,75	4,5	4,5	4,625	4,75	4,75
v_k	5,17	3,76	6,52	6,66	2,94	4,53	4,41	4,29
t-test (P value)	0,014		0,387		0,216		0,458	

Tabuľka 7 Celkové hodnotenie najcennejších častí jatočne opracovaného tela (sliepky)

Ukazovateľ	Stehná		Prsia	
	kontrola	pokus	kontrola	Pokus
n	30	30	30	30
$\bar{x}$ (body)	17,333	17,583	16,125	17,042
s_x	0,2157	0,3206	0,2415	0,0697
min.	16,875	16,75	15,375	16,875
max.	18,0	18,5	16,625	17,25
v_k	3,05	4,47	3,67	1,00
t-test (P value)	0,532		0,004	

Tabuľka 8 Celkové hodnotenie najcennejších častí jatočne opracovaného tela (kohúty)

Ukazovateľ	Stehná		Prsia	
	kontrola	pokus	kontrola	Pokus
n	30	30	30	30
$\bar{x}$ (body)	17,0417	17,458	16,583	16,833
s_x	0,2342	0,2342	0,2058	0,2157
min.	16,5	16,75	16,0	16,375
max.	17,75	18,0	17,125	17,5
v_k	3,37	3,29	3,04	3,14
t-test (P value)	0,237		0,421	

Organoleptickým hodnotením stehennej svaloviny sliepok medzi kontrolnou a pokusnou skupinou neboli zistené štatisticky významné rozdiely ($P \geq 0,05$), ale u kohútov boli významné rozdiely ($P \leq 0,001$; $P \leq 0,05$) v prospech pokusnej skupiny v hodnotení vône (+0,290 bodu) a chuti (+0,300 bodu).

V prsnej svalovine u sliepok boli dosiahnuté vyššie hodnoty u všetkých sledovaných zmyslových vlastností v pokusnej skupine oproti kontrole, ale významné rozdiely ($P \leq 0,01$) boli zistené len v hodnotení vône (+0,250 bodu) a jemnosti (+0,372 bodu). Kohúty v hodnotení prsnej svaloviny nedosiahli medzi kontrolnou a pokusnou

skupinou významné štatistické rozdiely ($P \geq 0,05$) podobne ako sliepky pri hodnotení stehennej svaloviny.

Hodnotením senzoričských vlastností bez rozdielu pohlavia u kurčiat Ross 308 boli významné rozdiely ($P \leq 0,001$) dosiahnuté v prsnej svalovine v hodnotení vône v pokusnej skupine (+0,207 bodu) a podobne v stehennej svalovine ($P \leq 0,05$) pri hodnotení vône v prospech pokusnej skupiny (+0,207 bodu) oproti kontrole.

Celkovým senzoričským zhodnotením stehennej a prsnej svaloviny podľa pohlavia sme zaznamenali vyššie hodnoty v pokusnej skupine kŕmenej doplnkom extraktu propolisu oproti kontrole, ale preukazné rozdiely ($P \leq 0,01$) boli zistené len v prsnej svalovine sliepok, ktorá dosiahla v pokusnej skupine o 0,917 bodu vyššiu hodnotu ako kontrola.

Dosiahnuté pozitívne výsledky senzoričského hodnotenia najcennejších častí JOT kurčiat Ross 308 v preverovanom experimente s aplikáciou propolisového extraktu v kŕmnych zmesiach sú v súlade s hodnotami a tendenciami, ktoré vo svojich pokusoch zistili pri aplikácii iných kŕmnych aditív vo forme rôznych probiotických preparátov vo výžive kurčiat **Mudřík et al. (1990)**, **Haščík et al. (2004, 2007)** a **Mihok et al. (2010)**. Pozitívne ovplyvnenie senzoričských ako aj technologických vlastností mäsa vplyvom probiotických preparátov, ale aj rastlinných silíc a iných prirodzených aditív vo výžive kurčiat deklarujú aj **Urminská a Michalík (1991)**, **Brož (1991)**, **Haščík et al. (2004, 2007)**, resp. **Bobko et al. (2006, 2009)**.

Zlepšené organoleptické (zmyslové) vlastnosti mäsa kurčiat potvrdili vo svojich štúdiách pri aplikácii tuku a olejnatých semien aj **Poltowicz (2000)**, **Osek et al. (2001)**, **Barteczko et al. (2003)**, **Marcinčák et al. (2009)** a pri aplikácii cesnaku aj **Kim et al. (2009)**. Autori zároveň konštatujú, že požadovanú a správnu technologickú, nutričnú a taktiež senzoričskú kvalitu mäsa kurčiat je možné dosiahnuť len preverenými a otestovanými kŕmnymi doplnkami, čo potvrdzujú aj výsledky **Bobka et al. (2006, 2009)**, ktorí upozorňujú, že nie všetky aditívne látky, resp. možné doplnky a ich množstvo aplikované vo výžive kurčiat má priaznivý vplyv na senzoričské vlastnosti mäsa, pretože zistili pri aplikácii rôznych rastlinných silíc vo väčšom množstve vo výžive kurčiat aj opačnú tendenciu, t.j. mierne zhoršenú senzoričskú kvalitu mäsa.

ZÁVER

V experimente bol preverovaný vplyv extraktu propolisu aplikovaného v kŕmnych zmesiach kurčiat Ross 308 v dávke 0,2 g.kg⁻¹ KKZ na senzoričské hodnotenie prsnej a stehennej svaloviny po tepelnej úprave pečením. Na základe dosiahnutých výsledkov podľa pohlavia boli dosiahnuté štatisticky významné rozdiely ($P \leq 0,05$ až 0,001) v hodnotení vône a chuti u kohútov v stehennej svalovine a u sliepok ($P \leq 0,01$) vo vône a jemnosti v prsnej svalovine. Senzoričským posudzovaním jednotlivých znakov bez rozdielu pohlavia boli významné rozdiely ($P \leq 0,05$ až 0,001) v prospech pokusnej skupiny dosiahnuté len v hodnotení vône tak v prsnej ako aj stehennej svalovine. Celkovým zhodnotením najcennejších častí jatočného tela kurčiat Ross 308 sme zistili pozitívny vplyv extraktu propolisu na ich senzoričské vlastnosti, ale preukazné rozdiely ($P \leq 0,01$) boli zaznamenané len u

sliepok v prsnej svalovine. Výsledky experimentu potvrdili, že propolisový extrakt v dávke 0,2 g.kg⁻¹ KKZ môžeme aplikovať vo výžive bojlerových kurčiat, nakoľko pozitívne ovplyvňuje senzoričskú kvalitu mäsa kurčiat, ktorá je jedným z najdôležitejších článkov pre využitie kuracieho mäsa v potravinovom reťazci človeka.

Acknowledgments:

This work was supported by grant VEGA No. 1/0360/09.

LITERATÚRA

- ALLISON, J. R., ELY, L. O., AMATO, S. V. 1978. Broiler profit maximizing models. In *Poult. Sci.*, vol. 57, 1978, p. 845-853.
- ANGELOVIČOVÁ, M., MELLEN, M., ANGELOVIČ, M. 2006. Uplatnenie biotechnologického postupu náhrady kŕmneho antibiotika premixom škoricovej silice vo výžive výkrmových kurčiat. In *Biotechnológia*, JU: České Budějovice, 2006, p. 134-136, ISBN 8085-645-53-X.
- ANGELOVIČOVÁ, M., LADYKOVÁ, M., LIPTAIOVÁ, D., MOČAR, K., ŠTOFAN, D. 2008. Riešenie náhrady kŕmnych antibiotík rastlinnými silicami pri výrobe kuracieho mäsa. In *Otvorené fórum o stave bezpečnosti, kvality a kontroly potravín*, Bratislava, 2008, p. 41-45.
- ANGELOVIČOVÁ, M., ANGELOVIČ, M. 2009. Zhodnotenie efektivity výkrmu kurčiat vo vzťahu k ich produkcii. In *Bezpečnosť a kontrola potravín*, SPU Nitra, 2009, p. 199-203, ISBN 978-80-552-0193-1.
- AUGUSTIN, CH., FISCHER, K. 1999. Fleischreifung und sensorische Qualität. In *Fleischwirtschaft*, vol. 79, 1999, no. 12, p. 96-98.
- BARTECZKO, J., BOROWIEC, F., WĘGLARZ, A. 2003. Chemical composition and sensory traits of meat of broiler chickens fed probiotic supplemented diets. In *Ann. Anim. Sci.*, vol. 2, 2003, p. 169-173.
- 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*, no. 49, SAPV, Nitra, 2005, p. 31-32, ISBN 80-89162-18-5.
- BERRI, C., BESNARD, J., RELANDEAU, C. 2008. Increasing dietary lysine increases final pH and decreases driploss of broiler breast meat. In *Poult. Sci.*, vol. 87, 2008, no. 3, p. 480-484.
- BOBKO, M., LAGIN, L., KROČKO, M. 2006. Zmeny senzoričských vlastností hydínového mäsa po nahradení antibiotík rastlinnými silicami. In *Zborník z mezinárodnej konferencie: „Družbež a mléko ve výživě člověka“*, ČZU Praha, 2006, p. 88-91, ISBN 80-213-1548-2.
- BOBKO, M., LAGIN, L., ANGELOVIČOVÁ, M., BOBKOVÁ, A., HAŠČÍK, P. 2009. Vplyv prídavku fytoaditív na kvalitu kuracieho mäsa. In *Potravinárstvo*, vol. 3, 2009, no. 2, p. 3-7.
- BOBKO, M., LAGIN, L., BOBKOVÁ, A., ANGELOVIČOVÁ, M., HAŠČÍK, P. 2009. Analýza vplyvu rozdielného prídavku škoricovej silice na kvalitu mäsa kurčiat. In *Acta fytotechnica et zootechnica*, mimoriadne číslo, Nitra, SPU, 2009, p. 47-51.
- BRESTENSKÝ, V. 2002. *Sprievodca chovateľu hospodárskych zvierat*. VUŽV : Nitra, 2002, p. 231, ISBN 80-88872-18-9.
- BROŽ, J. 1991. Použití nové generace enzymů ve výživě drůbeže. In *Zborník referátov Výroba a využitie krmív*,

krmných zmesí a krmných aditív v podmienkach trhovej ekonomiky, VÚK, Ivánka pri Dunaji, 1991, p. 39-43.

CERRATE, S., WALDROUP, P. 2009. Maximum Profit Feed Formulation of Broilers: 1. Development of a Feeding Program Model to Predict Profitability Using non Linear Programming1. In *Int. J. Poult. Sci.*, vol. 8, 2009, no. 3, p. 205-21.

CIVILLE, G. V., SZCZESNIACK, A. S. 1973. Guidelines to trainig a texture profile panel. In *Texture Stud.*, vol. 4, 1973, p. 204-223.

COMBS, G. F., NICHOLSON, J. L. 1964. Testing energy, amino acid and protein level specifications for linear programming of broiler rations. *Feedstuffs*, vol. 36, 1964, p. 17-19.

CHRAPPA, V., STRAŇICKÁ, H., ÁBELOVÁ, G., SABO, V. 1991. Účinnok skrmovania repkového semena „OO“ na úžitkovosť brojlerových kurčiat. In *Živočišna výroba*, vol. 36, 1991, no. 5, p. 437-488.

DONALDSON, W. E., COMBS, G. F., ROMOSER, G. L., SUPPLEE, W. C. 1957. Studies on energy levels in poultry rations. 2. Tolerance of growing chicks to dietary fat. In *Poult. Sci.*, vol. 36, 1957, p. 807-815.

FAO, 2002. World agriculture towards 2015/2030. Rome, Italy. Guèye, E. F. 2009. The role of networks in information dissemination to family poultry farmers. In *World's Poult. Sci. J.*, vol. 65, 2002, p. 115-123.

GONZALEZ ALCORTA, M. J., DORFMAN, J. H., PESTI, G. M. 1994. Maximizing profit in broilers production as prices change: A simple approximation with practical value. In *Agribusiness*, vol. 10, 1994, p. 389-399.

GREENAWAY, W., MAY, J., SCAYSBROOK, T., WHATLEY, F. R. 1991. Identification by gas chromatography-mass spectrometry of 150 compounds in propolis. In *Zeitschrift fur Naturforschung*, vol. 42, 1991, p. 111-121.

GREIG, I. D., HARDAKER, J. B., FARRELL, D. J., CUMMING, R. B. 1977. Towards the determination of the optimal systems of broiler production. In *Agric. Systems*, vol. 2, 1977, p. 47-65.

GUÁRDIA, M. D., SÁRRAGA, C., GUERRERO, L. 2010. *Handbook of Poultry Science and Technology*, Volume 2, Part IV. Product Quality and sensory attributes, published by John Wiley & Sons. Inc. Hoboken, New Jersey, vol. 2, 2010, p. 293-310.

GUÈYE, E. F. 2009. The role of networks in information dissemination to family poultry farmers. In *World's Poult. Sci. J.*, vol. 65, 2009, p. 115-123.

HAŠČÍK, P., ČUBOŇ, J., VAGAČ, V. 2004. Hodnotenie senzorickej kvality hydinového mäsa vplyvom probiotického preparátu IMB 52. In *Maso*, vol. 15, 2004, no. 1, p. 62-65.

HAŠČÍK, P., ČUBOŇ, J., HORŇIAKOVÁ, E., KRIVÁNEK, L., KULÍŠEK, V. 2005a. Vzťah medzi aplikáciou probiotického preparátu a množstvom abdominálneho tuku u výkrmových kurčiat. In *Agriculture (Poľnohospodárstvo)*, vol. 51, 2005, no. 11, p. 574-579.

HAŠČÍK, P., WEIS, J., ČUBOŇ, J., KULÍŠEK, V., MAKOVICKÝ, P., KAČÁNIOVÁ, M. 2005b. Vplyv probiotického preparátu v KKZ brojlerových kurčiat Ross 308 na chemické zloženie mäsa. In *Acta fytotechnica et zootechnica*, Nitra, vol. 8, 2005, no. 1, p. 20-24.

HAŠČÍK, P., ČUBOŇ, J., KAČÁNIOVÁ, M., KULÍŠEK, V. 2006. Vplyv probiotického preparátu na zloženie mäsa kurčiat. In *Maso*, vol. 17, 2006, no. 5, p. 13-15.

HAŠČÍK, P., BOBKÓ, M., KAČÁNIOVÁ, M., ČUBOŇ, J., KULÍŠEK, V., PAVLIČOVÁ, S. 2007. Effect of probiotic on production of fta in body of chickens. In *Slovak*

Agriculturasl university in Nitra, Abstracts of the international conference of the VII. Slovak conference of animal physiology, 2007, p. 15., ISBN 978-80-8069-885-0.

HOLOUBEK, J. 2001. Důvody trvalého rozširování drůbeže. In *Náš chov*, vol. 61, 2001, no. 11, p. 41-42.

JEDLIČKA, J. 1988. Kvalita mäsa. *Príroda* : Bratislava, 1988, p. 107-125.

KARAS, I. 1998. Technológie krmenia hydiny chovanej v rôznych systémoch. In *Roľnícke noviny* (príloha), vol. 205, 1998, no. 4.

KARLIK, G., PETRIČEVIĆ, A., IVETIĆ, D., VUKADINAWIĆ, B. 1997. Meat quality of chicken by dietary FAT. *Poultry Meat Quality. Proc. XIII Europ. Symp. Quality Poultry Meat, Poznań*, 1997, p. 216-222.

KHOJASTEH SHALMANY, S., SHIVAZAD, M. 2006. The effect of diet propolis supplementation on Ross broiler chicks performance. In *Int. J. Poult. Sci.*, vol. 5, 2006, no. 1, p. 84-88.

KIM, Y. J., JIN, S. K., YANG, H. S. 2009. Effect of dietary garlic bulb and husk on the physicochemical properties of chicken meat. In *Poult. Sci.*, vol. 88, 2009, p. 398-405.

KIMOTO, N., HIROSE MASAO, H., KAWABE, M., SATOH, T., HIDEKI, M., SHIRA, T. 1999. Post-initiation effects of a super critical extract of propolis in a rat two-stage carcinogenesis model in female F344 rats. In *Cancer Lett.*, vol. 147, 1999, p. 221-227.

KOVÁČ, M., HAŠČÍK, P., LAGIN, L. 1993. Náhrada sójového extrahovaného šrotu repkovými výliskami vo výkrme kurčiat. In *Výživná hodnota krmív a ich vplyv na kvalitu živočišných produktov*, VŠP, Nitra, 1993, p. 55-63.

LEE, K. W., EVERTS, H., KAPPERT, H. J., FREHNER, M., LOSA, R., BEYNEN A. C. 2003. Effects of dietary essential oil components on growth performance, digestive enzymes and lipid metabolism in female broiler chickens. In *Br. Poult. Sci.*, vol. 44, 2003, p. 450-457.

LEE, K. W., EVERTS, H., BEYNEN A. C. 2004. Essential oils in broiler nutrition. In *Int. J. Poult. Sci.*, vol. 3, 2004, p. 738-752.

MARCINČÁK, S., SOKOL, J., MESARČOVÁ, L., POPELKA, P., JANOŠOVÁ, J. 2009. Vplyv skrmovania ľanového semena a klinčeka na kvalitu mäsa brojlerových kurčiat. In *HYGIENA ALIMENTORUM XXX*, Štrbské Pleso - Vysoké Tatry, UVL Košice, vol. 30, 2009, p. 193-194.

MARKHAM, K. E., MITCHEL, K. A., WILKINS, A. L., DALDY, J. A., LU, Y. 1996. HPLC and GC-MS identification of the major organic constituents in New Zealand propolis. In *Phytochemistry*, vol. 42, 1996, p. 205-211.

MCDONALD, M. W., M. EVANS, 1977. A simulation study of the effects of dietary metabolizable energy on the economics of broiler production. In *Poult. Sci.*, vol. 56, 1977, p. 997-1003.

MEILGAARD, M., CIVILLE, G.V., CARR, B. T. 1987. *Sensory Evaluation Techniques*, vol. 1 and 2, Boca Raton, FL: CRC Press.

MIHOK, M., HAŠČÍK, P., ČUBOŇ, J., KAČÁNIOVÁ, M., BOBKÓ, M., HLEBA, L., PRÍVARA, Š., VAVRIŠINOVÁ, K., ARPÁŠOVÁ, H. 2010. Aplikácia probiotického preparátu vo výžive kurčiat Hybro na senzoricke vlastnosti mäsa. In *Potravinarstvo*, vol. 4, special issue, 2010, p. 466-473.

MOJTO, J., ZAUJEC, K. 2001. Aktuálne údaje o chemickom zložení a nutričnej hodnote mäsa hospodárskych a divých zvierat. In *Maso*, vol. 13, 2001, no. 4, p. 39-41.

MOJTO, J., ZAUJEC, K. 2003. Analýza krehkosti (strižnej sily) hovädzieho mäsa v jatočnej populácii. In *Maso*, vol. 15, 2003, no. 1, p. 25-27.

- MOREKI, J. C., DIKEME, R., POROGA, B. 2010. The role of village poultry in food security and HIV/AIDS mitigation in Chobe District of Botswana. *Livest. Res. Rural Dev.*, 22, Article 5, Retrieved from the web <<http://www.lrrd.org/lrrd22/3/more22055.htm>>.
- MUDŘÍK, Z., ELNUR, I. M., KOUDELA, K., PODSEDNÍČEK, M. 1990. Zlepšení organoleptických vlastností masa brojlerů při experimentálním skrmování probiotika Lactiferm. In *Zborník z konference „Probiotika ve výživě“*. Brno, 1990, p. 175-180.
- OSEK, M., JANOSHA, A., KLOCEK, B., WASIŁOWSKI, Z. 2001. Wpływ mieszanek zawierających różne tłuszcze na wskaźniki produkcyjne i jakość mięsa kurcząt rzexnych. In *Rośliny Oleiste*, vol. 1, 2001, p. 153-163.
- PERRY, B. D., RANDOLF, T. F., MCDERMOTT, J. J., THORNTON, P. K. P. K. 2002. *Investing in animal health research to alleviate poverty*. ILRI : Nairobi, Kenya, 2002, 148 p..
- PESTI, G. M., ARRAES, R. A., MILLER, B. R. 1986. Use of the quadratic growth response to dietary protein and energy concentrations in least-cost feed formulation. In *Poult. Sci.*, vol. 64, 1986, p. 1040-1051.
- POŁTOWICZ, K. 2000 Wpływ początkowego poziomu pH mięśni piersiowych na wybrane wskaźniki jakości mięsa kurcząt brojlerów należących do trzech genotypów. In *Rocz. Nauk. Zoot.*, vol. 8, 2000, p. 161-165.
- PRYTZYK, E., DANTAS, A. P., SALOMAO, K., PEREIRA, A. S., BANKOVA, V. S. DE CASTRO, S. L., AQUINO NETO, F. R. 2003. Flavonoids and trypanocidal activity of bulgarian propolis. In *J. Ethnopharmacol*, vol. 88, 2003, p. 189-193.
- SALEH, E. A., WATKINS, S. E., WALDROUP, A. L., WALDROUP, P. W. 2004. Effects of dietary nutrient density on performance and carcass quality of male broilers grown for further crossing. In *J. Poult. Sci.*, vol. 3, 2004, p. 1-10.
- SEVEN, T. P., SEVEN, I., YILMAZ, M., SIMSEK, G. Ü. 2008. The effect of Turkish propolis on growth and carcass characteristics in broilers under heat stress. In *Anim. Feed Sci. and Techn.*, vol. 146, 2008, p. 137-148.
- SHALMANY, S. K., SHIVAZAD, M. 2006. The effect of diet propolis supplementation on ross broiler chicks performance. In *J. Poult. Sci.* vol. 5, 2006, p. 84-88.
- STEINHAUSER, L., BENEŠ, J., BUDIG, J., GOLA, J., HOFMAN, I., INGR, I., KAMENIK, J. 1995. Hygiena a technologie masa. In *Last Brno*, 1st ed., 1995, p. 664, ISBN 80-9000260-4-4.
- 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*, Praha, 2003, p. 83-87, ISBN 80-213-1037-5.
- UHRÍN, V., HORVÁTHOVÁ, V., HORNIAKOVÁ, E., CHMELNÍČNÁ, L., BULLA, J. 1993. Kvalita hydinového masa. In *Acta zootechnica*, vol. XLIX, 1993, VŠP, Nitra, p. 111, ISBN 80-7137-124-6.
- URMINSKÁ, D., MICHALÍK, I. 1991. Enzymatická a inhibičná charakteristika bielkovín zrna obilnín. In *Biotechnologické postupy intenzifikácie rastlinnej výroby*, VŠP, Nitra, 1991, 88-94 s.
- VÝMOLA, J., KODEŠ, A., OBADÁLEK, J. 1995. Repkové výlisky vo výkrme brojlerových kurčiat. In *Živočišna výroba*, vol. 40, 1995, no. 9, p. 407-409.
- WANG, B. J., LIEN, Y. H., YU, Z. R. 2004. Supercritical fluid extractive fractionation–study of the antioxidant activities of propolis. In *Food Chem.* vol. 86, 2004, p. 237-243.

