Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach
Katedra hygieny, technológie a zdravotnej bezpečnosti potravín
Ministerstvo pôdohospodárstva a rozvoja vidieka Slovenskej republiky
Národný kontaktný bod pre vedeckú a technickú spoluprácu s EFSA
Štátna veterinárna a potravinová správa Slovenskej republiky
Slovenská spoločnosť pre poľnohospodárske, lesnícke, potravinárske
a veterinárske vedy pri SAV v Bratislave

HYGIENA ALIMENTORUM XLIII

Medzinárodná vedecká konferencia

pod záštitou Ministerstva pôdohospodárstva a rozvoja vidieka Slovenskej republiky

Zdravotná bezpečnosť a kvalita mliečnych a rastlinných komodít – aktuálne problémy a trendy

Zborník prednášok a posterov

Proceedings of lectures and posters

10. – 12. máj, 2023
Hotel Patria**** - Štrbské Pleso
Slovenská republika

HYGIENA ALIMENTORUM XLIII

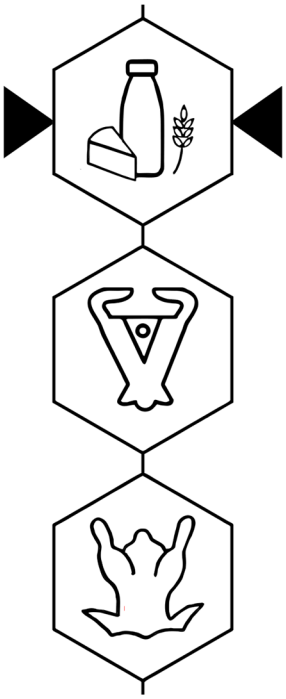
Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach
Katedra hygieny, technológie a zdravotnej bezpečnosti potravín
Ministerstvo pôdohospodárstva a rozvoja vidieka Slovenskej republiky
Národný kontaktný bod pre vedeckú a technickú spoluprácu s EFSA
Štátna veterinárna a potravinová správa Slovenskej republiky
Slovenská spoločnosť pre poľnohospodárske, lesnícke, potravinárske a veterinárske vedy pri SAV v Bratislave

HYGIENA ALIMENTORUM XLIII

Medzinárodná vedecká konferencia

pod záštitou Ministerstva pôdohospodárstva a rozvoja vidieka Slovenskej republiky

Zdravotná bezpečnosť a kvalita mliečnych a rastlinných komodít – aktuálne problémy a trendy



Zborník prednášok a posterov

Proceedings of lectures and posters

10. – 12. máj, 2023
Hotel Patria**** - Štrbské Pleso
Slovenská republika

ZOSTAVILI

BODNÁROVÁ Libuša, MVDr.
Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, Slovenská republika

RECENZOVALI

VAŠKOVÁ Janka, doc. RNDr., PhD.
Univerzita Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach, Slovenská republika
LOVAYOVÁ Viera, Ing., PhD.
Univerzita Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach, Slovenská republika

ODBORNÝ A ORGANIZAČNÝ GARANT KONFERENCIE

DUDRIKOVÁ Eva, doc., MVDr., PhD.
Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, Slovenská republika

MEDZINÁRODNÝ PROGRAMOVÝ VÝBOR

BANIA Jacek, prof. Dr. hab.
Fakulta veterinárnej medicíny, Wroclawská univerzita environmentálnych a biologických vied, Poľsko
BÍREŠ Jozef, prof. MVDr., DrSc.
Štátna veterinárna a potravinová správa Slovenskej republiky
BURSOVÁ Šárka, doc. MVDr., Ph.D.
Fakulta veterinárnej hygieny a ekológie, Veterinárna univerzita Brno, Česká republika
DUDA-CHODAK Aleksandra, prof. Dr. hab.
Fakulta potravinárskej technológie, Poľnohospodárska univerzita Krakow, Poľsko
GOLIAN Jozef, prof. Ing., Dr.
Fakulta biotechnológie a potravinárstva, Slovenská poľnohospodárska univerzita Nitra, Slovenská republika
HERIAN Karol, Ing., CSc.
Žilina, Slovenská republika
JAROŠOVÁ Alžbeta, prof. Ing., Ph.D.
Agronomická fakulta, Mendelova univerzita v Brne, Česká republika
KERESTEŠ Ján, Ing., CSc.
Považská Bystrica, Slovenská republika
MARCINČÁK Slavomír, prof. MVDr., PhD.
Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, Slovenská republika
NAGY Jozef, prof. MVDr., PhD.
Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, Slovenská republika
PETRAKOVIČOVÁ Denisa, Ing.
Ministerstvo pôdohospodárstva a rozvoja vidieka Slovenskej republiky
TREMLOVÁ Bohuslava, prof. MVDr., Ph.D.
Fakulta veterinárnej hygieny a ekológie, Veterinárna univerzita Brno, Česká republika
VORLOVÁ Lenka, prof. MVDr., Ph.D.
Fakulta veterinárnej hygieny a ekológie, Veterinárna univerzita Brno, Česká republika
ZDOLEC Nevijo, prof. MVDr., PhD.
Fakulta veterinárnej medicíny, Záhrebská univerzita, Chorvátsko

ORGANIZAČNÝ VÝBOR

DRINGUŠOVÁ Gabriela, Mgr.
HANZELOVÁ Zuzana, MVDr.
KOTRČOVÁ Zuzana, Ing.
KOVÁČOVÁ Mariana, Mgr., PhD.
REGECOVÁ Ivana, MVDr., PhD.
SEMJON Boris, MVDr., PhD.
VÝROSTKOVÁ Jana, MVDr., PhD.
ZAHUMENSKÁ Jana, MVDr., PhD.

GENERÁLNY PARTNER

SYRÁREŇ BEL SLOVENSKO a.s.

HLAVNÍ PARTNERI

BILLA, s.r.o.
Labaš, s.r.o.
Potraviny FRESH, s.r.o.
TESCO STORES SR, a.s.

MEDIÁLNI PARTNERI

FOLIA VETERINARIA - vedecké periodikum Univerzity veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach

SPONZORI

AQUA PRO EUROPE, a.s.
AT Dunaj, spol. s r.o., Mliekareň - Syráreň Dubník
Dalton, spol. s r.o. - Staromestská Mäsiareň
Koliba, a.s.
Milk Agro, s.r.o.
REGIA TT, s.r.o. - Pivnica Orechová
TAURIS® GROUP

VYSTAVOVATELIA

BioIng, s.r.o.
Biomedica Slovakia, s.r.o.
Chr. Hansen Poland Sp. z o.o.
JEMO TRADING, spol. s r.o.
Latte ingredients, s.r.o.
NOACK - SLOVAKIA, spol. s r.o.
O.K. SERVIS BioPro, s.r.o.
ŠKOLSKÉ HOSPODÁRSTVO - BÚŠLAK, spol. s r.o.

OBSAH - PREDNÁŠKY

1. Bíreš, J.: VÝSLEDKY ÚRADNÝCH KONTROL POTRAVÍN NA SLOVENSKU 16
2. Bírošová, L., Koreneková, J., Cverenkárová, K., Krahulcová, M.: PRÍTOMNOSŤ BAKTÉRIÍ REZISTENTNÝCH VOČI ANTIBIOTIKÁM V SUROVOM MLIEKU A POTRAVINÁCH RASTLINNÉHO PÔVODU 23
3. Bursová, Š.: MLÉKO A MLÉČNÉ VÝROBKY - AKTUÁLNÍ TRENDY 31
4. Jarošová A., Bogdanovičová, S., Krejčíková M.: OBSAH FTALÁTŮ V KRAVSKÉM MLÉCE V ZÁVISLOSTI NA ZPŮSOBU ZÍSKÁVÁNÍ 36
5. Kopáček, J.: MLÉKO A MLÉČNÉ VÝROBKY VERSUS ROSTLINNÉ ALTERNATIVY – 7 SROVNÁNÍ 45
6. Lauková, A., Pogány Simonová, M., Kandričáková, A.: STABILITA A PREŽÍVANIE PROSPEŠNÝCH BAKTERIOCÍN-PRODUKUJÚCICH KMEŇOV V MLIEKARENSKÝCH PRODUKTOCH 55
7. Macháček, M.: AUTOMATICKÉ ROBOTICKÉ DOJENÍ - VLIV NA HYGIENU MLÉKA 59
8. Maskaľová, I., Tačarová, M., Vajda, V., Timkovičova Lacková, P., Fraňová B.: HODNOTENIE VPLYVU VÝŽIVY NA MNOŽSTVO A KVALITU MLIEKA A EKOLOGICKÚ ZÁŤAŽ 66
9. Mojžišová, J., Dražovská, M., Kovalenko, A.: RIZIKO PRENOSU ZOONOTICKÝCH PATOGÉNOV MLIEKOM Z POHĽADU JEDNÉHO ZDRAVIA 77
10. Najgebauer-Lejko, D., Pluta-Kubica, A., Domagała, J., Walczycka, M.: KVALITA MÄKKÝCH SLADKÝCH KOZÍCH SYROV OBOHATENÝCH O BYLINKY DIVOKÉHO CESNAKU 84
11. Pleva, B., Pospiech, M., Javůrková, Z., Čaloudová, J., Tremlová, B.: VYUŽITÍ RAMANOVY SPEKTROSKOPIE PRO ROZLIŠENÍ KVĚTOVÝCH A LIPOVÝCH MEDŮ 90
12. Smutný, L., Smetana, P., Samková, E., Lorenc, F., Bedrníček, J., Climová, N., Honesová, S., Kuneš, R., Lang, A., Hankovec, T., Černý, P., Poborská, A., Kříž, P., Kernerová, N., Bartoš, P.: PRÍSTROJOVÁ ANALÝZA MLIEKA V REÁLNOM ČASE 98
13. Sokol, J., Maliarová, M., Maliar, T., Purdešová, A.: BIOLOGICKÝ VÝZNAM AVENANTRAMIDOV A ICH STANOVENIE V PRODUKTOCH OVSA 106
14. Šimko, P., Kolarič, L.: ZVYŠOVANIE BEZPEČNOSTI POTRAVÍN NA ZÁKLADE FYZIKÁLNOCHEMICKÝCH INTERAKCIÍ NEŽIADÚCICH ZLOŽIEK POTRAVÍN S MOLEKULAMI TYPU „FINGER PRINT" 114
15. Šulejová, L., Jurovčíková, J.: NOROVÍRUSY V POTRAVINÁCH RASTLINNÉHO PÔVODU: SKRYTÉ RIZIKO PRE NAŠE ZDRAVIE? 126
16. Tomáška, M., Drončovský, M., Kološta, M.: HYGIENICKÁ KVALITA SUROVÉHO KOZIEHO MLIEKA NA SLOVENSKU 130
17. Tremlová, B.: POTRAVINY ROSTLINNÉHO PŮVODU - AKTUÁLNÍ TRENDY 136
18. Vorlová, L., Bartáková, K., Navrátilová, P., Hanuš, O., Nejeschlebová, H., Samková, E., Dluhošová, S.: PŘIROZENÝ INHIBIČNÍ POTENCIÁL MLÉKA 142
19. Zagorchev, L., Doytchinov, V., Posheva, V., Teofanova, D., Dimitrov, T., Dimov, S. G.: SÚČASNÝ POKROK V ANALÝZE MIKROBIOTY SYROV 147

OBSAH - POSTEROVÉ PRÍSPEVKY

1. Arvaiová, J., Zigo, F., Lacková, Z., Farkašová, Z., Halás, Š., Ondrašovičová, S., Bak H. K., Paulsen, P.: VÝSKYT A ETIOLÓGIA MASTITÍD V CHOVE OVIEC POČAS PASTEVNEJ SEZÓNY 166
2. Bartáková, K., Pospíšil, J., Kameník J., Bursová, Š.: ZASTOUPENÍ MASTNÝCH KYSELIN V ROSTLINNÝCH ANALOZÍCH MASA 175
3. Bartáková, K., Vorlová, L., Motalová, G., Hanuš, O., Nejeschlebová, H., Samková, E., Navrátilová, P., Dluhošová, S.: VLIV VYBRANÝCH FAKTORŮ NA KONCENTRACI LAKTOFERINU V KRAVSKÉM MLÉCE 181
4. Bartkovský, M., Semjon, B., Marcinčák, S., Miščíková, A.: VPLYV MACERÁCIE HROZNA NA ANTIOXIDAČNÉ VLASTNOSTI A OBSAH CELKOVÝCH POLYFENOLOV VO VÍNE 188
5. Benešová, L., Jakabová, S., Čurlej, J., Čapla, J., Zajác, P., Golian, J.: POUŽITIE FT-NIR SPEKTROSKOPU NA ANALÝZU ZÁKLADNÉHO CHEMICKÉHO ZLOŽENIA SYROV VYROBENÝCH Z OVČIEHO A KOZIEHO MLIEKA 194
6. Bujňáková, D., Karahutová, L.: MOLEKULÁRNA CHARAKTERIZÁCIA BIOFILM PRODUKUJÚCICH *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* IZOLOVANÝCH ZO SUROVÉHO OVČIEHO SYRA 201
7. Cabanová, L., Škuntová, O.: DOHĽADÁVANIE POZITÍVNEHO NÁLEZU LISTÉRIE Z NEPASTERIZOVANÉHO OVČIEHO SYRA 207
8. Čobanová, K., Kucková, K., Grešáková, Ľ.: VPLYV PODÁVANIA ORGANICKÉHO ZINKU A ZMESI RASTLÍN NA OBSAH STOPOVÝCH PRVKOV A OXIDAČNÚ STABILITU MÄSA JAHNIAT 213
9. Demianová, A., Bobková, A., Poláková, K., Lidiková, J., Bobko, M., Jurčaga, L., Belej, Ľ., Harangozo, Ľ., Mesárošová, A.: VPLYV OBSAHU ŤAŽKÝCH KOVOV NA ANTIOXIDAČNÉ VLASTNOSTI ZELENEJ KÁVY *C. ARABICA* DOPESTOVANEJ VO VYBRANÝCH OBLASTIACH AFRIKY 218
10. Dudriková, E., Hanzelová, Z.: PRÍTOMNOSŤ ENTEROKOKOV - ŽIADUCA, ČI NEŽIADUCA SÚČASŤ ZREJÚCICH SYROV 228
11. Dudriková, E., Zahumenská, J., Výrostková, J., Kováčová, M., Hanzelová, Z.: VPLYV ZÁRUČNEJ DOBY NA KVALITU TVAROHOV 236
12. Farkašová, Z., Lacková, Z., Zigo, F., Bartáková, K., Vargová, M., Arvaiová, J., Halás, Š.: VPLYV MASTITÍD NA ZLOŽENIE A HLADINY MASTNÝCH KYSELÍN V KRAVSKOM MLIEKU 242
13. Fečkaninová, A., Koščová, J., Hudecová, P.: POTENCIÁL FYTOBIOTÍK V AKVAKULTÚRE 251
14. Fikselová, M., Zeleňáková, L., Čapla, J., Jakabová, S., Mezey, J., Golian, J., Stanček, M.: VYBRANÉ ODRODY AKOSTNÝCH VÍN RÔZNEHO PÔVODU- KVALITA A ZDRAVOTNÁ BEZPEČNOSŤ 261
15. Gancárová, B., Tančin, V., Tvarožková, K., Uhrinčať, M., Mačuhová, L., Vršková, M., Kopec, T.: POČET SOMATICKÝCH BUNIEK A ICH VPLYV NA ZLOŽENIE KOZIEHO MLIEKA 271
16. Golian, J., Vlčko, T., Jakabová, S., Benešová, L.: NUTRI-SCÓRE A PERSPEKTÍVY OZNAČOVANIA POTRAVÍN 279

17. Gregová, G., Szabóová, T., Dančová, N., Výrostková, J.: VÝZNAM HYGIENY PROSTREDIA PRI VÝSKYTE MASTITÍD V CHOVE DOJNÍC 289
18. Hajdučková, V., Királys, J., Lauko, S., Hudecová, P., Pilipčinec, E.: ANTIBIOFILMOVÁ AKTIVITA QUERCETÍNU A POMIFERÍNU VOČI IZOLÁTOM *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* POCHÁDZAJÚCICH Z MLIEKA DOJNÍC 295
19. Halás, Š., Bolger, D. K., Zigo, F., Farkašová, Z., Lacková, Z., Arvaiová, J.: POROVNANIE ÚČINNOSTI PROGRAMOV HYGIENICKÉHO DOJENIA PRI ZÍSKAVANÍ SUROVÉHO MLIEKA 301
20. Hanzelová, Z., Dudriková, E., Výrostková, J.: DETEKCIA PRÍTOMNOSTI ZÁSTUPCOV ČEĽADE *ENTEROBACTERIACEAE* V PROSTREDÍ REMESELNEJ VÝROBY SYROV 310
21. Havlová, L., Hufová, V., Pospiech, M., Tremlová, B.: STANOVENÍ ANTIOXIDAČNÍ KAPACITY KÁVY V ZÁVISLOSTI NA ZPŮSOBU SKLADOVÁNÍ 318
22. Hriciková, S., Kožárová, I.: KVALITATÍVNE STANOVENIE OBSAHU ß-LAKTÁMOVÝCH A TETRACYKLÍNOVÝCH ANTIBIOTÍK V SUROVOM KRAVSKOM MLIEKU 324
23. Hriciková, S., Kožárová, I.: KVANTITATÍVNE STANOVENIE OBSAHU AFLATOXÍNU M1 V SUROVOM KRAVSKOM MLIEKU 333
24. Hudecová, P., Koščová, J., Fečkaninová, A., Hajdučková, V.: ANTIBAKTERIÁLNA AKTIVITA VYBRANÝCH ESENCIÁLNYCH OLEJOV VOČI *YERSINIA RUCKERI*, VÝZNAMNÉMU PATOGÉNU RÝB 339
25. Humeník, F., Bartkovský, M., Lazár, J., Čurlík, J., Karolová, R., Lazár, P.: EKONOMICKÉ UKAZOVATELE PRODUKCIE ZVERINY NA SLOVENSKU V POĽOVNÍCKEJ SEZÓNE 2021/2022 346
26. Chomová, N., Moskáľová, L., Hreško Šamudovská, A., Harčárová, M., Bujňák, L., Koščová, J., Mudroňová, D.: *IN VIVO* TESTOVANIE VPLYVU RÔZNYCH DRUHOV HUMÍNOVÝCH LÁTOK NA ČREVNÚ MIKROBIOTU PRASIAT 349
27. Jakabová, S., Árvay, J., Štefániková, J., Ivanišová, E., Benešová, L., Golian, J.: VARIABILITA METYLXANTÍNOV V OOLONG ČAJOCH 356
28. Jarošová, E., Jarošová, M., Lorenc, F., Bedrníček, J., Smetana, P., Říha, V., Bárta, J.: VLIV PŘÍDAVKU CIBULOVÝCH SLUPEK A SLUPEK Z KONOPNÉHO OPLODÍ NA OXIDAČNÍ STABILUTU KONOPNÉHO OLEJE 364
29. Javůrková, Z., Pospiech, M., Pečová, M., Bartlová, M., Havlová, L., Tremlová, B.: NEBEZPEČÍ V POTRAVINÁCH ROSTLINNÉHO PŮVODU 372
30. Jevinová, P., Popelka, P., Hudáková, T., Pipová, M.: ANTIFUGÁLNA A ANIBAKTERIÁLNA ÚČINNOSŤ VODNÝCH EXTRAKTOV CHILLI PAPRÍK 381
31. Ježek, F., Bednář, J., Abdullah, F.A.A., Kameník, J., Bursová, Š.: HODNOCENÍ SENZORICKÝCH, TEXTURNÍCH A BAREVNÝCH VLASTNOSTÍ ANALOGŮ MASA 388
32. Királys, J., Hajdučková, V., Pilipčinec, E.: TVORBA BIOFILMU KMEŇOV *S. AUREUS* IZOLOVANÝCH Z DOJNÍC SO SUBKLINICKOU FORMOU MASTITÍDY 395
33. Kiššová, Z., Tkáčiková, Ľ., Mudroňová, D., Link, R.: IMUNOMODULAČNÝ POTENCIÁL PURIFIKOVANÝCH EXOPOLYSACHARIDOV ZÍSKANÝCH Z BAKTÉRII MLIEČNEHO KVASENIA SLEDOVANÝ POMOCOU *IN VITRO* KO-KULTÚRNEHO MODELU IMITUJÚCEHO ČREVO 408
34. Klimešová, M., Nejeschlebová, L., Necidová, L., Hanuš, O., Bursová, Š., Vorlová, L.: VLIV MÍRY PORUŠENÍ CHLADÍRENSKÉHO ŘETĚZCE NA CELKOVÉ POČTY MIKROORGANISMŮ VZORKŮ SYROVÉHO MLÉKA MALÝCH PŘEŽVÝKAVCŮ 418
35. Koréneková, B., Kožárová, I.: VEDĽAJŠIE ŽIVOČÍŠNE PRODUKTY V MLIEKARENSKOM PRIEMYSLE A PRAVIDLÁ ICH ÚRADNÝCH KONTROL 424

36. Kováčová, M., Regecová, I., Výrostková, J., Semjon, B., Marcinčák, S., Očenáš, P.: VPLYV BIOGÉNNYCH AMÍNOV NA PRÍTOMNOSŤ *TORULASPORA DELBRUECKII* V PROCESE FERMENTÁCIE VÍNA 430
37. Kováčová, M., Výrostková, J., Dudriková, E., Regecová, I., Zahumenská, J., Hanzelová, Z.: *PSEUDOMONAS* SPP. ZO SUROVÉHO MLIEKA A JEHO ANTIBIOTICKÁ REZISTENCIA 437
38. Kožárová, I., Regecová, I., Hriciková, S.: ŠPECIFICKÉ PRAVIDLÁ PRE ÚRADNÉ KONTROLY V SÚVISLOSTI S REZÍDUAMI PRÍSLUŠNÝCH LÁTOK V MLIEKU 443
39. Králová, M., Vorlová, L., Pospíšil, J., Navrátilová, P.: STANOVENÍ LAKTÓZY V KOBYLÍM MLÉCE POMOCÍ FT-NIR SPEKTROMETRIE 449
40. Lacková, Z., Zigo, F., Farkašová, Z., Arvaiová, J., Halás, Š., Vargová, M., Pecka-Kielb, E.: VPLYV ENVIROMENTÁLNYCH FAKTOROV NA BAKTERIÁLNU KONTAMINÁCIU OVČIEHO MLIEKA 455
41. Lauková, A., Kandričáková, A., Pogány Simonová, M.: ENKAPSULOVANÉ PROSPEŠNÉ KMENE A ICH STABILITA V OVČO-KOZÍCH JOGURTOCH 462
42. Makiš, A., Semjon, B., Bartkovský, M., Reitznerová, A., Koréneková, B., Marcinčáková, D., Marcinčák, S.: VPLYV FERMENTOVANÝCH KRMÍV NA KVALITATÍVNE PARAMETRE PRSNEJ SVALOVINY BROJLEROVÝCH KURČIAT 466
43. Marcinčák, S., Semjon, B., Mesarčová, L. Reitznerová, A., Bartkovský, M., Marcinčáková, D., Klempová, T., Nagy, J.: APLIKÁCIA FERMENTOVANÝCH PRODUKTOV A HUMÍNOVÝCH LÁTOK HYDINE, NOVÝ PRÍSTUP K PRODUKCII BEZPEČNÝCH A FUNKČNÝCH POTRAVÍN 473
44. Marcinčáková, D., Kolesárová, M., Snaková, M., Milek, M., Fedorová, M., Legáth, J., Marcinčák, S.: VPLYV EXTRAKČNÉHO ČINIDLA NA BIOLOGICKÉ VLASTNOSTI EXTRAKTOV REPÍKA LEKÁRSKEHO 480
45. Mesarčová, L., Koréneková, B., Reitznerová, A., Makiš, A., Naď, P., Jevinová, P., Pipová, M., Koščová, J., Bujňák, L., Bartkovský, M.: VPLYV PROBIOTÍK A HUMÍNOVYCH LÁTOK NA CHEMICKÉ ZLOŽENIE A MINERÁLNY PROFIL SVALOVINY HYDINY 489
46. Moskáľová, L., Mudroňová, D., Chómová, N., Ratvaj, M.: RAST PROSPEŠNÝCH BAKTÉRIÍ V PRÍTOMNOSTI RÔZNYCH KONCENTRÁCIÍ A FORIEM HUMÍNOVÝCH LÁTOK 496
47. Mudroňová, D., Koreneková, B., Bilíková, K., Toporčák, J., Kuzyšinová, K., Ratvaj, M., Chomová, N., Moskáľová, L.: VPLYV APLIKÁCIE PROBIOTICKÝCH BAKTÉRIÍ NA PEĽOVOM NOSIČI VČELÁM MEDONOSNÝM NA KVALITU MEDU 504
48. Nagyová, A., Korim, P., Takáčová, D., Nagy, J.: PRÁVNA ÚPRAVA ZDRAVOTNEJ BEZPEČNOSTI MLIEKA 509
49. Oravcová, M., Mačuhová, L., Tančin, V., Uhrinčať, M.: ANALÝZA MLIEKA A JEHO ZLOŽIEK VO VZŤAHU K POČTU SOMATICKÝCH BUNIEK 517
50. Pigošová, P., Marcinková, L.: MULTIREZIDUÁLNA ANALÝZA PESTICÍDOV V CITRUSOCH V ROKOCH 2020 – 2022 522
51. Pilipčinec, E., Király, J., Hajdučková, V., Gregová, G.: PREVALENCIA REZISTENTNÝCH IZOLÁTOV *S. AUREUS* Z MLIEKA DOJNÍC SO SUBKLINICKOU FORMOU MASTITÍDY 527
52. Ratvaj, M., Faixová, D., Cingeľová Maruščáková, I., Hrčková, G., Chomová, N., Mudroňová, D.: SILYBÍN VYKAZUJE CYTOTOXICKÉ, ANTIPROLIFERATÍVNE A PROTIZÁPALOVÉ ÚČINKY NA NÁDOROVÉ BUNKY, PRI ZACHOVANÍ ŽIVOTNOSTI A PROLIFERÁCIE ZDRAVÝCH INTESTINÁLNYCH BUNIEK 537