Contact address:

doc. Ing. Peter Haščík, PhD., Department of Evaluation and Processing of Animal Products, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Slovak University of Agriculture in Nitra, Trieda A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, E-mail: peter.hascik@uniag.sk

Ing. Jozef Garlík, Department of Evaluation and Processing of Animal Products, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Slovak University of Agriculture in Nitra, Trieda A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, E-mail: jozef.garlik@gmail.com

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

prof. Ing. Juraj Čuboň, CSc., Department of Evaluation and Processing of Animal Products, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Slovak University of Agriculture in Nitra, Trieda A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, E-mail: juraj.cubon@uniag.sk

Ing. Mgr. Martin Mellen, PhD., Agrokonzult s.r.o., Branovo, 941 31, email: martin.mellen@gmail.com

Ing. Michal Mihok, Department of Evaluation and Processing of Animal Products, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Slovak University of Agriculture in Nitra, Trieda A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, E-mail: mihok.michal@gmail.com

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

CHARACTERIZATION OF LACTOCOCCUS STRAINS AND THEIR USING IN DAIRY TECHNOLOGY

Zuzana Hladíková, Jana Smetanková, Gabriel Greif, Mária Greifová

ABSTRACT

Lactococcus lactis species is one of the most important groups of lactic acid bacteria that are used in the dairy industry. *Lactococci* are generally found on plants and the skins of animals. Special interest is placed on the study of *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* and *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*, as they are the strains used as starter cultures in industrial dairy fermentation. The major functions of this species in dairy fermentation are the production of lactic acid, formation of flavour and aroma compounds, development of ripened cheese texture and antimicrobial activity against spoilage bacteria and moulds.

Keywords: *Lactococcus lactis*, starter cultures, antimicrobial activity, technological properties

ÚVOD

Konzumácia potravín, ktoré vznikli činnosťou mikroorganizmov, sprevádza človeka už niekoľko tisícročí. Metódou pokusu a omylu sa ľudia snažili zabrániť nežiaducemu kazeniu potravín živočíšneho a rastlinného pôvodu. Na základe prirodzenej selekcie bol tak v priebehu storočí podporovaný rozvoj pozitívne pôsobiacich mikroorganizmov na úkor tých, ktoré spôsobovali kazenie.

V prípade mlieka človek neuviedol využívať účinky mikroorganizmov, ktoré sa do neho dostali prirodzenou cestou z prostredia, spôsobovali samovoľné skysnutie mlieka alebo smotany, prípadne ďalšie pochody ako je rozklad bielkovín a tukov pri výrobe syra.

Od konca 19. storočia je problematika kyslomliečnych baktérií riešená intenzívne a nepretržite v celej šírke, pričom zahŕňa izoláciu nových kmeňov, poznanie ich vlastností, výber kmeňov a ich vhodné kombinácie, výrobu rôznych foriem kyslíkových kultúr a ich aplikáciu v klaskej mliekarenskej technológii aj konzervácii najrôznejších potravinárskych výrobkov.

Jednou z najdôležitejších skupín mikroorganizmov s technologickým významom sú mikroorganizmy rodu *Lactococcus*. Baktérie patriace do tohto rodu sa nachádzajú v surovom kravskom mlieku, surovom ovčom mlieku, ale aj v iných potravinárskych komoditách a už dlho sa využívajú ako štartovacie kultúry v malovýrobe i vo veľkopriemyselnom spracovaní.

Konzervačný efekt rodu *Lactococcus* je spôsobený hlavne redukciou pH prostredia pomocou vyprodukovaných kyselín ako je kyselina mliečna, kyselina octová, kyselina jantárová, kyselina fenylmliečna, kyselina propiónová a i. a tiež tvorbou ďalších antimikrobiálnych látok vrátane bakteriocínov bielkovinovej povahy. Produkty ich metabolizmu majú uplatnenie nielen v biokonzervácii, ale prispievajú tiež k dosiahnutiu požadovaných organoleptických vlastností produktov tvorbou chuťových látok a enzýmov.

ROD LACTOCOCCUS

Pri štúdiu staršej mliekarenskej literatúry nachádzame v mliečnej skupine streptokokov pomenovania: *Streptococcus lactis*, *Streptococcus lactis* ssp. *diacetylactis*, *Streptococcus cremoris*, *Streptococcus lactis* ssp. *holandicus*, *Streptococcus lactis* var. *maltigenes*, *Streptococcus citrovorus*, *Streptococcus paracitrovorus* a pod..

Dôvody zhrnutia niektorých druhov mliečnej skupiny streptokokov (rod *Lactococcus*) do jedného druhu *Lactococcus lactis* boli nasledovné: *Lactococcus lactis* ssp. *diacetylactis* (arómový streptokok) má všetky hlavné vlastnosti totožné so species *Lactococcus lactis*, ale má navyše významnú vlastnosť fermentovať citran na arómotvornú látku diacetyl a na CO₂. Táto vlastnosť je podľa novších údajov regulovaná plazmidom, preto nie je trvalá. Napriek novej systematike sa taxon *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* biovar *diacetylactis* používa naďalej pre jeho výnimočné vlastnosti v mliekarenskej mikrobiológii (Görner a Valík, 2004).

Najväčšou mierou je v surovom mlieku, syroch a iných mliečnych produktoch zastúpený *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* a *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*, no izolovaný bol tiež aj *Lactococcus garviae* (Casalta et al., 2008; Corroler, Desmasures a Guegen, 1999).

Lactococcus lactis ssp. *lactis* sa veľmi dobre rozmnožuje v čerstvom, za hygienických podmienok nadojenom mlieku, až spôsobí skysnutie. Je neodmysliteľnou súčasťou používaných „čistých“ mliekarských kultúr na výrobu niektorých kyslých mliek, kyslých smotán a na výrobu všetkých druhov syrov ako jediná kultúra alebo spolu s inou špecifickou kultúrou mikroorganizmov. Bunky majú vajcovitý tvar priemeru 0,5 až 1,0 µm, sú väčšinou v pároch alebo v krátkych reťazkách. Rastie v rozmedzí teplôt 10 až 40 °C a jeho optimálna rastová teplota je asi pri 30 °C. Optimálna teplota pre rôzne kmene *Lactococcus lactis* je 27-33 °C, optimálna tvorba kyseliny mliečnej je pri 30 °C (Görner a Valík, 2004; Adamberg et al., 2003;

Lee, Collins 1976). Charakteristické je, že nefermentuje sacharózu alebo iba v nepatrnnej miere. V mlieku tvorí 0,8 až 0,9 % kyseliny mliečnej. Menej ako 10 % metabolitov (počítané na celkové metabolity) sú prchavé kyseliny, najmä kyselina octová. Tvorbou kyseliny mliečnej pri 20 °C až 30 °C mlieko zráža do druhého dňa. Kyselinu citrónovú neštiepi, netvorí acetoín a diacetyl ani CO₂ (existujú však arómové biovary ako napríklad *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* biovar *diacetylactis*). *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* štiepi peptón za tvorby amoniaku, kazeín v neutrálnom prostredí štiepi iba nepatrne. V médiu neznáša 6,5 % NaCl, ale pri 4 % NaCl rastie dobre (Görner a Valík, 2004).

Odolnosť kyslomliečnych baktérií voči zvýšenej koncentrácii NaCl je veľmi dôležitá z hľadiska výroby mnohých syrov. U rozličných kmeňov je však rôzna. Khedid et al. (2009) testovali kyslomliečne baktérie izolované z mlieka ťavy dvojhrbej z Morocca. *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* bol najviac zastúpeným vyizolovaným kmeňom. V ich štúdiu sa uvádza, že *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* a *Lactococcus lactis* biovar *diacetylactis* dobre tolerovali 4 % – 6,5 % - ný obsah NaCl. *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* toleroval menej ako 2 % - ný obsah NaCl.

Lactococcus lactis ssp. *cremoris* má niektoré charakteristické vlastnosti, ktorými sa líši od *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*: má nižšiu optimálnu teplotu (udáva sa 28 °C), tvorí merateľné množstvo CO₂, laktózu fermentuje pomalšie, morfológicky sa vyznačuje spravidla väčšími bunkami – 0,6 až 1,0 µm, ktoré ostávajú pri sebe v smere ich delenia, preto vznikajú dlhé retiazky zložené často z 20 i viac buniek. Tvorba dlhých retiazok je ale charakteristická len pre čerstvé kultúry pestované v mlieku. U starších kultúr sa retiazky rozpadávajú na páry. Niektoré kmene tvoria sliz. V mlieku tvorí asi 0,7 % kyseliny mliečnej. Ako homofermentatívna baktéria mliečneho kysnutia tvorí málo vedľajších metabolitov, pričom tvorba CO₂ je premenlivá. Vytvára aj málo acetoínu a diacetyl. Rastie ešte v médiu s obsahom 2 % NaCl, ale nie pri 4 % NaCl. Je preto typickým smotanovým alebo mliečnym streptokokom, nie však univerzálnym syránskym mikroorganizmom (v syroch sú zväčša vyššie koncentrácie NaCl). Aj podľa novších taxonomických štúdií sa ukazuje, že *Lactococcus cremoris* je príbuzný druhu *Lactococcus lactis*, a preto sa novšie uvádza ako *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* (Görner a Valík, 2004).

Viacero autorov skúmalo vplyv teploty a pH na rast *Lactococcus lactis*. Maximálna špecifická miera rastu *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* bola pozorovaná pri pH hodnote prostredia v rozmedzí od 6,3 do 6,9 (Bibal et al., 1988).

Lactococcus lactis ssp. *lactis* a *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* dosahujú vysoké hodnoty (>10⁸ KTJ/g) tak ako v prvý deň výroby, tak vysoký počet KTJ sa udržiava aj počas zrezej periódy mnohých syrov zo surového mlieka (Corroler, Desmaures a Guegen, 1999).

Poľskí autori Matuszewski, Pijanowski a Supieska navrhli v roku 1936, aby kmene *Streptococcus lactis*, ktoré majú schopnosť fermentovať citran (za prítomnosti fermentovateľného sacharidu) za tvorby acetoínu, CO₂ a arómovej látky diacetyl, dostali vlastné pomenovanie.

V Bergeyovej systematike (r. 1984) bol tento návrh akceptovaný (Görner a Valík, 2004).

Lactococcus lactis ssp. *lactis* biovar *diacetylactis* (bývalý *Streptococcus lactis* ssp. *diacetylactis*) má podobné charakteristiky ako *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*, s výnimkou tvorby väčšieho množstva prchavých látok regulovanej plazmidom. Od *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* sa líši dvomi znakmi: za prítomnosti fruktózy vytvára hlavne CO₂ a kyselinu octovú a štiepi kyselinu citrónovú, pričom v značnej miere tvorí acetoín. Tvorba diacetyl za tmy neprebíha alebo iba nepatrne. V takejto kultúre je možné preto ľahko dokazovať prítomnosť acetoínu. Diacetyl sa potom z acetoínu tvorí oxidáciou vzdušným kyslíkom. *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* biovar *diacetylactis* býva v mezofilných čistých mliekarských kultúrach, v ktorých sa požaduje tvorba arómy (diacetyl) a tvorba CO₂ nie je chybou (Görner a Valík, 2004).

Cachon a Diviés (1994) skúmali rast *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* biovar *diacetylactis* pri rozličných hodnotách pH. Zistili, že pre rast a produkciu kyseliny mliečnej *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* biovar *diacetylactis* bola optimálna hodnota pH 6,5.

Lactococcus raffinolactis v mliekarskej mikrobiológii nie je bežný. Má sérologickú skupinu N. Z fermentačného hľadiska sa od *Lactococcus lactis* líši najmä fermentáciou sacharózy, jeho pôvodným stanovišťom sú prirodzene skysnuté mlieka (Görner a Valík, 2004).

Status *Lactococcus lactis* „všeobecne považovaný za bezpečný“ (GRAS) ho robí atraktívnym pre produkciu proteínov pre potravinársky priemysel alebo terapeutické účely. Okrem toho kmene *Lactococcus lactis* produkujúce heterológne proteíny ako antigény sú študované pre použitie ako živé mukózne vakcíny (Sirén et al., 2009; Beresford et al., 2001; Salminen et al., 1998).

LACTOCOCCUS LACTIS AKO PROBIOTICKÁ KULTÚRA

Prínos probiotík je oceňovaný a skúmaný už po celé storočia. Hoci pojem funkčnej potraviny bol zavedený v dávnej minulosti Hippokratom a jeho mottom „Dovoľte potravínám byť vašimi liekmi“, ale až nedávno súbor dôkazov začal podporovať hypotézu, že strava môže hrať významnú úlohu v modulácii dôležitých fyziologických funkcií tela (Vasiljevic, Shah, 2008).

Probiotiká sú definované ako živé organizmy, ktoré ak sú konzumované v dostatočnom množstve, sú prospešné pre zdravie hostiteľa (Vouloumanou et al., 2008).

Medzi všeobecne používané probiotiká patria kmene rodov *Lactobacillus* a *Bifidobacterium*, ktoré boli pôvodne izolované z ľudského intestinálneho traktu. Niekoľko štúdií sa zaoberalo probiotickou aktivitou laktokokov, ktoré sú bežne používané ako štartovacie kultúry počas spracovania fermentovaných mliečnych produktov. Všeobecne sa predpokladá, že laktokoky neprežívajú prechod gastrointestinálnym (GI) traktom. Niektoré kmene laktokokov však môžu prežívať v ľudskom i živočíšnom GI trakte (Kimoto et al., 2003; Klijn, Weerkamp, de Vos, 1995).

Schopnosť tolerovať žľčové prostredie je nevyhnutnou charakteristikou probiotickej kultúry. Mnoho štúdií sa zaoberalo prežívaním kyslomliečnych baktérií v žľči a selekciou probiotík s najlepšimi vlastnosťami (Garriga et al., 1998; Jin et al., 1998).

Perrin, Gill a Schneider (2000) uviedli, že toxické účinky žlče môžu byť čiastočne zmiernené prídavkom sacharidu, ktorý môže byť metabolizovaný niektorými kmeňmi bifidobaktérií. Tolerancia niektorých kmeňov laktokokov sa odlišuje použitím rôznych druhov sacharidov v rastovom médiu (**Kimoto-Nira et al., 2009**).

Kimoto-Nira et al. (2010) testovali kmeň *Lactococcus lactis* G50 ako možného kandidáta probiotickej kultúry s imunomodulačnou aktivitou za rozličných podmienok. Výsledky ich práce potvrdili, že kmeň *Lactococcus lactis* G50 toleruje a preživa v prítomnosti lyzozýmu, pri nízkej hodnote pH prostredia a žlče, ale jeho rezistencia varíruje v závislosti od použitého zdroja uhlíka. Tiež pozorovali uprednostňovanie určitých sacharidov rozdielnymi kmeňmi kyslomliečnych baktérií a táto preferencia závisela od kmeňa a od typu gastrointestinálneho traktu. Probiotické vlastnosti troch kmeňov KMB (*Lactococcus lactis* CLFP 101, *Lactobacillus plantarum* CLFP 238 a *Lactobacillus fermentum* CLFP 242) izolovaných z rýb a schopnosť inhibovať priľnavosť 5 patogénnych mikroorganizmov rýb (*Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas salmonicida*, *Yersinia ruckeri* a *Vibrio anguillarum*) hostujúcich v intestinálnej mukóznej vrstve *in vitro* podmienkach skúmali **Balcázar et al. (2008)**. Výsledky ukázali, že len *Lactococcus lactis* CLFP 101 pôsobil protiadhézne a antibakteriálne voči všetkým patogénnym mikroorganizmom. Všetky kmene kyslomliečnych baktérií boli schopné prežiť pri pomerne nízkych hodnotách pH prostredia a pri vysokej koncentrácii rybacej žlče.

ANTIMIKROBIÁLNA AKTIVITA

Kyslomliečne baktérie sú zodpovedné za fermentáciu a majú biokonzervačný účinok využívaný v početných potravinových a krmovinových procesoch. Biokonzervácia slúži na predĺženie trvanlivosti a na zvýšenie bezpečnosti potravín použitím prirodzenej alebo pridanej mikroflóry a ich antimikrobiálnych produktov. Antimikrobiálne zložky produkované kyslomliečnymi baktériami zahŕňajú organické kyseliny, peroxid vodíka, oxid uhličitý, diacetyl, bakteriocíny a nízkomolekulárne antimikrobiálne látky, ale niekoľko štúdií sa venovalo aj ich polysacharidovým metabolitom, zvlášť exopolysacharidom (**Wu et al., 2010; Rohwer a Edwards, 2002**).

Mechanizmus pôsobenia antimikrobiálnych látok nemôže byť presne definovaný, pretože ide o komplexnú interakciu medzi viacerými zložkami, môžeme hovoriť o synergickom efekte (**Greifová et al., 2008**).

Už roku 1973 Haines a Harmon testovali inhibičné schopnosti 8 druhov baktérií patriacich do rodov *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* a *Streptococcus*. Dokázali, že zmesné kultúry spomínaných baktérií v laboratórnych podmienkach s médiom obsahujúcim *Staphylococcus aureus* potlačovali jeho rast viac ako samotné kultúry (**Haines a Harmon, 1973a, 1973b**).

Neskôr v roku 2008 **Charlier et al.** monitorovali 75 kmeňov *Lactococcus lactis* a ich potenciál inhibovať rast *Staphylococcus aureus* v mlieku a dokázali, že inhibičné vlastnosti týchto vybraných kmeňov boli rôzne. Väčšina kmeňov *Lactococcus lactis* (93 %) rast *Staphylococcus aureus* inhibovala a niekoľko kmeňov (7 %) nemalo voči *Staphylococcus aureus* žiadny inhibičný účinok.

Bolo zistené, že laktokoky izolované z iných zdrojov ako z mliečnych produktov, preukazovali vyššiu antimikrobiálnu aktivitu ako kmene izolované z mliečnych produktov, zahŕňajúc aj priemyselné štartéry. Tento fenomén môže byť vysvetlený tak, že schopnosť produkovať antibakteriálne látky týmito divokými kmeňmi je spôsobená konkurenčným bojom o prežitie s inými mikroorganizmami (**Wouters et al., 2002**).

BAKTERIOCÍNY

Mnoho mikrobiálnych skupín produkuje bakteriocíny patriace do heterogénnej skupiny peptidov a proteínov s antimikrobiálnym účinkom (**Castellano et al., 2008**). Bakteriocíny niektorých baktérií inhibujú rast príbuzných mikróbov, zatiaľ čo iné inhibujú širokú škálu mikroorganizmov, zahŕňajúcu prirodzených patogénov potravín a spórovtvorných mikroorganizmov ako sú *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* a *Clostridium tyrobutyricum* (**Gálvez et al., 2008**).

Niekoľko rodov alebo ich druhov ako sú *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*, *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*, *Lactococcus lactis* ssp. *diacetylactis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus plantarum* a *Lactobacillus curvatus* sú schopné syntetizovať peptidy alebo bakteriocíny, ktorých činnosť je namierená len proti taxonomicky úzko súvisiacim baktériám (**Batish et al., 1997**).

Niektoré z bakteriocínov produkované druhmi *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* sa používajú od roku 1950 ako potravinárske prídavné látky. Ako príklad môžeme uviesť nizín, ktorý má antibakteriálny účinok na grampozitívne mikroorganizmy a je schopný inhibovať klíčenie spór rodov *Clostridium* a *Bacillus* (**González et al., 2007**).

Vedecká literatúra ponúka príklady niekoľkých kmeňov kyslomliečnych baktérií schopných produkovať bakteriocíny. V tomto zmysle, určitý kmeň *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* produkuje nizín, bakteriocín, ktorý púta vo vedeckej oblasti najväčšiu pozornosť. Avšak, iné laktokoky sú tiež významnými producentami bakteriocínov. Napríklad lacticin 481 produkovaný kmeňom *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* CNRZ 481, lactococcin B produkovaný *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* 9B4, lactococcin G produkovaný *Lactococcus lactis* LMG 2081 a diplococcin produkovaný *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* a i. (**Lee et al., 1999**).

BIOSURFAKTANTY

Záujem o biosurfaktanty za posledné roky značne vzrástol. Sú potencionálnymi kandidátmi pre mnohé komerčné využitie v ropnom, farmaceutickom, biomedicínskom a potravinárskom priemysle (**Iyer et al., 2010**).

Biosurfaktanty sú mikrobiálne zlúčeniny s vyslovene povrchovou aktivitou, ktoré majú rozmanité chemické štruktúry ako glykolipidy, lipopeptidy, polysacharidovo-proteínové komplexy, lipopolysacharidy, fosfolipidy, mastné kyseliny a neutrálne lipidy. Sú užitočné nielen ako antibakteriálne, antifungálne a antivirotické látky, ale majú tiež potenciál pre použitie ako hlavné imunomodulačné molekuly, antiadhézivne činitele a dokonca ako vakcíny (**Rodrigues et al., 2006**).