53. Regecová, I., Kožárová I., Výrostková, J.: ÚRADNÁ KONTROLA SUROVÉHO MLIEKA A MLIEČNYCH VÝROBKOV V KONTEXTE POŽIADAVIEK NA ZDRAVIE ZVIERAT A ZDRAVIE ĽUDÍ 544
54. Regecová, I., Semjon, B., Výrostková, J., Marcinčák, S., Jevinová, P., Pipová, M.: PRÍTOMNOSŤ KVASINIEK RODU *PICHIA* V PROCESE FERMENTÁCIE VÍNA 549
55. Reitznerová, A., Semjon, B., Mesarčová, L., Makiš, A., Smetanková, A., Marcinčák, S.: HODNOTENIE ANTIOXIDAČNEJ AKTIVITY A OXIDAČNEJ STABILITY SYROV GOUDA 556
56. Rešková, Z., Koreňová, J., Andrezál, M.: ANALÝZA BAKTÉRIÍ MLIEČNEHO KVASENIA IZOLOVANÝCH ZO SRVÁTKY 561
57. Sasáková, N., Takáčová, D., Kachnič, J., Hromada, R.: VÝZNAM HYGIENY PROSTREDIA PRI ZÍSKAVANÍ MLIEKA 565
58. Semjon, B., Očenáš, P., Marcinčák, S.: BIOGÉNNE AMÍNY VO VÍNE 571
59. Semjon, B., Benešová, L., Jakabová, S., Golian, J.: ZMENY TEXTURÁLNYCH PARAMETROV VZORIEK PARENÍC POČAS SKLADOVANIA 575
60. Takáčová, D., Nagyová, A., Sasáková, N., Packová, A.: VPLYV NIEKTORÝCH TOXICKÝCH RASTLÍN NA KVALITU MLIEKA 581
61. Tauferová, A., Czerniková, A., Tremlová, B.: SENZORICKÁ PŘIJATELNOST BEZLEPKOVÝCH CHLEBŮ S PŘÍDAVKEM VLÁKNINY 588
62. Várady, M., Boržíková, J., Popelka, P.: VPLYV SPÔSOBU SPRACOVANIA KÁVY NA OBSAH ŤAŽKÝCH KOVOV 598
63. Vargová, M., Zigo, F., Sasáková, N., Veszelits Laktičová, K., Farkašová, Z., Lacková, Z.: HODNOTENIE HYGIENICKÉHO REŽIMU V SYRÁRNI 605
64. Vršková, M., Tvarožková, K., Tančin, V., Uhrinčať, M., Mačuhová, L., Holko, I.: VÝSKYT MASTITÍDNYCH PATOGÉNOV V OBDOBÍ ZASÚŠANIA DOJNÍC 610
65. Výrostková, J., Kováčová, M., Regecová, I., Dudriková, E., Zahumenská, J., Hanzelová, Z., Gregová, G.: DETEKCIA BAKTÉRIÍ RODU *PSEUDOMONAS* V SUROVOM KRAVSKOM MLIEKU 617
66. Zábrodská, B., Vepřková, E.: VÝVOJ KŘEHKOSTI A HMOTNOSTNÍCH ZTRÁT GRILOVÁNÍM V PRŮBĚHU ZRÁNÍ MASA BÝKŮ A KRAV PLEMENE GALLOWAY 623
67. Zahumenská, J., Dudriková, E., Kováčová. M., Zigo, F., Paulsen, P., Ondrašovičová, S.: MORFOLOGICKÁ CHARAKTERISTIKA SOMATICKÝCH BUNIEK V KRAVSKOM MLIEKU 637
68. Zahumenská, J., Ondrašovičová, S., Gubová, M., Kováčová, M.: KONTROLA KVALITY RASTLINNÝCH OLEJOV PROSTREDNÍCTVOM VYBRANÝCH UKAZOVATEĽOV 643
69. Zajác, P., Čapla, J.: PRÍRUČKY SPRÁVNEJ HYGIENICKEJ PRAXE PRE MLIEKARENSKÝ SEKTOR V SLOVENSKEJ REPUBLIKE 648
70. Zdolec, N., Kiš, M., Kavain, I., Batinić, J., Franičević, M., Čaušević, S.: MODERNIZÁCIA VÝROBY SYROV V CHORVÁTSKU POMOCOU LIEČIVÝCH A AROMATICKÝCH BYLÍN - PRÍKLAD PROJEKTU *CEKOM 3LJ* EURÓPSKEHO FONDU REGIONÁLNEHO ROZVOJA 656
71. Zigo, F., Lacková, Z., Farkašová, Z., Arvaiová, J., Vargová, M., Halás, Š., Ondrašovičová, S., Bak, K.H., Paulsen, P.: VYUŽITIE RÝCHLYCH FARMOVÝCH TESTOV NA DETEKCIU MASTITÍD DOJNÍC 661
72. Ženišová, K.: ŠTÚDIUM OCTOVEJ FERMENTÁCIE VÍNA POMOCOU RÔZNYCH KMEŇOV OCTOVÝCH BAKTÉRIÍ 671

TABLE OF CONTENTS - LECTURES

1. Bíreš, J.: RESULTS OF OFFICIAL FOOD CONTROLS IN SLOVAKIA 16
2. Bírošová, L., Koreneková, J., Cverenkárová, K., Krahulcová, M.: OCCURENCE OF ANTIBIOTIC RESISTANT BACTERIA IN RAW MILK AND FOOD OF PLANT ORIGIN 23
3. Bursová, Š.: MILK AND MILK PRODUCTS - CURRENT TRENDS 31
4. Jarošová A., Bogdanovičová, S., Krejčíková M.: PHTHALATE CONTENT IN COW'S MILK DEPENDING ON THE METHOD OBTAINING 36
5. Kopáček, J.: MILK AND DAIRY PRODUCTS VERSUS PLANT-BASED ALTERNATIVES – 7 COMPARISONS 45
6. Lauková, A., Pogány Simonová, M., Kandričáková, A.: STABILITY AND SURVIVING OF BENEFICIAL BACTERIOCIN-PRODUCING STRAINS IN DAIRY PRODUCTS 55
7. Macháček, M.: AUTOMATIC MILKING SYSTEMS - THE EFFECT ON HYGIENIC MILK QUALITY 59
8. Maskaľová, I., Tačarová, M., Vajda, V., Timkovičova Lacková, P., Fraňová B.: EVALUATION OF THE NUTRITION EFFECT ON THE QUANTITY AND QUALITY OF MILK AND ECOLOGICAL LOAD 66
9. Mojžišová, J., Dražovská, M., Kovalenko, A.: RISK OF ZOONOTIC PATHOGENS TRANSMISSION VIA MILK FROM THE ONE HEALTH PERSPECTIVE 77
10. Najgebauer-Lejko, D., Pluta-Kubica, A., Domagała, J., Walczycka, M.: QUALITY OF SOFT RENNET GOAT CHEESES ENRICHED WITH WILD GARLIC HERB 84
11. Pleva, B., Pospiech, M., Javůrková, Z., Čaloudová, J., Tremlová, B.: DIFFERENTIATION OF FLOWER AND LIME HONEYS USING RAMAN SPECTROSCOPY 90
12. Smutný, L., Smetana, P., Samková, E., Lorenc, F., Bedrníček, J., Climová, N., Honesová, S., Kuneš, R., Lang, A., Hankovec, T., Černý, P., Poborská, A., Kříž, P., Kernerová, N., Bartoš, P.: REAL TIME INSTRUMENTAL ANALYSIS OF MILK 98
13. Sokol, J., Maliarová, M., Maliar, T., Purdešová, A.: BIOLOGICAL IMPORTANCE OF AVENANTRAMIDS AND THEIR DETERMINATION IN OAT PRODUCTS 106
14. Šimko, P., Kolarič, L.: STRENGTHENING THE FOOD SAFETY ON THE BASE OF PHYSICO-CHEMICAL INTERACTIONS OF RISK FOOD COMPONENTS WITH FINGER-PRINT MOLECULES 114
15. Šulejová, L., Jurovčíková, J.: NOROVIRUSES IN PLANT-BASED FOODS: HIDDEN RISK FOR OUR HEALTH 126
16. Tomáška, M., Drončovský, M., Kološta, M.: HYGIENIC QUALITY OF RAW GOAT´S MILK IN SLOVAKIA 130
17. Tremlová, B.: PLANT ORIGIN FOOD - CURRENT TRENDS 136
18. Vorlová, L., Bartáková, K., Navrátilová, P., Hanuš, O., Nejeschlebová, H., Samková, E., Dluhošová, S.: NATURAL INHIBITORY POTENTIAL OF MILK 142
19. Zagorchev, L., Doytchinov, V., Posheva, V., Teofanova, D., Dimitrov, T., Dimov, S. G.: RECENT ADVANCES IN CHEESE MICROBIOTA ANALYSIS 147

TABLE OF CONTENTS - POSTERS

1. Arvaiová, J., Zigo, F., Lacková, Z., Farkašová, Z., Halás, Š., Ondrašovičová, S., Bak H. K., Paulsen, P.: OCCURRENCE AND ETIOLOGY OF MASTITIS IN SHEEP HERD DURING THE GRAZING SEASON 166
2. Bartáková, K., Pospíšil, J., Kameník J., Bursová, Š.: FATTY ACID CONTENT IN PLANT MEAT ANALOGUES 175
3. Bartáková, K., Vorlová, L., Motalová, G., Hanuš, O., Nejeschlebová, H., Samková, E., Navrátilová, P., Dluhošová, S.: INFLUENCE OF SELECTED FACTORS ON LACTOFERIN CONCENTRATION IN COW'S MILK 181
4. Bartkovský, M., Semjon, B., Marcinčák, S., Miščíková, A.: EFFECT OF GRAPE MACERATION ON THE ANTIOXIDANT AND THE CONTENT OF POLYPHENOLS IN WINE 188
5. Benešová, L., Jakabová, S., Čurlej, J., Čapla, J., Zajác, P., Golian, J.: THE USE OF FT-NIR SPECTROSCOPY TO ANALYSIS THE BASIC CHEMICAL COMPOSITION OF CHEESES MADE FROM SHEEP AND GOAT MILK 194
6. Bujňáková, D., Karahutová, L.: MOLECULAR CHARACTERIZATION OF BIOFILM-FORMING *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* COLLECTED FROM RAW OVINE CHEESE 201
7. Cabanová, L., Škuntová, O.: TRACEABILITY OF LISTERIA FROM POSITIVE SHEEP CHEESE MADE FROM UNPASTEURIZED MILK 207
8. Čobanová, K., Kucková, K., Grešáková, Ľ.: THE EFFECT OF DIETARY ORGANIC ZINC AND HERBAL MIXTURE ON TRACE MINERAL CONTENT AND OXIDATIVE STABILITY OF LAMB MEAT 213
9. Demianová, A., Bobková, A., Poláková, K., Lidiková, J., Bobko, M., Jurčaga, L., Belej, Ľ., Harangozo, Ľ., Mesárošová, A.: EFFECT OF HEAVY METALS CONTENT ON ANTIOXIDANT PROPERTIES OF GREEN *C. ARABICA* GROWN IN SELECTED AREAS OF AFRICA 218
10. Dudriková, E., Hanzelová, Z.: PRESENCE OF ENTEROCOCCI - A DESIRABLE OR UNDESIRABLE COMPONENT OF RIPENED CHEESES 228
11. Dudriková, E., Zahumenská, J., Výrostková, J., Kováčová, M., Hanzelová, Z.: INFLUENCE OF THE WARRANTY PERIOD ON THE QUALITY OF CURDS 236
12. Farkašová, Z., Lacková, Z., Zigo, F., Bartáková, K., Vargová, M., Arvaiová, J., Halás, Š.: THE EFFECT OF MASTITIS ON THE COMPOSITION AND LEVELS OF FATTY ACIDS IN COW´S MILK 242
13. Fečkaninová, A., Koščová, J., Hudecová, P.: POTENTIAL OF PHYTOBIOTICS IN AQUACULTURE 251
14. Fikselová, M., Zeleňáková, L., Čapla, J., Jakabová, S., Mezey, J., Golian, J., Stanček, M.: SELECTED VARIETIES OF WINES OF DIFFERENT ORIGIN: QUALITY AND HEALTH SAFETY 261
15. Gancárová, B., Tančin, V., Tvarožková, K., Uhrinčať, M., Mačuhová, L., Vršková, M., Kopec, T.: SOMATIC CELL COUNT AND THEIR EFFECT ON GOAT MILK COMPOSITION 271
16. Golian, J., Vlčko, T., Jakabová, S., Benešová, L.: NUTRI-SCORE AND FOOD LABELING PERSPECTIVES 279

17. Gregová, G., Szabóová, T., Dančová, N., Výrostková, J.: THE IMPORTANCE OF ENVIRONMENTAL HYGIENE IN THE OCCURRENCE OF MASTITIS IN DAIRY FARMING 289
18. Hajdučková, V., Király, J., Lauko, S., Hudecová, P., Pilipčinec, E.: ANTIBIOFILM ACTIVITY OF QUERCETIN AND POMIFERIN AGAINST *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* ISOLATED FROM MILK OF DAIRY COWS 295
19. Halás, Š., Bolger, D. K., Zigo, F., Farkašová, Z., Lacková, Z., Arvaiová, J.: COMPARISON OF THE EFFECTIVENESS OF HYGIENIC MILKING PROGRAMMES IN OBTAINING RAW MILK 301
20. Hanzelová, Z., Dudriková, E., Výrostková, J.: DETECTION OF THE PRESENCE OF FAMILY *ENTEROBACTERIACEAE* IN THE ENVIROMENT OF ARTISANAL CHEESEMAKING 310
21. Havlová, L., Hufová, V., Pospiech, M., Tremlová, B.: DETERMINATION OF THE ANTIOXIDANT CAPACITY OF COFFEE DEPENDING ON THE STORAGE METHOD 318
22. Hriciková, S., Kožárová, I.: QUALITATIVE DETERMINATION OF THE CONTENT OF ß-LACTAM AND TETRACYCLINE ANTIBIOTICS IN RAW COW'S MILK
23. Hriciková, S., Kožárová, I.: QUANTITATIVE DETERMINATION OF AFLATOXIN M1 CONTENT IN RAW COW'S MILK 324
24. Hudecová, P., Koščová, J., Fečkaninová, A., Hajdučková, V.: ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF SELECTED ESSENTIAL OILS AGAINST *YERSINIA RUCKERI* AS AN IMPORTANT FISH PATHOGEN 339
25. Humeník, F., Bartkovský, M., Lazár, J., Čurlík, J., Karolová, R., Lazár, P.: ECONOMIC INDICATORS OF GAME PRODUCTION ON SLOVAKIA IN THE HUNTING SEASON 2021/2022 346
26. Chomová, N., Moskáľová, L., Hreško Šamudovská, A., Harčárová, M., Bujňák, L., Koščová, J., Mudroňová, D.: *IN VIVO* TESTING OF THE EFFECT OF DIFFERENT HUMIC SUBSTANCES ON PIG´S INTESTINAL MICROBIOTA 349
27. Jakabová, S., Árvay, J., Štefániková, J., Ivanišová, E., Benešová, L., Golian, J.: VARIABILITY OF METHYLXANTINES IN OOLONG TEA 356
28. Jarošová, E., Jarošová, M., Lorenc, F., Bedrníček, J., Smetana, P., Říha, V., Bárta, J.: THE EFFECT OF FORTIFICATION WITH ONION SKINS AND HEMP PERICARP SKINS ON THE OXIDATIVE STABILITY OF HEMP OIL 364
29. Javůrková, Z., Pospiech, M., Pečová, M., Bartlová, M., Havlová, L., Tremlová, B.: HAZARDS IN FOODS OF PLANT ORIGIN 372
30. Jevinová, P., Popelka, P., Hudáková, T., Pipová, M.: ANTIFUNGAL AND ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF AQUEOUS EXTRACTS OF CHILI PEPPERS 381
31. Ježek, F., Bednář, J., Abdullah, F.A.A., Kameník, J., Bursová, Š.: EVALUATION OF SENSORY, TEXTURE AND COLOR PROPERTIES OF MEAT ANALOGUES 388
32. Király, J., Hajdučková, V., Pilipčinec, E.: BIOFILM FORMATION IN *S. AUREUS* ISOLATED FROM DAIRY COWS WITH SUBCLINICAL FORM OF MASTITIS 395
33. Kiššová, Z., Tkáčiková, Ľ., Mudroňová, D., Link, R.: IMMUNOMODULATORY POTENTIAL OF PURIFIED EXOPOLYSACCHARIDES DERIVED FROM LACTIC ACID BACTERIA MONITORED BY *IN VITRO* CO-CULTURE MODEL MIMICKING THE GUT 408
34. Klimešová, M., Nejeschlebová, L., Necidová, L., Hanuš, O., Bursová, Š., Vorlová, L.: THE EFFECT OF COLD CHAIN DISRUPTION ON THE TOTAL PLATE COUNT OF SMALL RUMINANTS MILK SAMPLES 418

35. Koréneková, B., Kožárová, I.: ANIMAL BY PRODUCTS IN THE DAIRY INDUSTRY AND RULES FOR THEIR OFFICIAL CONTROLS 424
36. Kováčová, M., Regecová, I., Výrostková, J., Semjon, B., Marcinčák, S., Očenáš, P.: THE EFFECT OF BIOGENEIC AMINES ON THE PRESENCE OF *TORULASPORA DELBRUECKII* IN THE WINE FERMENTATION PROCESS 430
37. Kováčová, M., Výrostková, J., Dudriková, E., Regecová, I., Zahumenská, J., Hanzelová, Z.: *PSEUDOMONAS* SPP. FROM RAW MILK AND ITS ANTIBIOTIC RESISTANCE 437
38. Kožárová, I., Regecová, I., Hriciková, S.: SPECIAL RULES FOR OFFICIAL CONTROLS IN RELATION TO RESIDUES OF RELEVANT SUBSTANCES IN MILK 443
39. Králová, M., Vorlová, L., Pospíšil, J., Navrátilová, P.: DETERMINATION OF LACTOSE IN MARE'S MILK BY FT-NIR SPECTROSCOPY 449
40. Lacková, Z., Zigo, F., Farkašová, Z., Arvaiová, J., Halás, Š., Vargová, M., Pecka-Kielb, E.: THE EFFECT OF ENVIRONMENTAL FACTORS ON BACTERIAL CONTAMINATION OF SHEEP´S MILK 455
41. Lauková, A., Kandričáková, A., Pogány Simonová, M.: ENCAPSULATED BENEFICIAL STRAINS AND THEIR STABILITY IN EWES -GOATS YOGHURTS 462
42. Makiš, A., Semjon, B., Bartkovský, M., Reitznerová, A., Koréneková, B., Marcinčáková, D., Marcinčák, S.: THE INFLUENCE OF FERMENTED FEEDS ON THE QUALITY PARAMETERS OF THE BREAST MEAT OF BROILER CHICKENS 466
43. Marcinčák, S., Semjon, B., Mesarčová, L. Reitznerová, A., Bartkovský, M., Marcinčáková, D., Klempová, T., Nagy, J.: APPLICATION OF FERMENTED PRODUCTS AND HUMIC SUBSTANCES TO POULTRY, A NEW APPROACH TO THE PRODUCTION OF SAFE AND FUNCTIONAL FOODS 473
44. Marcinčáková, D., Kolesárová, M., Snaková, M., Milek, M., Fedorová, M., Legáth, J., Marcinčák, S.: EFFECT OF EXTRACTION REAGENT ON BIOLOGICAL PROPERTIES OF SELECED EXTRACTS OF AGRIMONY 480
45. Mesarčová, L., Koréneková, B., Reitznerová, A., Makiš, A., Naď, P., Jevinová, P., Pipová, M., Koščová, J., Bujňák, L., Bartkovský, M.: THE EFFECT OF PROBIOTICS AND HUMIC SUBSTANCES ON THE CHEMICAL COMPOSITION AND MINERAL PROFILE OF POULTRY MUSCLE 489
46. Moskáľová, L., Mudroňová, D., Chómová, N., Ratvaj, M.: GROWTH OF BENEFICIAL BACTERIA IN THE PRESENCE OF DIFFERENT CONCENTRATION AND FORMS OF HUMIC SUBSTANCES 496
47. Mudroňová, D., Koreneková, B., Bilíková, K., Toporčák, J., Kuzyšinová, K., Ratvaj, M., Chomová, N., Moskáľová, L.: THE EFFECT OF THE APPLICATION OF PROBIOTIC BACTERIA ON THE POLLEN CARRIER TO HONEY BEES ON THE QUALITY OF HONEY 504
48. Nagyová, A., Korim, P., Takáčová, D., Nagy, J.: MILK SAFETY LEGISLATION 509
49. Oravcová, M., Mačuhová, L., Tančin, V., Uhrinčať, M.: ANALYSES OF MILK YIELD AND ITS QUALITATIVE TRAITS IN RELATION TO SOMATIC CELL COUNT 517
50. Pigošová, P., Marcinková, L.: MULTIRESIDUE ANALYSIS OF PESTICIDES IN CITRUS FRUITS BETWEEN 2020 AND 2022 522
51. Pilipčinec E., Király, J., Hajdučková, V., Gregová, G.: THE PREVALENCE OF *S. AUREUS* RESISTANT ISOLATES FROM THE MILK OF DAIRY COWS WITH SUBCLINICAL MASTITIS 527
52. Ratvaj, M., Faixová, D., Cingeľová Maruščáková, I., Hrčková, G., Chomová, N., Mudroňová, D.: SILYBIN SHOWS CYTOTOXIC, ANTIPROLIFERATIVE, AND ANTI-

INFLAMMATORY ACTIVITIES IN THE CANCER CELL LINE WHILE RETAINING VIABILITY AND PROLIFERATION IN NORMAL INTESTINAL CELLS 537
53. Regecová, I., Kožárová I., Výrostková, J.: OFFICIAL CONTROL OF RAW MILK AND MILK PRODUCTS IN THE CONTEXT OF ANIMAL HEALTH AND HUMAN HEALTH REQUIREMENTS 544
54. Regecová, I., Semjon, B., Výrostková, J., Marcinčák, S., Jevinová, P., Pipová, M.: THE PRESENCE OF YEAST OF THE GENUS *PICHIA* IN THE PROCESS OF WINE FERMENTATION 549
55. Reitznerová, A., Semjon, B., Mesarčová, L., Makiš, A., Smetanková, A., Marcinčák, S.: EVALUATION OF THE ANTIOXIDANT ACTIVITY AND OXIDATIVE STABILITY OF GOUDA CHEESES 556
56. Rešková, Z., Koreňová, J., Andrezál, M.: ANALYSIS OF LACTIC ACID BACTERIA IZOLATED FROM WHEY 561
57. Sasáková, N., Takáčová, D., Kachnič, J., Hromada, R.: THE IMPORTANCE OF ENVIRONMENTAL HYGIENE IN PRIMARY MILK PRODUCTION 565
58. Semjon, B., Očenáš, P., Marcinčák, S.: BIOGENIC AMINES IN WINE 571
59. Semjon, B., Benešová, L., Jakabová, S., Golian, J.: CHANGES IN THE TEXTURAL PARAMETERS OF THE PARENICA CHEESE SAMPLES DURING STORAGE 575
60. Takáčová, D., Nagyová, A., Sasáková, N., Packová, A.: THE INFLUENCE OF SOME TOXIC PLANTS ON MILK QUALITY 581
61. Tauferová, A., Czerniková, A., Tremlová, B.: SENSORY ACCEPTABILITY OF GLUTEN-FREE BREAD FORTIFIED WITH FIBER 588
62. Várady, M., Boržíková, J., Popelka, P.: EFFECT OF PROCESSING METHOD ON HEAVY METAL CONTENT 598
63. Vargová, M., Zigo, F., Sasáková, N., Veszelits Laktičová, K., Farkašová, Z., Lacková, Z.: ASSESSMENT OF THE HYGIENE REGIME IN CHEESE PRODUCTION 605
64. Vršková, M., Tvarožková, K., Tančin, V., Uhrinčať, M., Mačuhová, L., Holko, I.: OCCURRENCE OF MASTITIS PATHOGENS AT DRY OFF PERIOD IN DAIRY COWS 610
65. Výrostková, J., Kováčová, M., Regecová, I., Dudriková, E., Zahumenská, J., Hanzelová, Z., Gregová, G.: DETECTION OF *PSEUDOMONAS* BACTERIA IN RAW COW'S MILK 617
66. Zábrodská, B., Vepřková, E.: DEVELOPMENT OF TENDERNESS AND GRILLING WEIGHT LOSS DURING MEAT MATURATION OF GALLOWAY BULLS AND COWS 623
67. Zahumenská, J., Dudriková, E., Kováčová. M., Zigo, F., Paulsen, P., Ondrašovičová, S.: MORPHOLOGICAL CHARACTERISTICS OF SOMATIC CELLS IN COW'S MILK 637
68. Zahumenská, J., Ondrašovičová, S., Gubová, M., Kováčová, M.: QUALITY CONTROL OF VEGETABLE OILS THROUGH SELECTED INDICATORS 643
69. Zajác, P., Čapla, J.: GUIDES OF GOOD HYGIENIC PRACTICE FOR THE DAIRY SECTOR IN THE SLOVAK REPUBLIC 648
70. Zdolec, N., Kiš, M., Kavain, I., Batinić, J., Franičević, M., Čaušević, S.: UPGRADING THE CHEESE PRODUCTION IN CROATIA BY USING MEDICINAL AND AROMATIC HERBS – AN EXAMPLE OF THE EUROPEAN REGIONAL DEVELOPMENT FUND PROJECT *CEKOM 3LJ* 656
71. Zigo, F., Lacková, Z., Farkašová, Z., Arvaiová, J., Vargová, M., Halás, Š., Ondrašovičová, S., Bak, K.H., Paulsen, P.: USE OF RAPID FARM TEST TO DETECTION MASTITIS IN DAIRY COWS 661
72. Ženišová, K.: STUDY OF ACETIC FERMENTATION OF WINE USING DIFFERENT STRAINS OF ACETIC ACID BACTERIA 671

PREDNÁŠKY

LECTURES

VÝSLEDKY ÚRADNÝCH KONTROL POTRAVÍN NA SLOVENSKU

RESULTS OF OFFICIAL FOOD CONTROLS IN SLOVAKIA

Bíreš Jozef

Štátna veterinárna a potravinová správa SR, Botanická 17, 84213 Bratislava, Slovenská republika

ABSTRACT

Authorities of the State Veterinary and Food Administration perform official control in the area of plant origin food and animal origin food. Their performance of the official control is based on the concept of Plan of the official controls, in order to ensure high level of protection of the human health and interests of the consumers in the whole food chain, from the primary production to the retail sale.

Key words: official control, food safety, quality of food, laboratory analysis, deficiences, targeted control

ÚVOD

Výsledky úradných kontrol potravinárskych prevádzkarní

V Slovenskej republike bolo v roku 2022 celkovo zaregistrovaných v zmysle §6 zákona 152/1995 Z.z 16 301 právnych subjektov a 28 008 prevádzkarní. Každý prevádzkovateľ vrátane prevádzkovateľa predaja na diaľku, okrem prevádzkovateľov uvedených v osobitnom predpise, musí oznámiť podľa osobitného predpisu príslušnému orgánu úradnej kontroly potravín každú prevádzkareň podliehajúcu jeho kontrole, ktorá vykonáva činnosť na akomkoľvek stupni výroby, spracúvania a distribúcie potravín na účely registrácie. Prevádzkovateľ vrátane prevádzkovateľa predaja na diaľku, okrem prevádzkovateľov uvedených v osobitnom predpise, musí oznámiť príslušnému orgánu úradnej kontroly potravín akúkoľvek významnú zmenu činnosti prevádzkarne alebo jej uzatvorenie.