Rodrigues et al. (2004) študovali biosurfaktant produkovaný kmeňom *Lactococcus lactis* 53 s cieľom tento biosurfaktant izolovať a identifikovať, zahŕňajúc jeho molekulárne zloženie. Tento biosurfaktant izolovaný z *Lactococcus lactis* 53 bol fyzikálnochemicky a biochemicky charakterizovaný ako mnohozložkový biosurfaktant pozostávajúci z proteínu a polysacharidov, ktorý preukázal antimikrobiálnu aktivitu voči vybraným baktériám a mikroskopickým vlákňitým hubám (**Rodrigues et al., 2006, 2004a, 2004b**).

TECHNOLOGICKÝ VÝZNAM

Acidifikačné schopnosti

Kvalitná výživa dojníc je nutným predpokladom pre dosahovanie požadovaného látkového zloženia a technologických vlastností mlieka. Odrazom nedostatočného energetického krytia dojníc je znížená produkcia mlieka, mlieko vykazuje nižší obsah bielkovín (klesá najmä kazeínová zložka), nízke hodnoty beztukovej sušiny a titračnej kyslosti, dochádza k zhoršovaniu syriteľnosti a kysacej schopnosti mlieka (**Kološta, 1998**). Špecificky typická chuť a aróma tradične vyrábaných druhov syra závisí od druhu mlieka, jeho mikrobiologickej kvality, stupňa okyslenia zrazeného mlieka vo fáze formovania, výrobnjej technológie a podmienok zrenia (**Gonzáles et al., 2010**).

Lactococcus lactis je používaný ako mezofilná štartovacia kultúra pre jeho schopnosť acidifikovať mlieko, čo vedie ku koagulácii a tvorbe arómových látok počas zrenia. Z tohto dôvodu sa kladie dôraz na skúmanie parametrov, ktoré ovplyvňujú okysľovanie mlieka pomocou *Lactococcus lactis*. Zatiaľ nie je známe, ako redukovať acidifikačnú lag – fázu a zvýšiť životnosť buniek po inokulácii (**Jeanson et al., 2009**).

V tradičnej výrobe syrov sa len zriedka používa zmes mezofilných a termofilných kultúr. Avšak kmeň *Streptococcus thermophilus* sa stále viac používa s mezofilnými štartovacími kultúrami na reguláciu acidifikácie počas spracovania, formovania, lisovania a skladovania syrov. Okrem toho *Streptococcus thermophilus* môže byť užitočný proti bakteriofágom (**Champagne et al, 2009; Stokes et al., 2001**).

Champagne et al. (2009) sa zaoberali štúdiom interakcií medzi kultúrami *Lactococcus lactis* a *Streptococcus thermophilus* pri modelovej výrobe syra Cheddar. Výsledky ich práce poukazujú na ochrannú funkciu *Streptococcus thermophilus* voči bakteriofágom, zvýšenie rýchlosti acidifikácie počas čedarizácie, zníženie acidifikácie počas lisovania a skladovania a redukciu tvorby exopolysacharidov, zatiaľ čo kultúry *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* biovar. *diacetylactis* sa významne podieľajú na tvorbe chuti a arómy. Ak sa použije štartovacia kultúra pre tieto čedarové syry zložená z kultúr *Streptococcus thermophilus* a *Lactococcus lactis*, dosiahne sa optimálna chuť, textúra a post- acidifikácia.

Proteolytická a lipolytická aktivita

Škála a stupeň voľných aminokyselín vo fermentovanom mlieku závisí od mnohých premenlivých faktorov ako je druh mlieka, zloženie štartovacej kultúry, prípravných a skladovacích podmienok (**Juillard et al., 1995**).

Lactococcus lactis ako dôležitý komponent štartovacích kultúr používaný vo výrobe syrov vyžaduje komplex

aminokyselín a jeho optimálny rast v mlieku závisí od jeho veľmi zložitého proteolytického systému zahŕňajúceho bunkovú proteínázu spojenú so stenou, niekoľko peptidových transportných systémov lokalizovaných v membráne a množstvo intracelulárnych peptidáz (**Kunji et al., 1996**).

Ak je v mlieku nedostatočné množstvo nízkomolekulových komponentov, rast štartovacej kultúry závisí od jej proteolytickej schopnosti hydrolyzovať kazeíny. Kazeíny sú hlavným zdrojom aminokyselín pre *Lactococcus lactis*, zabezpečujú 98 % rastu (**Juillard et al., 1995**). Príspevok esenciálnych aminokyselín kazeínmi závisí od typu proteínázy (**Iyer et al., 2010**).

Katabolizmus aminokyselín zohráva dôležitú rolu v poskytovaní prekursorov pre biosyntézu aminokyselín, nukleotidov a vitamínov a v produkcii veľkého množstva kľúčových arómových komponentov (**Chaves et al., 2002**). Konkrétnejšie, kazeíny sú degradované na peptidy a aminokyseliny a tie sú hlavnými prekursorami pre prchavé aromatické komponenty (**Smit, Smit a Engels, 2005**).

Proteolytickou aktivitou sa zaoberali aj **Picon et al. (2010)**, ktorí testovali 24 divokých kmeňov *Lactococcus lactis* izolovaných zo španielskeho syra vyrobeného zo surového mlieka, u ktorých bola preukázaná rozdielna proteolytická a peptidolytická aktivita.

Görner a Valík (2004) vo svojej publikácii uvádzajú, že baktérie mliečného kysnutia nemajú výrazné proteolytické a lipolytické vlastnosti, ale vo svojom metabolizme predsa len tvoria z bielkovín štiepne produkty, peptidy a aminokyseliny, ktoré slúžia ako živiny náročným baktériám mliečného kysnutia ako ľahko využiteľný zdroj dusíka.

Gonzáles et al. (2010) izolovali z tradičného španielskeho syra „Genestoso cheese“ 24 kmeňov kyslomliečnych baktérií. Zhodnotili ich enzymatickú aktivitu (acidifikáciu a proteolytické schopnosti a karboxypeptidázovú, aminopeptidázovú, kazeinolytickú a esterázovú aktivitu) s cieľom selektovať pôvodné kmene v záujme spracovania syrov. Tieto kmene boli selektované na základe ich antimikrobiálnej aktivity a identifikované ako *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* (13 kmeňov), *Leuconostoc mesenteroides* (2 kmene), *Leuconostoc pseudomesenteroides* (1 kmeň), *Lactobacillus paracasei* (2 kmene), *Lactobacillus plantarum* (1 kmeň) a *Enterococcus faecalis* (5 kmeňov). Kmene *Lactococcus* sp. preukázali najvyšší stupeň acidifikácie a proteolytickej aktivity. Bezbunkový extrakt z kmeňa *Lactobacillus paracasei* vykazoval najvyšší stupeň aminopeptidázovej aktivity. Najvyšší stupeň kazeinolytickej aktivity preukázal bezbunkový extrakt jedného kmeňa *Lactococcus lactis*. Vysoké hodnoty boli tiež získané bezbunkovými extraktami *Lactobacillus* sp. a niektorými leukonostokmi. Karboxypeptidázová aktivita bola celkovo nízka alebo nepostrehnuteľná u väčšiny kmeňov. Najvyššia miera esterolytickej aktivity bola detegovaná u druhov rodu *Enterococcus*.

Kyslomliečne baktérie sú málo lipolytické v porovnaní s inými skupinami baktérií (napr. *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Achromobacter*). Esterolytický a lipolytický systém baktérií mliečného kysnutia zostáva slabo charakterizovaný. Esterázy kyslomliečnych baktérií, mikroskopických vlákňitých húb a baktérií rodu

Pseudomonas majú za následok ovocnú príchut' v potravinách. Mikrobiálne lipázy a esterázy sú neodmysliteľné v zlepšovaní kvality, urýchľujú zrenie syrov, fermentovaných mäsových výrobkov a iných potravín (Reddy et al., 2008).

Exopolysacharidy

Exopolysacharidy (EPS) sú definované ako dlhé polysacharidy vylučované mikrobiálnymi bunkami (Laws, Gu a Marshall, 2001). Polysacharidy sa všeobecne nachádzajú v rastlinách, mikroorganizmoch (huby a baktérie), riasách a zvieratách. Vďaka ich dostupnosti a reologickým vlastnostiam, polysacharidy reprezentujú triedu vysoko hodnotných polymérov s veľkým priemyselným využitím v potravinárskom, kozmetickom, textilnom a farmaceutickom priemysle. Využívajú sa napríklad ako emulgátory, stabilizátory a zlepšovače textúry v potravinárskom priemysle (Krizkova et al., 2006; McCue, Shetty, 2002). Niekoľko pokusov bolo vykonaných na riadenie fermentačných podmienok kvôli vzrastu produkcie EPS (Macedo et al., 2002; Grobбен et al., 1998), no doteraz je ešte mnoho nevyriešených otázok. Tiež niekoľko štúdií sa uskutočnilo na využitie EPS produkovaných kyslomliečnymi baktériami ako hlavnej funkčnej zložky predovšetkým pri výrobe syrov a jogurtov (Folkenberg et al., 2005; Hassan, Frank a Elsoda, 2003; Hassan et al., 1996).

Tvorba EPS, zdá sa, vzrastá so zvyšujúcim sa obsahom proteínov v médiu. Ostatné zložky média ako minerálne látky, špecifické aminokyseliny, karbohydráty tiež ovplyvňujú zloženie a výťažok exopolysacharidov (De Vuyst a Degeest, 1999; Grobбен et al., 1998).

Ayala-Hernández et al. (2009) sledovali účinok prídavku srvátkových bielkovín na reologické vlastnosti ultrafiltračného permeátu fermentovaného exopolysacharidy-produkujúcim kmeňom *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* JFR1. Mliečne permeáty obsahujúce 8% tuhých látok s rozličnými prídavkami srvátkových bielkovín (0, 2, 4, 6 a 8 %) boli fermentované 12 hod pri teplote 30 °C. Reologické vlastnosti fermentovaných vzoriek boli zhodnotené a porovnávané s kontrolnými vzorkami fermentovanými exopolysacharidy-neprodukujúcimi kmeňmi. Pozorovaním elektrónovým mikroskopom bola tiež potvrdená existencia interakcií medzi srvátkovými proteínovými agregátmi a EPS. Prítomnosť EPS značne zvyšovala viskozitu a viskoelastické vlastnosti média, hlavne u vzoriek obsahujúcich viac ako 2 % prídavok srvátkových proteínov. Získané výsledky názorne dokazujú význam interakcie v utváraní štruktúr EPS-proteín a môžu pomôcť vysvetliť viskozitné mechanizmy EPS vo fermentovaných mliečnych produktoch. Produkcia vysokoviskózneho materiálu by mohla byť potenciálne využívaná v budúcnosti ako nová bohatá vláknitá ingrediencia v mliekarenských produktoch.

Mlieko, srvátka alebo produkty z nich vyrobené sú vhodnými substrátmi na produkciu EPS kvôli ich vysokému obsahu laktózy (Macedo et al., 2002).

Za posledné roky sa čím ďalej, tým viac ukazuje, že niektoré polysacharidy izolované z kultivovateľných mikroorganizmov majú antioxidačné vlastnosti a nízku cytotoxicitu (Krizkova et al., 2006; McCue a Shetty, 2002). Bolo publikovaných mnoho prác prejednávajúcich

o skríningu, izolácii, charakterizácii, biosyntéze a funkčných vlastnostiach exopolysacharidov produkovaných kyslomliečnymi baktériami (Pan a Mei, 2010). Je v nich veľa informácií o exopolysacharidoch produkovaných niektorými kmeňmi *Lactococcus lactis* ako aj *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*. Avšak o kmeňoch *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* nie sú publikované štúdie diskutujúce o produkcii, purifikácii, charakterizácii a biologických vlastnostiach exopolysacharidov vo vzťahu k ich antioxidačným vlastnostiam *in vitro* a *in vivo* (Ayala-Hernández et al., 2009, 2008; Ruas-Madiedo et al., 2002).

Antioxidačný potenciál exopolysacharidov získaných z *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* 12 izolovaného z čínskej nakladanej kapusty popísali vo svojej práci Pan a Mei. Tieto exopolysacharidy preukázali silnú celkovú antioxidačnú kapacitu ako aj schopnosť inhibovať hydroxylové radikály a superoxidovú aniónovú aktivitu (Pan, Mei, 2010).

REZISTENCIA VOČI ANTIBIOTIKÁM

Klinické používanie antibiotík dosiahlo významné zníženie chôrob a úmrtnosti spojených s infekčnými ochoreniami a viedlo k úspešným chirurgickým zákrokom a protirakovinovej liečbe. Používanie antibiotík bolo rozšírené aj vo veterinárnej medicíne, kde sú využívané ako terapeutické faktory, tiež v poľnohospodárstve ako podpora rastu a prevencia ochorení rastlín (Levy, Marshall, 2004; Wegener, 2003).

Rezistencia na rozličné druhy antibiotík je významnou vlastnosťou kyslomliečnych baktérií a je považovaná za jedno z kritérií pre hodnotenie bezpečnosti kmeňov používaných pri výrobe potravín aj krmovín, pretože také mikroorganizmy môžu teoreticky preniesť rezistentné gény na patogény (Ammor, Flórez a Mayo, 2007; Flórez, Delgado a Mayo, 2005).

Rezistencia kyslomliečnych baktérií voči antibiotikám môže byť spôsobená množstvom rôznych mechanizmov, zahŕňajúc zníženú absorpciu antibiotík, inaktiváciu alebo modifikáciu miesta účinku antibiotika či hydrolýzu alebo modifikáciu antibiotika (Normark a Normark, 2002).

Lactococcus lactis je obvyčajne citlivý na spektrum antibiotík (makrolidy, bacitracín, erythromycín, lincomycín, novobiocín, teicoplanín a vancomycín), širokospektrálne antibiotiká (rifampicín, spectinomycín a chloramfenikol) a beta-laktámové antibiotiká (penicilín, ampicilín, amoxicilín, piperacilín, ticarcilín a imipenem). Citlivosť voči tetracyklínu, cefalotínu, nitrofurantoínu, cefotetánu je variabilná. Veľa druhov rodu *Lactococcus* je rezistentných na metronidazol, cefoxitín, trimethoprim, kyselinu nalidixovú a polymyxin B a aminoglykozidy gentamicín a kanamycín (Flórez, Delgado a Mayo, 2005; Temmerman et al., 2002; Herrero et al., 1996;).

Ammor, Flórez a Mayo (2007) vo svojej práci poukázali na rozdielnú senzitivitu rodov KMB na antibiotiká. V ich publikácii je uvedené, že *Pediococcus* sp. je citlivý na gentamicín, netilmicín, erythromycín, niektoré druhy rodu *Lactococcus* sú rezistentné na kyselinu nalidixovú a citlivé na antibiotiká erythromycín a vancomycín a beta-laktámové antibiotiká penicilín, ampicilín.

Tab 1 Mikrobiologické „breakpoints“ pre *Lactococcus lactis* (EFSA Journal, 2008)

Antibiotikum	ampicilín	vankomycín	gentamicín	kanamycín	streptomycín	erytromycín	klindamycín	tetracyklín	chloramfenikol
	(mg.l ⁻¹)								
<i>Lactococcus lactis</i>	2	4	32	64	64	2	4	4	8

Jasne definované hodnoty, ktoré rozlišujú odolné a citlivé kmene, sú životne dôležité. Tiež rozdiel medzi vnútornou (nešpecifickou, neprenosnou) a získanou rezistenciou je tiež veľmi dôležitý. EFSA stanovila tzv. mikrobiologické „breakpoints“ (mg/l) pre jednotlivé KMB, my uvádzame hodnoty pre *Lactococcus lactis*. Kmene s minimálnou inhibičnou koncentráciou vyššou než je uvedený „breakpoints“ sú považované za rezistentné (Flórez, Delgado a Mayo, 2005).

BIOGÉNNE AMÍNY

Biogénne amíny (BA) sú nízkomolekulové alifatické, aromatické alebo heterocyklické bázičné zlúčeniny odvodené od aminokyselín. Patria medzi významné zlúčeniny, ktoré sa nachádzajú v živých organizmoch ako metabolické medziprodukty a produkty, ktoré vykazujú biologickú aktivitu (Bover-Cid et al., 2008; Fernández et al., 2007; Landete, Ferrer a Pardo, 2007).

Niektoré druhy baktérií (laktobacily, enterokoky a iné) si pri adaptácii zvyšujú suboptimálne pH prostredie dekarboxyláciou aminokyselín histidínu a fenylalanínu na histamín a tyramín.

Tvorba biogénnych amínov baktériami môže byť ovplyvnená mnohými vonkajšími faktormi, ktoré môžu ovplyvňovať predovšetkým kinetiku dekarboxylázových reakcií. Medzi vonkajšie faktory, ktoré ovplyvňujú tvorbu biogénnych amínov u baktérií, patrí teplota a pH prostredia, aero-/anaerobióza, dostupnosť zdroja uhlíka (napr. glukózy), prítomnosť rastových faktorov, rastová fáza buniek, koncentrácia NaCl, vodná aktivita a i. (Emborg a Dalgaard, 2008; Greif, Greifová a Karovičová, 2006; Gardini et al., 2005; Santos et al., 2003; Bover-Cid et al., 2001; Gardini et al., 2001; Greif, Greifová a Karovičová, 1997).

Koncentrácia BA v čerstvom mlieku je nepatrná. V čerstvom mlieku, mliečnych nápojoch a výrobkoch, ktoré nie sú fermentované, sa nachádzajú amíny (propylamín, hexylamín, alifatické di- a polyamíny, histamín a tyramín) v malom množstve (menej ako 1 mg.kg⁻¹). Množstvo tyramínu v syre môže dosiahnuť hodnotu 500 mg/kg, ak sú prítomné proteolytické enzýmy a tyramíndekarboxyláza pozitívne kmene *Enterococcus faecalis* ssp. *liquefaciens* (Greif a Greifová, 2006).

Buňková et al. (2010, 2009) sledovali vplyv aeróbného a anaeróbného prostredia a rôzneho obsahu NaCl (2 %, 1 % a bez NaCl) v médiu na produkciu tyramínu u šiestich kmeňov bakteriálneho rodu *Lactococcus*, ktoré sa používajú ako štartéry vo výrobe mliečnych produktov. Pri testovaní kmeňov *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* bola pozorovaná najvyššia produkcia tyramínu v médiu

obohatenom o 2 % NaCl v anaeróbnom prostredí pri teplote 10 ± 1 °C (zrecia teplota prírodných syrov).

Podmienkou vzniku toxického množstva amínov v syroch je proteolýza, ktorá je pri zretí syrov považovaná za jeden z najdôležitejších pochodov ovplyvňujúcich kvalitu syra. Na proteolýze mliečnych bielkovín sa podieľajú natívne proteázy z mlieka, proteázy kvasinových kultúr, syridlové enzýmy, proteázy kontaminujúcej mikroflóry, ale hlavne baktérie štartovacích kultúr (*Lactococcus lactis*, *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, *Enterococcus faecalis* a *Enterococcus faecium*). Štartovacie kultúry používané pri výrobe syrov na zvýšenie stupňa proteolýzy tiež prispievajú k tvorbe BA (Greif a Greifová, 2006).

Využitím štartovacích kultúr v syrárskej technológii je možné významne znížiť koncentráciu histamínu, ale aj putrescínu a kadaverínu. Nizín produkovaný *Lactococcus lactis* a Enterococcin EFS 2 a Enterocín 4 produkovaný *Enterococcus faecalis* výrazne inhibujú rast mikroorganizmov produkujúcich histamín v syroch, ktorého producentmi sú predovšetkým *Lactobacillus buchneri* a *Lactobacillus brevis* (Greif a Greifová, 2006).

ZÁVER

Lactococcus lactis má široké využitie v mliečnej produkcii vďaka svojim pozitívnym vlastnostiam. Značne prispieva k organoleptickej kvalite a textúre fermentovaných produktov chuťovými a textúrou ovplyvňujúcimi činiteľmi, vyprodukovanými kyselinami znižuje pH hodnotu prostredia, čím dochádza k zrážaniu mlieka a tiež k zamedzeniu rastu nežiaducich baktérií. Úlohou výskumov je izolovať nové kmene, skúmať ich pozitívne a negatívne vlastnosti a po selekcii ich aplikovať vo výrobe mliečnych produktov.

Acknowledgments:

This work was supported by grant APVV no. 07/0158.

LITERATÚRA

- ADAMBERG, K., KASK, S., LAHT, T. M., PAALME, T. 2003. The effect of temperature and pH on the growth of lactic acid bacteria: a pH-auxostat study. In *International Journal of Food Microbiology*, vol. 85, 2003, p. 171-183.
- AMMOR, M. S., FLÓREZ, A. B., MAYO, B. 2007. Antibiotic resistance in non-enterococcal lactic acid bacteria and bifidobacteria. In *Food Microbiology*, vol. 24, 2007, p. 559-570.
- AYALA-HERNÁNDEZ, I., HASSAN, A. N., GOFF, H. D., MIRA DE ORDUNA, R., CORREDIG, M. 2008. Production, isolation and characterization of exopolysaccharides produced by *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* JFR1 and their interaction with milk proteins: Effect of pH and media

- composition. In *International Dairy Journal*, vol. 18, 2008, p. 1109-1118.
- AYALA-HERNÁNDEZ, I., HASSAN, A. N., GOFF, H. D., CORREDIG, M. 2009. Effect of protein supplementation on the rheological characteristics of milk permeates fermented with exopolysaccharide-producing *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*. In *Food Hydrocolloids*, vol. 23, 2009, p. 1299-1304.
- BALCÁZAR, J. L., VENDRELL, D., DE BLAS, I., RUIZ-ZARZUELA, I., MUZQIZ, J. L., GIRONES, O. 2008. Characterization of probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from intestinal microbiota of fish. In *Aquaculture*, vol. 278, 2008, p. 188-191.
- BATISH, V. K., ROY, U., LAL, R., GROVER, S. 2009. Antifungal attributes of lactic acid bacteria – A review. In *Critical Reviews in Biotechnology*, vol. 17, 1997, p. 2009-2225.
- BERESFORD, T. P., FITZSIMONS, N. A., BRENNAN, N. L., COGAN, T. M. 2001. Recent advances in cheese microbiology. In *International Dairy Journal*, vol. 11, 2001, p. 259-274.
- BIBAL, B., GOMA, G., VAYSSIER, Y., PAREILLEUX, A. 1988. Influence of pH, lactose and lactic acid on the growth of *Streptococcus cremoris*: a kinetic study. In *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 28, 1988, p. 340-344.
- BOVER-CID, S., HUGAS, M., IZQUIERDO-PULIDO, M., VIDAL-CAROU, M. C. 2001. Amino acid-decarboxylase activity of bacteria isolated from fermented pork sausages. In *International Journal of Food Microbiology*, vol. 66, 2001, p. 185-189.
- BOVER-CID, S., MIGUÉLEZ-ARRIZADO, M. J., BECKER, B., HOLZAPFEL, W. H., CARMEN, M., VIDAL-CAROU, M. C. 2008. Amino acid decarboxylation by *Lactobacillus curvatus* CTC273 affected by the pH and glucose availability. In *Food Microbiology*, vol. 25, 2008, p. 269-277.
- BUŇKOVÁ, L., BUŇKA, F., POLLAKOVÁ, E., PODEŠVOVÁ, T., DRÁB, V., KRÁČMAR, S. 2010. Effect of aero-/anaerobiosis on decarboxylase activity of selected lactic acid bacteria. In *Potravinárstvo*, vol. 4, 2010, p. 5-7.
- BUŇKOVÁ, L., BUŇKA, F., HLOBILOVÁ, M., VANÁTKOVÁ, Z., NOVÁKOVÁ, D., DRÁB, V. 2009. Tyramine production of technological important strains of *Lactobacillus*, *Lactococcus* and *Streptococcus*. In *European Food Research and Technology*, vol. 229, 2009, p. 533-538.
- CACHON, R., DIVIÉS, C. 1994. Generalized model of the effect of pH on lactate fermentation and citrate bioconversion in *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* biovar *diacetylactis*. In *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 41, 1994, p. 694-699.
- CASALTA, E., MONTEL, M. CH. 2008. Safety assessment of dairy microorganisms: The *Lactococcus* genus. In *International Journal of Food Microbiology*, vol. 126, 2008, p. 271-273.
- CASTELLANO, P., BELFIORE, C., FADDA, S., VIGNOLO, G. 2008. A review of bacteriocinogenic lactic acid bacteria used as bioprotective cultures in fresh meat produced in Argentina. In *Meat Science*, vol. 79, 2008, p. 483-499.
- CORROLER, D., DESMASURES, N., GUEGUEN, M. 1999. Correlation between polymerase chain reaction of analysis of the histidine biosynthesis operon, randomly amplified polymorphic DNA analysis and phenotypic characterization of dairy *Lactococcus* isolates. In *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 51, 1999, p. 91-99.
- DE VUYST, L., DEGEEST, B. 1999. Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. In *FEMS Microbiology Reviews*, vol. 23, 1999, p. 153-177.
- EMBORG, J., DALGAARD, P. 2008. Growth, inactivation and histamine formation of *Morganella psychrotolerans* and *Morganella morganii* – development and evaluation of predictive models. In *International Journal of Food Microbiology*, vol. 128, 2008, p. 234-243.
- FERNÁNDEZ, M., LINARES, D. M., RODRÍGUES, A., ALVAREZ, M. A. 2007. Factors affecting tyramine production in *Enterococcus durans* IPLA 655. In *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 73, 2007, p. 1400-1406.
- FLÓREZ, A. B., DELGADO, S., MAYO, B. 2005. Antimicrobial susceptibility of lactic acid bacteria isolated from a cheese environment. In *Canadian Journal of Microbiology*, vol. 51, 2005, p. 51-58.
- FOLKENBERG, D. M., DEJMEK, P., SKRIVER, A., IPSEN, R. 2005. Relation between sensory texture properties and exopolysaccharide distribution in set and in stirred yogurts produced with different starter cultures. In *Journal of Texture Studies*, vol. 36, 2005, p. 174-189.
- GÁLVEZ, A., LOPEZ, R. L., ABRIQUEL, H., VALDIVIA, E., OMAR, N. B. 2008. Application of bacteriocins in the control of foodborne pathogenic and spoilage bacteria. In *Critical Reviews in Biotechnology*, vol. 28, 2008, p. 125-152.
- 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*, vol. 64, 2001, p. 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*, vol. 16, 2005, p. 609-616.
- GARRIGA, M., PASCUAL, M., MONFORT, J. M., HUGAS, M. 1998. Selection of lactobacilli for chicken probiotic adjuncts. In *Journal of Applied Microbiology*, vol. 84, 1998, p. 125-132.
- GONZÁLES, L., SACRISTÁN, N., ARENAS, R., FRESNO, J. M., TORNADIJO, M. E. 2010. Enzymatic activity of lactic acid bacteria (with antimicrobial properties) isolated from a traditional Spanish cheese. In *Food Microbiology*, vol. 27, 2010, p. 592-597.
- GONZÁLES, L., SANDOVAL, H., SACRISTÁN, N., CASTRO, J. M., FRESNO, J. M., TORNADIJO, M. E. 2007. Identification of lactic acid bacteria isolated from Genestoso cheese throughout ripening and study of their antimicrobial activity. In *Food Control*, vol. 18, 2007, p. 716-722.
- GÖRNER, F., VALÍK, I. 2004. *Aplikovaná mikrobiológia potravín*. Malé centrum : Bratislava, 2004, 528 p.
- 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*, vol. 45, 2006, p. 21-29.
- GREIF, G., GREIFOVÁ, M., KAROVIČOVÁ, J. 1997. Tvorba kadaverínu a amoniaku činnosťou niektorých baktérií za modelových podmienok. In *Czech Journal of Food Science*, 16, 1997, p. 53-56.

- GREIF, G., GREIFOVÁ, M. 2006. Štúdium analýzy biogénnych aminov vo vybraných mliečnych výrobkoch. In *Mliekarstvo*, vol. 37, 2006, p. 38-42.
- GREIFOVÁ, M., KRAJČOVÁ, E., GREIF, G., PAGURKO, A., SCHMIDT, S. 2008. Antimikrobiálna aktivita *Lactobacillus reuteri* a produkty metabolismu počas fermentácie glycerolu. In *Mliekarstvo*, vol. 39, 2008, p. 19-24.
- GROBBEN, G. J., CHIN-JOE, I., KITZEN, V. A., BOELS, I. C., BOER, F., SIKKEMA, J. 1998. Enhancement of exopolysaccharide production by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* NCFB 2772 with a simplified defined medium. In *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 64, 1998, p. 1333-1337.
- HAINES, W. C., HARMON, L. G. 1973. Effect of selected lactic acid bacteria on growth of *Staphylococcus aureus* and production of enterotoxin. In *Applied Microbiology*, vol. 25, 1973a, p. 436-441.
- HAINES, W. C., HARMON, L. G. 1973. Effect of variations in conditions of incubation upon inhibition of *Staphylococcus aureus* by *Pediococcus cerevisiae* and *Streptococcus lactis*. In *Applied Microbiology*, vol. 25, 1973b, p. 169-172.
- HASSAN, A. N., FRANK, J. F., ELSODA, M. 2003. Observation of bacterial exopolysaccharide in dairy products using cryo-scanning electron microscopy. In *International Dairy Journal*, vol. 13, 2003, p. 755-762.
- HASSAN, A. N., FRANK, J. F., SCHMIDT, K. A., SHALABI, S. I. 1996. Rheological properties of yogurt made with encapsulated nonropy lactic cultures. In *Journal of Dairy Science*, vol. 79, 1996, p. 2091-2097.
- HERRERO, M., MAYO, B., GONZÁLES, B., SUÁREZ, J. E. 1996. Evaluation of technologically important traits in lactic acid bacteria isolated from spontaneous fermentations. In *Journal of Applied Bacteriology*, vol. 81, 1996, p. 565-570.
- CHAMPAGNE, C. P., GAGNON, D., ST-GELAIS, D., VUILLEMARD, J. C. 2009. Interactions between *Lactococcus lactis* and *Streptococcus thermophilus* strains in Cheddar cheese processing conditions. In *International Dairy Journal*, vol. 19, 2009, p. 669-674.
- CHARLIER, C., EVEN, S., GAUTIER, M., LE LOIR, Y. 2008. Acidification is not involved in the early inhibition of *Staphylococcus aureus* growth by *Lactococcus lactis* in milk. In *International Dairy Journal*, vol. 18, 2008, p. 197-203.
- CHAVES, A. C., FERNANDÉZ, M., LERAYER, A. L., MIERAU, I., KLEEREBEZEM, M., HUGENHOLTZ, J. 2002. Metabolic engineering of acetaldehyde production by *Streptococcus thermophilus*. In *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 68, 2002, p. 5656-5662.
- IYER, R., TOMAR, S. K., MAHESWARI, T. U., SINGH, R. 2010. *Streptococcus thermophilus* strains: Multifunctional lactic acid bacteria. In *International Dairy Journal*, vol. 20, 2010, p. 133-141.
- JEANSON, S., HILGERT, N., COQUILLARD, M. O., SEUKPANYA, C., FAIVELEY, M., NEVEU, P., ABRAHAM, CH., GEORGESCU, V., FOURCASSIÉ, P., BEUVIER, E. 2009. Milk acidification by *Lactococcus lactis* is improved by decreasing the level of dissolved oxygen rather than decreasing redox potential in the milk prior to inoculation. In *International Journal of Food Microbiology*, vol. 131, 2009, p. 75-81.
- JIN, L. Z., HO, Y. W., ABDULLAH, N., JALALUDIN, S. 1998. Acid and bile tolerance of *Lactobacillus* isolated from chicken intestine. In *Letters in Applied Microbiology*, vol. 27, 1998, p. 183-185.
- JUILLARD, V., LA BARS, D., KUNJI, E. R. S., KONINGS, W. N., RICHARD, J. 1995. Oligopeptides are the main source of nitrogen for *Lactococcus lactis* growth in milk. In *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 61, 1995, p. 3024-3010.
- KHEDID, K., FAID, M., MOKHTARI, A., SOULAYMANI, A., ZINEDINE, A. 2009. Characterization of lactic acid bacteria isolated from the one humped camel milk produced in Morocco. In *Microbiological Research*, vol. 164, 2009, p. 81-91.
- KIMOTO, H., NOMURA, M., KOBAYASHI, M., MIZUMACHI, K., OKAMOTO, T. 2003. Survival of *lactococci* during passage through mouse digestive tract. In *Canadian Journal of Microbiology*, vol. 49, 2003, p. 707-711.
- KIMOTO-NIRA, H., KOBAYASHI, M., NOMURA, M., SASAKI, K., SUZUKI, CH. 2009. Bile resistance in *Lactococcus lactis* strains varies with cellular fatty acid composition: analysis by using different growth media. In *International Journal of Food Microbiology*, vol. 131, 2009, p. 183-188.
- KIMOTO-NIRA, H., SUZUKI, CH. SASAKI, K., KOBAYASHI, M., MIZUMACHI, K. 2010. Survival of a *Lactococcus lactis* strain varies with its carbohydrate preference under in vitro conditions simulated gastrointestinal tract. In *International Journal of Food Microbiology*, vol. 143, 2010, p. 226-229.
- KLIJN, N., WEERKAMP, A. H., DE VOS, W. M. 1995. Genetic marking of *Lactococcus lactis* shows its survival in the human gastrointestinal tract. In *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 61, 1995, p. 2771-2774.
- KOLOŠTA, M. 1998. Vplyv faktorov prvovýroby na vhodnosť mlieka na výrobu syrov. In *Mliekarstvo*, vol. 29, 1998, p. 21-24.
- KRIZKOVA, L., ZITNANOVA, I., MISLOVICOVA, D., MASAROVA, J., SASINKOVA, V., DURACKOVA, Z., KRAJCOVIC, J. 2006. Antioxidant and antimutagenic activity of mannan neoglycoconjugates: Mannan-human serum albumine and mannan-penicillin G acylase. In *Mutation Research*, vol. 606, 2006, p. 72-79.
- KUNJI, E. R. S., MIERAU, I., HAGTING, A., POOLMAN, B., KONINGS, W. N. 1996. The proteolytic system of lactic acid bacteria. In *Antonie van Leeuwenhoek*, vol. 70, 1996, p. 187-221.
- LANDETE, J. M., FERRER, S., PARDO, I. 2007. Biogenic amine production by lactic acid bacteria, acetic bacteria and yeast isolated from wine. In *Food Control*, vol. 18, 2007, p. 1569-1574.
- LAWS, A. P., GU, Y., MARSHALL, V. M. 2001. Biosynthesis, characterization and design of bacterial exopolysaccharides from lactic acid bacteria. In *Biotechnology Advances*, vol. 19, 2001, p. 597-625.
- LEE, D. A., COLLINS, E. B. 1976. Influence of temperature on growth of *Streptococcus cremoris* a *Streptococcus lactis*. In *Journal of Dairy Science*, vol. 59, 1976, p. 405-409.
- LEE, H. J., JOO, Y. L., PARK, C. H., KIM, S. H., HWANG, I., AHN, J. G., HEEN, T.I. 1999. Purification and characterization of a bacteriocin produced by *L. lactis* subsp. *lactis* H559 isolated from kimchi. In *Journal of Bioscience and Bioengineering*, vol. 88, 1999, p. 153-159.
- LEVY, S. B., MARSHALL, B. 2004. Antibacterial resistance world wide: causes, challenges and responses. In *Nature Medicine*, vol. 10, 2004, p. 122-129.
- MACEDO, M. G., LACROIX, C., GARDNER, N. J., CHAMPAGNE, C. P. 2002. Effect of medium supplementation on exopolysaccharide production by *Lactobacillus rhamnosus* RW-9595M in whey permeate. In *International Dairy Journal*, vol. 12, 2002, p. 419-426.

- MC CUE, P., SHETTY, K. 2002. A biochemical analysis of mungbean (*Vigna radiata*) response to microbial polysaccharides and potential phenolic-enhancing effects for nutraceutical applications. In *Food Biotechnology*, vol. 16, 2002, p. 57-79.
- NORMARK, B. H., NORMARK, S. 2002. Evolution and spread of antibiotic resistance. In *Journal of Internal Medicine*, vol. 252, 2002, p. 91-106.
- PAN, D., MEI, X. 2010. Antioxidant activity of an exopolysaccharide purified from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 12. In *Carbohydrate polymers*, vol. 80, 2010, p. 908-914.
- PERRIN, S., GRILL, J. P., SCHNEIDER, F. 2000. Effects of fructooligosaccharides and their monomeric components on bile salt resistance in three species of bifidobacteria. In *Journal of Applied Microbiology*, vol. 88, 2000, p. 968-974.
- PICON, A., GARCÍA-CASADO, M. A., NUÑEZ, M. 2010. Proteolytic activities, peptide utilization and oligopeptide transport systems of wild *Lactococcus lactis* strains. In *International Dairy Journal*, vol. 20, 2010, p. 156-162.
- REDDY, G., ALTAF, MD., NAVEENA, B. J., VENKATESHWAR, M., KUMAR, E. V. 2008. Amylolytic bacterial lactic acid fermentation – A review. In *Biotechnology Advances*, vol. 26, 2008, p. 22-34.
- RODRIGUES, L. R., TEIXEIRA, J. A., VAN DER MEI, H. C., OLIVEIRA, R. 2006. Physicochemical and functional characterization of a biosurfactant produced by *Lactococcus lactis* 53. In *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, vol. 49, 2006, p. 79-86.
- RODRIGUES, L. R., VAN DER MEI, H. C., TEIXEIRA, J. A., OLIVEIRA, R. 2004. Influence of Biosurfactants from Probiotic Bacteria on Formation of Biofilms on Voice Prostheses. In *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 70, 2004a, p. 4408-4410.
- RODRIGUES, L. R., VAN DER MEI, H. C., TEIXEIRA, J. A., OLIVEIRA, R. 2004. Biosurfactant from *Lactococcus lactis* 53 inhibits microbial adhesion on silicone rubber. In *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 66, 2004b, p. 306-311.
- ROHWER, F., EDWARDS, R. 2002. The phage proteomic tree: a genome-based taxonomy for phage. In *Journal of Bacteriology*, vol. 184, 2002, p. 4529-4535.
- RUAS-MADIEDO, P., TUINIER, R., KANNING, M., ZOON, P. 2002. Role of exopolysaccharides produced by *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* on the viscosity of fermented milks. In *International Dairy Journal*, vol. 12, 2002, p. 689-695.
- SALMINEN, S., VON WRIGHT, A., MORELLI, L., MARTEAU, P., BRASSART, D., DE VOS, W. M., FONDÉN, R., SAXELIN, M., COLLINS, K., MOGENSEN, G., BIRKELAND, S. E., MATTILA-SANDHOLM, T. 1998. Demonstration of safety of probiotics – a review. In *International Journal of Food Microbiology*, vol. 44, 1998, p. 93-106.
- SANTOS, W. C., SOUZA, M. R., CERQUEIRA, M. M. O. P., GLORIA, M. B. A. 2003. Bioactive amine formation in milk by *Lactococcus* in the presence or not of rennet and NaCl at 20 and 32 °C. In *Food Chemistry*, vol. 81, 2003, p. 595-606.
- SCHLEIFER, K. H., KRAUS, J., DVORAK, C., KILLPER-BÄLZ, R., COLLINS, M. D., FISCHER, W. 1985. Transfer of *Streptococcus lactis* and related streptococci to the genus *Lactococcus* gen. nov. In *Systematic and Applied Microbiology*, vol. 6, 1985, p. 183-195.
- SIRÉN, N., SALONEN, K., LEISOLA, M., NYSSÖLÄ, A. 2009. A new salt inducible expression system for *Lactococcus lactis*. In *Biochemical Engineering Journal*, 2009, vol. 48, p. 132-135.
- SMIT, G., SMIT, B. A., ENGELS, W. J. M. 2005. Flavour formation by lactic acid bacteria and biochemical flavour profiling of cheese products. In *FEMS Microbiology Reviews*, vol. 29, 2005, p. 591-610.
- STOKES, D., ROSS, R. P., FITZGERALD, G. F., COFFEY, A. 2001. Application of *Streptococcus thermophilus* DPC1842 as a adjunct to counteract bacteriophage disruption in a predominantly lactococcal Cheddar cheese starter: use in bulk starter culture systems. In *Lait*, vol. 81, 2001, p. 327-334.
- TECHNICAL GUIDANCE. 2008. Update of the criteria used in the assessment of bacterial resistance to antibiotics of human or veterinary importance. In *The EFSA Journal*, 2008, 732, p. 1. 1-15.
- TEMMERMAN, R., POT, B., HUYS, G., SWINGS, J. 2003. Identification and antibiotic susceptibility of bacterial isolates from probiotic products. In *International Journal of Food Microbiology*, vol. 81, 2003, p. 1-10.
- VASILJEVIC, T., SHAH, N. P. 2008. Probiotics – From Metchnikoff to bioactives. In *International Dairy Journal*, vol. 18, 2008, p. 714-728.
- VOULOUMANOU, E. K., MAKRI, G. C., KARAGEORGIOPOULOS, D. E., FALAGAS, M. E. 2009. Probiotics for the prevention of respiratory tract infections: a systematic review. In *International Journal of Antimicrobial Agents*, vol. 34, 2009, p. 197.e1–197.e.10.
- WEGENER, H. C. 2003. Antibiotics in animal feed and their role in resistance development. In *Current Opinion in Microbiology*, vol. 6, 2003, p. 439-445.
- WOUTERS, J. T. M., AYAD, E. H. E., HUGENHOLTZ, J., SMIT, G. 2002. Microbes from raw milk for fermented dairy products. In *International Dairy Journal*, vol. 12, 2002, p. 91-109.
- WU, M. H., PAN, T. M., WU, Y. J., CHANG, S. J., CHANG, M. S., HU, CH.Y. 2010. Exopolysaccharide activities from probiotic bifidobacterium: Immunomodulatory effects (on J774A.1 macrophages) and antimicrobial properties. In *International Journal of Food Microbiology*, vol. 144, 2010, p. 104-110.

Contact address:

Ing. Zuzana Hladíková, Institute of Biotechnology and Food Technology, Department of Food Technology, Faculty of Chemical and Food Technology, Slovak University of Technology, Radlinského 9, 812 37 Bratislava, Slovakia, E-mail: zuzana.hladikova@stuba.sk

Ing. Jana Smetanková, Institute of Biotechnology and Food Technology, Department of Food Technology, Faculty of Chemical and Food Technology, Slovak University of Technology, Radlinského 9, 812 37 Bratislava, Slovakia, E-mail: jana.smetankova@stuba.sk

Ing. Gabriel Greif, PhD., Institute of Biotechnology and Food Technology, Department of Food Technology, Faculty of Chemical and Food Technology, Slovak University of Technology, Radlinského 9, 812 37 Bratislava, Slovakia, E-mail: gabriel.greif@stuba.sk

doc. Ing. Mária Greifová, PhD., Institute of Biotechnology and Food Technology, Department of Food Technology, Faculty of Chemical and Food Technology, Slovak University of Technology, Radlinského 9, 812 37 Bratislava, Slovakia, E-mail: maria.greifova@stuba.sk

MONITORING OF A GLUTEN CONTENT IN SELECTED MEAT PRODUCTS FROM THREE BIGGEST MEAT PRODUCERS IN SLOVAKIA

Marcel Mati, Ladislav Staruch

ABSTRACT

The work is focused on a monitoring of a gluten content in selected meat products from three biggest and most popular meat producers in Slovakia. Gluten is a type of protein complex which is typical naturally presented component of wheat, barley and rye. Flour from this sources with natural gluten content is also added into the some type of meat products and other foodstuffs for a technological reasons hand in hand with economic reasons. Some of the gluten quantities could be hazardous for sensitive people as celiatics and allergic to gluten. Within the context of this reasons there is a need to control the amounts of this hidden type of gluten inclusive of spice mixes using in a meat production. Monitoring by itself was realized with a use of the sandwich ELISA RIDASCREEN® Fast Gliadin test. ELISA means enzyme linked immunosorbent assay. It is based on a specific reaction among the enzyme and antigen leading to a creation of a complex. This test provides us exact quantification of a gluten content in this type of food products using a colorimetric reaction of a complex by observing of all fundamentals of this technique. There were analysed 16 meat products and 5 types of spice mixes in total.