VÝSLEDKY

V roku 2022 bolo skontrolovaných 8 378 právnych subjektov. Vykonaných bolo celkovo **49 888** úradných kontrol potravín na všetkých stupňoch v reťazci, pričom z tohto počtu bolo 2 504 **kontrol s nedostatkom**.

Bežné kontroly v pracovnej dobe boli vykonané v počte 49 138, z čoho bolo 2 232 kontrol s nedostatkom, čo predstavuje 4,5 % kontrol z počtu bežných kontrol.

Kontroly mimo pracovnej doby boli vykonané v počte 750, z čoho bolo 272 kontrol s nedostatkom, čo predstavuje 36,3 % kontrol z počtu kontrol mimo pracovnej doby.

Z celkového počtu 8 378 skontrolovaných právnych subjektov / t.j. u 15 032 **prevádzkarní** / boli zistené nedostatky v 2 003 **prevádzkarňach** *(t. j 13,3 %) - (porušenosť v roku 2021 predstavovala 14,0 %).*

Najčastejšie boli pri úradných kontrolách **na úrovni maloobchodu** zisťované uvedené typy nedostatkov (Tabuľka č. 1):

Tabuľka č. 1, *Počet kontrol s nedostatkom nie je súčtom celého stĺpca, nakoľko v niektorých prípadoch v rámci jednej úradnej kontroly bolo zistených viac typov nedostatkov

Typ nedostatku - maloobchod	Počet kontrol s nedostatkom	Počet nedostatkov celkom
Hygiena technologického zariadenia, pracovné pomôcky	533	1260
Označenie - nečitateľné, nedostatočné alebo nesprávne	446	1022
Hygiena budov, hygiena prevádzkarne	443	1685
Osobná hygiena	372	473
Hygiena skladovania	287	1017
po DS/DMT	264	1039
Hygiena predaja	221	653
Dodržiavanie a evidencia teplotných režimov	136	248
Nevyhovujúce laboratórne analýzy	107	115
HACCP, SPP a podobné systémy	65	187

Najviac nedostatkov 2464 bolo v stredných predajniach, a to v 2003 prevádzkarňach.

Nedostatky sa týkali označenia, hygieny technologických zariadení, pracovných pomôcok, predaja po dátume spotreby a dobe minimálnej trvanlivosti, hygieny budov a prevádzkarne, osobnej hygieny.

Najvyššia frekvencia nezhôd sa vyskytovala v maloobchode. Prehľad najčastejšie zistených skupín nedostatkov (počty úradných kontrol v zmysle zákona č.152/95 Z. z.) sú uvedené v prehľadových tabuľkách nižšie a porovnaním stavu v roku 2021 a 2022.

Prevádzkovateľom potravinárskych podnikov boli uložené opatrenia na odstránenie zistených nedostatkov a následne uložená pokuta v zmysle zákona č.71/1967 o správnom konaní.

Tabuľka č. 2, Porovnanie počtu kontrol s nedostatkom v rokoch 2021 a 2022 v obchodnej sieti a vývoj za sledované obdobie v jednotlivých oblastiach

Hypermarkety a supermarkety

Hygiena budov, hygiena prevádzkarne	174	2021
Označenie - nečitateľné, nedostatočné alebo nesprávne	91	
Hygiena skladovania	92	
Hygiena technologického zariadenia, pracovné pomôcky	162	
Hygiena predaja	77	
po DS/DMT	68	
Poškodený obal, tovar	12	
Hygiena budov, hygiena prevádzkarne	228	2022
Označenie - nečitateľné, nedostatočné alebo nesprávne	122	
Hygiena skladovania	146	
Hygiena technologického zariadenia, pracovné pomôcky	211	
Hygiena predaja	107	
po DS/DMT	94	
Poškodený obal, tovar	9	

Stredné predajne

Hygiena technologického zariadenia, pracovné pomôcky	202	2021
Hygiena budov, hygiena prevádzkarne	113	
Osobná hygiena	193	
Hygiena skladovania	62	
Označenie - nečitateľné, nedostatočné alebo nesprávne	179	
Hygiena predaja	77	
po DS/DMT	79	
Hygiena technologického zariadenia, pracovné pomôcky	204	2022
Hygiena budov, hygiena prevádzkarne	150	
Osobná hygiena	201	
Hygiena skladovania	86	
Označenie - nečitateľné, nedostatočné alebo nesprávne	173	
Hygiena predaja	69	
po DS/DMT	104	

Malé predajne

Osobná hygiena	129	2021
Označenie - nečitateľné, nedostatočné alebo nesprávne	121	
Hygiena technologického zariadenia, pracovné pomôcky	109	
Hygiena budov, hygiena prevádzkarne	70	
Hygiena predaja	55	
Hygiena skladovania	49	
Dodržiavanie a evidencia teplotných režimov	41	
Osobná hygiena	138	2022
Označenie - nečitateľné, nedostatočné alebo nesprávne	137	
Hygiena technologického zariadenia, pracovné pomôcky	116	
Hygiena budov, hygiena prevádzkarne	64	
Hygiena predaja	43	
Hygiena skladovania	54	
Dodržiavanie a evidencia teplotných režimov	54	

V Tabuľke č. 3 sú uvádzané najviac vyskytujúce sa nedostatky, zoradené podľa počtu úradných kontrol v príslušnom kalendárnom roku zistené na všetkých stupňoch reťazca.

Tabuľka č. 3, Porovnanie celkového počtu úradných kontrol s nedostatkom v rokoch 2021 a 2022

Oblasť kontroly	Rok	
	2022	2021
Hygiena technologického zariadenia, pracovné pomôcky	612	536
Hygiena budov, prevádzky	539	440
Označenie nečitateľné, nedostatočné, nesprávne	509	466
Osobná hygiena	401	387
Hygiena skladovania	334	248
Hygiena predaja	224	211
Predaj po DS/DMT	274	198
Nevyhovujúce laboratórne analýzy	172	184
Dodržiavanie a evidencia teplotných režimov	157	152
Nedostatky v dokumentácii	91	117
DDD, evidencia, výskyt škodcov	86	74
HACCP, SPP a podobné systémy	107	80
Registrácia	45	74
Sanitačný poriadok, evidencia	62	69
Vysledovateľnosť	78	56

Graf č. 1, Porovnanie počtu kontrol za roky 2021 až 2022



Graf č.2, Porovnanie porušenosti pri úradných kontrolách v rokoch 2021 až 2022



Politika kvality

V zmysle Zákona NR SR č. 152/1995 Z. z. o potravinách v znení neskorších predpisov, § 9a odsek (9) úradnú kontrolu poľnohospodárskych výrobkov a potravín s chráneným označením pôvodu (CHOP), s chráneným zemepisným označením (CHZO) alebo s označením zaručenej tradičnej špeciality (ZTŠ) spĺňajúcich požiadavky podľa osobitných predpisov vykonávajú orgány štátnej veterinárnej a potravinovej správy.

Pri bežných plánovaných úradných kontrolách v obchodnej sieti preto inšpektori úradnej kontroly potravín na jednotlivých RVPS kontrolovali aj oprávnenosť použitia loga na výrobkoch s chráneným označením.

V roku 2022 bolo v obchodnej sieti vykonaných spolu 1 258 úradných kontrol, pri ktorých boli skontrolované potraviny rastlinného aj živočíšneho pôvodu s chráneným označením. Spolu bolo prekontrolovaných 3406 výrobkov, z toho bolo 568 výrobkov s chráneným označením pôvodu, 2206 výrobkov s chráneným zemepisným označením a 632 výrobkov s označením zaručená tradičná špecialita. Podľa krajiny pôvodu išlo najmä o výrobky zo Slovenska, Českej republiky, Talianska, Nemecka, Grécka, Litvy, Francúzska, Španielska, a z iných krajín. Medzi najčastejšie prekontrolované komodity patrili syry, mäsové výrobky, pivo a olivový olej. Pri uvedených kontrolách neboli zistené nedostatky.

ZÁVER

Výsledky úradných kontrol potravín na Slovensku za rok 2022 potvrdili garancie zdravotnej bezpečnosti a kvality potravín predávaných na slovenskom trhu. Ochrana spotrebiteľa je zabezpečená konsolidovaným systémom úradných kontrol potravín na každom stupni potravinového reťazca cestou organizácií Štátnej veterinárnej a potravinovej správy SR. Nástroj analýzy rizika umožňuje proaktívne uplatňovať opatrenia na ochranu spotrebiteľa v prípade porušenia potravinového práva.

Kontaktná adresa: Bíreš Jozef**,** Štátna veterinárna a potravinová správa SR, Botanická 17, 84213 Bratislava, Slovenská republika, E-mail: jozef.bires@svps.sk

PRÍTOMNOSŤ BAKTÉRIÍ REZISTENTNÝCH VOČI ANTIBIOTIKÁM V SUROVOM MLIEKU A POTRAVINÁCH RASTLINNÉHO PÔVODU

OCCURENCE OF ANTIBIOTIC RESISTANT BACTERIA IN RAW MILK AND FOOD OF PLANT ORIGIN

Bírošová Lucia, Koreneková Júlia, Cverenkárová Klára, Krahulcová Monika

Oddelenie výživy a hodnotenia kvality potravín, Ústav potravinárstva a výživy, Fakulta chemickej a potravinárskej technológie STU Radlinského 9, 81237 Bratislava, Slovenská republika

ABSTRACT

Incidence of foodborne diseases in developing and developed countries represents a significant number. Even if causative agent is antibiotic resistant bacteria, this threatens the consumers health and increases the cost of his treatment. In our work, we focused on monitoring the occurrence of antibiotic resistant coliform bacteria and enterococci in raw milk, vegetable and fruit salads and smoothies from food establishments, as well as in flour and plant powders, which are gaining more and more popularity among consumers. The presence of antibiotic resistant bacteria was recorded in samples raw milk from wending machines and in smoothies as well as in flour and powders. Multidrug resistant isolates occurred only in raw milk and smoothies. These isolates have efflux pumps overproduction. Most of the obtained isolates belonged to strong and moderate biofilm producers. The bla_{OXA} and bla_{SHV} genes were mainly detected in a one fifth of the isolates of coliforms. Our results point to the fact that raw food even plant-based food can represent a microbiological risk for the consumer, especially for immunocompromised persons.

Key words: antibiotic resistance, coliform bacteria, enterococci, raw milk, smoothie, flour

ÚVOD

Globalizácia, znečistenie prostredia či nové trendy v stravovaní predstavujú výzvy pre neustály dohľad nad bezpečnosťou potravín na trhu. Nejde pri tom len o chemickú, ale najmä o mikrobiologickú bezpečnosť, nakoľko incidencia alimentárnych nákaz v rozvojových ale aj v rozvinutých krajinách predstavuje nezanedbateľné číslo. Ak sú pôvodcom alimentárnej nákazy baktérie odolné voči antibiotikám, ohrozuje to nielen zdravie konzumenta ale taktiež zvyšuje náklady na jeho liečbu. Riziko expozície konzumenta závisí aj od prípravy jedla a preferencie spotrebiteľa. Rastúci dopyt po surových a nedostatočne tepelne upravených potravinách môže mať za následok zvýšené riziko expozície rezistentnými mikroorganizmami

(Bennani a kol., 2020). Obavy vyvoláva najmä konzumácia tepelne neupravenej alebo surovej stravy, ktorá môže viesť k prenosu rezistentných baktérií ako aj génov rezistencie (Manyi-Loh a kol., 2018).

Baktérie rezistentné voči antibiotikám sa v tele hospodárskych zvierat zvyčajne vyvíjajú po požití antibiotík (ATB), avšak v potravinách rastlinného pôvodu je mikrobiálna rezistencia často dôsledkom kontaminácie rezistentnými baktériami a génmi rezistencie v celom potravinovom reťazci. Medzi významné zdroje mikrobiálnej kontaminácie v prostredí patrí pôda, organické hnojivá a závlahová voda (Cheng a kol., 2019). Veľká časť ATB podávaných hospodárskym zvieratám nie je transformovaná na neaktívne zlúčeniny a zachováva si svoju aktivitu aj po vylúčení do životného prostredia. Vylučované lieky môžu v prostredí pretrvávať a spôsobovať náhodnú a spontánnu mutagenézu v exponovaných bakteriálnych populáciách (Manyi-Loh a kol., 2018). Pôda predstavuje rezervoár rezistentných baktérií nesúcich rozmanitý súbor determinantov rezistencie (Thanner a kol., 2016). Ošetrenie pôdy maštaľným hnojom do značnej miery ovplyvňuje početnosť baktérií rezistentných voči ATB a zodpovedajúcich génov rezistencie (Thanner a kol., 2016; Manyi-Loh a kol., 2018). Zároveň, po vstupe do pôdy môže dochádzať k prenosu mobilných genetických prvkov medzi rovnakými alebo rôznymi bakteriálnymi druhmi, najmä v rámci čeľade *Enterobacteriaceae* (Gao a kol., 2015). Baktérie prítomné v pôde prechádzajú do povrchových vôd a v konečnom dôsledku môžu negatívne ovplyvňovať vývoj rastlín a kvalitu potravinárskych výrobkov (Thanner a kol., 2016). Voda používaná na zavlažovanie je vo všeobecnosti považovaná za významný zdroj bakteriálnej kontaminácie, najmä listovej zeleniny. Niekoľko autorov charakterizovalo rezistentné baktérie a gény rezistencie v zelenine, vrátane kapusty, reďkovky, šalátu, zelenej kukurice, cibule a mrkvy pestovaných na hnojenej pôde zavlažovanej odpadovou vodou (Manyi-Loh a kol., 2018)

MATERIÁL A METODIKA

V práci boli použité vzorky surového mlieka, smoothie nápojov, šalátov, múk a rastlinných práškov zakúpených v potravinových prevádzkach (zariadenia spoločného stravovania, obchodné reťazce) v Bratislave. Vzorky mlieka boli odobraté z mliekomatov v Bratislave a Liptovskom Mikuláši. V prípade smoothie nápojov bolo analyzovaných 20 vzoriek (7 zeleninových, 13 ovocných) zo 6 prevádzok. Desať vzoriek čerstvých ovocných a zeleninových šalátov pochádzalo zo 7 prevádzok. Ďalej bolo analyzovaných 29 vzoriek rôznych cereálnych múk a 30 vzoriek rastlinných práškov.

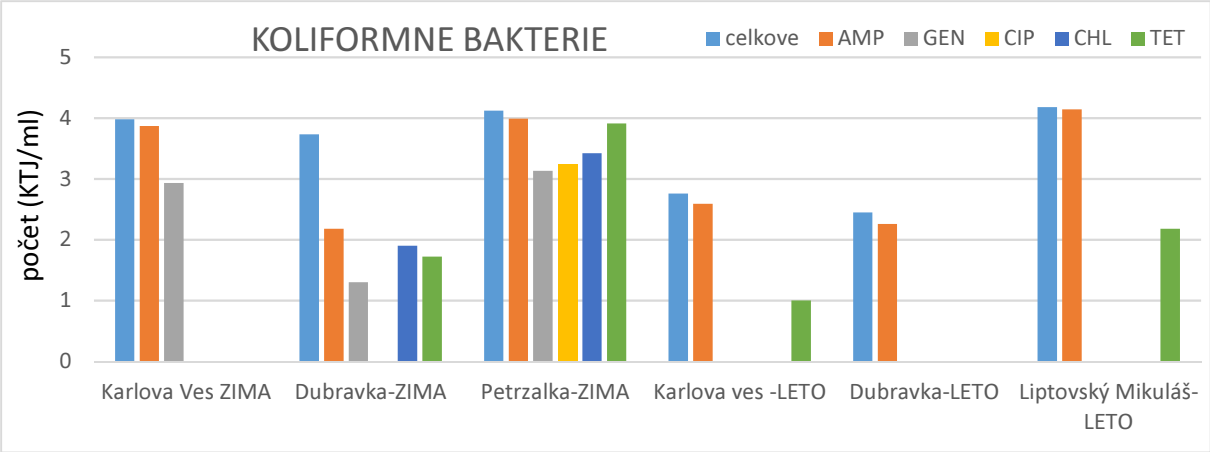
Vzorky čerstvých potravín (mlieko, smoothie, šalát) boli ihneď transportované do laboratória a kde prebehla mikrobiologická analýza. Koliformné baktérie (KFB) boli kultivované na

Chromocult coliform agar 24h pri 37°C a enterokoky (ENK) 48h pri 40°C na diagnostickom médiu Slanetz-Bartley. V prípade selekcie rezistentných baktérií bolo do média pridané antibiotikum o koncentrácií určujúcej hranicu rezistencie, ktorú udáva Európsky výbor pre testovanie antimikrobiálnej citlivosti (EUCAST). Vyrastené rezistentné kolónie boli následne izolované a identifikované pomocou MALDI-TOF. Citlivosť na antibiotiká jednotlivýh izolátov bola testovaná makrodilučnou kvapkovou metódou (Lépesová a kol.,2020). Tvorba biofilmu bola stanovená spektrofotometricky s kryštálovou violeťou (Beenken a kol, 2003). Nadprodukcia efluxných púmp bola detogovaná s využitím etídium bromidu Carthweelovou metódou (Lépesová a kol., 2020). Gény rezistencie sa stanovovali pomocou PCR a to v prípade betalaktamáz (TEM, SHV, OXA) ako aj génov kódujúcich efluxné pumpy pre tetracyklín (*tetA*, *tetE*). U ENK rezistentných voči vankomycínu sa stanovoval *vanA* gén (Lépesová a kol., 2020).

VÝSLEDKY A DISKUSIA

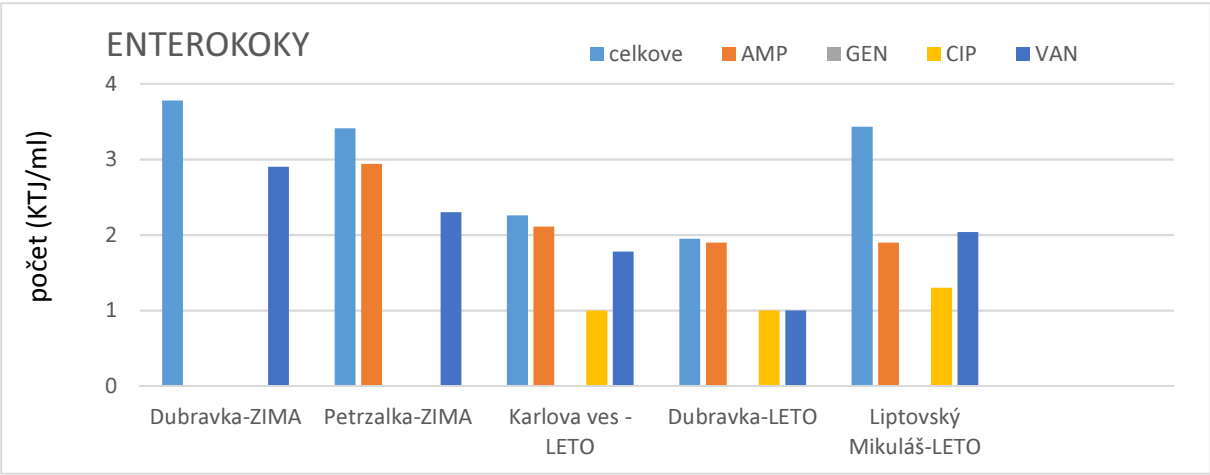
Surové mlieko

Nakoľko surové mlieko je medzi slovenskými spotrebiteľmi obľúbené a niektorí z nich nerešpektujú upozornenia týkajúce sa jeho tepelného ošetrenia, sledovali sme prevalenciu rezistentných KFB a ENK ako ukazovateľov mikrobiálnej kvality surového mlieka odoberaného z mliečnych automatov na Slovensku. Celkový počet KFB bol stanovený v rozmedzí 2,45 – 4,18 log KTJ/ml Pri sledovaní rezistentných KFB boli použité ATB: ampicilín, gentamicín, ciprofloxacín, tetracyklín a chloramfenikol. Zvolené ATB reprezentujú rozličné antimikrobiálne skupiny. Najvyšší percentuálny podiel rezistentov medzi KFB sme zväčša evidovali v prípade ampicilínovej rezistencie (Obr. 1). Dôvodom je fakt, že majorita týchto baktérií disponuje prirodzenou rezistenciou voči ampicilínu, V zimných vzorkách z mliečneho automatu v Petržalke sme zaznamenali najvyššie počty rezistentných KFB. Najlepšie výsledky boli naopak detegované vo vzorkách surového mlieka odobraného z mliekomatu v Dúbravke, počas letného obdobia. Letné mlieko vo všeobecnosti vykazovalo nižšiu prevalenciu rezistentných KFB v porovnaní so zimným mliekom.



Obrázok č. 1, Počty celkových a rezistentných koliformných baktérií v surovom mlieku

Počet celkových ENK vo vzorkách surového mlieka odoberaného z mliečnych automatov sa pohyboval medzi 1,95 – 3,78 log KTJ/ml (Obr. 2). Sledovali sme rezistenciu voči ATB: ampicilín, gentamicín, ciprofloxacín, vankomycín. V prípade stanovenia počtu rezistentných ENK sme aplikovali len hranice rezistencie dané normami EUCAST. Vo všetkých vzorkách surového mlieka bola zaznamenaná rezistencia voči vankomycínu. Rezistencia voči tomuto ATB, riadená niekoľkými génmi, je považovaná za hlavnú príčinu obáv, vzhľadom k obmedzeným liečebným možnostiam pre boj s infekciami spôsobenými VRE (Jung a kol., 2007). Dôležitosť týchto kmeňov prízvukuje aj ich prítomnosť na zozname rezistentných patogénov vytvorenom organizáciou WHO, zaraďujúca VRE medzi najvyššie prioritné patogény. Žiadna z testovacích vzoriek neobsahovala ENK rezistentné voči gentamicínu. Najčastejšie sme zaznamenali rezistenciu voči ampicilínu a menej voči 47 ciprofloxacínu. Rezistentné ENK prevažovali v letných vzorkách surového mlieka v porovnaní so zimným mliekom. Najlepšie výsledky vykazoval zimný odber z mliečneho automatu v Karlovej Vsi a Dúbravke, kde boli prítomné len VRE.

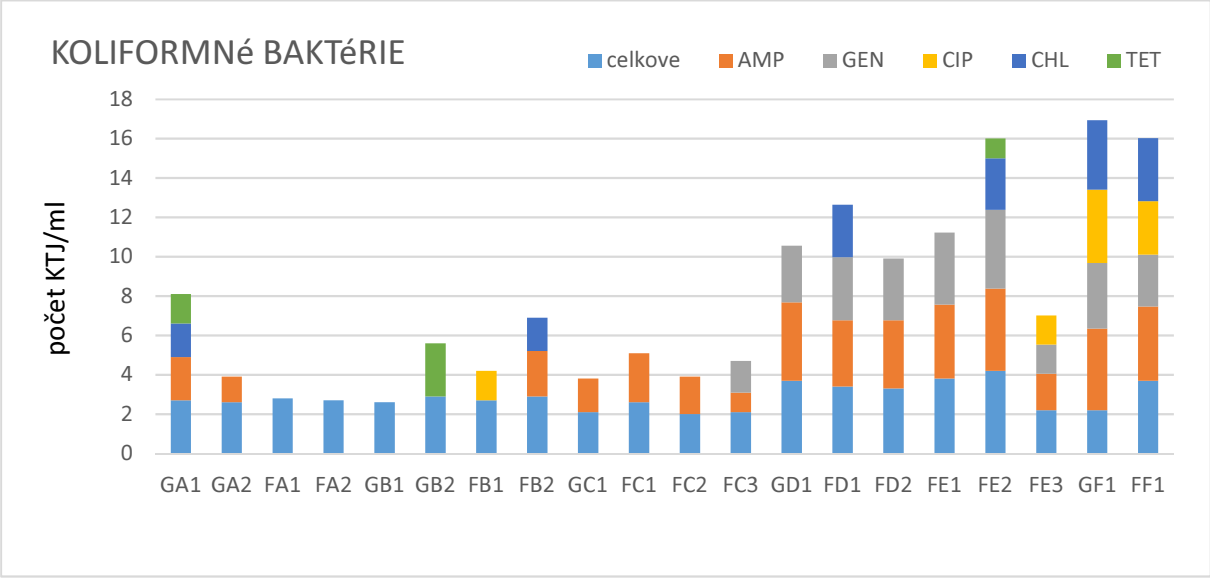


Obrázok č. 2, Počty celkových a rezistentných enterokokov v surovom mlieku

Následne bolo izolovaných 35 rezistentných KFB, identifikovaných ako *E. coli* (43 %), *Raoultella planticola* (23 %), *Hafnia alvei* (17 %), *Enterobacter ludwigii* (11 %) a *Citrobacter spp*. (6 %). Žiaden izolát nevykazoval multirezistenciu. Nadprodukcia efluxných púmp bola pozorovaná u 83 % izolátov. Väčšina kmeňov (66 %) obsahovala gén bla_{TEM}. Tiež bolo identifikovaných 27 rezistentných ENK, identifikovaných ako *E. faecalis* (37 %), *E. casseliflavus* (30 %), *E. gallinarum* (18 %) a *E. faecium* (15 %). Deväť kmeňov bolo multirezistentných. Gén pre vankomycín *vanA* bol zaznamenaný u 7 % kmeňov.

Smoothie nápoje

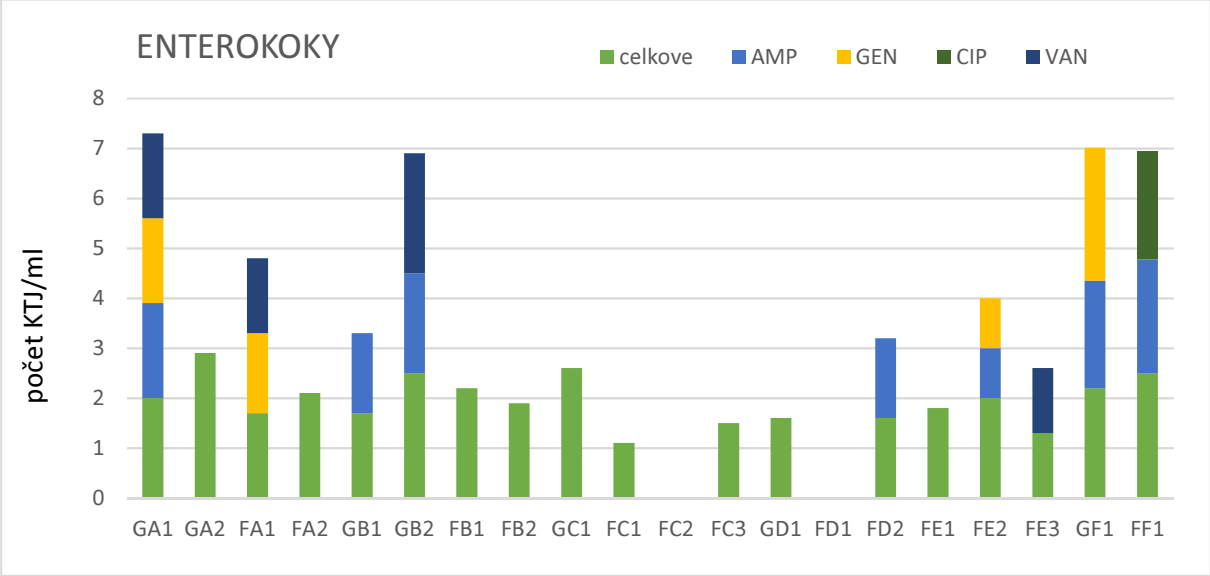
V posledných rokoch je badateľná zmena životného štýlu. Objavili sa mnohé nové trendy v stravovacích návykoch preferujúce menej spracované potraviny pre zachovanie nutričných hodnôt pôvodných surovín. Smoothie nápoje pripravené z čerstvých ingrediencií, ovocia a zeleniny, si získali svoju obľubu u konzumentov. Tieto nápoje je možné zakúpiť si v rôznych stravovacích zariadeniach či obchodných sieťach. Okrem nutričnej hodnoty výrobku je však potrebné zvážiť aj riziko kontaminácie patogénnymi baktériami, ktoré je u tepelne neopracovaných komodít výrazne vyššie. Prítomnosť rezistentných KFB a ENK sme sledovali vo vzorkách zelených (G) aj ovocných (F) nápojov zakúpených v 6 (A-F) prevádzkach v Bratislave a vybraných na základe preferencií spotrebiteľov. Všetky vzorky obsahovali KFB (Obr. 3), pričom rezistenty neboli pozorované iba v 3 vzorkách. Najväčšie spektrum rezistentných KFB bolo pozorovaných vo vzorkách z prevádzky E a F.