Keywords: gluten, ELISA test, gluten intolerance, gluten allergy

ÚVOD

Celiakia je permanentná potravinová intolerancia na lepok, ktorý je prirodzene prítomný v obilninách akými sú pšenica, jačmeň a raž (Petr, Michalík et al., 2003). O bezpečnosti bielkovín z ovsa pre celiatikov sa stále vedú otvorené vedecké debaty (Black, Orfila, 2011). Celiakia je bližšie definovaná ako stav organizmu, pri ktorom je abnormálnym spôsobom zmenšená prirodzená plocha črevnej sliznice (sploštením črevných klkov), a tento stav sa dá morfológicky upraviť dodržiavaním tzv. „bezlepkovej diéty“ (Abdulkarim, Murray, 2003). Prvýkrát bola celiakia popísaná Samuelom Gee v roku 1880 vo Veľkej Británii (Walker, Murray, 2010). Súvislosť medzi konzumáciou lepku a prejavmi ochorenia bola dokázaná počas druhej svetovej vojny (Abdulkarim, Murray, 2003). V súčasnosti je výskyt tohto ochorenia približne 1:100 (Sollid, Koshla, 2011). Klasickými prejavmi ochorenia sú hnačka, bolesti v brušnej oblasti a úbytok hmotnosti, čo dokazujú štúdie na probandoch postihnutých celiakiou (Olén, Askling et al., 2011). Okrem klasických prejavov ochorenia vznikajú ďalšie, ktoré sú dôsledkom nedostatočného vstrebávania dôležitých zložiek výživy v procese trávenia. Ide o osteoporózu, bolesti kĺbov, chronickú únavu, poranenia kože, anémiu a iné (Fasano, 2009). Výrazné histologické zmeny sa pri dodržiavaní bezlepkovej diéty podľa dostupných štúdií prejavujú už za 3 mesiace a za 2 roky diéty sa pacienti s celiakou stávajú prakticky asymptomatickí (Anderson, 2008). Štúdie dokazujú, že celiakia sa môže vyskytnúť u jedincov prakticky v ľubovoľnom veku (Mukherjee, Egbuna, Brar et al., 2010). Celiakiou bývajú postihnuté najčastejšie deti a dospelí vo veku okolo štyridsať rokov (Petr, Michalík

et al., 2003). Štandardom pri spoľahlivej diagnóze celiakie je biopsia tenkého čreva, o ktorej potrebe rozhodujú sérologické testy (Ludvigsson, Green, 2011). Príčina tejto intolerancie je stále skúmaná. Vedecké závery však dosiaľ predpokladajú najväčší vplyv pri vzniku ochorenia genetickým dispozíciám jedincov. Tieto závery sú podporené výskumami poukazujúcimi na to, že ak malo jedno z detí- jednovaječných dvojčiek celiakiu, u toho druhého sa vyskytovala rovnako až v 75 % prípadov (Gutierrez-Achury, Coutinho de Almeida et al., 2011). Pšeničný lepok je potravinovou komoditou, ktorá je známa svojim použitím v pekárskom priemysle. Využívaný je však aj v ostatných odvetviach potravinárskeho priemyslu, medzi ktoré patrí aj mäsová výroba. Lepok je nositeľom viskózoelastických vlastností a pri výrobe mäsových výrobkov sa používa najčastejšie vo forme múky na zvýšenie väzby vody vo výrobku a ako plnidlo, čo je pozitívne z ekonomického i technologického hľadiska (Asgar et al., 2010).

Lepok je komplexnou bielkovinou zloženou majoritne z nasledovných bielkovín:

V alkohole rozpustných gliadínov (u pšenice), sekalínov (u raže), alebo hordeínov (u jačmeňa) (Abdulkarim, Murray, 2003).

V alkohole nerozpustných glutenínov (Tatham, Shewry, 2008).

Gliadíny (sekalíny, či hordeíny) predstavujú obsahovo približne 50 % bielkovín lepku. ELISA RIDASCREEN® Fast Gliadin test je založený práve na zaistení kvantity gliadínu, ktorej vynásobením známym koeficientom rovným 2 dostaneme výsledný obsah lepku v potravinárskom výrobku. Gliadín je tiež považovaný za potenciálny alergén (Wang, Young, Karl, 2010). ELISA

testy poskytujú vo všeobecnosti citlivú a selektívnu metódu na detekciu veľkej skupiny antigénov v rôznych matriciach. Existujú dva základné typy ELISA metód: sendvičová ELISA metóda, ktorú sme pri analýze použili a kompetitívna ELISA metóda. Sendvičová analýza je založená na tvorbe komplexu medzi protilátkou, imobilizovanou na tuhej fáze a antigénom z extraktu skúmanej vzorky. Následným prídavkom druhej protilátky a jej naviazaním vzniká komplex protilátka- antigén-protilátka (tzv. sendvičový komplex). Stanovenie množstva gliadínu vo vzorke je položené na báze kolorimetrickej reakcie s následným meraním absorbancie pomocou spektrofotometra. Kompetitívna ELISA metóda využíva naopak špecifický antigén imobilizovaný na tuhej fáze (Hnasko, Lin, McGarvey et al., 2011). Vyššiu citlivosť než ELISA testy má metóda PCR (polymerázová reťazová reakcia). Ide približne o 10 x lepšiu citlivosť. Systém real time PCR má detekčný limit pre stanovenie gliadínu na úrovni 0,16 ppm, čo znamená citlivejšiu metódu najmä pre stopové množstvá gliadínu, na ktorých kvantifikáciu už ELISA nestačí. Nevýhodou PCR metódy je ale nutnosť prítomnosti pomnožiteľnej deoxyribonukleovej kyseliny vo vzorke a schopnosť detegovať kontamináciu vzorky nukleovými kyselinami práve tej obilniny, ktorej prítomnosť bielkovín chceme stanoviť (Hulín et al., 2008). ELISA metóda stanovenia lepku vo vzorkách bola z vyššie spomínaných dôvodov prijatá komisiou Codex Alimentarius za metódu číslo 1 pri danom type stanovení (van Eckert, Bond et al., 2010). Nariadenie Komisie Európskeho Spoločenstva č. 41/ 2009 z 20. januára 2009 o zložení a označovaní potravín vhodných pre osoby trpiace neznášanlivosťou gluténu (lepku) na základe vzájomnej podobnosti celiatičkov (čo sa týka ich citlivosti) pre uľahčenie ich života rozlišuje a nariaďuje nasledovné označovanie potravinárskych výrobkov v Európskej únii:

Tzv. „bezgluténové“ výrobky sú výrobky, ktoré obsahujú menej ako 20 mg lepku na kilogram hotového výrobku. Výrobky s „veľmi nízkym obsahom“ lepku- sú tie, ktoré obsahujú viac ako 20 mg lepku na kilogram hotového výrobku, ale menej ako 100 mg lepku na kilogram hotového výrobku (keďže celiatici ešte tieto množstvá lepku tolerujú) (Vyhláška č. 41/2009).

MATERIÁL A METÓDY

Na obsah lepku bolo celkovo analyzovaných 21 vzoriek. Išlo o 16 vzoriek mäsových výrobkov od troch rôznych výrobcov (A, B, C) a 5 druhov koreníacich zmesí dodaných od dvoch výrobcov mäsových výrobkov (B a C), ktoré používajú vo svojich výrobkoch, a ktoré pre nich vyrábajú iné firmy. K analýze bol použitý ELISA RIDASCREEN® Fast Gliadin test, ktorý je sendvičovou ELISA metódou, ktorý využíva monoklonálne protilátky R5 (Fric, Gabrovská, Nevoral, 2011). Test využíva protilátky imobilizované na tuhej fáze, ktorou býva najčastejšie takzvaná mikrotitračná platnička. Pomocou

takto zakotvených protilátok sú zachytávané špecifické (alergénne) bielkoviny z analyzovaných vzoriek. Takto zachytené bielkoviny sú detegované ďalšími proteín-špecifickými protilátkami, ktoré sú označené enzýmom umožňujúcim kolorimetrickú reakciu. Výsledná koncentrácia antigénu/ alergénu je priamo úmerná intenzite zafarbenia, ktorá je nameraná pomocou spektrofotometra. Detekčný limit metódy je 2 ppm gliadínu, čo zodpovedá po prepočítaní 4 ppm gluténu (lepku). Dolný kvantifikačný limit testu je 5 ppm gliadínu, čo zodpovedá 10 ppm gluténu (lepku) a vrchný limit je 80 ppm gliadínu (JEMO TRADING, 2010).

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Výsledky v tab. 1 dokazujú, že analyzované výrobky od firmy A, ktoré sú označované ako bezgluténové sú takto označované právom. V prípade výrobku Pečeneý syr paštéta (vzorka č. 34) toto označenie chýba napriek tomu, že podľa výsledkov analýz môže byť jeho nositeľom, čo by umožnilo ešte lepší prehľad celiatikom v sortimente výrobkov firmy A. Výrobok Pečená sekaná (vzorka č. 35) sa nezaraďuje medzi bezgluténové výrobky. Obsah lepku (gluténu) u analyzovanej vzorky tohto výrobku sme stanovili na úrovni viac ako 80 mg/ kg hotového výrobku (80 ppm lepku), čo je viac ako limit kvantifikácie samotného testu a zároveň potvrdenie, že výrobok sa správne nezaraďuje medzi bezgluténové výrobky. Lepok sa do Pečenej sekanj dostáva pri výrobe prídavkom strúhanky. Firma A neposkytla k analýze žiadny druh nimi používaných koreníacich zmesí, ktoré by mohli byť zdrojom kontaminácie výrobkov. U mäsových výrobkov šlo o zmes výrobkov z kategórie mäkkých mäsových výrobkov a trvanlivých tepelne neopracovaných mäsových výrobkov.

Výsledky uvedené v tab. 2 dokazujú, že analyzované mäsové výrobky od firmy B a koreníacie zmesi od iných dodávateľov sú právom označované ako „bezgluténové“.

Tab. 3 podáva výsledky analýzy mäsových výrobkov od firmy C a koreníacich zmesí, pochádzajúcich od iných firiem, ktoré firma C používa vo výrobe. Mäsové výrobky pochádzali z kategórie trvanlivých tepelne neopracovaných mäsových výrobkov. U všetkých mäsových výrobkoch výsledky potvrdzujú správnosť označovania výrobkov za bezgluténové. U koreníacej zmesi Gombasecká bol zachytený obsah lepku na úrovni 12,19 mg na kilogram hotového výrobku, ktorý nepredstavuje riziko pre celiatikov, ale vzhľadom na označenie výrobku za „bezalergénny“ pri výrobe ktorého sa používa je tento výsledok mierne prekvapivý. Toto množstvo môže poukazovať na krížovú kontamináciu u výrobcu koreníacej zmesi. Navyše sa zmes pridáva do fermentovaného mäsového výrobku, o ktorých legislatíva hovorí, že: „Do trvanlivých tepelne neopracovaných mäsových výrobkov je zakázané používať vláknu a nemäsové bielkoviny“ (Výnos č. 1895/2004- 100).

Tab. 1 Obsah gluténu vo vzorkách mäsových výrobkov a koreniacich zmesí od firmy A

Vzorka	Číslo vzorky	ppb gliadínu	ppb *500	ppm gliadínu	ppm gluténu
Spišské párky classic	9	<10	<5000	<5	<10
Rusnácka klobása	11	<10	<5000	<5	<10
Spring nárez	13	<10	<5000	<5	<10
Saláma Austria	15	<10	<5000	<5	<10
Pečeňový syr paštéta	34	<10	<5000	<5	<10
Pečená sekaná	35	>80	>40000	>40	>80

Tab. 2 Obsah gluténu vo vzorkách mäsových výrobkov a koreniacich zmesí od firmy B

Vzorka	Číslo vzorky	ppb gliadínu	ppb *500	ppm gliadínu	ppm gluténu
Údená medová šunka	1	<10	<5000	<5	<10
Pečená šunka	3	<10	<5000	<5	<10
Šunka špeciál	5	<10	<5000	<5	<10
Poľovnícke pliecko s cesnakom	6	<10	<5000	<5	<10
Jelenia klobása hubert	8	<10	<5000	<5	<10
Spišské párky premium	32	<10	<5000	<5	<10
koreniaca zmes Frankfurter combi	27	<10	<5000	<5	<10
koreniaca zmes Delikates pate mix	25	<10	<5000	<5	<10
koreniaca zmes Poltermax	29	<10	<5000	<5	<10

Tab. 3 Obsah gluténu vo vzorkách mäsových výrobkov a koreniacich zmesí od firmy C

Vzorka	Číslo vzorky	ppb gliadínu	ppb *500	ppm gliadínu	ppm gluténu
Lovecká saláma	17	<10	<5000	<5	<10
Malokarpatská saláma	18	<10	<5000	<5	<10
Nitran saláma	20	<10	<5000	<5	<10
Uhorčík klobása	22	<10	<5000	<5	<10
Koreniaca zmes Gombasecká	30	12,19	6095	6,095	12,19
Koreniaca zmes Ponitran	31	<10	<5000	<5	<10

ZÁVER

Výsledky analýz mäsových výrobkov od firmy A, B a C (uvedené v tabuľkách 1, 2 a 3), ktoré sme vykonali potvrdzujú, že mäsové výrobky, ktoré sú označované ako „bezgluténové“ spĺňajú limit pre zaradenie do takejto kategórie. Koreniaca zmes Gombasecká, ktorú používa firma C pri výrobe rovnomenného mäsového výrobku vykázala diskutabilný obsah lepku, uvedený v tab. 3 a diskutovaný vo výsledkoch. Celkovo však môžeme na základe získaných výsledkov konštatovať dodržiavanie metodiky HACCP a ISO 22000 vo výrobách mäsových výrobkov.

LITERATÚRA

ABDULKARIM, A. S., MURRAY, J. A. 2003. Review article: the diagnosis coeliac disease. In *Aliment. Pharmacol. Ther.*, vol. 17, 2003, no. 8, p. 987.

ANDERSON, R. P. 2008. Coeliac disease: current approach and future prospects. In *Internal Medicine Journal*, vol. 38, 2008, no. 10, p. 792.

ASGAR, A. M., FAZILAH, A., HUDA, N., RAJEEV, B., KARIM, A. A. 2010. Nonmeat Protein Alternatives as Meat Extenders and Meat Analogs. In *Comprehensive Reviews in Food Safety*, vol. 9, 2010, no. 5, p. 513-529.

BLACK, J. L., ORFILA, C. 2011. Impact of coeliac disease on dietary habits and quality of life. In *Journal of Human Nutrition and Dietetics*, vol. 24, 2011, no. 6, p. 582.

FASANO, A. 2009. Surprises from Celiac Disease. In *Scientific American*, vol. 301, 2009, no. 2, p. 54- 61.

JEMO TRADING spol. s r.o. 2010. Produktová špecifikácia: RIDASCREEN® Fast Gliadin.

FRIC, P., GABROVSKA, D., NEVORAL, J. 2011. Celiac disease, gluten- free diet, and oats. In *Nutrition Reviews*, vol. 69, 2011, no. 2, p. 108.

GUTIERREZ-ACHURY, J., COUTINHO DE ALMEIDA, R., WIJMEGA, C. 2011. Shared genetics in coeliac disease

and other immunemediated diseases. In *Journal of Internal Medicine*, vol. 269, 2011, no. 6, p. 591.

HULÍN, P., DOSTÁLEK, P., HOCHÉL, I. 2008. Metody stanovení lepkových bílkovin v potravinách. In *Chemické listy*, vol. 102, 2008, no. 5, p. 327- 337.

LUDVIGSSON, J. F., GREEN, P. H. 2011. Clinical management of coeliac disease. In *Journal of Internal medicine*, vol. 269, 2011, no. 6, p. 563.

MUKHERJEE, R., EGBUNA, I., BRAR, P., HERNANDEZ, L., MCMAHON, D. J., SHANE, E. J., BHAGAT, G., GREEN, P. H. 2010. Celiac Disease: Similar Presentations in the Elderly and Young Adults. In *Digestive Diseases and Sciences*, vol. 55, 2010, no. 11, p. 3147.

OLÉN, O., ASKLING, J., et al. 2011. Coeliac disease characteristics, compliance to a gluten free diet and risk of lymphoma by subtype. In *Digestive and Liver Disease*, vol. 43, 2011, no. 11, p. 865.

HNASKO, R., LIN, A., MCGARVEY, A. J., STANKER, L. H. 2011. A rapid method to improve protein detection by indirect ELISA. In *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 410, 2011, no. 4, p. 726.

PETR, J., MICHALIK, I., TLASKALOVÁ, H., CAPOUCHOVÁ, I., FAMĚRA, O. URMINSKÁ, D., TUČKOVÁ, L. KNOBLOCHOVÁ, H. 2003. Extention of the Spectra of Plant Products for the Diet in Coeliac Disease, In *Czech Journal of Food Science*, vol. 21, 2003, no. 2, p. 59.

SOLLID, L. M., KOSHLA. 2011. Novel therapies for coeliac disease. In *Journal of Internal Medicine*, vol. 269, 2011, no. 6, p. 604.

TATHAM, A. S., SHEWRY, P. R. 2008. Allergens in wheat and related cereals. In *Clinical and Experimental Allergy*, vol. 38, 2008, no. 11, p. 1713.

VAN ECKERT, R., BOND J., RAWSON, P., KLEIN, CH. L., STERN, M., JORDAN, T. W. 2010. Reactivity of gluten

detecting monoclonal antibodies to a gliadin reference material. In *Journal of Cereal Science*, vol. 51, 2010, no. 2, p. 199.

Výnos Ministerstva pôdohospodárstva Slovenskej republiky a Ministerstva zdravotníctva Slovenskej republiky z 18. augusta 2005 č. 1895/2004 – 100, ktorým sa vydáva hlava Potravinového kódexu Slovenskej republiky upravujúca mäsové výrobky.

Vyhláška č. 41/2009 Zb. Nariadenie Komisie (ES) z 20. januára 2009 o zložení a označovaní potravín vhodných pre osoby trpiace neznášanlivosťou gluténu.

WALKER, M. M., MURRAY, J. A. 2010. An update in the diagnosis of coeliac disease. In *Histopathology*, vol. 59, 2010, no. 2, p. 166.

WANG, X., YOUNG, O. A., KARL, D. P. 2010. Evaluation of Cleaning Procedures for Allergen Control in a Food Industry Environment. In *Journal of Food Science*, vol. 75, 2010, no. 9, p. 150.

Acknowledgments:

This article was part of the project VEGA 1/0234/2009.

Contact address:

Marcel Mati, Department of Biotechnology and Food Science, Faculty of Chemical and Food Technology, Slovak University of Technology, Radlinského 9, 812 37 Bratislava, Slovakia, E-mail: marcel.mati@gmail.com

Ladislav Staruch, Department of Biotechnology and Food Science, Faculty of Chemical and Food Technology, Slovak University of Technology, Radlinského 9, 812 37 Bratislava, Slovakia, E-mail: ladislav.staruch@stuba.sk

SENSORY EVALUATION OF FRESH CHEESE TASTE WITH THE ADDITION OF OREGANO

Adriana Pavelková, Erika Flimelová, Vladimír Vietoris

ABSTRACT

The aim of the study was to assess the sensory characteristics, especially the taste of fresh cheese with the addition of oregano. The oregano was added in the form of leachate and in the form of essences. From the methods of sensory analysis, the Time-Intensity method was selected and used for evaluation of taste of product. The samples of produced fresh cheeses were evaluated after 24 hours and vacuum-packed samples of cheeses were evaluated after 7 days storage under refrigeration. From the obtained results we can state, that in the samples with the addition of oregano leachate, were observed significant changes in taste perception of oregano after 7 days of storage compared with the results of sensory evaluation after 24 hours. In the case of application of the addition of oregano essence, significant differences were not perceived by assessors between samples of cheese after 24 hours and after 7 days storage. Thus, the essence seems to be the acceptable possibility of its use in the manufacture of fresh cheeses in comparison with the addition of the leachate.

Keywords: fresh cheese, oregano, sensory analysis, Time-Intensity

ÚVOD

Pod pojmom mlieko rozumieme vo všeobecnosti biologickú tekutinu, ktorú vylučujú mliečne žľazy rôznych druhov cicavcov, napr. kráv, oviec, kôz, byvolích kráv, tiav, lám, jakov či sobov (Mair-Waldburg et al., 2003). Mlieko a mliečne výrobky sú zdrojom cenných látok nevyhnutných pre výživu a vývoj ľudského organizmu, pre normálnu funkciu látkovej výmeny a ochranu zdravia človeka (Jamrichová, 2004; Bozaa Sanz Sampelayo, 1997). Mlieko obsahuje vodu, tuk, bielkoviny, mliečny cukor – laktózu, minerálne látky, vitamíny, enzýmy, plyny a ďalšie zlúčeniny biochemického pôvodu (Ataro et al., 2008; Keresteš a Selecký, 2005). Taktiež obsahuje vitamíny a ďalšie zložky, pričom je veľmi dôležitý pomer v akom sú živiny zastúpené (Haenlein, 1996). Mliečne výrobky sú odporúčané ako zdroj vápnika, pre udržanie kostnej hmoty, takže ich konzumáciou sa dá čiastočne predchádzať zlomeninám a osteoporóze (Kira a Maio, 2004).

Znížená spotreba syrov je u nás v posledných rokoch alarmujúca, preto je v súčasnej dobe snahou výrobcov produkovať čo najrozličnejšiu škálu syrov ochutených rôznym spôsobom. Pri výrobe nových typov syrov je nevyhnutnou súčasťou aj posudzovanie ich senzorických vlastností, ako je chuť, vôňa, textúra a pod.

Jednou z možností zvýšenia spotreby mlieka formou mliečnych výrobkov, by mohlo byť napríklad použitie korenín pri výrobe syrov. Korenie je bohaté na fenolové zlúčeniny ako sú flavonoidy a fenolové kyseliny, ktoré vykazujú širokú škálu biologicky účinkov vrátane antioxidačných a antimikrobiálnych vlastností (Matan et al., 2006; Suppakul et al., 2003). Esenciálne oleje sú aromatické masné tekutiny získané z rastlinného materiálu extrakciou, fermentáciou, lisovaním alebo inými

metódami, ale destilačná metóda je najbežnejšia metóda pre komerčnú výrobu esenciálnych olejov (Burt, 2004).

Jednou z najčastejšie používaných korenín v potravinárskom priemysle je oregano (*Origanum vulgare*), ktoré sa vyznačuje veľkou variabilitou vlastností. Hlavnými zložkami oreganového esenciálneho oleja sú karvakrol (stopy – 80 %), thymol (stopy – 64 %), γ -terpinen (2 – 52 %), p-cymén (stopy – 52 %) (Burt, 2004). Účinok oreganového esenciálneho oleja bol testovaný v potravinách ako je mäso (Tsigarida et al., 2000), šaláty (Skandamis et al., 2002), avšak sú obmedzené štúdie, ktoré sledujú antimikrobiálny účinok oreganového oleja na čerstvé potraviny (Gutierrez et al., 2009).

Priame začlenenie esenciálnych olejov do potravín môže mať za následok zníženie mikrobiologickej populácie, ale môžu byť ovplyvnené aj senzorické vlastnosti danej potraviny.

Senzorická analýza je založená na skutočnosti, že ľudské zmysly sú stimulované chemickými alebo fyzikálnymi podnetmi, ktoré je človek schopný postrehnúť svojím vnímaním (Wendin et al., 2003).

Na posudzovanie senzorickej kvality ako aj jednotlivých vlastností slúži množstvo metód a testov. Jednou z nich je aj senzorická metóda **TI (Time-Intensity)** - Metóda meranie intenzity v čase, ktorá sa aplikuje na monitorovanie intenzity danej vlastnosti vnímanej spotrebiteľom v čase (Labbe et al., 2009; McGowan et al., 2005), s možnosťou sledovania intenzity napríklad vybranej chuti v čase (Meyners, 2011).

Naša práca bola zameraná na senzorické ohodnotenie chuti čerstvých syrov s prídavkom oregana v rôznej forme pomocou senzorickej metódy Time-Intensity.

MATERIÁL A METÓDY

Čerstvé syry boli vyrobené na Katedre hodnotenia a spracovania živočíšnych produktov FBP SPU Nitra. Na výrobu syrov sa použilo mlieko s 1,5 % obsahom tuku zakúpené v obchodnej sieti. Výroba vzoriek syrov sa uskutočnila paralelne klasickým spôsobom s použitím chloridu vápenatého a syridla (Milase, CSK, Food Enrichment, Holandsko). Vzorky A a B boli získané nasledovne:

Vzorka A - prídavok výluhu oregana v množstve 0,8 % z objemu mlieka použitého na výrobu syra, pričom výluh oregana sa získal po 10 minútovom lúhovaní a následnom prefiltrovaní 5 g korenia zaliatého 150 ml 100 °C destilovanej vody. Oregano bolo zakúpené v obchodnej sieti a pochádzalo z jednej výrobnéj šarže.

Vzorka B - prídavok oreganovej esencie (NATURAL ORIGANO FLAVOUR FNB0209 SA, NACTIS Food Flavours Ingredients & Fragrances, Francúzsko) v množstve 1 % z objemu mlieka použitého na výrobu syra. Prídavok oregana bol realizovaný pred samotným syrením. Po odkvapnutí syrov (24 hodín) sa časť vzorky senzoricky zhodnotila a druhá časť vzorky sa vákuovo zabalila a senzoricky ohodnotila po 7 dňoch skladovania pri chladničkovj teplote.

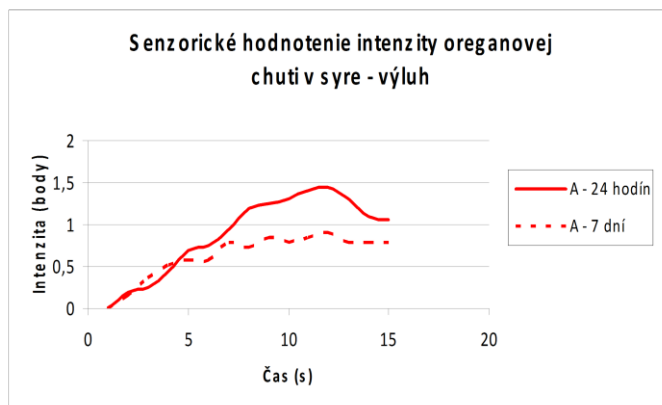
Na senzorické hodnotenie intenzity chuti sa použila metóda merania intenzity v čase TI (Time-intensity), ktorá pracuje na základe merania vnímania zvoleného atribútu (oreganová príchuť) hodnotiteľom v stanovenom časovom intervale (15 sekúnd) pomocou zvolenej bodovej stupnice (0 – 6 bodov) (Vietoris, 2010). Vzorky syrov boli senzoricky ohodnotené zamestnancami Fakulty biotechnológie a potravinárstva SPU Nitra. Získané výsledky sa štatisticky a graficky spracovali.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

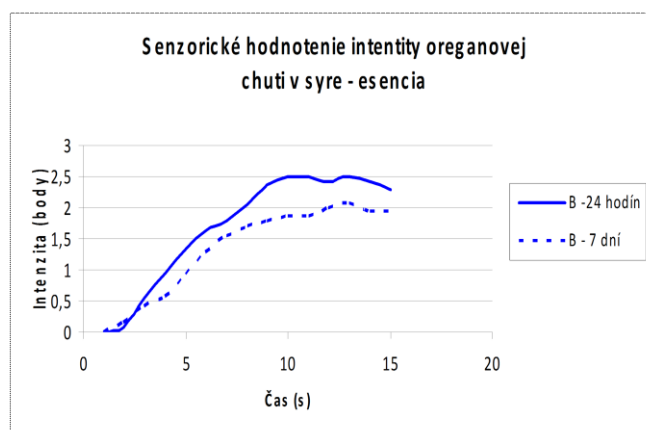
Metóda merania intenzity v čase TI je používaná pre širokú škálu výrobkov, ako napríklad pivo (King a Duineveld, 1999), víno (Ishikawa a Noble, 1995), ale aj pre sledovanie vlastností textúry mäsa (Duizer et al., 1993) alebo syrov (Wendin et al., 2003). Táto metóda je tiež užitočná pri štúdiu nových typov syrov ako sú nízkotučné syry (Fox et al., 2004), ale môže byť využitá aj pre hodnotenie syrov s novými chuťovými vlastnosťami. Metóda TI poskytuje možnosť vnímania pocitov v priebehu časového intervalu. Ak sa sleduje viac atribútov, chuť alebo textúra, je možné zobrazit' rozdiely, ktoré sa menia v čase medzi výrobkami a tak získať komplexný profil potraviny (Lawless a Heymann, 2010). Sledovanie doby intenzity pomocou metódy T-I je efektívny spôsob, ako pozorovať zmeny intenzity zvolenej senzorickej vlastnosti. Graficky popisuje vzťah medzi intenzitou atribútu a dĺžkou jeho vnímania v čase (McGowan et al., 2005).

Na obr. 1 je znázornené vnímanie intenzity oreganovej chuti realizovanej vo forme prídavku výluhu. Z porovnania hodnotení uskutočnených po 24 hodinách a po 7 dňoch skladovania vyplýva, že nastali výraznejšie zmeny vnímania chuti hodnotiteľmi, čo môže byť zapríčinené slabšou koncentráciou esenciálnych zložiek zodpovedných za typickú oreganovú príchuť vo výluhu. V prípade použitia esencie bolo vnímanie oreganovej chuti intenzívnejšie, čomu zodpovedá aj vyššie bodové ohodnotenie ako je uvedené na obr. 2. Pri posudzovaní

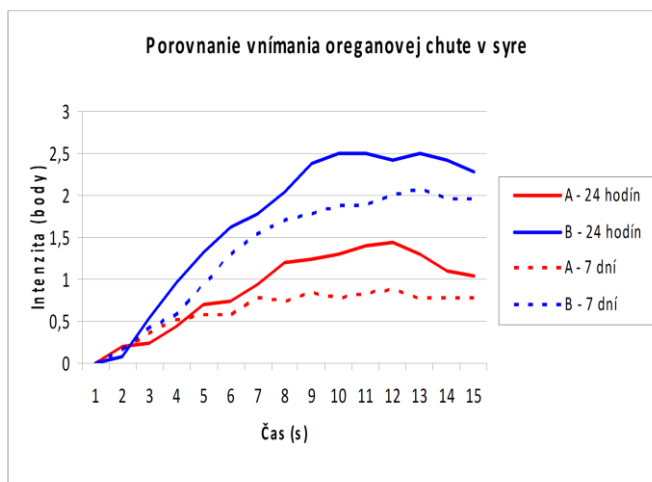
intenzity chuti po 24 hodinách a po 7 dňoch vákuového skladovania pri chladničkovj teplote bol pozorovaný intenzívnejší vývoj oreganovej chuti v čase, aj keď s určitými rozdielmi medzi jednotlivými hodnotiacimi obdobiami. Porovnaním jednotlivých vzoriek syrov hodnotených po 24 hodinách a 7 dňoch skladovania sa najlepšou intenzitou oreganovej chuti v stanovenom čase prejavoval syr s prídavkom esencie, a to ako po 24 hodinách tak aj po 7 dňoch skladovania oproti syrom s prídavkom výluhu (obr. 3).



Obr. 1 Senzorické hodnotenie intenzity oreganovej chuti v syre - výluh



Obr. 2 Senzorické hodnotenie intenzity oreganovej chuti v syre - esencia



Obr. 3 Porovnanie vnímania oreganovej chute v syre

ZÁVER

Senzorické hodnotenie je dôležitou súčasťou posudzovania potravín. Jednou z metód zmyslového vnímania rôznych vlastností, teda aj chuti, môže byť použitie metódy merania intenzity v čase. Táto metóda sa stáva čoraz rozšírenejšia pri posudzovaní senzorických vlastností pri vývoji nových výrobkov, ktorými by mohli byť syry s novými príchutami.

LITERATÚRA

- ATARO, A., MC CRINDLE, R. I., BOTHA, B. M., MC CRINDLE, C. M. E., NDIBEWU, P. P. 2008. Quantification of trace elements in raw cow's milk by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS). In *Food Chemistry*, vol. 111, 2008, no. 1, p. 243-248.
- BOZA, J., SANZ SAMPELAYO, M. R. 1997. Aspectos nutricionales de la leche de cabra. In *Anales de la Real Academia de Ciencias Veterinarias de Andalucía Oriental*, vol. 10, 1997, p. 109-139.
- BURT, P. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods -a review. In *International Journal of Food Microbiology*, vol. 94, 2004, no. 3, p. 223-253.
- DUIZER, L. M., GULLET, E. A., FINDLAY, C. J. 1993. Time-intensity methodology for beer tenderness perception. In *Journal of Food Science*, vol. 58, 1993, no. 5, p. 943-947.
- FOX, P. F., MC SWEENEY, P. L. H., COGAN, T. M., GUINEE, T. P. 2004. *Cheese Chemistry, Physics and Microbiology*. London : Elsevier Ltd. 3. ed., 2004, 617 p., ISBN 0-1226-3652-X.
- GUTIERREZ, J., BOURKE, P., LONCHAMP, J., BARRY-RYAN, C. 2009. Impact of plant essential oils on microbiological, organoleptic and quality markers of minimally processed vegetables. In *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, vol. 10, 2009, no. 2 135-2296.
- HAENLEIN, G. F. W. 1996. Nutritional value of dairy products of ewe and goat milk. In *Proceedings of the IDF/CIRVAL Seminar Production and Utilization of Ewe and Goat Milk*, vol. 9603. Crete, Greece, Internat. Dairy Fed. Publ., Brussels, Belgium, p. 159-178.
- ISHIKAWA, T., NOBLE, A. C. 1995. Temporal perception of astringency and sweetness in red wine. In *Food Quality and Preference*, vol. 6, 1995, no. 1, p. 27-34.
- JAMRICHOVÁ, S. 2004. Princípy technológie výroby tepelne ošetrovaných mliečnych výrobkov. In *Mliekárstvo*, vol. 35, 2004, no. 4, p. 23.
- KERESTEŠ, J., SELECKÝ, J. 2005. *Syrárstvo na Slovensku, história a technológia*. NIKA : Považská Bystrica, 2005, 166 p. ISBN 80-969387-9-7.
- KING, B. M., DUINEVELD, C. A. A. 1999. Changes in bitterness as beer ages naturally. In *Food Quality and Preference*, vol. 10, 1999, no. 4/5, p. 315-324.
- KIRA, C. S., MAIO, F. D. 2004. Comparison of partial digestion procedures for determination of Ca, Cr, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, P, and Zn in milk by inductively coupled plasma optical emission spectrometry. In *Journal of AOAC International*, vol. 87, 2004, no. 1, p. 151-156.
- LABBE, D., SCHLICH, P., PINEAU, N., GILBERT, F., MARTIN, N. 2009. Temporal dominance of sensations and sensory profiling: A comparative study. In *Food Quality and Preference*, vol. 20, 2009, no. 3, p. 216-221.
- LAWLESS, H. T., HEYMANN, H. 2010. *Sensory Evaluation of Food. Principle and Practices*. 2. vyd. New York : Springer, 2010. p. 179-201. ISBN 978-1-4419-6487-8.
- MAIR-WALDBURG, H., FRIEDRICH-WILHELM, E., MARKOVÁ, M., VACHULOVÁ, K., FLUBACHER, H. D., 2003. Čo je syr. *Syry: Veľká encyklopédia – všetko o syroch, Lexikón syrov, Recepty*, Bratislava : Trio Publishing, 2003, p. 7, ISBN 80-968705-1-3.
- MATAN, N., RIMKEEREE, H., MAWSON, A. J., CHOMPREEDEA, P., HARUTHAITHANASAN, V., PARKER, M. 2006. Antimicrobial activity of cinnamon and clove oils under modified atmosphere conditions. In *International Journal of Food Microbiology*, vol. 107, 2006, no. 2, p. 180-185.
- MCGOWAN, B. A., PADUA, G. W., LEE, S. Y. 2005. Formulation of Corn Zein Chewing Gum and Evaluation of Sensory Properties by the Time-Intensity Method. In *Journal of Food Science*, vol. 70, 2005, no. 5, p. 475-481.
- MEYERS, M. 2011. Panel and panelist agreement for product comparisons in studies of Temporal Dominance of Sensations. In *Food Quality and Preference*, vol. 22, 2011, no. 4, p. 365-370.
- SKANDAMIS, P. N., DAVIES, K. W., MCCLURE, P. J., KOUTSOUMANIS, K., TASSOU, C. 2002. A vitalistic approach for non-thermal inactivation of pathogens in traditional Greek salads. In *Food Microbiology*, vol. 19, 2002, no. 5, p. 405-421.
- SUPPAKUL, P., MILTZ, J., SONNEVELD, K., BIGGER, P. W. 2003. Antimicrobial properties of basil and its possible application in food packaging. In *Journal of Agricultural Food Chemistry*, vol. 51, 2003, no. 11, p. 3197-3207.
- TSIGARIDA, E., SKANDAMIS, P., NYCHAS, G. J. E. 2000. Behaviour of *Listeria monocytogenes* and autochthonous flora on meat stored under aerobic, vacuum and modified atmosphere packaging conditions with or without the presence of oregano essential oil at 5 °C. In *Journal of Applied Microbiology*, vol. 89, 2000, no. 6, p. 901-909.
- VIETORIS, V. 2010. Software TI-TDS. Release 1.1. 2010.
- WENDIN, K., JANESTAD, H., HALL, G. 2003. Modeling and analysis of dynamic sensory data. In *Food Quality and Preference*, vol. 14, 2003, no. 8, p. 663-671.

Contact address:

Ing. Adriana Pavelková, PhD., Slovak University of Agriculture, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Department of Evaluation and Processing of Animal Product, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovakia, E-mail: Adriana.Pavelkova@uniag.sk

Ing. Erika Flimelová, Slovak University of Agriculture, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Department of Evaluation and Processing of Animal Product, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovakia, E-mail: Erika.Flimelova@uniag.sk

Ing. Vladimír Vietoris, PhD., Slovak University of Agriculture, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Department of Storing and Processing Plant Products, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovakia, E-mail: vladimir.vietoris@uniag.sk

EFFECT OF DIFFERENT ENVIRONMENTAL FACTORS ON THE GROWTH DYNAMICS OF *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* IN MODEL MEDIUM

Adriana Studeničová, Alžbeta Medved'ová, Ľubomír Valík

ABSTRACT

As the strains of *S. aureus* growing during fermentation of raw milk cheeses are exposed to the competitive growth of lactic acid bacteria and their metabolites, in this work, we characterized the growth of the strain *S. aureus* 2064 isolated from such environment against of water activity values and incubation temperature. Water activity of the tested media was adjusted by NaCl in the range from 0 % to 20.72 % and the experiments were carried out at 37 °C. It was found that the strain under study showed growth until NaCl concentration of 19.95 % in PCA broth. The complete growth cessation of *S. aureus* 2064 was observed at NaCl concentration higher than 20.72 %. The effect of water activity on the *S. aureus* 2064 lag-phase duration was described by the modified Davey model with discrepancy of 24.6 %. The growth rate dependence on water activity was described more precisely and reliably by Gibson model that provided the following validation indices: bias factor 0.999 and discrepancy factor 9.6 %. Based on the results we can conclude that secondary models used in this work were suitable to predict growth of *S. aureus* 2064, originally the ewes' cheese isolate.

Keywords: *Staphylococcus aureus*, temperature, water activity

ÚVOD

Hygienická bezchybnosť surovín a následne aj potravín je jedným zo základných ukazovateľov kvality potravín a významne určuje zdravotnú neškodnosť finálnych potravinárskych výrobkov. Na aktuálnosť tejto problematiky poukazuje aj skutočnosť, že napriek všeobecne klesajúcej tendencii alimentárnych ochorení, spoločnosť ešte stále zaskakujú hromadné ochorenia, s ktorými sa nedokáže k vlastnej spokojnosti vysporiadať. V ostatnom období sa objavujú značné počty kamylobaktérióz i salmonelóz ako aj stafylokokových enterotoxikóz. Výskyt listérióz síce nie je tak častý, ale toto infekčné ochorenie sa vyznačuje vysokou závažnosťou a úmrtnosťou (Normanno et al. 2005, Valík a Prachar, 2009).

Staphylococcus aureus, predovšetkým jeho rast a produkcia enterotoxínov, predstavuje v potravinách, vzhľadom na podmienky vnútorného a vonkajšieho prostredia, potenciálne až reálne riziko ohrozenia verejného zdravia, ktoré spočíva vo vzniku stafylokokových enterotoxikóz. Podľa Aspergera a Zangerla (2003) a Kérouantona et al. (2007), je *S. aureus* po rode *Salmonella*, druhým najčastejším agens potravinových otráv vo svete. Jeho charakteristickým znakom, ktorý ho odlišuje od ostatných patogénnych baktérií, je jeho vysoká tolerancia voči nízkym hodnotám aktivity vody a koncentráciám chloridu sodného až do 20 % (Sutherland et al., 1994; Jay, 2000). Z hľadiska produkcie termostabilných enterotoxínov, sa požiadavky na hodnoty aktivity vody pohybujú približne v tom istom rozpätí, ako hodnoty povoliujúce rast ich producenta. V potravinách so zníženou hodnotou aktivity vody a za aeróbnych podmienok, sa produkcia enterotoxínov

pozoruje v rozsahu hodnôt 0,89 až 0,86 a_w (Ewald a Notermans, 1998).

S. aureus existuje s človekom vo vzťahu blízkom komenzálnemu, napr. na koži alebo na slizniciach nespôsobuje ťažkosti približne u tretiny ľudí. Stačí však seba menšia porucha prirodzenej odolnosti a prejaví sa ako patogén (Votava et al., 2003) spôsobujú ochorenia gastrointestinálneho, urogenitálneho alebo kardiovaskulárneho systému.

Cieľom tejto práce bolo popísať dynamiku rastu *Staphylococcus aureus* 2064, izolátu z ovčieho hrudkového syra v závislosti od koncentrácie NaCl, vyjadrenej prostredníctvom hodnoty aktivity vody (a_w = 0,99 až 0,83) v GTK bujone pri optimálnej teplote 37 °C. Ďalším zámerom bolo aplikovať na získané rastové parametre vhodné sekundárne modely a matematicko-statisticky ich validovať.

MATERIÁL A METÓDY

Mikroorganizmus. Izolát *S. aureus* 2064 pochádza z ovčieho hrudkového syra a bol izolovaný na Štátnom veterinárnom a potravinovom ústave v Prešove MVDr. A. Hanzélyovou. Jeho totožnosť bola potvrdená pomocou Gramovho farbenia, katalázového testu, API systému (BioMérieux, Marcy l'Étoile, Francúzsko), fluorescenčného farbenia VIT-Staphylococcus (Vermicon, Mnichov, Nemecko) a PCR analýzy v súlade s prácami Akinedena et al. (2007), Boynukara et al. (2008) a Pereiru et al. (2009).

Inokulácia a inkubácia. Do predtemperovaného GTK bujónu (IMUNA, Šarišské Michaľany, Slovensko) s nastavenou hodnotou aktivity vody sme inokulovali čistú 18 h kultúru *S. aureus* 2064 vyrastenú na GTK agare (IMUNA, Šarišské Michaľany, Slovensko) pri 37 °C, tak

aby sme v každej paralelke dosiahli počiatočnú denzitu mikroorganizmu približne 10^3 KTJ.ml⁻¹. Paralelne inokulované vzorky živných médií boli staticky aeróbne kultivované pri teplote 25 ± 1 °C, za účelom popísania dynamiky rastu *S. aureus* 2064 v závislosti od meniacej sa hodnoty aktivity vody. Hodnota aktivity vody bola nastavená prídavkom NaCl (Sigma-Aldrich, Buchs, Švajčiarsko) podľa **Rödela et al. (1979)** a kontrolovaná použitím a_w -metra (Nowasina, Lachen, Švajčiarsko).