Obrázok č. 3, Počty celkových a rezistentných koliformných baktérií v smoothie nápojoch

Enterokoky sa nevyskytovali v 2 vzorkách ovocných smoothie z 2 rôznych prevádzok (Obr. 4). V porovnaní s KFB sa rezistentné ENK vyskytovali len v 9 vzorkách smoothie.

Rezistencia voči ciprofloxacínu bola pozorovaná len v 1 vzorke ovocného smoothie. Pri smoothie nápojoch neboli izolované rezistentné enterokoky.



Obrázok č. 4, Počty celkových a rezistentných enterokokov v smoothie nápojoch

Zo smoothie nápojov bolo izolovaných 106 rezistentných KFB. Väčšina bola identifikovaná ako *Enterobacter spp.* a *Klebsiella spp.* Multirezistenciu vykazovalo 10 % kmeňov a nadprodukciu efluxných púmp až 20 % izolátov. Takmer 90 % rezistentov tvorilo silný alebo veľmi silný biofilm. Zo sledovaných betalaktamáz bola pozorovaná najmä prítomnosť bla_{OXA}.

Zeleninové a ovocné čerstvé šaláty

Počty celkových KFB sa vo vzorkách pohybovali medzi 2,10 log KTJ/g až 5,80 log KTJ/g. Najnižšie počty celkových aeróbnych baktérií a KFB boli detegované v prípade vzorky ovocného šalátu. Najvyššie počty KFB boli detegované vo vzorkách zeleninových šalátov podávaných formou obedového menu v školskej jedálni. Počas monitoringu bola zaznamenaná rezistencia iba pri aplikácii ATB ampicilín, ktorá je u KFB prirodzená. V prípade analyzovaných šalátov nebola v žiadnej zo vzoriek zaznamenaná baktéria *E. coli*, čo odpovedá mikrobiologickým kritériám podľa nariadenia komisie (ES) č. 360/2011. Baktérie rodu *Enterococcus spp.* boli detegované iba v prípade jedinej vzorky zeleninového šalátu. Rezistencia voči vybraným ATB nebola u ENK detegovaná.

Múky a rastlinné prášky

KFB sa vyskytovali v 17 z 29 vzoriek rastlinných práškov v intervale od 2,26 - 5,26 log KTJ/g a v 16 z 20 vzoriek múky v rozmedzí 2,26 – 4,13 log KTJ/g. V 13 vzorkách múky boli

zaznamenané KFB rezistentné voči ampicilínu a v jednej vzorke ražnej múky aj voči gentamicínu. V prípade práškov bola rezistencia voči ampicilínu zaznamenaná v 12 vzorkách, v 6 vzorkách aj voči gentamicínu. Vzorka gaštanovej múky obsahovala KFB rezistentné voči štyrom sledovaným antibiotikám (ampicilín, gentamicín, chloramfenikol a tetracyklín).

ENK sa nachádzali iba v rastlinných práškoch (n=6) v intervale 2,43 – 4,68 log KTJ/g, pričom všetky tieto vzorky obsahovali ENK rezistentné voči ampicilínu. V troch vzorkách gaštanového a kokosového prášku sa nachádzali aj VRE. Prítomnosť celkových a rezistentných KFB a ENT v práškoch ako cícerový, ryžový, banánový, pohánkový, mandľový a kokosový vyvoláva značné znepokojenie, keďže sa odporúčajú aj na použitie v studenej kuchyni na prípravu nápojov, nátierok, šalátov, na ochutenie jogurtu, prípravu smoothies a pod (online 1).

Z týchto vzoriek bolo izolovaných 32 rezistentných kmeňov KFB prevažne identifikovaných ako *Klebsiella spp* a *Enterobacter spp*. a 10 izolátov ENK identifikovaných najmä ako *E. casseliflavus*. Izoláty nevykazovali multirezistenciu ani nadprodukciu efluxných púmp. Z betalaktamáz sa u 12 % kmeňov vyskytoval iba gén bla_{SHV} iné betalaktamázy neboli zaznamenané.

ZÁVER

Bakteriálna rezistencia voči antibiotikám stále predstavuje jedno z najväčších ohrození zdravia a života. Rezistentné kmene baktérií sa nachádzajú ubikvitne v prostredí, nevynímajúc potravinový reťazec. Naša práca poukazuje na dôležitosť tepelného opracovania nielen potravín nielen živočíšneho ale aj rastlinného pôvodu, nakoľko aj tieto potravinu môžu byť významným zdrojom rezistentných baktérií a prispievať k šíreniu rezistencie v potravinovom reťazci.

POĎAKOVANIE

Táto práca vznikla s podporou projektu VEGA 1/0464/21.

POUŽITÁ LITERATÚRA

1. BEENKEN, K. E.-BLEVINS, J. S.-SMELTZER, M. S. Mutation of *sarA* in *Staphylococcus aureus* Limits Biofilm Formation. In *Infection and Immunity*. 2003, vol. 7, p. 4206-4211.
2. BENNANI, H. a kol. Overview of Evidence of Antimicrobial Use and Antimicrobial Resistance in the Food Chain. In *Antibiotics*, 2020, v. 9.
3. CAPITA, R. – ALONSO-CALLEJA, C. Antibiotic-Resistant Bacteria: A Challenge for the Food Industry. In *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2013, v. 53, p. 11–48.

4. DALLENE, C. a kol. Development of a set of multiplex PCR assays for the detection of genes encoding important beta-lactamases in *Enterobacteriaceae.* In *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2010, v. 65, p. 490-495.
5. EUCAST - EUROPEAN COMMITTEE ON ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY TESTING. 2021. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version
6. 11.0, 2021.
7. CHENG, G. a kol. Selection and dissemination of antimicrobial resistance in Agri-food production. In *Antimicrobial Resistance & Infection Control*, 2019, v. 8.
8. GAO, L. a kol. Application of swine manure on agricultural fields contributes to extended-spectrum β-lactamase-producing *Escherichia coli* spread in Tai'an, China. In *Frontiers in Microbiology*, 2015, v. 6
9. JUNG, W.K. a kol. Vancomycin-resistant enterococci from animal sources in Korea. In *International Journal of Food Microbiology*, 2007, v. 113, p.102 – 107
10. LÉPESOVÁ a kol. Hospital wastewater—important source of multidrug resistant coliform bacteria with ESBL-production. In *International Journal of Environmental Research and Public Health* 17(21), 2020, 7827, pp. 1-14
11. MANYI-LOH, C. a kol. Antibiotic Use in Agriculture and Its Consequential Resistance in Environmental Sources: Potential Public Health Implications. In *Molecules*, 2018, v. 23.

Kontaktná adresa: Bírošová Lucia, Department of Nutrition and Food Quality Assessment, Institute of Food Science and Nutrition, Faculty of Chemical and Food Technology, Slovak University of Technology, Radlinského 9, 81237 Bratislava, Slovak Republic; E-mail: lucia.birosova@stuba.sk

MLÉKO A MLÉČNÉ VÝROBKY – AKTUÁLNÍ TRENDY

MILK AND DAIRY PRODUCTS – CURRENT TRENDS

Bursová Šárka

Ústav hygieny a technologie potravin živočišného původu a gastronomie, Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární univerzita Brno, Palackého tř. 1946/1, 612 42 Brno, Česká republika

ABSTRACT

A change in lifestyle and eating habits logically entails requirements for a change in food. Food innovations take place in different ways – the development of novel foods or products with unusual flavors, the use of ecological packaging, new production technologies or reformulation of products. In the case of dairy products, reformulations are most often aimed at adjusting the content of basic nutrients, reducing the content of salt and added sugars, minimizing the use of additives or product fortification. The article provides a brief overview of new trends in the production of milk and milk products.

Key words: reformulation, convenience, sustainability

ÚVOD

Mléko přestavuje svým složením téměř ideální potravinu, obsahuje všechny živiny potřebné pro normální růst a vývoj mláďat. Mléko je komplexní potravina obsahující téměř všechny nutričně významné makro a mikroživiny. Současně se jedná o potravinu zcela přirozeného původu (Golian).

Inovace potravin může probíhat různým způsobem a na různých úrovních. Na trh může být uveden zcela nový produkt, příkladem mohou být potraviny nového typu tzv. Novel Food. Novým výrobkem může být i výrobek nové, neobvyklé chuti nebo výrobek určený pro konkrétní skupinu spotřebitelů. V poslední době velmi akcentovaným způsobem inovace výrobků jsou jejich reformulace. Výrobek může mít zvýšenou nutriční hodnotu, je zabalen do nového typu obalu s lepšími funkčními vlastnostmi nebo obalu, který je vyroben ekologičtějším způsobem. Mezi inovace patří také využití nových výrobních technologií, např. membránových technik. Kombinace jednotlivých možností inovace výrobků jsou časté.

REFORMULACE MLÉČNÝCH VÝROBKŮ

Jako reformulace se označuje úprava složení potravinářského výrobku ve prospěch zdravého životního stylu. Jednou z možností je snížení kalorické hodnoty potraviny či snížení složky, jejíž nadměrná konzumace přispívá ke vzniku obezity jako hlavního rizikového faktoru rozvoje neinfekčních onemocnění. Druhá cesta spočívá ve vylepšení nutričního složení potraviny ve smyslu přidání prospěšných složek (vláknina, bílkoviny) nebo mikroprvků. Prvořadou podmínkou reformulace potravin je zachování jejich kvality a bezpečnosti. Jednou ze strategií reformulace je snížení celkového objemu konzumované stravy, což je podmíněno dostupností malých nebo zmenšených porcí (web reformulace).

V případě mléčných výrobků jsou reformulace nejčastěji zaměřeny na úpravu zastoupení základních živin (zvýšení podílu bílkovin, snížení obsahu tuku), snížení obsahu soli a přidaných cukrů, minimalizace, případně úplné vypuštění použití přídatných látek, fortifikace výrobku vybranými minerálními látkami, vitamíny či jeho obohacení jinou nutričně prospěšnou složkou.

Reformulace konzumního mléka je omezena skutečností, že podle platných legislativních předpisů (Nařízení EP a Rady č. 1308/2013) nelze až na výjimky z mléka nic odebírat ani přidávat. Mezi povolené výjimky patří úprava obsahu mléčného tuku (v tomto případě se nejedná o klasickou reformulaci), snížení obsahu laktózy (obvykle její přeměnou na glukózu a galaktózu) či fortifikace mléka přídavkem vitamínů (vitamín D) či mléčných bílkovin (na nejméně 3,8 %) (Nařízení EP a Rady č. 1925/2006).

Mléčné bílkoviny jsou vysoce stravitelné (z téměř 95 %) a jsou významným zdrojem esenciálních aminokyselin. Konzumenty jsou velmi dobře přijímány, ve střevě se dobře vstřebávají. Mimo nutriční funkce mají řadu funkcí fyziologických týkajících se funkce kardiovaskulárního a nervového systému, obranyschopnosti organismu, transportu minerálních látek (železo, vápník) a trávicího systému (Golian). Obohacování mléčných výrobků o další mléčné proteiny je vhodné nejen pro nárůst svalové hmoty, ale také jako prevence řady civilizačních chorob. Zvýšený příjem je žádoucí u skupin obyvatel vyžadujících zvýšený příjem proteinů, jako jsou sportovci či senioři.

Velké možnosti pro reformulace složení výrobků nabízejí fermentované mléčné výrobky. Aktuálními trendy jsou tzv. koncentrované mléčné výrobky, tj. vysokoproteinové jogurty a nápoje, či bezlaktózové jogurty a zakysané smetany. Inovace jsou zaměřeny také na snížení přidaného cukru u ochucených výrobků, úpravu mikrobiálního složení přídavkem probiotických a protektivních kultur či jejich obohacení přídavkem vlákniny a prebiotik (Kopáček, 2019).

Přibližně 10-12 % populace má problémy s trávením mléčného cukru laktózy. Z tohoto důvodu je vývoji bezlaktózových výrobků či výrobků s nízkým obsahem laktózy věnována značná pozornost. V souladu s vyhláškou č. 54/2004 Sb. ve znění vyhlášky č. 39/2018 Sb. jsou jako výrobky s nízkým obsahem laktózy označeny výrobky obsahující 1 g laktózy / 100 g výrobku, jako bezlaktózové potom výrobky obsahující 10 mg laktózy / 100 g výrobku. Se snižováním obsahu laktózy se setkáváme zejména v případě konzumního mléka, fermentovaných mléčných výrobků a sýrů.

Reformulace přírodních a tavených sýrů je zaměřena zejména na náhradu mléčného tuku, snižování obsahu soli a přítomnosti aditivních látek. V případě náhrady mléčného tuku tukem rostlinným vzniká tzv. analogový výrobek, který nesmí být označen vyhrazeným názvem pro mléčný výrobek. Budoucím řešením snížení energetické hodnoty mléčných výrobků může být náhrada mléčného tuku mikropartikulovanými syrovátkovými bílkovinami (Kopáček, 2020). Z technologického hlediska hraje sůl při výrobě sýrů významnou roli – ovlivňuje výslednou chuť výrobku, aktivitu enzymů, růst bakteriálních kultur, podporuje synerezi sýřeniny a tím v konečném důsledku sušinu a texturu sýra a má také konzervační účinek. Na druhé straně stojí doporučení významných zdravotnických organizací snížit příjem sodíku na méně jak 2,3 g Na/ den, což odpovídá 5,8 g soli (Minárik). V případě přírodních sýrů není snížení obsahu soli o 0,4 – 0,5 % spotřebiteli vnímáno negativně a výrobek současně získá i zdravotní benefit. Vyšší míra snížení obsahu soli by však již mohla změnit původní charakter výrobku a zhoršit jeho kvalitu (Kopáček, 2020).

DALŠÍ NOVÉ TRENDY

Jako reakce na preference spotřebitelů je trh s mléčnými výrobky neustále obohacován. Spotřebitelé stále více upřednostňují kvalitní potraviny domácí provenience. Vedle oblíbených tradičních příchutí se lze v některých ročních obdobích (zima, léto) nárazově setkat s výrobky s neobvyklými příchutěmi často typickými právě pro dané roční období. Typicky je tomu tak u fermentovaných mléčných výrobků.

Trh s etnickými potravinami má v České republice výrazný růstový potenciál. Jedná se např. o české ekvivalenty tradičních sýrů jako mozzarella či halloumi. Návrat k české tradici představují výrobky z tvarohu, jehož obliba v posledních letech výrazně stoupá. Nelze opominout ani výrobky nesoucí značku kvality chráněné zeměpisné označení (CHZO) – Jihočeská niva, Jihočeská zlatá niva, Olomoucké tvarůžky, či národní značky kvality Klasa a Regionální potravina. S ekologickým přístupem k životu souvisí i mléčné výrobky řady BIO, jejichž spektrum se také stále rozšiřuje.

Další významnou oblastí je tzv. convenience a zážitkové domácí vaření. Do těchto inovací spadají výrobky upravené tak, aby co nejvíce usnadnily přípravu pokrmů (různé formy strouhaných sýrů či tvarohy, sýry upravené přímo na gril aj.).

S ohledem na udržitelnost životního prostředí lze za významnou inovaci považovat používání ekologických obalových materiálů. Příkladem je kartonový obal Pure-pak Imagine na mléko, který současně zachovává lepší vlastnosti produktu. Použitý karton má vyšší odolnost s nižší spotřebou papíru, obsahuje 10x méně plastů než průměrná PET láhev a je zcela biologicky rozložitelný (Potravinářská komora ČR, 2021).

ZÁVER

Pro řadu skupin spotřebitelů se jídlo stává trendem a stále více i životním stylem než jen pouhou potravou. Tento trend se týká také mléka a mléčných výrobků. Tomu nutně musí odpovídat i reakce zpracovatelů mléka a výrobců mlékárenských výrobků. Na rozdíl od řady mléčných výrobků je v případě konzumního mléka možnost uplatnění inovací poměrně omezená, ale i zde jsou určité možnosti spočívající např. v použití inovativních obalových materiálů či neustálé zlepšování pohody zvířat. Mléko a mléčné výrobky hrají ve výživě lidí nezastupitelnou roli a bude tomu tak jistě i do budoucna.

POĎAKOVANIE

Vznik příspěvku byl finančně podpořen z prostředků institucionální podpory dlouhodobého koncepčního rozvoje výzkumných organizací.

POUŽITÁ LITERATÚRA

1. ANONYMUS. Platforma pro reformulace. [online]. 2023 [cit. 2023-24-04]. Dostupné na internetu: <http://www.reformulace.cz/>.
2. GOLIAN, J., MINÁRIK, P., MINÁRIKOVÁ, D. *Potravinová a nutričná gramotnosť. 2. diel*. 1. vyd. Bratislava: Dr. Jozef Raabe Slovensko, s. r. o. 2021. s. 379–414. ISBN: 978-80-8140-622-5.
3. KOPÁČEK, J. 7 nejnovějších trendů v mléčných výrobcích, které byste měli ochutnat. 2019 [cit. 2023-24-04]. Dostupné na internetu: <http://www.cmsm.cz/prispevek-2019-nejnovejsi-trendy-v-mlecnych-vyrobcich.html>.
4. KOPÁČEK, J. Inovace v mlékárenství. 2020 [cit. 2023-24-04]. Dostupné na internetu: <https://www.foodnet.cz/images/J_Kopek_III.pdf>.

5. MINÁRIK, P., MINÁRIKOVÁ, D., GOLIAN, J., PENESOVÁ, A., BABJAKOVÁ, J. *Odporúčania pre stravovanie a výživu u dospelých*. 1. vyd. Bratislava: Dr. Jozef Raabe Slovensko, s. r. o. 2023. 216 s. ISBN: 978-80-8140-800-7.
6. NAŘÍZENÍ EVROPSKÉHO PARLAMENTU A RADY (EU) č. 1308/2013 ze dne 17. prosince 2013, kterým se stanoví společná organizace trhů se zemědělskými produkty a zrušují nařízení Rady (EHS) č. 922/72, (EHS) č. 234/79, (ES) č. 1037/2001 a (ES) č. 1234/2007. Úřední věstník L 347, 20. 12. 2013, s. 671-854.
7. NAŘÍZENÍ EVROPSKÉHO PARLAMENTU A RADY (ES) č. 1925/2006 ze dne 20. prosince 2006 o přidávání vitaminů a minerálních látek a některých dalších látek do potravin. Úřední věstník L 404, 30. 12. 2006, s. 26-38.
8. POTRAVINÁŘSKÁ KOMORA ČR. *Inovace v mlékárenství mají rychlé tempo*. [online]. 2021 [cit. 2023-24-04]. Dostupné na internetu: <https://bezpecnostpotravin.cz/inovace-v-mlekarenstvi-maji-rychle-tempo/>.
9. VYHLÁŠKA č. 39/2018 Sb. ze dne 2. března 2018 kterou se mění vyhláška č. 54/2004 Sb., o potravinách určených pro zvláštní výživu a o způsobu jejich použití, ve znění pozdějších předpisů. *Sbírka zákonů České republiky*, 2018, částka 20, 2. 3. 2018, s. 362-366.
10. VYHLÁŠKA č. 54/2004 Sb. ze dne 30. ledna 2004 o potravinách určených pro zvláštní výživu a o způsobu jejich použití. *Sbírka zákonů České republiky*, 2004, částka 17, 30. 1. 2004, s. 810-855.

Kontaktná adresa: Bursová Šárka, Department of Animal Origin Food and Gastronomic Sciences, Faculty of Veterinary Hygiene and Ecology, University of Veterinary Sciences Brno, Palackého tř. 1946/1, 612 42 Brno, Czech Republic; E-mail: bursovas@vfu.cz

OBSAH FTALÁTŮ V KRAVSKÉM MLÉCE V ZÁVISLOSTI NA ZPŮSOBU ZÍSKÁVÁNÍ

PHTHALATE CONTENT IN COW'S MILK DEPENDING ON THE METHOD OBTAINING

Jarošová Alžbeta[1], Bogdanovičová Soňa[2], Krejčíková Magdaléna[3]

[1]Ústav technologie potravin, Agronomická fakulta, Mendelova univerzita v Brně, 61300 Brno, Česká republika, e-mail:alzbeta.jarosova@mendelu.cz

[2]Státní zemědělská a potravinářská inspekce, Pavelkova 13, 772 85 Olomouc, Česká republika, e-mail: Bogdanovicova.S@seznam.cz

[3]Dům dětí a mládeže Zastávka, příspěvková organizace, Kopečky 115, 66484 Zastávka, e-mail: magda.krejcikova@seznam.cz.

ABSTRACT

There was monitored the content of phthalic acid esters (PAE) in samples of cow's milk obtained by manual and machine milking. Samples were taken in four seasons (January, April, July and October). Five dairy cows for manual milking and five dairy cows for machine milking were involved in the test. There was a mixed sample obtained from every dairy cow from morning and evening milking. Samples were taken during five day. In samples obtained by machinery milking there was average concentration of di-n-butyl phthalate (DBP) during the whole monitored period from 5.03 ± 1.29 $mg.kg^{-1}$ to 28.12 ± 3.46 $mg.kg^{-1}$ and average concentration of di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) moved from undetectable values (<0.2 $mg.kg^{-1}$) to 1.48 ± 1.45 $mg.kg^{-1}$. In samples obtained by manual milking average concentration of di-n-butyl phthalate (DBP) during the whole period of milking moved from 2.55 ± 0.89 $mg.kg^{-1}$ to 24.04 ± 2.75 $mg.kg^{-1}$ and di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) from undetectable values (<0.2 $mg.kg^{-1}$) to 0.64 ± 1.31 $mg.kg^{-1}$. Highly statistically significant ($p<0.01$) differences between the mean concentrations of DBP and DEHP were demonstrated throughout the experiment. During the whole monitored period there was found statistically highly significantly ($p<0.01$) lower average concentration of di-n-butyl phthalate (DBP) in milk samples obtained by manual milking. The study provides new findings on possible contamination of milk from milking technological devices and thus highlights the need to substitute toxic phthalates in plastic materials.

Keywords: di-n-butyl phthalate (DBP), di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP), contaminant, toxicity, milking

ÚVOD

Estery kyseliny ftalové (PAE – phthalic acid esters, ftaláty) patří do skupiny všudypřítomných organických kontaminantů životního prostředí (HORN aj., 2004). Byly detekovány ve vzduchu (WENSING aj., 2005), půdě, sedimentech, výluzích ze skládek (SCHWARZBAUER aj., 2002; ZHENG aj., 2007) a i v přírodních vodách (STAPLES aj., 1997; WEIZHEN aj., 2020).

Mezi nejčastěji se vyskytující ftaláty patří dibutyl ftalát (DBP) a di-(2-ethylhexyl) ftalát (DEHP) (WORMUTH aj., 2006).

Ftaláty s vyšší molekulovou hmotností, jako DEHP, se primárně používají jako změkčovadla polyvinylchloridových (PVC) produktů, zatímco ftaláty nižší molekulové hmotnosti, jako je například DBP, diethyl-ftalát (DEP), butyl benzyl ftalát (BBzP), jsou široce používány jako rozpouštědla a fixační činidla např. v parfémech a jako přísada do prostředků osobní hygieny a kosmetiky (CAO, 2010).

Vzhledem k tomu, že ftaláty nejsou v polymeru chemicky vázané, mohou se uvolňovat z výrobku a tím kontaminovat potravní řetězec a životního prostředí (WORMUTH aj., 2006). K uvolňování ftalátů dochází nejenom během jejich užívání, ale i při nakládání s plastovými odpady. Hlavní znečišťovanou částí životního prostředí je půda (kolem 77 %) a voda (21 %) (HUNTER a UCHRIN, 2000).

Odbourávání ftalátů v životním prostředí může probíhat hydrolýzou, fotodegradací i biodegradací. Rychlost odbourávání je natolik nízká, že za běžných podmínek v životním prostředí nehraje významnou roli (GOMÉZ-HENS a AGUILAR-CABALLOS, 2003).

K expozici člověka ftaláty může dojít požitím potravin nebo vody (orálně), z ovzduší (inhalačně), dermální absorpcí nebo parenterální aplikací (CORY-SLECHTA, 2008). Největší expozicí pro lidský organizmus představuje příjem ftalátů potravinami, a to hlavně potravinami s vysokým obsahem tuku, kde dochází k jejich kumulaci (VELÍŠEK, 2002).

K expozici PAE u populace dochází po celý život, a to již od nitroděložního vývoje (LATINI, 2005). DEHP je schopen prostupovat placentární bariérou a působit na plod, což potvrzují i analýzy pupečníkové krve (LATINI aj., 2003). Kojenci jsou expozicí ftaláty vystaveni konzumací kontaminovaného mateřského mléka v souvislosti s expozicí matek kontaminujícím látkám, a dále z hraček nebo z výrobků pro děti, které jsou vkládány do úst (TSATSAKIS aj., 2019).

Z hlediska dlouhodobého působení vykazují ftaláty, zejména DBP a DEHP, teratogenní, mutagenní a karcinogenní účinky (YIN aj., 2003). Ftaláty potenciálně podněcují vznik astmatu a kožních nemocí u malých dětí (WORMUTH aj., 2006). Některé ftaláty jsou považovány za vývojově toxické a látky poškozující reprodukci (WITASSEK aj., 2011). Expozice DEHP v

kritickém období vývoje může být potenciálním rizikovým faktorem při rozvoji diabetu (LIN aj., 2011).

Byla potvrzena i migrace ftalátů z obalů do potravin (TSUMARA aj., 2002; KORKMAZ aj., 2019).

Problematikou obsahu ftalátů v mléce a mléčných výrobcích se zabývala studie Fierens aj. (2013). Vzhledem k lipofilnímu charakteru ftalátů, mléko a mléčné výrobky jako je smetana, máslo a sýr s vyšším obsahem tuku, lze považovat za více kontaminované ftaláty, nežli nízkotučné potraviny. Studie potvrdila závislost mezi obsahem tuku a obsahem DEHP v mléčných výrobcích.

Cílem předložené studie bylo sledování esterů kyseliny ftalové ve vzorcích kravského mléka získaných ručním a strojním dojením.

MATERIÁL A METODIKA

Chemikálie

Pro analytické stanovení ftalátů byly použity analytické standardy DBP a DEHP od firmy Supelco (USA) o minimální čistotě 99,9 %. Základní a pracovní roztoky byly ředěny acetonitrilem, který byl HPLC čistoty pro residua. Použitá rozpouštědla n-hexan, cyklohexan, dichlormethan a aceton byly čistoty pro residua. Kyselina sírová byla čistoty p.a. Voda byla neionizovaná a čištěna použitím Mili-Q-patron.

Vzorky mléka

Vzorky kravského mléka byly odebírány z farmy se sídlem v Jihomoravském kraji, kde byla možnost jak ručního, tak strojního dojení. Vzorky o objemu 250 ml byly odebrány na farmě do skleněných nádob s víčkem s polytetrafluorethylenovým (PTFE) těsněním. Do pokusu bylo zařazeno pět dojnic pro ruční a pět dojnic pro strojové dojení. Od každé dojnice se získal směsný vzorek z ranního a večerního dojení, který byl schlazen a následně zmražen. Vzorky byly odebírány po dobu pěti dnů. První pokus proběhl v lednu (odběr 1), druhý v dubnu (odběr 2), třetí v červenci (odběr 3) a čtvrtý v říjnu (odběr 4).

Použité metody

K detekci PAE byly použity ověřené metody pro stanovení DBP a DEHP v potravinách (JAROŠOVÁ aj., 1998, 1999).

Vzorky mléka byly homogenizovány, naváženy (400-600 g) do kovových misek a zamrazeny. Postupně byly mrazené vzorky lyofilizovány a následně byl 3 krát extrahován tuk směsí rozpouštědel (3x80 ml) hexan:aceton (1:1). PAE od koextraktů byly separovány gelovou permeační chromatografií na gelu Bio beads S-X3. Pro dočištění eluátů bylo použito čistícího postupu s koncentrovanou kyselinou sírovou. Stanovení PAE bylo provedeno vysokoúčinnou

kapalinovou chromatografií (HPLC), kapalinový chromatograf Agilent Technologies LC/MSD VL, na koloně Zorbax Eclipse XDB-C8, 150 x 4,6 mm; zrnění 5 µm, mobilní fáze acetonitril:voda se měnila s časem eluce následovně: 0 až 3 min – 80:20, 3 až 9 min – 95:5, 9 až 12 minut – 100:0, 13 až 18 min – 80:20. Vyhodnocení bylo provedeno za pomoci programu Agilent chemstation.

Všechna laboratorní skla byla v průběhu přípravy vzorku proplachována hexanem. Všechny vzorky byly analyzovány v duplikátech. Celkem bylo odebráno 200 vzorků a provedeno 400 analýz. Koncentrace DEHP a DBP jsou vztaženy na původní vzorek.
Výsledky byly statisticky zpracované v programu Microsoft Excel a STATISTICA 12. Byl použit Duncanův test.

VÝSLEDKY

Průměrné koncentrace DBP a DEHP u vzorků mléka získaných v lednu (odběr 1), dubnu (odběr 2), červenci (odběr 3) a v říjnu (odběr 4) ručně a strojově jsou uvedeny v tabulce 1.

Tab. 1 *Průměrné koncentrace DBP a DEHP ($\bar{x}$ ± S.D) v mg.kg^{-1} původního vzorku u vzorků kravského mléka získaných ručním a strojovým dojením v lednu (odběr 1), dubnu (odběr 2), v červenci (odběr 3) a v říjnu (odběr 4)*

	Strojové dojení		Ruční dojení	
	DBP (mg.kg^{-1})	DEHP (mg.kg^{-1})	DBP (mg.kg^{-1})	DEHP (mg.kg^{-1})
Odběr 1 (leden)	8,67 ± 3,80	ND	4,66 ± 4,10	ND
Odběr 2 (duben)	7,21 ± 2,48	ND	3,44 ± 1,55	ND
Odběr 3 (červenec)	5,52 ± 2,01	ND	2,85 ± 1,14	ND
Odběr 4 (říjen)	19,43 ± 5,07	0,32 ± 0,38	16,48 ± 5,23	0,20 ± 0,18

Pozn. ND = nebyl detekován, limit detekce (<0,20 mg.kg^{-1})

V lednu se u vzorků získaných strojovým dojením pohybovaly průměrné koncentrace DBP od 6,28 ± 2,82 mg.kg^{-1} do 10,43 ± 3,59 mg.kg^{-1} a DEHP v analyzovaných vzorcích nebyl detekován (<0,20 mg.kg^{-1}). U vzorků získaných ručním dojením v lednu se průměrné koncentrace DBP pohybovaly od 2,76 ± 1,20 mg.kg^{-1} do 7,02 ± 4,26 mg.kg^{-1} a DEHP nebyl detekován (<0,20 mg.kg^{-1}).

V lednu byly zjištěny statisticky vysoce průkazně nižší ($p<0,01$) průměrné koncentrace DBP u vzorků mléka získaného ručním dojením.

V dubnu se u vzorků získaných strojovým dojením pohybovaly průměrné koncentrace DBP od 5,86 ± 1,15 mg.kg^{-1} do 8,70 ± 2,53 mg.kg^{-1} a DEHP v analyzovaných vzorcích nebyl detekován (<0,20 mg.kg^{-1}). U vzorků získaných ručním dojením v dubnu se průměrné koncentrace DBP pohybovaly od 2,55 ± 0,89 mg.kg^{-1} do 5,30 ± 2,12 mg.kg^{-1} a DEHP nebyl detekován (<0,20 mg.kg^{-1}).

V dubnu byla zjištěna statisticky vysoce průkazně nižší ($p<0,01$) průměrná koncentrace DBP u vzorků mléka získaného ručním dojením.

U vzorků získaných strojovým dojením v červenci se průměrné koncentrace DBP pohybovaly od 5,03 ± 1,29 mg.kg^{-1} do 6,11 ± 2,57 mg.kg^{-1} a DEHP v analyzovaných vzorcích nebyl detekován (<0,20 mg.kg^{-1}). U vzorků získaných ručním dojením v červenci se průměrné koncentrace DBP pohybovaly od 2,46 ± 1,18 mg.kg^{-1} do 3,2 ± 1,44 mg.kg^{-1} a DEHP nebyl detekován (<0,20 mg.kg^{-1}).

U tohoto odběru byly zjištěny statisticky vysoce průkazně nižší ($p<0,01$) průměrné koncentrace DBP u vzorků mléka získaného ručním dojením.

U vzorků získaných strojovým dojením v říjnu se průměrné koncentrace DBP pohybovaly od 9,55 ± 1,25 mg.kg^{-1} do 28,12 ± 3,46 mg.kg^{-1} a DEHP od (<0,20 mg.kg^{-1}) do 1,48 ± 1,45 mg.kg^{-1}. U vzorků získaných ručním dojením v říjnu se průměrné koncentrace DBP pohybovaly od 4,84 ± 2,04 mg.kg^{-1} do 24,04 ± 2,75 mg.kg^{-1} a DEHP od (<0,20 mg.kg^{-1}) do 0,64 ± 1,31 mg.kg^{-1}. U tohoto odběru byly zjištěny statisticky průkazně nižší ($p<0,05$) průměrné koncentrace DBP i DEHP u vzorků mléka získaného ručním dojením.

DISKUZE

Impulsem k provedení tohoto experimentu byly studie zabývající se problematikou ftalátů jako kontaminantů životního prostředí a potravního řetězce, konkrétně problematikou výskytu ftalátů v mléce.

YONG-LAI aj. (2005) zjistili, že estery kyseliny ftalové uvolněné z polyvinylchloridové hadice používané při dojení by mohly být zdrojem potenciální kontaminace mléka a mléčných produktů.

Koncentrace DEHP ve vzorcích plnotučného mléka zakoupeném v maloobchodě v Dánsku byly až 0,14 mg.kg^{-1} (PETERSEN, 1991). Koncentrace DEHP v syrovém kravském mléce se pohybovala v rozsahu od nedetekovaných množství do 0,154 mg.kg^{-1}, průměrná koncentrace byla 0,057 mg.kg^{-1} (KIM aj., 2009).

Ve studii FIERENS aj. (2012) byly zjištěny nižší průměrné koncentrace ftalátů ve vzorcích mléka dojených ručně (100 µg.kg^{-1} tuku) oproti vzorkům dojeným strojově (179 µg.kg^{-1} tuku). Autoři došli k závěru, že dojící zařízení je jedním z hlavních zdrojů kontaminace

mléka. Tyto závěry korespondují i s výsledky získanými v našem experimentu, kdy v lednu, dubnu a červenci byly zjištěny statisticky vysoce průkazně nižší ($p<0,01$) průměrné koncentrace DBP u vzorků mléka dojeného ručně, oproti vzorkům mléka získaným strojovým dojením. V říjnu byly zjištěny statisticky průkazně nižší ($p<0,05$) průměrné koncentrace DBP i DEHP u vzorků mléka získaného ručním dojením, oproti vzorkům mléka získaným strojovým dojením.

Po celou dobu experimentů byly prokázány rozdíly v průměrných koncentracích DBP a DEHP u obou typu dojení. Tyto rozdíly mohou být způsobeny odlišným metabolismem dojnic, poměrem mezi kumulací a eliminací ftalátů z organismu a částečně i odlišnými fyzikálně-chemickými vlastnostmi obou ftalátů. DBP má menší molekulu s kratším nerozvětveným řetězcem, což umožňuje částečnou rozpustnost DBP ve vodě. DEHP je ve vodě nerozpustný. RHIND aj. (2005) uvádí, že díky lipofilnímu charakteru ftalátů může docházet ke kumulaci ftalátů (z krmiva a z prostředí) v živočišných tkáních, svalovině, tuku a dále také mohou ftaláty přecházet z trávícího traktu do mléka, což vede k dalšímu potenciálnímu ohrožení potravního řetězce a tím i člověka.

Podle zákona č. 110/1997 Sb., o potravinách a tabákových výrobcích, resp. vyhláška č. 53/2002 Sb., upravovala nejvyšší přípustný obsah sumy DEHP a DBP v lihovinách (1 $mg.kg^{-1}$), v potravinách s nízkým obsahem tuku (2 $mg.kg^{-1}$ původního vzorku) a v tucích a v potravinách s vyšším obsahem tuku (4 $mg.kg^{-1}$). Přijetím legislativy EU v r. 2004 byly tyto limity z vyhlášky vypuštěny. Za předpokladu platnosti těchto limitů by byly shledány jako nevyhovující všechny námi analyzované vzorky mléka bez ohledu na termín odběru i typ dojení.

Současná legislativa platná v České republice problematiku ftalátů v potravinách upravuje na základě migračních limitů. Dle Nařízení komise (EU) č. 10/2011 plasty a plastové výrobky nesmějí do potravin uvolňovat svoje složky v množství větším než 60 $mg.kg^{-1}$ potraviny, nebo 10 $mg.dm^{-2}$ povrchu materiálu nebo výrobku. Specifický migrační limit pro DEHP je 1,5 $mg.kg^{-1}$ a DBP 0,3 $mg.kg^{-1}$ potraviny.

Tam, kde hrozí potencionální riziko kontaminace ftaláty, je nutné tyto komodity pravidelně monitorovat. Měla by se také posoudit nutnost případného ustanovení legislativních limitů pro obsahy ftalátů v krmivech, jako vstupů do potravního řetězce.

Jednou z cest postupného snížení rizika ftalátů je prosazovat náhrady toxických ftalátů jinými zdravotně nezávadnými látkami, např. citráty, fenolalkylsulfonáty, benzoáty, a to zvláště při výrobě materiálů používaných v zemědělství, potravinářství a zdravotnictví.

LITERATURA

1. CAO, X-L. (2010): Phthalate Esters in Foods: Sources, Occurrence, and Analytical Methods. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety [online], 9, 21–43. Dostupné na: http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1541-4337.2009.00093.x/full
2. CORY-SLECHTA, D. (2008): Phthalates and Cumulative Risk Assessment The Task Ahead [online]. Committee on the Health Risks of Phthalates, National Research Council, 208 s. ISBN 0-309-12842-0. Dostupné na: http://www.nap.edu/catalog/12528.html
3. ECHA (European Chemicals Agency) (2009): Background document for dibutyl phthalate (DBP), Background document for bis(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) [online]. Dostupné na http://echa.europa.eu/doc/authorisation/annex_xiv_rec/subs_spec_background_docs/dehp.pdf
4. FIERENS, T., VAN HOLDERBEKE, M., WILLEMS, H., DE HENAUW, S., SIOEN, I. (2013): Transfer of eight phthalates through the milk chain - A case study. Environment International, 51, 1-7.
5. FIERENS, T., HOLDERBEKE, M. V., WILLEMS, H., SIOEN, I., DE HANAUW, S. (2012): Phthalates in Belgian cow's milk and the role of feed and other contamination pathways at farm level. Food and Chemical Toxicology, 50, 2945-2953.
6. GOMÉZ-HENS, A., AGUILAR-CABALLOS, M. P. (2003): Social and economic interest in the control of phthalic acid esters. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 22, 847-857.
7. HORN O., NALLI S., COOPER D., NICELL J. (2004): Plasticizer metabolites in the environment. Water Research, 38, 3 693−3 698.
8. HUNTER, J. G., UCHRIN, CH. G. (2000): Adsorption of Phthalate Esters on Soil at Near Saturation Conditions.Journal of Enviromental Science and Health, 35, 1503-1515.
9. JAROŠOVÁ, A., GAJDŮŠKOVÁ, V., RASZYK, J., ŠEVELA, K. (1998): Determination of phthalic acid esters (PAEs) in biological materials by HPLC. Czech Journal of Food Sciences, 16, 122-130.
10. JAROŠOVÁ, A., GAJDŮŠKOVÁ, V., RASZYK, J., ŠEVELA, K. (1999): Di-2-ethylhexyl phthalate and di-n-butyl phthalate in the tissues of pigs and broiler chicks after their oral administration. Veterinární medicína, 44, 61-70.
11. KIM, M., YUN, S. J., CHUNG, G. S. (2009): Determination of phthalates in raw bovine milk by gas chromatography/time-of-flight mass spektrometry (GC/TOF-MS) and

dietary intakes. Food Additives and Contaminants. Part A, Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment, 26, 134-138.

12. KORKMAZ, S.D.; ÜPLÜLÜ, Ö. (2019): Determination of phthalates in some milk products by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. Veteriner Fakültesi Dergisi, DOI: 10.33988/auvfd.436873.
13. LATINI, G., DE FELICE, C., PRESTA, G., DEL VECCHIO, A., PARIS, I., RUGGIERI, F., MAZZEO, P. (2003): In utero exposure to di-(2-ethylhexyl)phthalate and duration of human pregnancy. Environmental Health Perspectives, 111, 1783-5.
14. LATINI, G. (2005): Monitoring phtalate exposure in humans. Clinica Chimica Acta, 361: 20-9.
15. LIN, Y., WEI, J., LI, Y., CHEN, J., ZHOU, Z., SONG, L., WEI, Z., LY, Z., CHEN, X., XIA, W., XU, S. (2011): Developmental exposure to di(2-ethylhexyl) phthalate impairs endocrine pankreas and leads to long-term adverse effects on glucose homeostasis in the rat. The American Journal of Physiology - Endocrinologyand Metabolism, 301, 527-38.
16. NAŘÍZENÍ KOMISE (EU) č. 10/2011 o materiálech a předmětech z plastů určených pro styk s potravinami.
17. PETERSEN J., H. (1991): Survey of di-(2-ethylhexyl)phthalate plasticizer contamination of retail Danish milks. Food Additives adn Contaminants, 8, 701-706.
18. RHIND S. M., KYLE C. E., MACKIE C., TELFER G. (2005): Effects of exposure of ewes to sewage sludge-treated pasture on phthalate and alkyl phenol concentrations in their milk. Science of the Total Environment, 383, 70–80.
19. SCHWARZBAUER J., HEIM S., BRINKER S., LITTKE R. (2002): Occurrence and alteration of organic contaminants in seepage and leakage water from a waste deposit landfill. Water Research, 36, 2 275-2 287.
20. STAPLES C. A., PETERSON D. R., PARKERTON T. F., ADAMS W. J. (1997): The environmental fate of phthalate esters: a literature review. Chemosphere, 35, 667−749.
21. TSUMARA, Y., KAIHARA, A., ISHIMITSU, S., YOSHII, K., TONAGAI, Y. (2002): Contents of plasticizers in cap-sealing for bottled food and their migration into food. Journalof the Food Hygienic Society of Japan, 43, 377-384.
22. TSATSAKIS, A.M.; KATSIKANTAMI, I.; KALANTZI, O.I.; SEVIM, C.; TSAROUHAS, K.; SARIGIANNIS, D.; TZATZARAKIS, M.N.; RIZOS, A.K. (2019): Phthalates: Exposure and Health Effects. Encyclopedia of Environmental Health (Seconf Edition), 163–173. doi: 10.1016/B978-0-12-409548-9.11434-4.
23. VELÍŠEK, J. (2002): Chemie potravin 3. Tábor: OSSIS, 343 s. ISBN 80-86659-03-8.

24. WENSING M., UHDE E., SALTHAMMER T. (2005): Plastics additives in the indoor environment - Flame retardants and plasticizers. Science of the Total Environment, 339,19−40.
25. WEIZHEN, Z., XIAOWEI, Z., PENG, G. et al. (2020): Distribution and risk assessment of phthalates in water and sediment of the Pearl River Delta. Environ. Sci Pollut. Res., 27, 12550–12565. doi: 10.1007/s11356-019-06819-y.
26. WITTASSEK, M., KOCH, H. M., ANGERER, J., BRÜNING, T. (2011): Assessing exposure to phthalates – human biomonitoring approach. Molecular Nutrition and Food Research, 55, 7-31.
27. WORMUTH, M., SCHERINGER, M., VOLLENWEIDER, M., HUNGERBUHLER, K. (2006): What are the sources of exposure to eight frequently used phthalic acid esters in Europeans? Risk Analysis, 26, 803-824.
28. YIN R., LIN X.G., WANG S.G., ZHANG H.Y. (2003): Effect of DBP/DEHP in vegetable planted soil on the quality of capsicum fruit. Chemosphere, 50, 801-805.
29. YONG-LAI, F., JIPING, Z., SENSENSTEIN, R. (2005): Development of a headspace solid-phase microextration method combined with gas chromatography mass spectrometry for the determination of phthalate esters in cow milk. Analytica Chimica Acta, 538, 41-48.
30. ZHENG Z., HE P. J., SHAO L. M., LEE D. J. (2007): Phthalic acid esters in dissolved fractions of landfill leachates. Water Research, 41, 4 696−4 702.

PODĚKOVÁNÍ

Práce byla řešena za podpory Interní grantové agentury AF MENDELU, projekt IP5/2013.

Kontaktní adresa: Jarošová Alžbeta, Ústav technologie potravin, Agronomická fakulta, Mendelova univerzita v Brně, 61300 Brno, Česká republika; E-mail: alzbeta.jarosova@mendelu.cz

MLÉKO A MLÉČNÉ VÝROBKY VERSUS ROSTLINNÉ ALTERNATIVY – 7 SROVNÁNÍ

MILK AND DAIRY PRODUCTS VERSUS PLANT-BASED ALTERNATIVES - 7 COMPARISONS

Kopáček Jiří

Českomoravský svaz mlékárenský z.s., V Olšinách 2300/75, 100 00 Praha 10, Česká republika

ABSTRACT

Today's dairy industry faces an extraordinary task in defending the irreplaceable role of milk and milk products in the balanced and healthy diet of the global population. Manufacturers of vegetable substitutes often literally discredit the importance of milk and by spreading unfounded misinformation they damage the good image of dairy foods. The presentation, based on scientific evidence, provides a range of information and facts about the comparison of milk and milk products with plant based alternatives, which it compares from the point of view of health and nutrition, from the point of view of environmental impacts, from the point of view of the economy, from the point of view of production technology, then compares the both groups from a regulatory point of view, and finally from the point of view of food safety and consumer perception. In conclusion, the presentation defends dairy products as an irreplaceable and indispensable part of human nutrition.

Keywords: milk and milk products, plant based dairy alternatives, health and nutrition, environment, economy

ÚVOD

Mléko a výrobky z něho patří od pradávna mezi nejzákladnější potraviny lidstva. Mléko jako takové je ostatně dokonalá a nejpřirozenější potravina, se kterou se lidský jedinec setkává bezprostředně po svém narození, kdy je živen mateřským mlékem. Později již konzumujeme mléka získávaná od řady hospodářských zvířat, která jsou po celý život a v různých formách neopominutelnou součástí výživy moderního člověka. Bez mléka bychom se mnohdy neobešli ani v pokročilém věku, protože mléko působí dokonce i jako prevence proti zákeřné osteoporóze kostí.

Mléčné výrobky poskytují „balíček“ bohatý na živiny, obsahující zejména vysoce kvalitní bílkoviny a další významné esenciální nutrienty jako jsou vápník, fosfor, draslík, jód a vitamíny B2 a B12. Bílkoviny obsažené v mléčných výrobcích jsou v mnoha ohledech lepší

než rostlinné bílkoviny, protože jsou komplexním zdrojem esenciálních aminokyselin a mají také lepší stravitelnost. Navíc je potřeba poznamenat, že živiny obsažené v mléce a mléčných výrobcích se ve svých výživových a metabolických funkcích vzájemně doplňují jako součást tzv. mléčné matrice. Jednoduše řečeno, naše těla absorbují živiny z mléka lépe nežli přidané živiny z fortifikovaných výrobků a z výrobků na rostlinné bázi, protože tyto potraviny obsahují sloučeniny inhibující absorpci některých živin, například vápník.

Mléčné výrobky, jako mléko, sýry a jogurty, mohou mít prostřednictvím jedinečné kombinace obsažených interaktivních živin celkově pozitivní vliv na lidské zdraví. Systematické přehledy a metaanalýzy prokazují, že vysoká spotřeba mléka a mléčných výrobků nás může chránit před růstem hmotnosti a obezitou. Mléčné výrobky, jako například jogurty, mohou rovněž snižovat riziko diabetu 2. typu a související kardiovaskulární onemocnění.

Získání správných živin z potravin je zásadní, zejména pro vývoj, růst a kognitivní výkonnost dětí, a je zvláště důležité pro zranitelné skupiny obyvatelstva a starší dospělé.

I přes všechna výše uvedená pozitiva je potřeba si na druhé straně uvědomit, že v poslední době stoupá zájem spotřebitelské veřejnosti o alternativy mléčných výrobků a různé náhražky vyrobené z různých rostlinných zdrojů. To ostatně prosazuje také současný strategický směr v Evropské unii formovaný v tzv. Zelené dohodě (*Grean Deal*) a její princip ekologicky udržitelné stravy a výroba klimaticky příznivých potravin. Samotná veřejnost má ale své další důvody pro vyřazování živočišných výrobků z výživy a jejích nahrazování rostlinnou stravou. U některých osob to může být ze zdravotních důvodů spojených například s alergiemi na bílkoviny mléka či metabolickou disfunkcí nestravitelnosti mléčného cukry laktosy. Řada odpůrců živočišné stravy argumentuje důvody ekologickými a mnozí jsou dokonce přesvědčeni o vyšším zdravotním přínosu rostlinných výrobků oproti živočišným, v čemž je utvrzuje zejména velmi efektivní marketingová komunikace rostlinných výrobků ze strany jejich výrobců. Je potřeba dodat, že tato komunikace je vedena mnohdy záměrně, ale především bez jakéhokoliv vědeckého zdůvodnění.

Před současným mlékárenstvím tudíž stojí mimořádný úkol v obhájení nezastupitelné role mléka a mléčných výrobků ve vyvážené a zdravé stravě celosvětové populace. Výrobci rostlinných náhražek často totiž doslova diskreditují význam mléka a šířením nepodložených dezinformací poškozují dobré image mléčných potravin.

V dalším se proto zaměřím z několika hledisek na srovnání mléka a mléčných výrobků s jejich alternativami vyrobenými na rostlinné bázi, a shrnu hlavní vědecky podložená zjištění o porovnání obou skupin výrobků.

1. Srovnání z pohledu zdraví a výživy

Oproti alternativním produktům z rostlinných surovin představuje mléko komplexní výživovou matrici přirozeně bohatou na veškeré základní živiny a stejně tak významnou škálu důležitých mikronutrientů. Mléko je jedinečným produktem právě díky této matrici, která je nejenom souborem všech těchto obsažených živin, ale i jejich vzájemných interakcí. Jednoduše řečeno, mléko a mléčné výrobky jsou neuvěřitelně důležitým a cenným přispěvatelem živin pro nutričně vyváženou a zdravou stravu, a tyto přínosy jsou velmi dobře zdokumentovány ve vědecké literatuře.

Podobné výhody ale nebyly prokázány u rostlinných výrobků, které jsou při svém zpracování toliko obohacovány a formulovány tak, aby částečně napodobily nutriční přínos mléka a mléčných výrobků. Nutrienty obsažené v rostlinných výrobcích jako takových matrici netvoří, a například jejich biologická hodnota bílkovin je až o 10–30 % nižší než v případě bílkovin živočišných.