Stanovenie počtu *S. aureus* 2064 v GTK bujóne. V príslušne stanovených časových intervaloch sme odoberali príslušné množstvá na stanovenie denzity *S. aureus* 2064 na GTK agar podľa STN ISO 4833, pričom sme pri každom vyhodnocovaní sledovali charakteristické kolónie, ktorých morfológia bola overená aj mikroskopicky. Zo zistených počtov mikroorganizmov sme zostrojili rastové čiary v závislosti od času a teploty inkubácie podľa Baranyiho D-modelu (**Baranyi et al., 1993**).

Sekundárne modelovanie. Sekundárne modely sú konštruované tak, aby popísali závislosť faktorov a podmienok životného prostredia na parameter rastu. Maximálna rastová rýchlosť a lag-fáza, ktoré odhadujú výšku krivky boli modelované ako funkcia hodnoty aktivity vody. Na tento typ modelovania bola použitá užitočná transformácia aktivity vody $b_w = \sqrt{1 - a_w}$,

zavedená **Gibsonovou et al. (1994)**, ktorá predpokladá, že optimálna hodnota aktivity vody je menšia ako $a_w = 1$ (**Valík a Piecková, 2001**). Následne je prirodzený logaritmus špecifickej rastovej rýchlosti modelovaný podľa nasledovnej kvadratickej funkcie:

$$\ln \mu = C_0 + C_1 b_w + C_2 b_w^2 \quad (1)$$

Na popísanie závislosti lag-fázy od inkubačnej teploty a aktivity vody bol použitý Davey-ov model, ktorý rozšíril Arrheniov typ modelu o vplyv teploty a vodnej aktivity. Tento model má nasledovnú formu:

$$\ln k = C_0 + \frac{C_1}{T} + \frac{C_2}{T^2} + C_3 a_w + C_4 a_w^2 \quad (2)$$

kde k je rastová rýchlosť, a_w je hodnota aktivity vody, T je teplota a $C_0, \dots, C_4$ sú neznáme koeficienty (**Ross a McMeekin, 1994; Daughtry et al., 1997**).

Validácia rastových parametrov. Na validáciu matematických modelov popisujúcich ich presnosť a správnosť v porovnaní s experimentálnymi výsledkami boli využité dva indexy a to index presnosti A_f a index spoľahlivosti B_f na základe ktorých môžeme jednotlivé modely medzi sebou porovnávať (**Baranyi et al., 1999**). Taktiež sa využíva index percenta diskrepancie označovaný ako D_f .

$$A_f = \exp \left(\sqrt{\frac{\sum_{k=1}^m [\ln f(x^k) - \ln(\mu^k)]^2}{m}} \right) \quad (3)$$

$$B_f = \exp \left(\sqrt{\frac{\sum_{k=1}^m [\ln f(x^k) - \ln(\mu^k)]}{m}} \right) \quad (4)$$

$$D_f = (A_f - 1) \times 100 \quad (5)$$

kde μ je maximálna špecifická rýchlosť ako funkcia faktorov prostredia, $x = (x_1, x_2, \dots, x_n)$ je vektor faktorov prostredia a m je počet meraní.

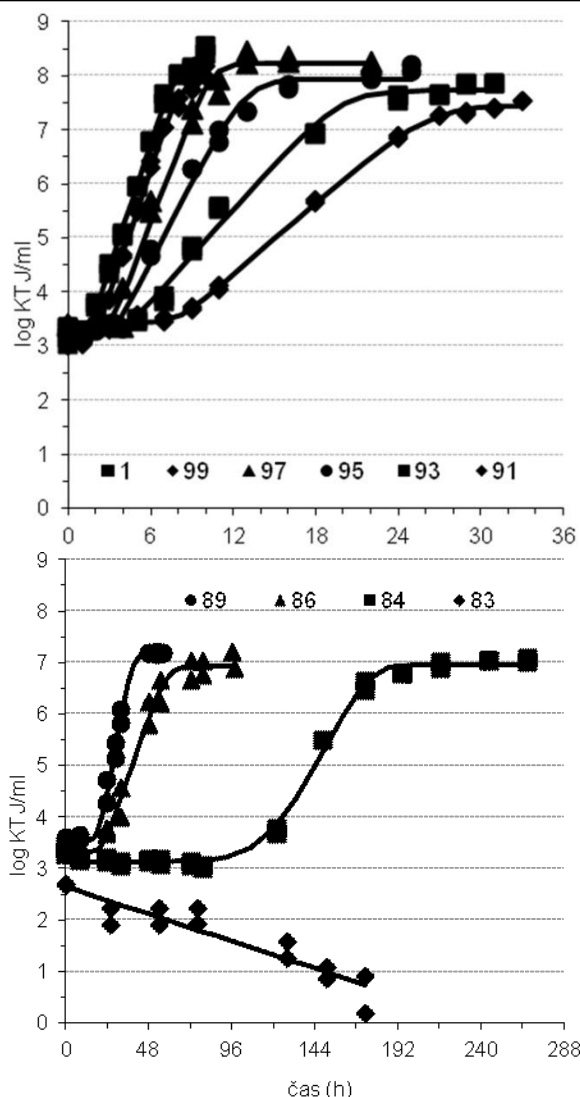
VÝSLEDKY A DISKUSIA

Dynamika rastu *Staphylococcus aureus* 2064 v závislosti od aktivity vody pri 37 °C

Staphylococcus aureus môže rásť v širokom rozmedzí podmienok prostredia a následne kontaminovať potraviny. Pri príprave potravín a pri manipulácii s nimi môže kontaminácia *S. aureus* pochádzať z rôznych surovín (napr. mastitídne mlieko), z prostredia spracovateľského závodu alebo z ľudskej činnosti (**Le Loir et al., 2003**). V tejto súvislosti je vhodné poznať a definovať podmienky, ktoré vedú k inhibícii *S. aureus* a teda aj prípadnej produkcii termostabilných enterotoxínov. Nakoľko soľ je pri výrobe potravín nevyhnutná a v nadväznosti na prácu **Medved'ovej (2009)**, v ktorej bol popísaný vplyv teploty na sledovaný izolát, sme sa v našej práci zamerali na sledovanie dynamiky rastu *S. aureus* 2064 v závislosti od aktivity vody v modelovom prostredí GTK bujónu pri jeho optimálnej rastovej teplote 37 °C.

Grafické znázornenie rastových čiar *S. aureus* 2064 v závislosti od meniacich sa hodnôt aktivity vody pri teplote 37 °C v GTK bujóne je uvedené na **obr. 1**. V médiu bez prídavku soli, t.j. pri a_w 0,993 sledovaný mikroorganizmus sa množil za daných podmienok rýchlosťou 0,780 log KTJ.ml⁻¹.h⁻¹ s odpovedajúcim časom zdvojenia 23 minút a v stacionárnej fáze sa oproti počiatočným počtom pomnožil až o 5 log poriadkov. **Sutherland et al. (1994)** uvádzajú, že *S. aureus* sa pri 37 °C a bez NaCl rozmnožoval s časom zdvojenia 23 minút, čo je identická hodnota, aká bola vypočítaná pre náš kmeň 2064. Tento pri teplote 35 °C v mlieku dosahoval rastovú rýchlosť 0,722 log KTJ.ml⁻¹.h⁻¹, čo bola porovnateľná hodnota s rastovou rýchlosťou bez prídavku soli (**Medved'ová et al., 2009**).

Postupným zvýšením koncentrácie NaCl na 8 % ($a_w = 0,947$) sme pozorovali nárast počtov buniek *S. aureus* 2064 v stacionárnej fáze oproti počiatočným počtom o 5 logaritmickej poriadkov, pričom rastová rýchlosť klesla oproti predchádzajúcej hodnote 1,6-násobne na $G_{R,8} = 0,485$ log KTJ.ml⁻¹.h⁻¹ (čas zdvojenia $t_d = 0,62$ h). **Charlier et al. (2009)** uviedli, že *S. aureus* sa pri 37 °C, pH 7,5 a 8 % prídavku NaCl v tryptón-kazeín-sójovom bujóne rozmnožoval rastovou rýchlosťou 0,740 log KTJ.ml⁻¹.h⁻¹ ($t_d = 0,41$ h). Pri tých istých environmentálnych podmienkach, ale v tryptón-sójovom bujóne zaznamenal **Sutherland et al. (1994)** rastovú rýchlosť 0,188 log KTJ.ml⁻¹.h⁻¹ ($t_d = 1,6$ h), čo je porovnateľná hodnota, akou sa množil izolát 2064 pri 13 % prídavku NaCl do GTK bujónu ($a_w = 0,913$). Pri tejto koncentrácii chloridu sodného sa daný stafylokok dokázal pomnožiť už len o 4 log poriadky a po približne 1,5 dňoch



Obr. 1: Dynamika rastu *S. aureus* 2064 v GTK bujóne pri teplote 37 °C v závislosti od hodnoty aktivity vody

(33 h) trvajúcom experimente dosiahol svoje maximálne počty na úrovni $N_{\max} = 3,5 \cdot 10^7$ KTJ.ml⁻¹.

Ako výsledok postupne zhoršujúcich sa kultivačných podmienok sme zaznamenávali aj znižovanie maximálnych nárastov buniek *S. aureus* 2064 v stacionárnej fáze oproti počiatočným počtom. A tak pri 20 % prídavku NaCl, čomu odpovedá $a_w = 0,840$, sme po 11 dňoch zaznamenali nárast izolátu 2064 len o 3 log poriadky, na konečné počty $N_{\max} = 1,1 \cdot 10^7$ KTJ.ml⁻¹. Prirodzene sa aj znížila rastová rýchlosť a dosiahla hodnotu $G_{R,20} = 0,066$ log KTJ.ml⁻¹.h⁻¹ ($t_d = 4,6$ h), čím bola 3,3-násobne menšia ako pri predchádzajúcom prídavku soli.

Prídavok NaCl 21 % ($a_w = 0,830$) predstavoval neprekonateľnú bariéru pre rast *S. aureus* 2064 a preto sme po 173 h (7 d) od začiatku trvania pokusu pozorovali postupné odumieranie buniek študovaného izolátu, čo sa prejavilo aj na záporných hodnotách rastových rýchlostí.

Schopnosť baktérií rásť pri vysokých koncentráciách soli súvisí s ich schopnosťou prispôbiť sa osmotickému stresu intracelulárnou akumuláciou betaínu, trehalózy, prolínu, karnitínu atď., ktoré sa môžu vyskytovať prostredníctvom *de novo* syntézy alebo prostredníctvom

transportu z rastového média (Wood et al., 2001). Tieto zlúčeniny pôsobia ako osmolyty, ktoré znižujú straty intracelulárnej vody osmózou a ich koncentrácia v bunke je jedným z hlavných faktorov určujúcich začatie rastu v prostredí s vysokým obsahom soli (Koutsoumanis, 2008).

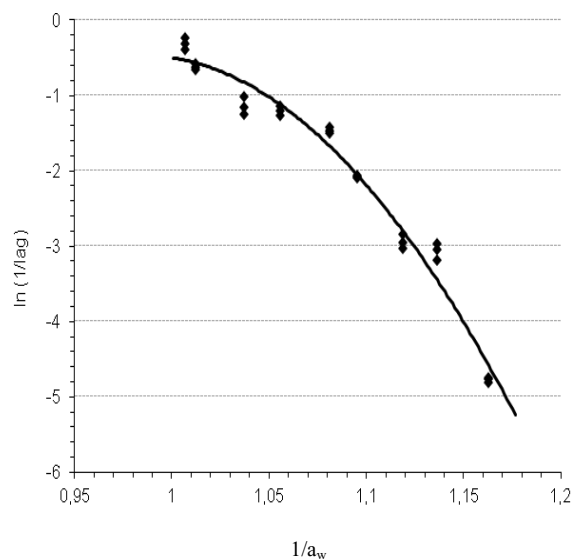
Tab. 1 Rastové parametre *S. aureus* 2064 v GTK bujóne pri teplote 37 °C

% NaCl	a_w	lag-fáza [h]	G_r [log KTJ.ml ⁻¹ .h ⁻¹]
0	0,993	1,4	0,780
1,72	0,988	1,9	0,774
5,0	0,964	3,2	0,677
7,95	0,947	3,3	0,485
10,6	0,925	4,3	0,284
13,05	0,913	8,0	0,221
15,25	0,894	19,0	0,185
18,17	0,869	21,0	0,097
19,95	0,840	117,5	0,066
20,72	0,830	-	-0,011

Vplyv aktivity vody a inkubačnej teploty na lag-fázu *Staphylococcus aureus* 2064

Vplyv vonkajších faktorov prostredia na dĺžku trvania lag-fázy bol predmetom sekundárneho modelovania. Daughtry et al. (1997) prispôbili Davey-ov model na popisovanie vplyvu inkubačnej teploty na trvanie lag-fázy. V tomto modeli sme nahradili teplotu parametrom aktivity vody a následne aplikovali na získané výsledky.

Pri pohľade na vyššie popísané rastové čiary a ich grafické znázornenie na obr. 2 je zrejmé, že čím bola hodnota aktivity vody vyššia, tým sa dĺžka trvania lag-fázy daného izolátu *S. aureus* 2064 v GTK bujóne pri teplote 37 °C postupne skracovala. Prirodzene najkratšia lag-fáza bola pozorovaná bez prídavku soli a trvala len 1,4 h.



Obr. 2 Závislosť vplyvu aktivity vody na trvanie lag fázy *S. aureus* 2064 v GTK bujóne pri 37 °C

Charlier et al. (2009) uvádzajú hodnotu trvania lag-fázy pre *S. aureus* v tryptón-kazeín-sójovom bujóne pri teplote 37 °C a 0,5 % prídavku NaCl dĺžku trvania lag-fázy 1 h, čo je porovnateľná hodnota. Ak sme zvýšili prídavok soli na 5 %, trvanie lag-fázy sa predĺžilo 2-násobne na 3 h, pri 13 % prídavku NaCl sa lag-fáza predĺžila na 8 h, pri 18 % koncentrácii soli dosahovala až 21 h. Prirodzene najdlhšia lag-fáza bola sledovaná pri 20 % prídavku soli, kedy daný kmeň 2064 začal rásť po približne 5 dňoch trvajúcej lag-fáze.

Vplyv aktivity vody na trvanie lag-fázy izolátu 2064 pri 37 °C bol popísaný pomocou nasledovnej kvadratickej rovnice a mieru nepresnosti daného modelu sme vyjadrili definovaním príslušných validačných koeficientov $A_f = 1,246$, $B_f = 0,999$, $D_f = 24,6$ % a aj pomocou korelačného koeficientu $R^2 = 0,973$.

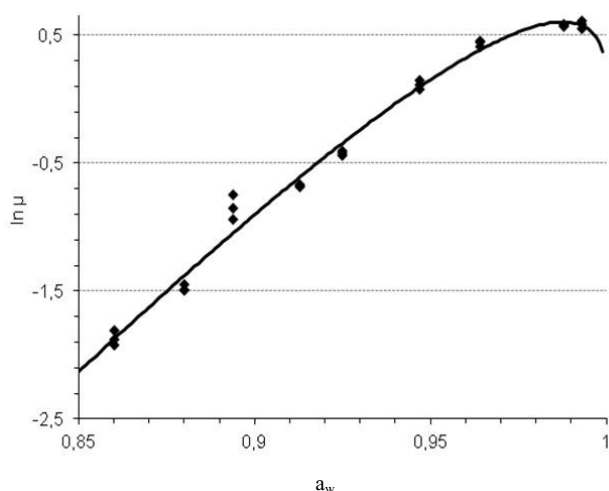
$$\ln(1/\text{lag})_{37} = 129,9a_w^2 + 255,9a_w - 126,6$$

Vplyv aktivity vody a inkubačnej teploty na rastovú rýchlosť *S. aureus* 2064

Vplyv aktivity vody na rastovú rýchlosť *S. aureus* pri inkubačnej teplote 37 °C v GTK bujóne bol popísaný prostredníctvom Gibsonovej transformovaného modelu (Gibson et al., 1994), pričom jeho grafické znázornenie je zobrazené na obr. 3. Z uvedeného obrázku vyplýva, že so zvyšujúcou sa hodnotou aktivity vody je rastová rýchlosť vyššia, pričom svoje maximum dosiahne pri nulovom prídavku NaCl. Postupným zvyšovaním prídavkov NaCl dochádzalo k spomaľovaniu rastu *S. aureus* 2064, teda pri 8 % prídavku soli sa rastová rýchlosť spomalila 1,6-násobne, pri 13 % koncentrácii 3,5-násobne a pri 18 % prídavku 8-násobne oproti rastovej rýchlosti v médiu bez prídavku soli. Najpomalší rast daného mikroorganizmu sme pozorovali pri 20 % prídavku soli, pričom spomalenie jeho rastu bolo až 12-násobné.

Vplyv aktivity vody na rastovú rýchlosť *S. aureus* 2064 pri 37 °C bol popísaný prostredníctvom nasledovnej rovnice s pomerne vysokým korelačným koeficientom $R^2 = 0,988$, indexom presnosti $A_f = 1,096$, indexom spoľahlivosti $B_f = 0,999$ a chybou stanovenia $D_f = 9,6$ %.

$$\ln(\mu)_{37} = -35,936a_w^2 + 8,01a_w + 0,159$$



Obr. 3 Závislosť vplyvu aktivity vody na rastovú rýchlosť *S. aureus* 2064 v GTK bujóne pri 37 °C

ZÁVER

V práci sa potvrdila skutočnosť, že *S. aureus* 2064 pri teplote 37 °C rástol v GTK bujóne v širokej oblasti a_w . Jeho rast sa prirodzene so zvyšujúcou koncentráciou NaCl významne ovplyvňoval, čo sa prejavilo aj na predlžovaní trvania lag-fázy a znižovaním rastovej rýchlosti v exponenciálnej fáze. Po dosiahnutí maximálnej koncentrácie soli v rastovom médiu sme pozorovali zastavenie rastu mikroorganizmu a v ďalšej fáze dochádzalo k úbytku životaschopných buniek, čo sa prejavilo v záporných hodnotách rastových rýchlostí. Na základe získaných výsledkov možno konštatovať, že ku kompletnej redukcii počtov *S. aureus* 2064 dochádzalo pri teplote 37 °C v GTK bujóne až pri 21 % koncentrácii chloridu sodného. Rastové parametre boli v poradí rastovej rýchlosti a lag-fázy popísané Gibsonovej a Davey-ovým modelom. Za účelom zistenia vhodnosti použitých modelov na predpovedanie rastu *S. aureus* boli jednotlivé závislosti podrobené vnútornej validácii. Z uvedených skutočností možno konštatovať, že sekundárne modely použité v našej práci sú vhodné na predpovedanie dynamiky rastu *S. aureus* v modelovom prostredí. Ich použitím sa získajú presné a spoľahlivé výsledky v rámci intervalu validačných koeficientov.

LITERATÚRA

- AKINEDEN, Ö., HASSAN, A. A., SCHNEIDER, E., USLEBER, E. 2007. Enterotoxinogenic properties of *Staphylococcus aureus* isolated from goats' milk cheese. In *International Journal of Food Microbiology*, vol. 124, 2007, p. 211-216.
- ASPERGER, H., ZANGERL, P. 2003. *Staphylococcus aureus*. *Encyclopedia of Dairy Sciences*. Academic Press, 2003, p. 2563-2569.
- BARANYI, J., PIN, C., ROSS, T. 1999. Validating and comparing predictive models. In *International Journal of Food Microbiology*, vol. 48, 1999, p. 159-166.
- BARANYI, J., ROBERTS, T. A., MCCLURE, P. 1993. A non-autonomous differential equation to model bacterial growth. In *Food Microbiology*, vol. 10, 1993, p. 43-59.
- BOYNUKARA, B., GULHAN, T., ALISARLI, M., GURTURK, K., SOLMAZ, H. 2008. Classical enterotoxinogenic characteristics of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine subclinical mastitis in Van, Turkey. In *International Journal of Food Microbiology*, vol. 125, 2008, p. 209-211.
- CHARLIER, C., CRETENET, M., EVEN, S., Le LOIR Y. 2009. Interactions between *Staphylococcus aureus* and lactic acid bacteria: an old story with new perspectives. In *International Journal of Food Microbiology*, vol. 18, 2009, p. 197-203.
- DAUGHTRY, B. J., DAVEY, K. R., KING, K. D. 1997. Temperature dependence of growth kinetics of food bacteria. In *Food Microbiology*, vol. 14, 1997, p. 21-30.
- EWALD, S., NOTERMANS, S. 1998. Effects of water activity on growth and enterotoxin D production of *Staphylococcus aureus*. In *International Journal of Food Microbiology*, vol. 6, 1998, p. 25-30.
- GIBSON, A., BARANYI, J., PITT, J. I., EYLES, M. J., ROBERTS, T. A. 1994. Predicting fungal growth the effect of water activity on *Aspergillus flavus* and related species. In *International Journal of Food Microbiology*, vol. 23, 1994, p. 419-431.