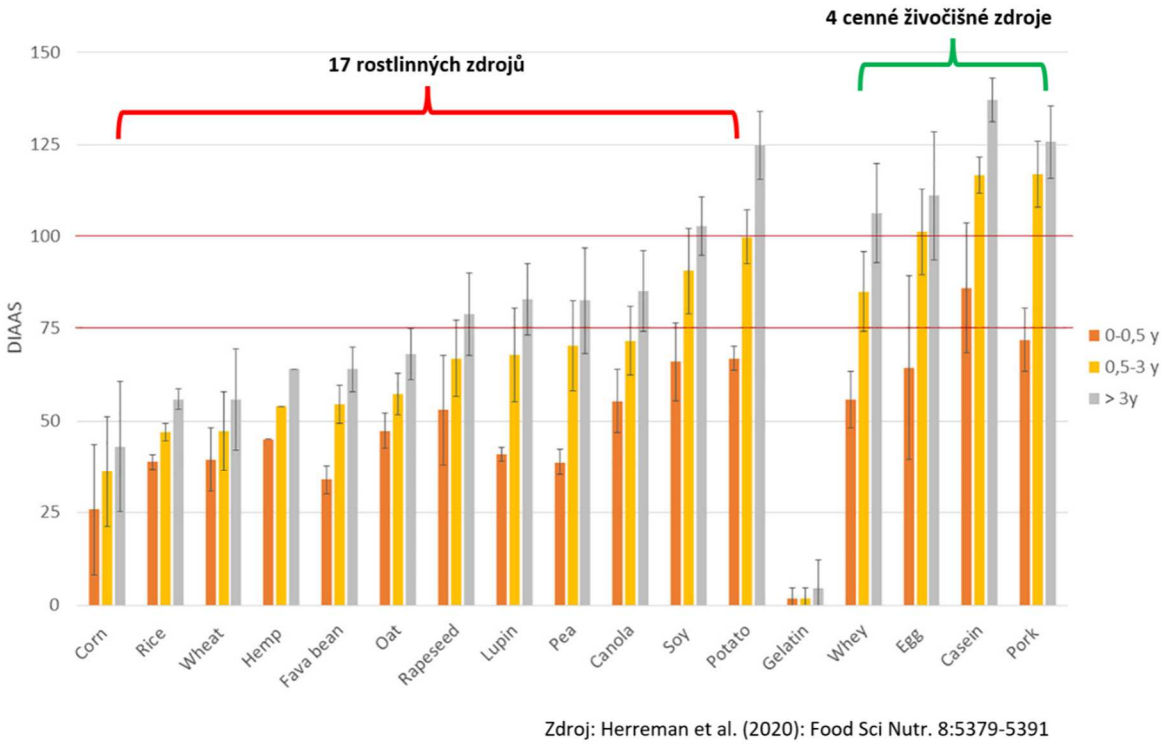
FAO používá pro hodnocení kvality bílkovin kritérium „DIAAS“ (*Digestable Indispensable Amino Acid Score*), tedy tzv. skóre stravitelných nepostradatelných aminokyselin (nahradilo dřívější kritérium PDCAAS = *Protein Digestibility Corrected Amino Acid Score*). Bílkoviny s hodnotou DIASS ≥ 100 jsou považovány za vysoce kvalitní, což platí pro syrovátkové bílkoviny, kasein, vaječnou bílkovinu, ale nikoliv pro bílkoviny z rostlinných surovin (Obr. 1).

Porovnání nutriční hodnoty a složení mléka a rostlinných nápojů je uvedeno v Tab.1.

Tab.1: Porovnání nutriční hodnoty a složení mléka a rostlinných nápojů (ve 100 ml)

	Jednotka	Polotučné mléko	Rýžový nápoj	Sójový nápoj
Energetická hodnota	kJ	197	202	163
Tuky - nasycené MK	g	1,5 0,9	1,1 0,1	1,8 0,3
Sacharidy - cukry	g	4,9 4,9	9,5 3,3	2,5 2,5
Bílkoviny	g	3,4	0,1	3,0
Sůl	g	0,3	0,09	0,11
Vápník	mg	125	-	-
Vláknina	g	-	0,1	0,5
Složení		mléko	Pitná voda, rýže (12%), slunečnicový olej, fosforečnan vápenatý, maltodextrin, emulgátor (řepkový lecitin), mořská sůl, stabilizátor (guma gellan), vitaminy (B2, B12, D), regulátor kyselosti (hydrogenfosforečnan draselný)	Pitná voda, loupané sójové boby (5,9%), cukr, fosforečnan vápenatý, regulátor kyselosti (dihydrogenfosforečnan draselný), mořská sůl, aroma, stabilizátor (guma gellan), vitaminy (B2, B12, D),

Obr. 1: Porovnání nutriční hodnoty bílkovin z rostlinných a živočišných zdrojů



Zdroj: Herreman et al. (2020): Food Sci Nutr. 8:5379-5391

V současné době neexistují v podstatě ani vědecké důkazy, které by podpořily zdravotní přínosy rostlinných alternativ jako takových, a nemůže být tudíž podporováno tvrzení, že jsou rostlinné produkty zdravější nebo dokonce nutričně ekvivalentní alternativou k mléčným výrobkům. Prostě neexistuje žádný vzorec – receptura, podle kterého by mohlo být napodobeno jedinečné složení mléka a mléčných výrobků.

2. Srovnání z pohledu dopadů na životní prostředí

Dopady na životní prostředí jsou většinou druhým nejuváděnějším argumentem o výhodnosti rostlinných náhražek mléčných výrobků předkládaných jejich zastánci. Posuzování dopadů potravinových systémů na životní prostředí a jejich snižování je ale mnohem složitější než porovnávání dopadů pouhých výrobků rostlinného či živočišného původu. Komplexní potravinový systém vyžaduje vícerozměrný přístup, neboť i rostliny a zvířata fungují jako propojený a integrovaný systém.

Na jedné straně se může zdát, že alternativní výrobky rostlinného původu mohou být v množstevním vyjádření k životnímu prostředí šetrnější nežli mléko a mléčné výrobky, nicméně zcela jiný pohled získáme, pokud vyjádříme tyto dopady na nutriční hodnotu obou typů produktů.

Mlékárenství poskytuje kromě výživy ještě navíc mnoho dalších významných hodnot ve srovnání s pěstováním rostlinných monokultur, jakou je například sója. Jsou jimi biologická rozmanitost, biomasa, vitalita venkova, zachování tradiční krajiny, pastviny atd. V případě environmentálních přínosů výrobků na rostlinné bázi není bohužel k dispozici dostatek důkazů a doposud také bylo na toto téma publikováno jen velmi málo přesvědčivých vědeckých prací. Naopak v případě mléka máme k dispozici dostatek informací o konkrétních dopadech na životní prostředí počínaje chovem skotu a prvovýrobou mléka, až po environmentálními dopady zpracovatelského průmyslu a zhodnocování a využívání vedlejších živočišných výrobků a odpadů.

Mlékárenský průmysl upoutává postupně po celém světě zvýšenou pozornost, co se týče jeho vlivu na životní prostředí. S každým soustem jídla, které jíme, jsou spojené vlastní náklady na životní prostředí, ale to, co si mnozí lidé ani neuvědomují, je skutečnost, že mléčná zvířata přinášejí celému našemu ekosystému mnoho výhod. Jejich hnůj přispívá k úrodnosti půdy, přidává jí organickou hmotu a obohacuje o živiny. Toto přírodní hnojivo samozřejmě poskytuje kvalitnější půdu, která zemědělcům pomáhá produkovat opět vysoce kvalitní potraviny.

Chovaný skot včetně malých přežvýkavců obhospodařuje v mnoha zemích často i takové pozemky, na kterých se nenechá nic pěstovat, a kde zvířata spásají porosty nevhodné jinak pro lidskou výživu, a které tak přeměňují na mléko vhodné pro výrobu chutných a zdravých potravin.

Samozřejmě, že jako průmysl, uznává mlékárenství svůj dopad na životní prostředí a bere vážně povinnost zlepšovat svoji výkonnost. Proto je přijímána řada závazků, jak nepřetržitě snižovat ekologickou stopu mlékárenství. V poslední zprávě Organizace OSN pro výživu a zemědělství (FAO) se uvádí, že v letech 2005-2015 došlo ke snížení emisí skleníkových plynů z produkce mléka o téměř 11 %, zatímco se v tomto období produkce mléka naopak o 30 % navýšila. Za posledních 50 let také došlo v průmyslových zemích ke snížení objemu vznikajícího metanu souvisejícího s mléčnou produkcí, a to nejenom ve vyjádření jeho snížení na kg produkovaného mléka, ale i v jeho celkovém objemu.

V případě mléka je uhlíková stopa jednou z nejnižších ze všech potravin živočišného původu. Celkový příspěvek výroby a přepravy mléka představuje pouze 2,7 % celosvětových emisí skleníkových plynů (GHG). Emise GHG se měří podle metodiky FAO/LEAP a pro celý mlékárenský sektor mají průměrnou hodnotu 2,8 kg CO_2 na 1 litr mléka (v zemích OECD to je ale pouze 1,7 kg). Další opatření na snižování GHG jsou neustále přijímána a jejich emise se také dále snižují. Pro konzumní mléko je dnes uváděna hodnota 1,29 kg CO_2/l (a to bez odečtení sekvestrace uhlíku do půdy).

V případě výrobků na rostlinné bázi se liší tento údaj mezi jednotlivými plodinami významně:

- Sójový nápoj: střední hodnota emisí GHG je 0,75 kg CO_2/litr, maximální hodnota ale může být až 1,5 CO_2/litr
- Mandlový nápoj: pěstování mandlí je především náročné na používání vody a pesticidů; vodní stopa byla propočítána dokonce na 10 240 litrů vody na 1 kg mandlových jader; střední hodnota GHG je 0,42 kg CO_2/litr
- Rýžový nápoj: střední hodnota GHG emisí je dokonce 2,55 kg CO_2 /litr !!!
- Ovesný nápoj: střední hodnota GHG emisí je 0,3 kg CO_2/litr nápoje

V případě environmentálních přínosů výrobků na rostlinné bázi bohužel není k dispozici dostatek důkazů a doposud také bylo na toto téma publikováno jen velmi málo přesvědčivých vědeckých prací.

3. Srovnání z pohledu ekonomiky

Jak se uvádí v Rotterdamské mlékařské deklaraci IDF/FAO z roku 2016 (*Dairy Declaration of Rotterdam*), která uznala úlohu mléka při naplňování cílů OSN v oblasti udržitelného rozvoje (SDG = *Sustainable Development Goals*), je dobré si připomenout a uvědomit, že výroba a zpracování mléka poskytuje obživu nejméně jedné miliardě lidí na naší planetě a celkem 133 miliónům mléčných farem, přičemž ve 37 milionech z nich mají vedoucí postavení ženy. Zpracovatelský mlékárenský průmysl také vytváří celosvětově 250 miliónů přímých a nepřímých pracovních míst.

Při zajišťování celosvětové výživy je mlékárenský sektor hlavním přispívatelem k naplnění udržitelných cílů SDG v boji proti hladu a zajištění dobré pohody. Dojnice přeměňují mnohdy i nejedlé nebo méně výživné potraviny na produkty, které poskytují lidem základní živiny, a tak jim pomáhají. Na Světovém mlékárenském summitu IDF v roce 2018 v Jižní Koreji uvedl bývalý generální tajemník OSN Ban Ki Moon, že *„mléko je dokonalost"* a je *„důležitým výživným jídlem“*, které může být *„jedním z řešení, jak bojovat proti nedostatku potravin“*.

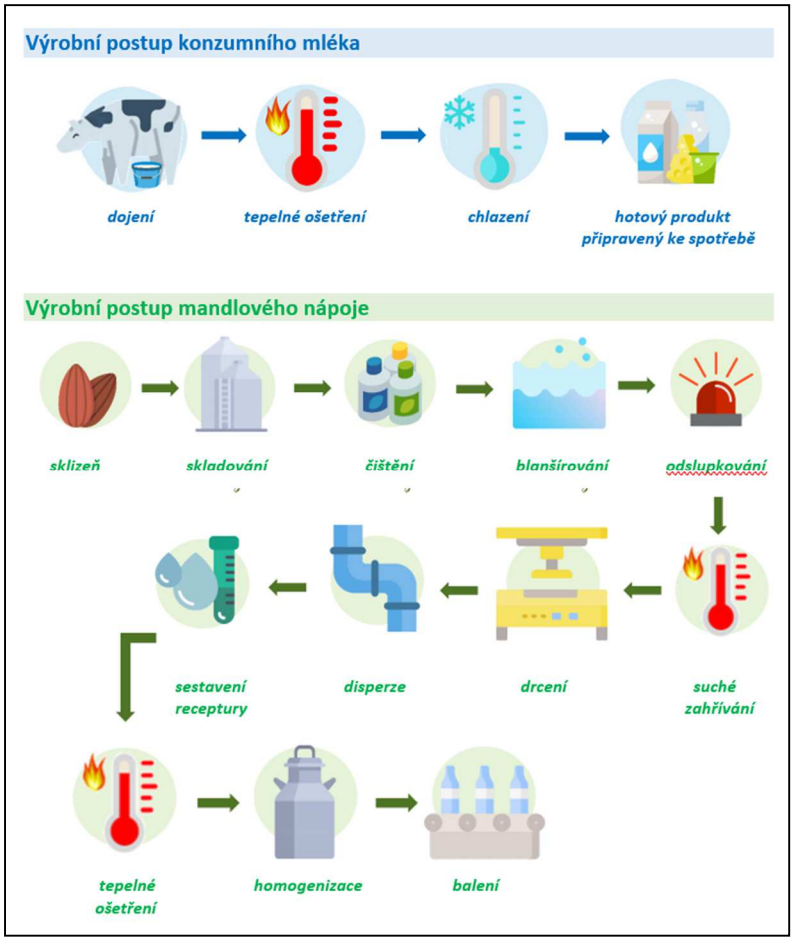
Z pohledu výživy jsou pak mléko a mléčné výrobky potravinami snadno dostupnými spotřebitelům po celém světě. Jsou totiž nepostradatelným zdrojem nákladově nejefektivnějších živin nezbytných pro udržitelnou stravu. A navíc, náklady na 1 gram nebo mikrogram bílkovin, vápníku a vitamínů obsažených v mléce a mléčných produktech jsou výrazně nižší, než tomu je u živin získávaných z výrobků na rostlinné bázi, což činí právě tyto výrobky méně dostupnými pro nízkopříjmové skupiny obyvatel.

4. Srovnání z pohledu výrobní technologie

Mléko je čistě přírodní produkt s minimálním zásahem do jeho složení (s výjimkou standardizace tučnosti nebo cíleného snížení obsahu laktosy), zatímco rostlinné náhražky jsou zpracovanými a formulovanými potravinami.

Na Obr. 2 je jako příklad popsán technologický postup výroby polotučného konzumního mléka a mandlového nápoje.

Obr. 2 Technologický postup výroby polotučného konzumního mlieka a mandlového nápoja



Zdroj: EDA Fact Sheet Milk vs Plant Based Beverages, červen 2021

Podobný příklad vysokého stupně zpracování by bylo možné ukázat na technologické postupu výroby sýrových náhražek na rostlinném základě, buď na bázi polysacharid/rostlinný olej nebo na bázi rostlinná bílkovina/rostlinný olej, při kterých vzniká viskoelastický produkt podobný vzhledově sýrům, bohužel ale stále s odlišnými organoleptickými vlastnostmi.

Dalším významným rozdílem je také skutečnost, že při výrobě rostlinných náhražek vzniká při zpracování jednotlivých druhů rostlinných surovin (sója, mandle, oves, rýže a další)

poměrně značné množství odpadů a těžko odstranitelných vedlejších produktů. Naproti tomu je známo, že mlékárenský sektor velmi úspěšně zhodnocuje své odpady a vedlejší živočišné produkty vznikající při zpracování mléka, jako jsou např. podmáslí, syrovátka, odřezky ze sýrů apod.

5. Srovnání z regulativního pohledu

V souladu s obecným kodexovým standardem pro používání mléčných termínů (*Codex General Standard for Use of Dairy Terms*) je používání mléčných termínů/výrazů (mléko, máslo, jogurt, sýr apod) vyhrazeno výlučně pro mléčné výrobky.

V návaznosti na další mezinárodní kodexovou normu (*Codex Guidelines on Claims*) je povoleno používání označení „bez laktózy“ pouze u mléčných výrobků, v případě rostlinných alternativ je tedy vyloučeno.

6. Srovnání z pohledu bezpečnosti potravin

Potraviny, tedy jak na živočišné, tak na rostlinné bázi, které jsou na trh uváděny v souladu s příslušnou potravinovou legislativou, jsou vždy bezpečné pro konzumaci.

K zajištění kvality mléka existuje řada předpisů a její kontrola a testování je mimořádně dobře zvládnuto už pro skutečnost, že jsou výrobky z mléka velmi důležitou součástí výživy dětí. Také v případě rostlinných produktů existují přísné předpisy stanovující úroveň bezpečnosti známých kontaminantů v použitých rostlinných surovinách použitých k jejich výrobě.

Souhrnně lze tedy říci, že z pohledu bezpečnosti potravin není rozdíl mezi mléčnými výrobky a jejich alternativami z rostlinných zdrojů.

7. Srovnání z pohledu spotřebitelského vnímání

Spotřebitelské vnímání rostlinných alternativních výrobků versus mléka a mléčných výrobků bývá často zmatečné. Spotřebitelé se často domnívají a zavádějící marketingové komunikace nepodložené vědeckými důkazy je v tom navíc utvrzují, že jsou rostlinné náhražky nutričně ekvivalentní, a dokonce někdy i lepší než mléko. Zmatek panuje ohledně produktů (viz. např. označování sójové či mandlového nápoje za „mléko“), ale nejasnosti panují také z pohledu příjmu živin (což jsme si již vysvětlili dříve).

ZÁVĚR

Mléko a mléčné výrobky jsou po tisíce let součástí kulturního dědictví a tradic lidstva po celém světě. Pro každého chovatele mléčného skotu je pro jeho úspěšnost a živobytí také zcela zásadní zdraví a dobrá pohoda zvířat a dosažení všeobecného povědomí o tom, že o každé zvíře ve stáji je vždy dobře postaráno. Farmáři se neustále snaží vylepšovat chovatelské postupy a zlepšovat dobré životní podmínky pro zvířata. Nejsou to ale pouze nové chovatelské postupy, je to i zájem o zajišťování kvalitních a výživově hodnotných krmiv, dostatečného přísunu vody a důsledná kontrola zdravotního stavu zvířat. Zdravá a spokojená dojnice totiž předurčuje kvalitní a výživově hodnotné mléko.

Nové moderní výrobky na rostlinné bázi patří samozřejmě také k důležitým potravinám, protože přispívají k nasycení stále rostoucí světové populace. Přesto, že je jejich nutriční hodnota jiná než v případě živočišných výrobků, jsou přinejmenším zajímavým novým zdrojem bílkovin, kterých se na planetě nedostává.

Nicméně příběh o vytváření udržitelné stravy by nebyl kompletní bez zařazování mléčných výrobků. Proto je nezbytné obhajovat mléko a jeho nezastupitelnou roli, kterou sehrává při podpoře naplňování globálních cílů udržitelného rozvoje.

POUŽITÁ LITERATÚRA

1. Horáčková Š. a kol.: Mléko a mléčné výrobky – rozdíly a souvislosti s výrobky rostlinnými; publikace PK ČR, ČTPP, CZPVI, Praha (2021)
2. Data comparison of milk and plant-based beverages, dokument IDF Task Force (verze 2020)
3. Climate change and the global dairy cattle sector – The role of the dairy sector in a low-carbon future; FAO/GDP, (2019)
4. Kanter, Mitch; Moore, Donald: A World Without Cows – Imagine Waking Up One Day to a New Reality, Nutrition Today (Nr. 11-12/2020)
5. Kongerslev Thorning T et al, “Whole dairy matrix or single nutrients in assessment of health effects: current evidence and knowledge gaps,” American Journal of Clinical Nutrition, 2017, https://academic.oup.com/ajcn/article/105/5/1033/4569873
6. Australian Dairy Farmer, “Milk critical food source: Ban Ki Moon,” 24 Oct, 2018, http://adf.farmonline.com.au/news/magazine/industry-news/general/milk-critical-food-source-ban-ki-moon/2758102.aspx
7. Dairy Declaration, http://www.dairydeclaration.org/Facts-and-Resources
8. Food and Agriculture Organisation of the United Nations and Global Dairy Platform, “Climate Change and the Global Dairy Sector,” 2019,

https://dairysustainabilityframework.org/wp-content/uploads/2019/01/Climate-Change-and-the-Global-Dairy-Cattle-Sector.pdf

9. Food and Agriculture Organisation of the United Nations, “Greenhouse Gas Emissions from the Dairy Sector A Life Cycle Assessment,”2010, http://www.fao.org/3/k7930e/k7930e00.pdf

Kontaktní adresa: Kopáček Jiří, Czech & Moravian Dairy Association, V Olšinách 2300/75, 100 00 Prague 10, Czech Republic, E-mail: jkopacek@cheesespectrum.cz

STABILITA A PREŽÍVANIE PROSPEŠNÝCH BAKTERIOCÍN-PRODUKUJÚCICH KMEŇOV V MLIEKARENSKÝCH PRODUKTOCH

STABILITY AND SURVIVING OF BENEFICIAL, BACTERIOCIN-PRODUCING STRAINS IN DAIRY PRODUCTS

Lauková Andrea, Pogány Simonová Monika, Kandričáková Anna

Centrum biovied SAV v.v.i. Ústav fyziológie hospodárskych zvierat, Šoltésovej 4-6, 04 01 Košice, Slovenská republika

ABSTRACT

Dairy products are used for daily consumption. Those enriched with beneficial bacterial strains can influence not only product itself but also consumers health as functional food. Therefore, it is necessary to check their stability in the product. Bacteriocin-producing, beneficial strains were selected from stored ewes cheese and raw goat milk; *Lactiplantibacillus plantarum* LP17L/1, *Lacticaseibacillus paracasei* LPa12/1 and *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* MK1/3. These strains were identified and taxonomically allotted. Their stability was tested in yoghurts from cows and ewes-goats milks available at commercial network. The strains were labeled by rifampicin to differ them from other microbiota. They were applied (10^9 CFU/g) into yoghurts in dry- freezing form and stored at the temperature 4˚C. Their counts were checked in individual intervals on MRS agar with rifampicin (100 µg) and pH as well. The best surviving in ewes-goats milk yoghurts showed LPa12/1 strain; at day 10 it reached 6.1 (log10) CFU/g. *L. lactis* MK 1/3 reached 4.66 CFU/g and LP17L/1 reached the count 4.60 CFU/g at day 7; but at day 10 its count lowered to 10^2 CFU/g. LP17L/1 in cow milk yoghurt reached only 2.13 (log 10) CFU/g at day 10; however, this count has been almost stable during whole checking. LP17L/1 reached 2.39 CFU/g at day 14 and at day 20 it was 8.28 CFU/g. It seems, it formed probably most part of lactic acid bacteria. The pH values of the products were not negatively influenced.

Key words: yoghurt, beneficial, bacteriocin-producing strains, stability, storage

ÚVOD

Mliekarensky priemysel dennodenne dodáva do obchodnej siete rozmanitý sortiment produktov, medzi ktorými sú zastúpené aj jogurty z kravského mlieka alebo tiež ovčo-kozie jogurty od rôznych dodávateľov. Výrobcovia sa snažia zaujať spotrebiteľov inovovaním produktov, ktoré by okrem výživovej a chuťovej kvality pôsobili aj na zdravie spotrebiteľa ako v súčasnosti často označovaná funkčná potravina. A preto je na trhu veľa jogurtov obohatených

probiotickými/prospešnými bakteriálnymi kultúrami. Aby však tieto užitočné mikrobiota mohli napĺňať svoje vlastnosti, mali by byť v danom produkte aplikované vo vhodnej forme, v ktorej by si zachovali dostatočnú stabilitu. Na našom pracovisku (Centrum biovied SAV, v.v.i. ÚFHZ v Košiciach) a v spolupráci s kolegami na Výskumnom ústave mliekarenskom a.s. v Žiline boli izolované, charakterizované a preštudované na technologické a ďalšie užitočné (bakteriocínová produkcia) vlastnosti viaceré prospešné kmene: *Lacticaseibacillus paracasei* LPa12/1 a *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* MK1/3 izolované zo surového kozieho mlieka a *Lactiplantibacillus plantarum* LP17L/1 z ovčieho (sudovaného) syra (Lauková a kol. 2023a,b). Prežívanie a stabilita týchto kmeňov boli testované v kravskom jogurte, ale aj v ovčo-kozom jogurte, pričom kmene boli aplikované v lyofilizovanej forme.

MATERIÁL A METODIKA

Z kmeňov *Lacticaseibacillus paracasei* LPa12/1, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* MK1/3 a *Lactiplantibacillus plantarum* LP17L/1 boli pripravené rifampicínom značené varianty (na odlíšenie od ostatnej mikrobioty, Lauková a kol. 2023a). Kmene boli aplikované v lyofilizovanej forme (10^9 KTJ/g) do jogurtov zakúpených z obchodnej siete. Pred aplikovaním boli jogurty otestované na mikrobiologické pozadie použijúc krvný agar. Po inokulovaní jogurtov danými kmeňmi, boli tieto skladované v chladničke (pri teplote 4˚C). Následne po 24 h, na 7. a 10. deň a pri kravskom jogurte aj na 14. a 20. deň boli sledované počty kmeňov po odobratí vzoriek a ich následnom vyriedení podľa ISO (1:9) v peptónovej vode (Merck), a merané boli aj hodnoty pH (pH-meter). Kmene boli zachytené na MRS agare (Merck, Darmstadt, Nemecko) s rifampicínom (100 µg), ale sledované boli aj celkové počty kyselinu mliečnu produkujúcich baktérií na MRS agare. Počty baktérií boli vyjadrené v kolónie tvoriacich jednotkách na gram KTJ/g (log 10). Vzorky boli vysievané dvojmo.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Kmeň LP17L/1 dosiahol po 24 h počty 2,88 (log10) KTJ/g z inokulačných 10^9 KTJ/g a tieto počty ostali v podstate nezmenené aj na 10. deň (Tabuľka č. 1). V ovčo-kozom jogurte kmeň LP17L/1 dosiahol vyššie počty po 24 h, aj na 7. deň (do 5, 0 log 10 KTJ/g), ale na 10. deň tieto počty výrazne poklesli (1,90 KTJ/g, log 10). Teda kmeň LP17L/1 bol v kravskom jogurte stabilnejší (aj keď spočiatku v nižších počtoch) než v ovčo-kozom jogurte. Pri kontrole na 14. deň sa počty kmeňa LP17L/1 v kravskom jogurte zvýšili na 2,39 KTJ/g (log 10) a na 20. deň sa priblížili ku inokulačnej hodnote (8,28 KTJ/g log 10) a pravdepodobne tvoril väčšiu časť KMPB (Tabuľka č. 1). Kmene LPa12/1 a MK1/3 prežívali veľmi dobre a boli stabilné; kmeň

LPa12/1 dosiahol na 10. deň počty 6,1 (log10) KTJ/g a kmeň *L. lactis* MK 1/3 dosiahol 4,66 KTJ/g (log 10). Hodnoty pH produktov neboli negatívne ovplyvnené.