- JAY, J. M. 2000. Staphylococcal Gastroenteritis. In JAY, J. M. *Modern Food Microbiology*. 6th ed. Gaithersburg: Aspen Publishers, Inc., vol. 23. 2000. ISBN 0-8342-1671-X, p. 441-459.
- KÉROUANTON, A., HENNEKINNE, J. A., LETERTRE, C., PETIT, L., CHESNEAU, O., BRISABOIS, A., DE BUYSER, M. L. 2007. Characterization of *Staphylococcus aureus* strains associated with food poisoning outbreaks in France. In *International Journal of Food Microbiology*, vol. 115, 2007, p. 369-375.
- KOUTSOUMANIS, K. 2008. A study of the variability in the growth limits of individual cells and its effect on the behavior of microbial populations. In *International Journal of Food Microbiology*, vol. 128, 2008, p. 116-121.
- LE LOIR, Y., BARON, F., GAUTIER, M. 2003. *Staphylococcus aureus* and food poisoning. In *Genetics and Molecular Research*, vol. 2, 2003, no. 1, p. 63-76.
- MEDVEĐOVÁ, A. 2009. Aplikácia kvantitatívnej a prediktívnej mikrobiológie pri zvyšovaní hygienickej bezchybnosti potravín. Dizertačná práca. Bratislava, 2009, 179 p.
- MEDVEĐOVÁ, A., VALÍK, E., STUDENIČOVÁ, A. 2009. The effect of temperature and water activity on the growth of *Staphylococcus aureus*. In *Czech Journal of Food Sciences*, vol. 27, 2009, p. 28-35.
- NORMANNO, G., FIRINU, A., VIRGILIO, S., MULA, G., DAMBROSIO, A., POGGIU, A., DECASTELLI, L., MIONI, R., SCUOTA, S., BOLZONI, G., DI GIANNATALE, E., SALINETTI, A. P., LA SALANDRA, G., BARTOLI, M., ZUCCON, F., PIRINO, T., SIAS, S., PARISI, A., QUAGLIA, N. C., CELANO, G. V. Coagulase-positive Staphylococci and *Staphylococcus aureus* in food products marked in Italy. In *International Journal of Food Microbiology*, 2005, vol. 98, p. 73-79.
- PEREIRA, V., LOPES, C., CASTRO, A. SILVA, J., GIBBS, P., TEIXEIRA, P. 2009. Characterization for enterotoxin production, virulence factors, and antibiotic susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolates from foods in Portugal. In *Food Microbiology*, vol. 26, 2009, p. 278-282.
- PINTO, B., CHENOLL, E., AZNAR, R. 2005. Identification and typing of food-borne *Staphylococcus aureus* by PCR-based techniques. In *Systematic and Applied Microbiology*, vol. 28, 2005, p. 340-352.
- RÖDEL, W., KRISPEN, K., LEISTNER, L. 1979. Measuring the water activity (a_w -value) of meat and meat products. In *Fleischwirtschaft*, vol. 59, 1979, p. 849-851.
- ROSS, T., McMEEKIN, T. A. 1994. Predictive microbiology, review paper. In *International Journal of Food Microbiology*, vol. 23, 1994, p. 241-264.
- STN ISO 4833. Mikrobiológia: Všeobecné pokyny na stanovenie celkového počtu mikroorganizmov. Metóda počítania kolónii kultivovaných pri 30 °C. Bratislava: Slovenský ústav technickej normalizácie, 1997, 9 p.
- SUTHERLAND, J. P., BAYLISS, A. J., ROBERTS, T. A. 1994. Predictive modelling of growth of *Staphylococcus aureus*: the effects of temperature, pH and sodium chloride. In *International Journal of Food Microbiology*, vol. 21, 1994, p. 217-236.
- VALÍK, E., PIECKOVÁ, E. 2001. Growth modelling of heat-resistant fungi: the effect of water activity. In *International Journal of Food Microbiology*, vol. 63, 2001, p. 11-17.
- VALÍK, E., PRACHAR, V. 2009. *Pôvodcovia ochorení z požívatin a minimalizácia ich rizika*. 1. vyd. Bratislava: Nakladateľstvo STU, 2009. 167 p. ISBN 978-80-227-3200-0.
- VOTAVA, M. 2003. Stafylokoky koagulasopozitívni. In VOTAVA, M. et al. *Lékařská mikrobiologie speciální*. Brno: Neptun, 2003. ISBN 80-902898-6-5, p. 100-106.
- WOOD, J. M., BREMER, E., CSONKA, L. N., KRAEMER, R., POOLMAN, B., VAN DER HEIDE, T., SMITH, L. T. 2001. Osmosensing and osmoregulatory compatible solute accumulation by bacteria. In *Journal of Comparative Biochemistry and Physiology*, vol. 130, 2001, p. 437-460.

Acknowledgments:

This work was supported by the Slovak Research and Development Agency under the contract No. APVV-0590-10 and by the Ministry of Education of the Slovak Republic Project No. VEGA 1/0094/10.

Contact address:

Adriana Studeničová, Institute of Biochemistry, Nutrition and Health Protection, Faculty of Chemical and Food Technology, Slovak University of Technology in Bratislava, Radlinského 9, 812 37 Bratislava, Slovakia, E-mail: adriana.studenicova@stuba.sk.

Alžbeta Medveďová, Institute of Biochemistry, Nutrition and Health Protection, Faculty of Chemical and Food Technology, Slovak University of Technology in Bratislava, Radlinského 9, 812 37 Bratislava, Slovakia, Email: alzbeta.medvedova@stuba.sk.

Lubomír Valík, Institute of Biochemistry, Nutrition and Health Protection, Faculty of Chemical and Food Technology, Slovak University of Technology in Bratislava, Radlinského 9, 812 37 Bratislava, Slovakia, Email: lubomir.valik@stuba.sk.

MOLECULAR PROPERTIES OF SELECTED POLYSACCHARIDES DETERMINED BY SEC CHROMATOGRAPHY AND THEIR IMPACT ON WATER ABSORPTION OF WHEAT FLOUR

Marián Tokár, Krzysztof Buksa, Halina Gambuś, Tatiana Bojňanská, Eva Ivanišová

ABSTRACT

Chemical composition and solubility in water of selected polysaccharides as β -glucan, arabinoxylan and inulin preparation were determined. All these preparation were of good purity, they consist of at least 71% of polysaccharide of interest. Solubility in water was the highest in the case of inulin and the lowest in the case of β -glucan. Molecular properties of examined preparations were determined by SEC chromatography. β -glucan and arabinoxylan were of much higher molecular mass than inulin. Molecular mass of examined polysaccharides was correlated with increase of water absorption of the flour caused by 2% addition of each polysaccharide.

Keywords: inulin, beta-glucan, arabinoxylan, SEC analysis

INTRODUCTION

Size exclusion chromatography (SEC) is presently the most popular method in the analysis and characterization of both synthetic and biopolymers. SEC became a conventional method for determination of molecular mass distributions of numerous polymeric materials such as polysaccharides. The knowledge of molecular mass and its distribution for polymeric materials is necessary to estimate their processability and basic utility properties (Trathnigg, 2000).

β -glucan, arabinoxylan and inulin are popular non starch polysaccharides. β -glucan and arabinoxylan are the most important fraction of dietary fiber whereas inulin is the reserve polysaccharide of several plants.

Cereal β -glucan (BG) is a polysaccharide, which consists of linear chains of β -D-glucopyranosyl units linked via (1 $\rightarrow$ 3) and (1 $\rightarrow$ 4) linkages. β -glucan is acknowledged as a functional and bioactive food ingredient (Lazaridou, Biliaderis and Izydorczyk, 2007). The functional properties are related to its solution behavior. β -glucan has the ability to form viscous solutions and increase water absorption of the dough. β -glucan molecules have the ability to self-associate and form aggregates, which may contribute to increased viscosity (Cui and Wang, 2009; Wood, 2004).

Arabinoxylan (AX) is a major component of the cell walls of wheat and rye, consisting of a linear backbone of (1 $\rightarrow$ 4)-linked β -D-xylopyranose units. The xylose units can be either unsubstituted or mono- or di-substituted with L-arabinofuranose (Cleemput et al., 1993; Izydorczyk and Biliaderis, 1995). Other substituents, including glucuronic acids, D-galactose and/or hydroxycinnamic acids (mainly ferulic acid) may also be present (Izydorczyk and Biliaderis, 1995).

In general, arabinoxylans are classified as water extractable AX (WE-AX) or water unextractable AX (WU-AX) (Courtin & Delcour, 2002). Arabinoxylans

influence dough rheology in similar way to β -glucan increasing water absorption of the flour.

Inulin consists primarily of β (2 $\rightarrow$ 1) fructosyl fructose units with commonly a reducing end formed in an individual glucopyranose unit (Stevens, Meriggi, & Booten, 2001). This structural singularity raises its interesting properties like beneficial nutritional attributes, which in turn excites the chemical modification of inulin in recent years (Beylot, 2005).

Inulin has a significant effect on the rheological properties of dough in depending on the added amount (Tokár et al., 2011). From the technological point of view addition of preparation of these polysaccharides to the dough may influence its properties such as water absorption. Moreover there is relationship between molecular properties of these polysaccharides and ability to bind water.

The aim of this research work was to determine molecular properties of inulin, BG and AX preparation and their influence on water absorption of wheat flour.

MATERIAL AND METHODOLOGY

Three kinds of preparations of beta-glucan, inulin and arabinoxylan were examined using SEC chromatography. Innovative β -glucan preparations (BG-1 and BG-2) were obtained from polish producer the Futurum company. Preparation of beta glucan (BG-Ch) was also obtained from Chinese producer. Inulin was obtained from Dera Food Technology company. Innovative rye arabinoxylan preparation was isolated by laboratory method (Buksa et al., 2010).

Sugar composition of selected polysaccharides was determined by HPLC/RI analysis. Samples were hydrolyzed using 2M H_2SO_4 (100°C, 2h), neutralized, filtered through 0,45 μ m filter and applied on HPLC column system. Glucose, xylose, arabinose and fructose solutions were used as a standard.

Free sugars after dissolving in water for 24h at 50°C were determined using anthronemethod (Morris, 1948).

Molecular mass distribution profiles were performed by SEC analysis. SEC system consist of 2 columns filled with Sephacryl gels (Pharmacia) with dimension of S-200, 37 x 1,6 cm and S-500, 46 x 1,6, peristaltic pump (Pharmacia) and fraction collector. 0,32% Na₂CO₃ solution was used as eluent and flow rate was 0,429 cm³/min. Calibration curve was measured using pullulans with known molecular mass P-10, 50, 200, 400, 800 (Shodex Standard, Macherey-Nagel) and glucose. Preparation were dissolved 24h in 0,32% Na₂CO₃ at 50 °C, centrifuged 5 min at 12000 x g and applied on column system. In collected after analysis fractions total carbohydrate was determined by anthrone method (Moris, 1948). Glucose was used for calibration of polysaccharides concentration. Weight average molecular mass M_w , number average molar mass M_n and polydispersity index (PDI) were calculated from mass distribution.

RESULTS AND DISCUSSION

Basic chemical composition of examined preparation was presented in table 1. All preparation were of good quality. β -glucan preparation consisted of 72 to 83% of glucose which is component of beta glucan.

Arabinoxylan preparation was composed of arabinose and xylose content determined as 71% and small amount of glucose. Inulin preparation was composed of 92% of fructose and 9,6% of glucose, which both are components of inulin. The solubility in water (50°C) of isolated polysaccharides present in preparation was almost 100% in the case of arabinoxylan and inulin and slightly worse in the case of β -glucan preparation.

Water absorption of wheat flour type 650 with addition of 2% of each preparation (added before mixing, in the place of 2% of the flour) compared to flour without any additives showed that using of β -glucan and arabinoxylan preparation resulted in strong increase of water absorption determined by farinograph. Otherwise inulin addition resulted in no change of water absorption of the flour.

Determination of molecular mass distribution profiles by SEC analysis (fig. 1) and calculation of molecular properties (tab. 2) of examined polysaccharides showed that inulin was of smaler average molecular mass than arabinoxylan and β -glucan. Extensive molecules of β -glucan and arabinoxylan were responsible for higher water absorption of examined flour with addition of these compounds. Otherwise much smaller molecules of inulin did not influenced water absorption.

Tab. 1 Basic chemical composition of preparation

	Total sugar content [%]				Water soluble sugar content [%]	Increase of water absorption [%]**
	glu	xyl	ara	fru		
BG-1	83±1,2	-	-	-	70,0	8,9
BG-2	72±1,7	-	-	-	67,2	-
BG-Ch	76±1,5	-	-	-	61,9	-
Arabinoxylan	3,8±0,5	53,3±0,6	38,1±0,4	-	73	6,9
Inulin	9,6±0,3	-	-	92±3,5	100*	0

* - declared by producer

** - estimated by farinograph on flour type 650, with 58,5% WA as the difference between water absorption of the flour without and with 2% addition of each preparation

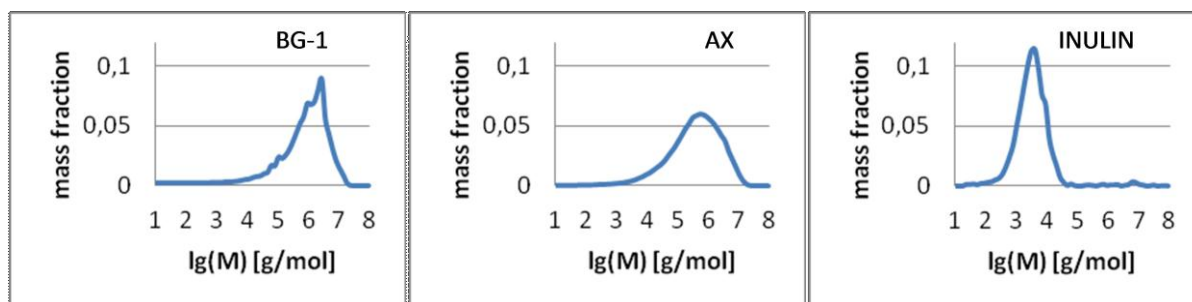


Fig. 1 Molecular mass distribution profiles of β -glucan (BG-1), arabinoxylan (AX) and inulin determined by SEC analysis

Tab. 2 Molecular properties of examined preparations

	BG-1	BG-2	BG-Ch	AX	INULIN
M_n [g/mol]	8 506	9 652	7 848	16 949	1 724
M_w [g/mol]	1 754 092	958 351	308 610	1 208 462	85 459
PDI	206	99	39	71	50

CONCLUSION

All examined preparations were of good purity. Innovative β -glucan preparation was better purified than commercially available preparation obtained from Chinese producer. Solubility of examined polysaccharides preparation in warm water were also good. Results of SEC analysis showed that molecular mass of polysaccharides is one of the most important factors responsible for water binding properties of the polysaccharides. Addition of relatively small molecules of inulin in comparison to big molecules of β -glucan and arabinoxylan did not influence water absorption of the flour.

REFERENCES

- BEYLOT, M. 2005. Effects of inulin -type fructans on lipid metabolism in man and in animal models. In *British Journal of Nutrition*, vol. 93, 2005, Suppl. 1, p. 163-168.
- BUKSA, K., NOWOTNA, A., PRAZNIK, W., GAMBUŠ, H., ZIOBRO, R., KRAWONKA, J. 2010. The role of pentosans and starch in baking of wholemeal rye bread. In *Food Research International*, vol. 43, 2010, no. 8 p. 2045-2054.
- CLEEMPUT, G., ROELS, S. P., VANOORT, M., GROBET, P. J. and DELCOUR, J. A. 1993. Heterogeneity in the structure of water-soluble arabinoxylans in European wheat flours of variable bread-making quality. In *Cereal Chemistry*, vol. 70, 1993, no. 3, p. 324-329.
- COURTIN, C. M., DELCOUR, J. A. 2002. Arabinoxylans and endoxylanases in wheat flour bread-making. In *Journal of Cereal Science*, vol. 35, 2002, no. 3, p. 225-243.
- CUI, S. W., WANG, Q. 2009. Cell wall polysaccharides in cereals: chemical structures and functional properties. In *Structural Chemistry*, vol. 20, 2009, no. 2, p. 291-297.
- MORRIS D. L. 1948. Quantitative Determination of Carbohydrates With Dreywood's Anthrone Reagent. In *Science*, vol. 5, 1948, p. 107-108.
- IZYDORCZYK, M. S., BILIADERIS, C. G. 1995. Cereal arabinoxylans: Advances in structure and physicochemical properties. In *Carbohydrate Polymers*, vol. 28, 1995, no. 1, p. 33-48.
- LAZARIDOU, A., BILIADERIS, C. G., IZYDORCZYK, M. S. 2007. Cereal β -glucans: structures, physical properties, and physiological functions. In *Functional Food Carbohydrates*, 2nd ed., CRC Press : Boca Raton, FL, 2007, 570 p. ISBN 0-8493-1822-X.
- STEVENS, C. V., MEREGGI, A., BOOTEN, K. 2001. Chemical modification of inulin, a valuable renewable resource, and its industrial applications. In *Biomacromolecules*, vol. 2, 2001, no. 1, 2001, p. 1-16. ISSN 1525-7797.
- TOKÁR, M., BOJŇANSKÁ, T., IVANIŠOVÁ, E., DRÁB, Š. 2011. Effect of inulin addition on technological and baking quality of wheat bread. In *Potravinárstvo*, vol. 5, 2011, special issue, p. 326-331.
- TRATHNIGG, B. 2000. Size - exclusion chromatography of polymers. In *Encyclopedia of analytical chemistry*, Wiley : Chichester, 2000, p. 8008-8034.
- WOOD, P. J. 2004. Relationships between solution properties of cereal β -glucans and physiological effects - a review. In *Trends in Food Science & Technology*, vol. 15, 2004, no. 6, p. 313-320.

Contact address:

Marian Tokár, Department and Storing and Processing Plant Products, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Slovak University of Agriculture, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovak Republic, E-mail: marian.tokar44@gmail.com

Krzysztof Buksa, Department of Carbohydrates, Faculty of Food Technology, University of Agriculture in Kraków, Balicka 122, PL-30-149, Poland, E-mail: kbuksa@ar.krakow.pl

Halina Gambuś, Department of Carbohydrates, Faculty of Food Technology, University of Agriculture in Kraków, Balicka 122, PL-30-149, Poland, E-mail: rrhgambu@cyf.kr.edu.pl

Tatiana Bojňanská, Department and Storing and Processing Plant Products, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Slovak University of Agriculture, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovak Republic, E-mail: tatiana.bojnanska@uniag.sk

Eva Ivanišová, Department and Storing and Processing Plant Products, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Slovak University of Agriculture, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovak Republic, E-mail: eva.ivanisova@post.sk

H A C C P

CONSULTING

PODPORUJEME VEDU A VÝSKUM

www.haccp.szm.sk

Prihláška

na vedeckú konferenciu s medzinárodnou účasťou

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

Priezvisko a meno, tituly:

Pracovisko a adresa:

Tel.: E-mail:

Prihlasujem:

prednášku:.....

poster:

Objednávka na ubytovanie

Žiadam o ubytovanie na noc*:

z 27.3. na 28. 3. 2012 ☐ áno ☐ nie

z 28. 3. na 29. 3. 2012 ☐ áno ☐ nie

.....
podpis účastníka

* Ubytovanie si hradí každý účastník sám na mieste.

Ubytovanie je možné telefonicky zabezpečiť do 10. marca 2012:

Hotel Agroinštitút Nitra, tel.: +421 37 7910 111, www.agroinstitut.sk,

Hotel Olympia, Nitra, tel.: +421 37 65 36 727-9, www.hotelolympia.sk,

ŠD Poľnohospodár, tel: +421 37 65 34 541, www.uniag.sk

FAKULTA BIOTECHNOLÓGIE A POTRAVINÁRSTVA

**SLOVENSKEJ POĽNOHOSPODÁRSKEJ UNIVERZITY
V NITRE**

KATEDRA HYGIENY A BEZPEČNOSTI POTRAVÍN



**IX. VEDECKÁ KONFERENCIA S MEDZINÁRODNOU
ÚČASŤOU**

**BEZPEČNOSŤ A KONTROLA
POTRAVÍN**

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



**KATEDRA HYGIENY
A BEZPEČNOSTI POTRAVÍN**

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

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

* Predmety označené hviezdíčkou sa vyučujú aj v anglickom jazyku.



Školenia pre potravinárske firmy

Školenia sú akreditované Ministerstvom školstva SR

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

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

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

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

EFFECT OF APPLE CIDER VINEGAR ON PLASMA LIPIDS (MODEL EXPERIMENT IN MICE)

*László Bárdos, Balázs Bender.....*1-4

SELECTED PROPERTIES OF LACTIC ACID BACTERIA ISOLATED FROM RAW COW'S MILK

*Jana Bezeková, Monika Lavová, Miroslav Kročko, Margita Čanigová.....*5-9

ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF THYME AND ROSEMARY ESSENTIAL OIL AGAINST ENTEROCOCCI ISOLATED FROM MEAT

*Viera Duckova, Margita Čanigová, Miroslav Kročko, Jana Bezeková.....*10-13

SENSORY EVALUATION OF MEAT CHICKENS ROSS 308 AFTER APPLICATION OF PROPOLIS IN THEIR NUTRITION

*Peter Haščík, Jozef Garlík ml., Miroslava Kačániová, Juraj Čuboň, Martin Mellen, Michal Mihok, Ibrahim Omer Eliman
Eliman.....*14-20

CHARACTERIZATION OF LACTOCOCCUS STRAINS AND THEIR USING IN DAIRY TECHNOLOGY

*Zuzana Hladíková, Jana Smetanková, Gabriel Greif, Mária Greifová.....*21-29

MONITORING OF A GLUTEN CONTENT IN SELECTED MEAT PRODUCTS FROM THREE BIGGEST MEAT PRODUCERS IN SLOVAKIA

*Marcel Mati, Ladislav Staruch.....*30-33

SENSORY EVALUATION OF FRESH CHEESE TASTE WITH THE ADDITION OF OREGANO

*Adriana Pavelková, Erika Flimelová, Vladimír Vietoris.....*34-36

EFFECT OF DIFFERENT ENVIRONMENTAL FACTORS ON THE GROWTH DYNAMICS OF STAPHYLOCOCCUS AUREUS IN MODEL MEDIUM

*Adriana Studeničová, Alžbeta Medved'ová, Ľubomír Valík.....*37-41

MOLECULAR PROPERTIES OF SELECTED POLYSACCHARIDES DETERMINED BY SEC CHROMATOGRAPHY AND THEIR IMPACT ON WATER ABSORPTION OF WHEAT FLOUR

*Marián Tokár, Krzysztof Buksa, Halina Gambuś, Tatiana Bojňanská, Eva Ivanišová.....*42-44

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



**KATEDRA HYGIENY
A BEZPEČNOSTI POTRAVÍN**

IX. VEDECKÁ KONFERENCIA S MEDZINÁRODNOU ÚČASŤOU

**BEZPEČNOSŤ A KONTROLA
POTRAVÍN**

28. – 29. marca 2012
Nitra, Slovenská republika