Tabuľka č. 1, Stabilita kmeňa LP17L/1 v jogurte a z kravského mlieka a počty ostatných KMPB v KTJ/g (log 10)

	pH	LP17L/1	KMPB
P/24h	nt	2,88	7,08
K/24h	nt	nt	7,1
P/7. deň	3,81	2,20	10,1
K/7. deň	4,06	nt	8,99
P/10.deň	3,95	2,13	8,56
K/10.deň	4,20	nt	10,1
P/14.deň	3,89	2,39	8,46
K/14.deň	3,97	nt	8,83
P/20. deň	3,79	8,28	8,43
K/20.deň	3,82	nt	10,1

P-pokusná vzorka**,** K-kontrolná vzorka**,** KMPB-kyselinu mliečnu produkujúce baktérie

Zistenie stability či prežívania daných kmeňov je významným poznatkom, nakoľko uvedené kmene so svojimi základnými vlastnosťami (napr. produkcia bakteriocínov, produkcia beta-galaktozidázy a aj technologickými vlastnosťami) boli použité na prípravu fermentovaného mliečneho nápoja (v spolupráci s VUM a.s. v Žiline a mliekarenskými prevádzkami) na báze kozieho mlieka a sú súčasťou patentových prihlášok podaných na Úrad priemyselného vlastníctva Slovenskej republiky. O potenciálnom využití kmeňa LP17L/1 bolo už spomínané aj v našej predchádzajúcej práci (Lauková et al. 2022), ale aj v súvislosti s jeho účinkom proti infekcii *Trichinella spiralis* (Vargová et al. 2020; Dvorožňáková et al. 2016). Kmeň LP17L/1 preukázal protektívny efekt pri infekcii nematódom *T. spiralis* zvýšením oxidatívneho metabolizmu peritoneálnych makrofágov u myšiek Balb/c; aktivoval metabolickú aktivitu makrofágov počas migrácie novorodených lariev, teda mal schopnosť znížiť intenzitu parazitickej infekcie aj ovplyvnením dôležitých komponentov imunitného systému (fagocytóza). Naviac preukázal i antilisteriálny a antistafylokokový účinok. Do takejto miery doposiaľ nebol preštudovaný potravinársky kmeň, dávajúc tak komplexný obraz o svojom potenciálnom využití. Kmeň LP17L/1 a Ll MK1/3 boli deponované do Českej zbierky mikroorganizmov pod číslami CCM 9208 a CCM 9209 podľa Budapeštianskej dohody.

ZÁVER

Aplikované prospešné kmene vykázali dostatočné prežívanie a stabilitu v jogurtoch počas sledovaného obdobia, avšak táto stabilita a prežívanie sú ovplyvnené ako druhom kmeňa, tak aj druhom jogurtu (kravský alebo iný).

POĎAKOVANIE

Výsledky boli dosiahnuté v rámci projektov APVV-17-0028 a APVV-20-0204.

POUŽITÁ LITERATÚRA

1. DVOROŽŇÁKOVÁ, E. Effect of probiotic bacteria on phagocytosis and respiratory burst activity of blood polymorphonuclear leucocytes (PMNL) in mice infected with *Trichinella spiralis.* In *Veterinary Parasitology*, 2016, vol. 231, p. 69-76. 2016
2. LAUKOVÁ, A. et al. Bacteriocin-producing strain *Lactiplantibacillus plantarum* LP17L/1 isolated from traditional stored ewes milk cheese and its beneficial potential. In *Foods*,2022, vol. 11, p. 959 (open access) https://doi.org/10.3390/foods11070959.
3. LAUKOVÁ, A. et al. *Lactiplantibacillus plantarum* LP17L/1 from ewes stored cheese, promising strain for use not inly in dairy products. In *Proceedings of Scientific works from XX. conference „Food safety and quality*„ Nitra-Piešťany,29.3-31.3.2023a, (in Slovak), eds. Golian and Čapla, ISBN 78-80-8266-028-2, p. 34-36, https://doi.org/10.15414/2023.sqf23-psp.
4. LAUKOVÁ, A. et al. Ovčí sudovaný syr, zdroj autochtónnych, prospešných, bakteriocín-produkujúcich baktérií a ich aplikačný potenciál (Ewes stored cheese, a source of autochtonnous, beneficial, bacteriocin-producing bacteria and their application potential). In Sborník přednášek 17. Sympozia Společnosti pro probiotika a prebiotika (In Proceedings of lectures from the 17th Symposium of Society for Probiotics and Prebiotics, in Slovak), Praha 6-Suchdol, Česká republika, 4.4. 2023b, pp. 22**;** vydaný ČZU v Prahe, Ed. doc. Ing. Šárka Musilová, PhD, RNDr. Hana Kozáková, CSc., prof. Ing. Eva Vlková PhD, ISBN 978-80-213-3262-1.
5. VARGOVÁ, M. et al. Probiotic bacteria can modulate murine macrophages superoxide production in *Trichinella spiralis* infection. In *Helminthologia* 2020, vol. 57, p. 226-234. 2020

Kontaktná adresa: Lauková Andrea, Centre of Biosciences of the Slovak Academy of Sciences, Institute of Animal Physiology, Šoltésovej 4-6, 040 01 Košice, Slovak Republic; E-mail: laukova@saske.sk

AUTOMATICKÉ ROBOTICKÉ DOJENÍ - VLIV NA HYGIENU MLÉKA

AUTOMATIC MILKING SYSTEMS - THE EFFECT ON HYGIENIC MILK QUALITY

Macháček Miroslav

Veterinární univerzita Brno, Ústav ochrany a welfare zvířat a veřejného veterinárního lékařství Palackého třída 1, 612 42 Brno

ABSTRACT

Milk is one of the world most important food commodity. Milking is time-consuming human work. Therefor is manual work more and more substituted by automatic milking robots. Because the conditions for milking are hazardous for milk contamination, it is necessary, that they need to be as good as possible.

Milk hygiene is affected by teat hygiene. If the cow, that is enter in to the automatic milking machine, has dirty teats, the cleaning with automatic milking robot mustn´t be satisfactory. For this case it is necessary, that the hygienic condition in stables must be very good. Cleanliness of teats is affected by the stabling technology, bedding quality and dairy cows welfare.

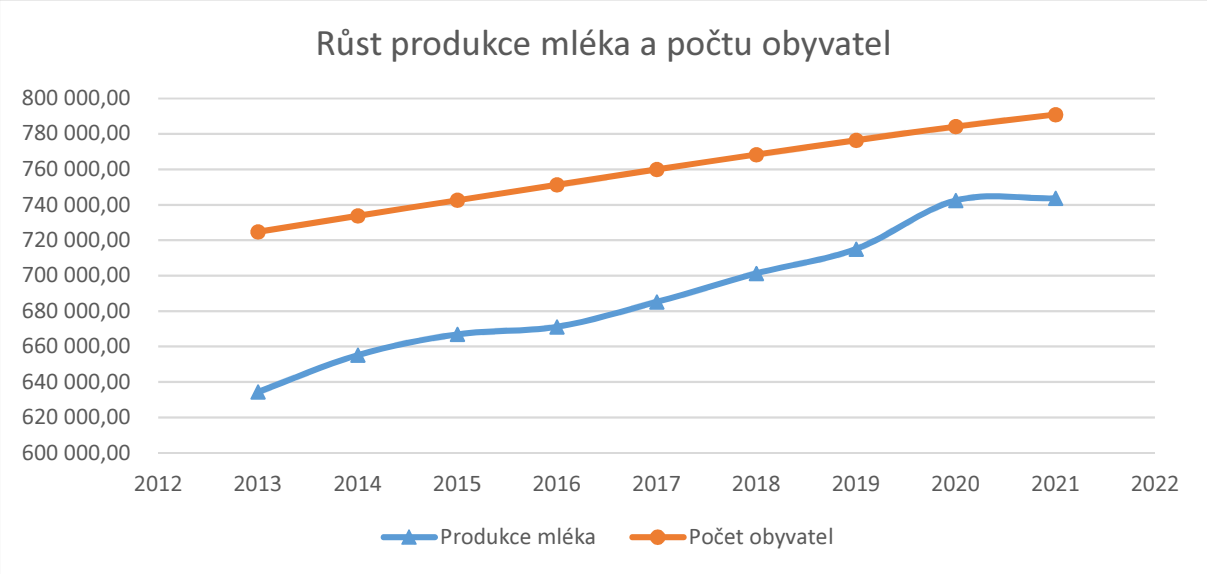
During the milking it is necessary ensure basic steps for satisfy hygiene of milk too. This steps include cleaning teats, hygienic quality control of raw milk (udder health control) and disinfection after milking. The control of milk hygienic quality is make by checking the color, electrical conductivity, somatic cell count and temperature measuring.

Key words: milk hygiene, stable hygiene, hygiene of milking, mastitis

ÚVOD

Už v pravěku bylo mléko využíváno k lidské spotřebě. (www.sciencemag.cz) V současné době patří k jedněm nejvýznamnějším potravinovým komoditám, kdy se používá jak k přímé konzumaci, tak ke zpracování na další potraviny. (Doležal et al., 2000) Vzhledem k významném podílu mléka v lidské potravě a vzhledem ke zvyšujícímu se růstu lidské populace, dochází k neustálému růstu produkce mléka. (Graf č. 1) V roce 2022 byla celosvětová produkce mléka 544,15 tisíc tun, z toho v Evropské unii se vyprodukovalo 143,9 tisíc tun v České republice 3,17 tisíc tun a na Slovensku 0,82 tisíc tun (www.statistica.com, www.clal.it).

Graf č. 1, Růst celosvětové produkce mléka (x 10 000 tun) a počtu obyvatel (x 1 000) v letech 2013 – 2021 (Zdroj: www.clal.it)



Jelikož je získávání mléka fyzicky a časově náročné, tak se hledají metody, kdy by mohla být tato náročná část lidské práce nahrazena. Jednou z možností je používání automatických dojících robotů. Přestože používáním automatických dojících robotů dochází ke značné úspoře lidské práce, tak je potřeba zajistit vysokou hygienu takto získávaného mléka. Hygiena mléka začíná už v prvovýrobě, kdy je důležitý zdravotní stav dojnic, hygiena ustájení a hygiena dojení. Právě hygiena získávání mléka má velký význam na jeho následnou kvalitu v celém výrobním procesu.

HYGIENA STÁJÍ

Hygiena stájí je ovlivněna technologií ustájení, podestýlkou a také welfarem zvířat. V případě zanedbání některého z těchto faktorů dochází k výraznému znečištění struků, které automatický dojící stroj nemusí dostatečně očistit. Proto je důležité, aby v chovech s automatickým robotickým dojením byla zajištěna i správná hygiena stájí (Junga, 2014).

Technologie ustájení

V dnešních moderních velkochovech se v největší míře používá volné boxové ustájení. V takovýchto stájích bývá největším rizikovým faktorem kontaminace mléčné žlázy v hnojné chodbě. V případě manuálního odklízení se hnojná chodba nejčastěji odklízí jednou až dvakrát denně. Tato frekvence je ale u automatického robotického dojení nedostatečná, protože krávy před vstupem na dojírnu mohou ležet v hnojné chodbě plné výkalů. Proto je vhodnější instalace

roštových podlah nebo automatických lopat, které zajistí lepší hygienu hnojné chodby. (Sýkora, 2014, Vegricht et al., 2008)

Podestýlka

Jelikož krávy většinu času leží v lehacích boxech a přežvykují, tak má na čistotu mléčné žlázy výrazný vliv hygiena boxů. V bezstelivových systémech se nejčastěji používají gumové rohože, kdy je nutné provádět jejich pravidelné čištění. U stelivových systémů je důležitá kvalita podestýlky. Nejčastěji používané stelivové materiály v chovech dojnic jsou organického původu jako například sláma, piliny hobliny nebo separovaná kejda. V těchto materiálech ale může docházet k pomnožení mikroorganismů a tím pádem ke zvýšení kontaminace mléčné žlázy nebo zvýšenému výskytu mastitid. Z tohoto důvodu se jako nejvhodnější stelivový materiál jeví písek, protože se zde mikroorganismy nemohou množit, a proto je jeho mikrobiální kontaminace nižší. (Macháček, 2016)

Welfare

Welfare zvířat může mít výrazný vliv na jejich chování a tím také na fyziologické projevy. Mezi základní nedostatky z pohledu welfare zvířat patří tepelný stres, který je u skotu při teplotách nad 20 °C. Při vyšších teplotách se zvířata brání přehřátí chlazením mléčné žlázy ve výkalech v hnojné chodbě. Pokud takto špinavá kráva vstupuje do dojírny, tak je zde velké riziko kontaminace mléka mechanickými nečistotami a fekálními bakteriemi. Proto je nutné, aby se v případě výskytu teplot nad 20 °C prováděly postupy vedoucí ke snížení tepelného stresu ochlazováním vzduchu (například ventilací). (Chmelíková et al., 2022)

DOJENÍ

Samotný proces dojení sestává z několika významných kroků nutných pro zajištění hygieny mléka. Mezi tyto kroky patří očištění struků, případně provedení jejich dezinfekce ihned po vstupu dojnice do dojírny. Před samotným dojením je nutné provést kontrolu kvality mléka a po ukončení dojení se musí provést dezinfekce struků. V případě dojení dojičem musí všechny tyto kroky provést dojič. Jestliže se ale k dojení krav používá automatický robot, tak všechny tyto kroky musí provést a správně vyhodnotit dojící robot sám. (Kudělková, 2020)

Očista struků před dojením

Očista struků před samotným dojením se provádí z důvodu odstranění hrubých nečistot. Tyto nečistoty nejčastěji bývají přischlá podestýlka, nebo přischlé výkaly.

Čištění struků před dojením může být prováděno různými způsoby. Tyto způsoby se dělí na dvě velké skupiny, kdy se čištění provádí pomocí rotačních kartáčků, nebo ve strukovém násadci pomocí teplé vody a tlaku a podtlaku vzduchu. Podle typu použití tyto systémy dělíme na:

- Čištění všech struků najednou pomocí horizontálního kartáčku
- Postupné čištění jednotlivých struků pomocí kartáčků nebo stěrek
- Čištění všech struků najednou ve strukovém násadci, který je po jeho očistě také používán k dojení
- Postupné čištění jednotlivých struků speciálním čistícím zařízením (Hovinen et al., 2005)

Kontrola kvality mléka

Automatický dojící robot musí sám provést kontrolu mléka a následně toto mléko správně vyhodnotit, zda je hygienický nezávadné, nebo zda je hygienicky závadné a musí se z nádoje vyřadit. Kontrola kvality mléka může být prováděna na základě měření teploty, vodivosti mléka, hodnocením barevného spektra nebo počítáním somatických buněk. (Kic and Nehasilová, 1997, Knížková et al., 2011, Knappstein et al., 1998, Nielen et al., 1995)

- Změna barvy mléka bývá způsobena výskytem krve, hnisem nebo změnou struktury mléka. Tyto změny jsou nejčastěji způsobeny zánětem mléčné žlázy.
- Vodivost mléka bývá způsobena zvýšením počtu sodíkových (Na^+) a chloridových (Cl^-) iontů. K přestupu iontů do mléka dochází zvýšením cévní propustnosti při onemocnění mléčné žlázy.
- Počet somatických buněk patří mezi jedny z nejčastějších nepřímých metod detekce zánětu mléčné žlázy. Počet somatických buněk ale také může být ovlivněn ročním obdobím, pořadím laktace a fází laktace. Proto je potřeba pro správné vyhodnocení tento parametr sledovat a případně pro jednotlivé dojnice upravovat. V případě zánětu mléčné žlázy dojde nejenom k výraznému zvýšení počtu somatických buněk, ale k tomuto zvýšení dojde velice rychle. (Kamphis et al., 2008, Norberg, 2005, Hamann and Zecconi, 1998, Hamann, 2002)

Hodnocení hygienické kvality mléka je důležité i z hlediska vyhledávání krav s mastitidou. (Knappstein et al., 1998) Právě včasná detekce a léčba nemocných krav má pozitivní vliv na zdravotní stav celého stáda dojnic, na zvýšení hygienické kvality získaného mléka a na zlepšení welfare dojnic a ekonomiky chovu. (Jacobs and Siegford, 2012)

Automatičtí dojící roboti mají ve srovnání s běžným manuálním dojením také tu výhodu, že každá čtvrť je dojená zvlášť. Díky tomu mohou automatičtí dojící roboti oddělit infekční mléko z jednotlivých čtvrtí tak, aby mléko z nemocné čtvrti bylo dojené mimo celkový nádoj. (Jacobs and Siegford, 2012)

Dezinfekce struků po dojení

Po dojení dochází u krav vlivem oddojení velkého množství mléka z mléčné žlázy k nasávání vzduchu z prostředí. Proto je nutné z důvodu prevence před mastitidami provádět dezinfekci struků po dojení. Dezinfekční přípravky musí mít účinnost proti patogenům způsobujícím mastitidu a musí mít rychlý dezinfekční nárůst. Z důvodu zajištění hygieny mléka, ale nesmí rezidua dezinfekčních přípravků přecházet do mléka. Dezinfekční přípravky by také měli mít dobrý protektivní vliv na pokožku (Kunc et al., 2004).

ZÁVĚR

Mléko patří mezi jedny ze základních potravinových komodit. Vzhledem k jeho relativně snadné produkci a dostupnosti stále roste jeho celosvětová produkce. Jelikož získávání mléka probíhá v přímém kontaktu zvíře X potravinářská technologie, tak je potřeba zajisti, aby proces dojení probíhal v podmínkách splňujících co nejvyšší hygienické parametry. Manuální dojení je stále více nahrazováno dojením automatickým robotickým, a proto je nutné, aby byly splněny veškeré faktory mající vliv na hygienu mléka, jelikož odpadá fyzická kontrola dojičem. Mezi faktory mající vliv na hygienu získávání mléka a tím na jeho hygienickou nezávadnost patří hygiena ustájení dojnic a hygiena samotného získávání mléka.

Hygiena stájí ovlivňuje to, s jak čistými nebo špinavými struky přijde dojnice do dojírny. V případě že je vemeno dojnice silně znečištěno, tak dojící robot nemusí tuto očistu provést dokonale a následně může dojít ke kontaminaci mléka.

Faktory mající vliv na čistotu struků jsou technologie ustájení (typ ustájení a frekvence odklizu výkalů), podestýlka (mikrobiální čistota) a welfare dojnic (tepelný stres, nestandardní chování).

Hygienu mléka může ovlivnit přímé získávání mléka. V rámci správné hygieny dojení je nutné provést důkladnou očistu struků, vyhodnotit, zda mléko nepochází od krav trpících zánětem mléčné žlázy a po dojení provést dezinfekci struků.

Vyhodnocení zdravotního stavu mléčné žlázy patří mezi kritické body nutné pro zajištění hygienické nezávadnosti mléka. Zdravotní stav mléčné žlázy se posuzuje na základě změny barvy mléka, vodivosti mléka, počtu somatických buněk a/nebo měření teploty mléka

ihned po získání. Při vyhodnocování těchto parametrů je nezbytné, aby čidla, která je měří byla v pořádku a aby byl správně nastavený software, který tyto parametry vyhodnocuje.

LITERATURA

1. DOLEŽAL, O., EDVALD, M., HANUŠ, O., HLÁSNÝ, J., JÍLEK, F., KVAPILÍK, J., PYTLOUN, J., VEGRICHT, J., (2000). Mléko, dojení, dojírny. Praha: Agrospoj.
2. HAMANN, J. (2002). Relationships between somatic cell count and milk composition. *Bulletin. International Dairy Federation*, 372, 56–59.
3. HAMANN, J., ZECCONI, A. (1998). Evaluation of the electrical conductivity of milk as a mastitis indicator. *Bulletin. International Dairy Federation*. https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=BE1999000906. Bulletin of the International Dairy Federation. 334. 5-22.
4. HOVINEN, M., AISLA, A., PYÖRÄLÄ, S. (2005). Visual Detection of Technical Success and Effectiveness of Teat Cleaning in Two Automatic Milking Systems. *Journal of Dairy Science*, 88(9), 3354–3362.
5. HOVINEN, M., AISLA, A., PYÖRÄLÄ, S. (2006). Accuracy and reliability of mastitis detection with electrical conductivity and milk colour measurement in automatic milking. *Acta Agriculturae Scandinavica Section A-animal Science*, 56(3–4), 121–127.
6. CHMELÍKOVÁ, E., HACKEROVÁ, L., HAVLÍKOVÁ, K. (2022) Účinek tepelného stresu na produkční a reprodukční vlastnosti skotu. Náš chov, 12, p. 51-53. ISSN 0027-8068.
7. JACOBS, J. A., SIEGFORD, J. M. (2012). Invited review: The impact of automatic milking systems on dairy cow management, behavior, health, and welfare. *Journal of Dairy Science*, 95(5), 2227–2247.
8. JUNGA, P. (2014). Zemědělské stavby II. Brno: Mendelova univerzita v Brně. ISBN 978-80-7509-014-0.
9. KAMPHUIS, C., SHERLOCK, R., JAGO, J., MEIN, G. A., HOGEVEEN, H. (2008). Automatic Detection of Clinical Mastitis Is Improved by In-Line Monitoring of Somatic Cell Count. *Journal of Dairy Science*, 91(12), 4560–4570.
10. KIC, P.; NEHASILOVÁ, D. (1997). Dojicí roboty a jejich vliv na zdravotní stav mléčné žlázy: (studijní zpráva). Praha: Ústav zemědělských a potravinářských informací. ISBN 80-86153-32-0.
11. KNAPPSTEIN, K., REICHMUTH, J., SUHREN, G. (1998). Ausgewählte milchhygienische Aspekte beim Einsatz von Melkrobotern—Beobachtungen in einem Praxisbetrieb. Pages 263–268 in Bericht 39. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes

Lebensmittelhygiene der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft (DVG) vom 22.- 25.9 in Garmish-Partenkirchen, Germany.

12. KNÍŽKOVÁ, I., KUNC, P., PŘIKRYL, M., MALOUN, J., JIROUTOVÁ, P., STANĚK, S., MALAŤÁK, J. (2011) Automatické dojicí systémy - Vybrané faktory ovlivňující proces robotizovaného dojení. VÚŽV Uhříněves, ISBN 978-80-7403-085-7
13. KUDĚLKOVÁ, L. (2020) Péče o dojnice na dojírnách a v systémech využívajících roboty. Náš chov, 12, p. 44-46. ISSN 0027-8068.
14. KUNC, P., KNÍŽKOVÁ, I., DOLEŽAL, O., KNÍŽEK, J., NĚMEČKOVÁ, I. (2004) Správná rutina dojení v dojírnách. . Praha Uhříněves: VÚŽV, v.v.i., , 8 p. 80-86454-54-1
15. MACHÁČEK, M. (2016) Hygiena stelivového materiálu v chovech dojnic *Dezinfekce Dezinsekce Deratizace*, roč. XXV, č. 4, p. 97-98.
16. NIELEN, M., SCHUKKEN, Y. H., BRAND, A., HARING, S., ZONNEVELD, R. F. (1995). Comparison of Analysis Techniques for On-Line Detection of Clinical Mastitis. *Journal of Dairy Science*, 78(5), 1050–1061.
17. NORBERG, E. (2005). Electrical conductivity of milk as a phenotypic and genetic indicator of bovine mastitis: A review. *Livestock Production Science*, 96(2–3), 129–139.
18. SÝKORA, J. (2014). Zemědělské stavby: základy navrhování. Praha: Grada. Stavitel. ISBN 978-80-247-5273-0.
19. ŠIMON, J. (2013). Automatické dojicí systémy a český trh, *Zemědělec*, Profi Press
20. VEGRICHT, J., MACHÁLEK, A., FABIÁNOVÁ, M., MILÁČEK, P., AMBROŽ, P. (2008) Inovace technických a technologických systémů pro chov dojnic : metodická příručka / Praha : Výzkumný ústav zemědělské techniky, 80 p. : ISBN: 978-80-86884-37-0
21. www.clal.it
22. www.sciencemag.cz
23. www.statistica.com

Kontaktní adresa: Macháček Miroslav, Veterinární univerzita Brno, Ústav ochrany a welfare zvířat a veřejného veterinárního lékařství Palackého třída 1, 612 42 Brno, Česká republika; E-mail: machacekm@vfu.cz

HODNOTENIE VPLYVU VÝŽIVY NA MNOŽSTVO A KVALITU MLIEKA A EKOLOGICKÚ ZÁŤAŽ

EVALUATION OF THE EFFECT OF NUTRITION ON THE QUANTITY AND QUALITY OF MILK AND THE ECOLOGICAL LOAD

Maskaľová Iveta, Tačarová Marcela*, Vajda Vladimír, Timkovičová Lacková Petra, Fraňová Beáta

Katedra výživy a chovu zvierat, Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, Komenského 73, 041 81 Košice, Slovenská republika

**Syráreň BEL Slovensko a.s., Lastomírska 1, 071 01 Michalovce, Slovenská republika*

ABSTRACT

The most effective way to control the level of nutrition is to evaluate the intake and metabolic transformation of nutrients from feed to milk based on the principle of controlling the formation of ration and evaluating the nutritional and energy balance of nutrient intake in relation to the production response of dairy cows. The aim of the work was to develop a system of evaluation of nutrition and feeding of dairy cows by analyzing the mutual relationship of nutritional and production markers. By analyzing the nutritional composition of rations and feed intake, in relation to the amount and composition of milk, evaluate the production response of dairy cows. Statistical processing of mutual nutritional and production relationships to determine the production potential of the herd, the rate of the energy balance of nutrient metabolism and the efficiency of N transformation from feed to milk. The analyzed individual values of milk components and metabolites in milk can be used as a diagnostic tool for evaluating the level of phase nutrition, the feeding system together with the evaluation of the environmental load.

Key words: nutrition, transformation, milk, ecology, texture

ÚVOD

Efektívnosť výroby mlieka je limitovaná systémom chovu a spôsobom výživy dojníc, ktoré v posledných desaťročiach prechádzajú významnými zmenami. Správne modely riadenia výživy na farme zvyšujú efektívnosť chovu a znižujú ekologickú záťaž mliekarenského odvetvia na životné prostredie (Jackson-Smith a kol., 2010). Pri tvorbe a členení dojníc do produkčných skupín sa uplatňuje voľba podľa laktačných dní a množstva produkovaného mlieka a mliečnych zložiek. Realizácia a kontrola fázovej výživy a príprava nutričných programov na úrovni chovu začína tvorbou skupín a formovaním kŕmnych dávok pre dojnice

pri posúdení produkčného potenciálu a veľkosti stáda, telesného rámca, hmotnosti a kondičného stavu kráv. Tieto parametre ovplyvňujú záchovnú potrebu živín, kapacitu príjmu sušiny krmiva, rýchlosť pasáže a stráviteľnosť sacharidov a bielkovín kŕmnej dávky.

Produkčné parametre sú dôležité pre odhad normy potreby živín, ale aj kontrolu efektívnosti transformácie živín a hodnotení úrovne výživy dojníc. Produkcia mlieka a analyzovaný obsah zložiek mlieka predstavuje ekonomicky výhodnejšiu a neinvazívnu alternatívu, ktorá je často používaná v praxi. Dôsledok skrmovania KD, režim kŕmenia ako aj výsledná metabolická situácia stáda je posudzovaná pomocou údajov hodnotením množstva produkovaného mlieka a podielu zložiek v mlieku, ktoré sú k dispozícii pri pravidelnom posudzovaní genetického potenciálu dojníc. Systém hodnotenia má empirickú povahu, ale jeho využitie ponúka praktické uplatnenie pri hodnotení bilancie živín v KD a riziká prejavu metabolických porúch.

Analýza a hodnotenie fázovej výživy dojníc je v princípe založené na analýze a hodnotení biologickej efektívnosti produkcie dojníc realizované: - *hodnotením príjmu živín* analýzou množstva a pomerného zastúpenia prijatých živín v kŕmnej dávke (KD), - *hodnotením množstva vylúčených živín* podľa dennej produkcie a zložiek mlieka - *hodnotením biologickej a ekonomickej efektívnosti transformácie živín z krmiva do mlieka* (Eicher 2004). V takomto vzťahu potvrdená nutričná nerovnováha vystupuje ako dôležitý rizikový faktor výskytu tráviacich a metabolických ochorení, ktoré sa prejavujú ako reakcia zvierat na pretrvávajúcu nutričnú záťaž ktorá podmieňuje výskyt produkčných chorôb (ketóza, steatóza, popôrodná paréza a subakútna acidóza bachora (Dechow a Goodling 2008). Hodnotenie produkčnej odpovede dojníc na prijem živín v kŕmnej dávke poskytuje aktuálnu informáciu o úrovni metabolickej transformácie živín. Metabolický stav laktujúcich kráv je možné analyzovať s uplatnením rôznych systémov: - hodnotením skóre kondičného stavu (BCS) tela (Thorup a kol., 2011), - hodnotením úrovne bachorovej fermentácie (Vlaeminck a kol., 2006; Beauchemin a Penner 2009) a krvných metabolitov (Herdt 2000), alebo - analýzou úrovne produkcie mlieka a obsahu mliečnych zložiek (Reist a kol., 2002).

Cieľom práce bolo: systém hodnotenia výživy a kŕmenia dojníc analýzou vzájomného vzťahu nutričných, metabolických a produkčných markerov na úrovni chovu a produkčnej skupiny. Analýzou nutričného zloženia a príjmu krmiva, vo vzťahu k množstvu a zloženiu mlieka hodnotiť produkčnú odpoveď dojníc na skrmovanú TMR a efektívnosť transformácie dusíka z krmiva do mlieka. Analyzované individuálne hodnoty obsahu bielkovín, tuku a zastúpenie metabolitov v mlieku uplatniť ako diagnostický nástroj hodnotenia úrovne fázovej výživy, systému kŕmenia a stavu metabolickej záťaže dojníc, spolu s hodnotením ekologických vplyvov záťaže životného prostredia.

MATERIÁL A METODIKA

V chovateľských podmienkach pri kŕmnych experimentoch bol hodnotený vplyv nutričného zloženia kŕmnej dávky a príjmu krmiva v 1. fáze laktácie, vo vzťahu k produkcii, obsahu zložiek a zastúpenia močoviny v mlieku pre hodnotenie úrovni výživy a efektívnosti chovu dojníc v priebehu celoročného sledovania na úrovni farmy. Celkovo bolo hodnotených viac ako 1976 produkčných testov mlieka v stáde vysoko produkčných dojníc Holsteinskeho plemena na farme s ročnou produkciou 10 154 kg.

Dojnice boli kŕmené zmesnou kŕmnou dávkou (TMR) predkladanou dva krát denne kŕmnym vozom systémom *ad libitného* príjmu s pravidelnou kontrolou zvyškov krmiva na žľabe. V žľabových vzorkách TMR bol analyzovaný obsah živín konvenčnými metódami (Nariadenie komisie ES č.152/2009) o úradnej kontrole krmív. Nevláknité sacharidy a netto energia laktácie (NEL) boli vypočítané rovnicami NRC (2001).

Analýzou vzoriek mlieka odobratých individuálne raz mesačne bola hodnotená úroveň produkcie, zastúpenie zložiek a obsah močoviny v mlieku v Centrálnom analytickom laboratóriu mlieka realizované Plemenárskou službou Slovenskej republiky (PSSR š.p.) využitím Plemenárskeho informačného systému (PLIS). Obsah bielkovín, tuku, laktózy a koncentrácia močoviny v mlieku boli analyzované metódou blízko infračervenej spektrofotometrickej analýzy použitím prístroja MilkoScan FT^{+} a BENTLEY FTS, denná produkcia bielkovín, tuku a laktózy bola vypočítaná vynásobením analyzovaného podielu zložiek mlieka a produkcie mlieka.

Štatistické hodnotenie. Získané výsledky boli spracované matematicko-štatistickými metódami s využitím štatistického programu GraphPad Prism4.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Analyzovaný obsah živín v žľabových vzorkách TMR pre dojnice spolu s bilancovaným denným príjmom živín a energie podľa zaznamenávaného príjmu sušiny v 1. fáze laktácie sú sumarizované v Tab. 1. Pripravovaná TMR v kŕmnom voze bola predkladaná dva krát denne pri rannom a večernom dojení do kŕmnych žľabov. Príjem sušiny bol priebežne hodnotený odborným odhadom s priebežným kontrolným vážením nedožerkov.

Zastúpenie živín v žľabových vzorkách podľa analyzovaného zloženia a aktuálneho príjmu krmiva prezentuje priemerný denný príjem živín ktorý bol v následnom hodnotení použitý hodnotenie bilancie energie a konverzie živín podľa aktuálne stanovenej dojivosti a zastúpenia zložiek mlieka.

Tabuľka č. 1, Analyzovaný obsah živín v TMR a priemerný príjem živín v 1.fáze laktácie

	Obsah živín	Príjem živín/d
Sušina g/kg	450,9 ± 12,0	24,5 ± 0,74
Dusíkaté látky g/kg suš.	157,2 ± 5,8	3 836
Podiel BDB g/kg suš.	101,0 ± 1,8 (64,2%)	2 464
Podiel BNB g/kg suš.	56,2 ± 1,0 (35,8%)	1 371
Škrob g/kg suš.	272,2 ± 18,4	6 642
EE g/kg suš.	43,6 ± 2,3	1 064
NDV g/kg suš.	348,2 ± 10,4	8 496
ADV g/kg suš.	215,9 ± 7,8	5 268
NVS g/kg suš.	385,9 ± 2,8	9 416
NEL MJ/kg suš.	6,63 ± 0,32	161,8
Formulovaná TMR: krmna skupina s hmotnosťou 650 kg, pre produkciu 39 kg tuk 3,60% a bielkovina 3,24%		
Zloženie TMR (kg): kukuričná siláž 20,0 – 34,0lucernová senáž 6,0-16, trávna siláž 2,0-5,0, seno lúčne 0,8-1,0, seno lucernová 1,0 slama 0,5-0,8, kukuričný glutén 4,0, repkový šrot 2,0- 4,0 drobné zrniny 3,0 -4,5. Príjem sušiny TMR 25 kg		
Skutočne potvrdená produkcia 43 ± 7 kg/d. Odporúčaná kalkulácia (NRC 2001) krmnej dávky na úrovni 82%-tilu pre produkčnú skupinu je potrebná kalkulácia na úrovni 50 kg dennej produkcie.		

Denná produkcia mlieka podľa štatistického členenia zvierat do kvartilov predstavuje rozdelenie dojníc do štyroch rovnako početných skupín z ktorých každá tvorí štvrtinu zo súboru. Pri takomto členení sú hodnotené tri kvartily: - *prvý (dolný) kvartil* (Q1), - *druhý (stredný) kvartil* (Q2), - *tretí (horný) kvartil* (Q3). Takéto rozčlenenie dojníc pri rovnakej krmnej dávke, v rámci skupiny podľa fázy laktácie, umožňuje analyzovať efektívnosť výživy, bilanciu energie a konverziu bielkovín podľa produkcie a zložiek mlieka, v priemere aj individuálne u dojníc v rámci kvartilov. Usporiadanie dojníc do skupín podľa kvartilov produkcie a hodnotenie produkčnej odpovede podľa výšky nameranej dojivosti pri príjme krmnej dávky rovnakého nutričného zloženia, signalizuje mieru produkčnej a genetickej vyrovnanosti dojníc v krmnej skupine.

Pri celoročnom hodnotení krmnej skupiny dojníc v 1. fáze laktácie bolo analyzovaných 1976 vzoriek mlieka s priemernom 131±68 dní laktácie a rozsahu nameranej produkcie 12 – 67

kg denne. Hodnotenie produkcie a zložiek mlieka pre 1.fázu laktácie (Tab.2) potvrdilo negatívnu závislosť medzi dňom laktácie a výškou produkcie mlieka (*P<0,0001*) a negatívnu závislosť medzi výškou produkcie s obsahom tuku (*P<0,0001*) a bielkovín (*P<0,0001*) v mlieku. Analýza zložiek mlieka a zmena obsahu mliečneho tuku, bielkovín a ich pomerného zastúpenia podľa fázy laktácie (Podpečan a kol., 2008; Strzałkowska a kol., 2009) vo vzťahu k príjmu živín sa uplatňuje ako nástroj na hodnotenie úrovne výživy a produkčnej odpovede dojníc z nutričného, biologického, ekonomického a ekologického hľadiska.

Produkcia mlieka pri hodnotení dojníc v 1. fáze laktácie vykazuje rozdiel priemerných denných pôdojov o 10 kg mlieka podľa hodnotených stúpajúcich kvartilov produkcie.

- *v I. kvartile* sú dojnice v priemere na úrovni 150 dní laktácie s produkciou mlieka 33,6 kg, pri obsahu 3,21 % bielkovín 3,67 % tuku a konverziou krmiva na úrovni 1,41 kg ECM na kg prijatej sušiny TMR.
- *II.kvartil* začleňuje dojnice s priemerom 135 dní laktácie, ktoré pri priemernej dennej produkcii mlieka 43,1 ± 2,8 kg s rozsahom produkcie 38,2 – 48,3 kg/d, vykazujú značnú redukciu obsahu mliečnych zložiek (bielkoviny 3,08 % a tuk 3,35 %), pri konverzii krmiva na úrovni 1,72 kg ECM na kg krmiva.
- *III. kvartil* tvoria dojnice s priemerom v 102. laktačnom dni a produkciou 52,4 kg mlieka, pri rozsahu produkcie 48,3 – 68,6 kg/d. Dojnice v tomto kvartile pri vysokej produkcii bielkovín 1,53 a tuku 1,59 kg vykazujú výrazný pokles zložiek mlieka (bielkoviny 2,92 % a tuk 3,03 %) s konverziou krmiva na úrovni 1,98 kg ECM na kg prijatej sušiny TMR.

Zníženie produkcie a zložiek mlieka odráža nevybilancovanie kŕmnej dávky, zmeny v systéme chovu (tepelný stres), alebo zdravotné poruchy (Fleischer a kol., 2001; Mulligan a kol., 2006).

Hodnotenie nízkeho podielu bielkovín a tuku v mlieku u dojníc vystupuje ako nástroj pre hodnotenie úrovne výživy**.** Individuálne hodnoty bielkovín resp. tuku v mlieku sú regulované: - *úrovňou produkcie* pri zrieďovaní zložiek mlieka so stúpajúcou laktáciou, -*nutričným vplyvom* podľa prívodu živín v TMR resp. efektívnosti transformácie živín z krmiva a ich prerozdeľovanie do mlieka. Objektívnu analýzu úrovne výživy poskytuje: - hodnotenie počtu individuálnych vzoriek mlieka so sublimitnými hodnotami bielkovín pod 3,2% resp. tuku pod 3,6 % v percentuálnom vyjadrení z počtu zvierat v II. kvartile, ktoré sú definované ako dojnice s *priemernou produkciou mlieka* pre hodnotenú fázu laktácie.

Rovnako porovnanie dynamiky sublimitných hodnôt v rámci kvartilov analyzuje vplyv výživy na zložky mlieka pri rozdielnej dennej produkcii. Takáto analýza produkcie slúži ako hodnotiaci ukazovateľ na posúdenie toho, či kravy s priemernou produkciou mlieka boli dostatočne kŕmené aby dosiahli obsah mliečnych bielkovín resp. tuku na úrovni plemenného štandardu.

Tabuľka č. 2, Produkcia a zloženie mlieka v 1.fáze laktácie – členenie podľa kvartilov

	Priemer n 1976	I.kvartil n 494	II.kvartil n 988	III.kvartil n 494
Laktačné dni	131 ± 68	150 ± 78*	135 ± 66*	102 ± 49*
Produkcia mlieka kg/d	43,0 ± 7,5	33,6 ± 4,4*	43,1 ± 2,8*	52,4 ± 3,4*
Rozsah produkcie kg/d	12 - 67	12 - 38	>38 - 48	>48 - 67
Bielkovina obsah %	3,07 ± 0,29	3,21 ± 0,3*	3,08 ± 0,3*	2,92 ± 0,2*
% pokles < 3,2%	66,2%	47,0%	66,3%	87,9%
% zvýšenia > 3,8%	0,9%	3,0%	0,2%	-
Produkcia bielkovín kg	1,32	1,08	1,33	1,53
Tuk obsah %	3,35 ± 0,69	3,67 ± 0,7*	3,35 ± 0,6*	3,03 ± 0,7*
% pokles < 3,6%	67%	44,7%	70,0%	84%
% zvýšenia > 4,0%	14,3%	27,3%	1,6%	6,7%
Produkcia tuk kg	1,44	1,23	1,44	1,59
Laktóza %	4,88 ± 0,2	4,83 ± 0,2	4,89 ± 0,1	4,92 ± 0,1
Tuk/Bielkovina	1,09 ± 0,23	1,15 ± 0,2	1,09 ± 0,2	1,04 ± 0,2
Produkcia ECM kg/d	41,8	34,4	41,9	48,2
Konverzia krmiva	1,71	1,41	1,72	1,98

V hodnotenej 1. fáze laktácie (Tab. 2.) medzikvartivový rozsah produkcie mlieka (II. kvartil) predstavoval rozsah produkcie 38 – 48 litrov s priemerným denným pôdojom 43 kg a individuálnym výskytom sublimitných hodnôt bielkovín 66% a tuku 70%. Dojnice v I. kvartile pri priemernej produkcii 33,6 kg s rozsahom produkcie 12 – 38 kg vykazujú výskyt sublimitných hodnôt bielkovín 47% a tuku 45%. Naproti v skupine dojníc v III. kvartile pri priemernej produkcii 52 kg mlieka s rozsahom 48 – 69 kg bol potvrdený individuálny výskyt sublimitných hodnôt bielkovín u 88 a pri tuku u 84% analyzovaných vzoriek mlieka.

Pri analýze podmieňujúcich faktorov vysokého výskytu sublimitných hodnôt, vystupujú: - *manažérske príčiny* produkčnej nevyrovnanosti dojníc pri tvorbe kŕmnych skupín a presunov zvierat v rámci kŕmnych skupín podľa produkcie a kondičného stavu.

- *z nutričných vplyvov je potrebné prehodnotiť*: - limitovaný podiel tuku 43,6 g v TMR oproti potrebe 60 - 70g/kg sušiny pri produkcii dojníc nad 30 kg denne, - kvalitu objemových krmív, úroveň bielkovinovej výživy a podiel BNB, stráviteľnosť a štrukturálnu účinnosť NDV v TMR.

Nevyrovnanosť príjmu živín a produkcie mlieka v 1. fáze laktácie, kde žravosť zvierat je limitovaná plnivým efektom t.j. vyššia denná laktácia nie je kompenzovaná zvyšovaním príjmu krmiva (Ingvartsen a Andersen 2000), najviac ovplyvňuje výrazný pokles bielkovín pod 3,2 % u 66 % a tuku pod 3,6 % u 67 % dojníc. Pokles koncentrácie mliečneho tuku (pod 3,5% pre dojnice plemena Holstein alebo 4,1% pre dojnice plemena Jersey) poukazuje na nevyváženosť KD a nedostatočné pomerné zastúpenie a stráviteľnosť NDV resp. feNDV (Mulfair a kol., 2010). Zvýšené percento mliečneho tuku v porovnaní s bielkovinami v mlieku u dojníc po otelení je podmienený nadmernou NEB a nekompenzovanou lipomobilizáciou s rizikom tukovej infiltrácie pečene (Eastrige 2009). Nízky obsah bielkovín v mlieku v dôsledku nedostatočného príjmu a využiteľnosti resp. nevybilancovaného pomeru metabolizovateľných aminokyselín v TMR alebo narušením syntetickej kapacity mikrobiálnych bielkovín (Schwab a Broderick 2017). Najvýraznejší individuálny pokles s obsahom sub-limitných hodnôt bielkovín 88 % a tuku 84 % v mlieku bol pozorovaný v III.kvartile. Vysoká produkcia na začiatku laktácie pri limitovanom príjme energie podmieňuje NEB, ktorá vysvetľuje nižší obsah mliečnych bielkovín (Friggens a kol.,2004 Hansen a kol.,2006).

Efektívnosť transformácie dusíka (ETN) ***z krmiva do mlieka*** v 1. fáze laktácie podľa kvartilov je sumárne hodnotená v tabuľke 3.

Tabuľka č. 3, Bilancia príjmu a vylučovania N v 1.fáze laktácie – členenie podľa kvartilov

	Priemer n 1976	I.kvartil n 494	II.kvartil n 988	III.kvartil n 494
Laktačné dni	131 ± 68	150 ± 78*	135 ± 66*	102 ± 49*
Produkcia mlieka kg/d	43,0 ± 7,5	33,6 ± 4,4*	43,1 ± 2,8*	52,4 ± 3,4*
Rozsah produkcie kg/d	12 - 67	12 - 38	>38 - 48	>48 - 67
Bielkovina obsah %	3,07 ± 0,29	3,21 ± 0,3*	3,08 ± 0,3*	2,92 ± 0,2*
% pokles < 3,2%	66,2%	47,0%	66,3%	87,9%
% zvýšenia > 3,8%	0,9%	3,0%	0,2%	-
Produkcia bielkovín kg/d	1,32	1,08	1,33	1,53
Vylúčený N v mlieku g/d	207,0	169,1	208,0	239,8
ETN vylúčené/príjem x 100	33,7%	27,6%	33,9%	39,1%
Močovina mg/dl	28,13 ± 6,78	26,87 ± 7,2	27,91 ± 6,4	29,81 ± 6,8
Obsah > 30 mg/dl	38,0%	31,2%	36,6%	47,9%
ETN podľa močoviny	32,0%	30,2%	32,1%	32,7%

Úmerne so zvyšovaním dennej sekrécie bielkovín z 1,08 na 1,53 kg, sa znižuje podiel bielkovín v mlieku v priemere od 3,21 do 2,92% podľa kvartilov pri zvýšenej priemernej dennej produkcie mlieka. Bilančné hodnotenie efektívnosti transformácie dusíka podľa denného príjmu 614g dusíka v TMR a analyzovaného obsahu bielkovín vylúčených v dennom pôdoji v priemere podľa kvartilov vykazuje tendenciu vzostupu s najvyššou úrovňou konverzie u najproduktívnejších dojníc. Pri takomto hodnotení ETN v II. aj v III. kvartile dosahujú resp. prekračujú biologický limit konverzie bielkovín z krmiva do mlieka (34 resp. 39%) a potvrdzujú úhradu bielkovín vylúčených do mlieka z telových rezerv (Schwab a Broderick, 2017). Vyšší príjem sušiny u kráv s najvyššou produkciou môže ovplyvniť presnosť bilančného hodnotenia ETN (Maskaľová a Vajda, 2021). Paralelné hodnotenie ETN podľa analyzovaného obsahu močoviny potvrdzuje konverziu dusíka z krmiva do mlieka v rozpätí 30 – 33%.

Vplyv výživy a produkcie na ekologickú záťaž prostredia. Hodnotenie vplyvu výživy a podiel produkcie CH_4 a exkrécie močoviny, ako miera ekologickej záťaže prostredia pri rôznej úrovni dojivosti podľa kvartilov produkcie je v priemerných hodnotách sumarizovaná v tabuľke 4.

Tabuľka č. 4, Hodnotenie ekologickej záťaže (CH_4, N, NH_3) v 1.fáze laktácie- kvartily

	I.kvartil n 494	II.kvartil n 988	III.kvartil n 494
Produkcia mlieka kg/d	33,6 ± 4,4	43,1 ± 2,8	52,4 ± 3,4
Tuk %	3,67 ± 0,7	3,35 ± 0,6	3,03 ± 0,7
Bielkovina %	3,21 ± 0,3	3,08 ± 0,3	2,92 ± 0,2
Objem produkcie CH_4 g/d	539,0	539,4	539,4
Intenzita produkcie CH_4 g/kg mlieka	16,0	12,5	10,3
Účinnosť produkcie CH_4 g/kg sušiny	22,1	22,7	22,1
Príjem N v g/d	613,7		
Sekrécia N v mlieku g/d	169,1	208,0	239,8
Exkrécia N v moči g/d - bilancia	243,4	204,4	172,6
Exkrécia N v moči g/d – reg.rovnica	211,1	219,3	234,2
Emisia amoniaku g/d	88,1	90,5	95,0

Pri rovnakom zložení a príjme krmív u dojníc v prvej fáze laktácie neboli potvrdené rozdiely pri dennom *objeme produkcie metánu* (539 g/d) a *účinnosti produkcie* (22 g/kg) na príjem sušiny krmiva v rámci kvartilových skupín zvierat. Zistené hodnoty sú porovnateľné

s údajmi pri rovnakom systéme chovu a produkcie dojníc vo svete (Appuhamy a kol., 2016). Významné rozdiely boli potvrdené pri hodnotení *intenzity produkcie* CH_4 v prepočte na kg produkovaného mlieka denne. V skupinách so zvyšovaním produkcie, vyšší podiel energie krmiva je u dojníc efektívnejšie využívaný pre produkciu mlieka a úmerne klesá miera ekologickej záťaže prostredia na kg produkovaného mlieka.

Exkrécia N v moči v 1. fáze laktácie stanovená bilančnou metódou príjmu a vylučovania v mlieku podľa kvartilov vykazuje tendenciu poklesu hodnôt vylúčených v moči od I., II. a III. kvartilu v množstve 243 resp. 204 resp. 172 g N denne. Tento pokles vylučovania je úmerný ku zvyšovaniu sekrécie dusíka vylúčeného v mlieku v objeme vzostupu hodnôt 169 resp. 208 resp. 240 g dusíka na deň. Hodnotenia exkrécie N v moči výpočtom podľa analyzovaného obsahu močoviny v mlieku (MUN) regresnou rovnicou podľa Huhtanen a kol. (2015) potvrdzuje vzostup exkrécie dusíka súbežne so zvyšovaním produkcie mlieka pri vzostupe hodnôt podľa kvartilov 170, 178 resp. 192 g denne. Tento priamy vzťah medzi zvyšovaním ETN do mlieka a zvyšovaním vylučovania N v moči, je ovplyvnený mierou proteolýzy a transformácie N z telových rezerv.

ZÁVER

Tvorba skupín a presuny zvierat pri fázovej výžive dojníc sú dôležité nástroje manažmentu efektívnosti produkcie mlieka. Hodnotenie produkcie a zložiek mlieka v členení podľa dní laktácie potvrdilo pri všetkých hodnotených parametroch menšie rozdiely v rámci sledovaných skupín v 1.fáze laktácie, ako boli zistené pri členení zvierat podľa produkčných kvartilov. Tieto zistenia poukazujú na potrebu venovať pri výbere zvierat pre tvorbu kŕmnych skupín a presunov dojníc vyššiu dôležitosť hodnoteným produkčných parametrov a kondícií dojníc pred hodnotiacim parametrom podľa dňa laktácie.

Efektívnosť transformácie dusíka podľa analyzovaného obsahu močoviny v mlieku s uplatnením regresnej rovnice podľa Huhtanen a kol. (2015) vystupuje ako vhodný spôsob hodnotenia efektívnosti utilizácie dusíka, ktorý oproti ostatným hodnoteniam zohľadňuje úroveň močoviny a dennej produkcie mlieka. Živiny, ktoré nie sú transformované do mlieka sú vo forme močoviny resp. CH_4 vylučované do prostredia. Zlepšenie efektívnosti transformácie živín má dva hlavné dôsledky: - ovplyvňuje množstvo a zastúpenie zložiek mlieka, - zlepšuje environmentálny vplyv produkcie mlieka na ekologickú záťaž prostredia.

POUŽITÁ LITERATÚRA

1. APPUHAMY, J.A.D.R.N, FRANCE. J., KEBREAB, E. Models for predicting enteric methane emissions from dairy cows in North America, Europe, and Australia andNew Zealand. Global Change Biology, 2016, 22:3039–305
2. BEAUCHEMIN, K., PENNER, G. New Developments in Understanding Ruminal Acidosis in Dairy Cows. In Proc.Tri-State Dairy Nutrition Conference. 2009, p 1-12
3. DECHOW, C.D., and GOODLING, R.C. Mortality, Culling by Sixty Days in Milk, and Production Profiles in High- and Low-Survival Pennsylvania Herds., ISSN 0022-0302, *J. Dairy Sci*., 2008, 91:4630-4639
4. EASTRIDGE, M.L. Opportunities to Manipulate Milk Fat Content in Dairy Cattle In: Proceedings of the 30th Western Nutrition Conference, September 23-24, Winnipeg, MB, 2009, p180
5. EICHER, R. Evaluation of the metabolic and nutritional situation in dairy herds: Diagnostic use of milk component. In Proceedings of the WBC Congress, 11-16 july 2004, Québec, Canada, 2004, available: http://www.ivis.org/proceedings/wbc/wbc2004/ WBC2004-Eicher-simple.pdf (20 July 2012)
6. FLEISCHER, P., METZNER, M., BEYERBACH, M., HOEDEMAKER, M., KLEE, W. The relationship between milk yield and the incidence of some diseases in dairy cows., ISSN 0022-0302, *J. Dairy Sci*., 2001, 84:2025-2035
7. HERDT, T.H. Variability characteristics and test selection in herd-level nutritional and metabolic profile testing., ISSN 0749-0720, *Vet Clin North Am. Food Anim Prac*., 2000, 16:387-403
8. HUHTANEN P., CABEZAS-GARCIA E.H., KRIZSAN S.J., SHINGFIELD K.J. Evaluation of between cow variation in milk urea and rumen ammonia nitrogen concentrations and the association with nitrogen utilization and diet digestibility in lactating cows. J. Dairy Sci., 2015, 98(5):3182–3196
9. INGVARTSEN, K.L., ANDERSEN, J.B. Integration of metabolism and intake regulation: A review focusing on periparturient animals., ISSN 0022-0302, *J. Dairy Sci*., 2000, 83:1573-1597
10. JACKSON-SMITH, D.B., HALLING, M., HOZ, E., MCEVOY, J.P., HORSBURGH, J.S., Measuring conservation program best management practice implementation and maintenance at the watershed scale. ISSN 0022-4561, *J. Soil Water Conserv.* 2010, 65:413–423.
11. MASKAĽOVÁ I., VAJDA V. Milk urea concentration to evaluation of nitrogen efficiency transformation on dairy farms. Folia veterinaria, 2021, 65(3)30-39

12. MAULFAIR, D.D., ZANTON, G.I., FUSTINI, M., HEINRICHS, A.J. Effect of feed sorting on chewing behavior, production, and rumen fermentation in lactating dairy cows., ISSN 0022-0302, *J. Dairy Sci*., 2010, 93:4791–4803
13. MULLIGAN F.J., O'GRADY, L., RICE, D.A., DOHERTY, M.L. A herd health approach to dairy cow nutrition and production diseases of the transition cow., ISSN 0378-4320, *Anim. Reprod. Sci*., 2006, 96:331-353
14. NRC (National Research Council) 2001: Nutrient requirements of dairy cattle. 7th rev. ed. National Academy Press, Washington, DC, 2001, p 408
15. PODPEČAN O., MRKUN J., ZRIMŠEK P. Diagnostic evaluation of fat to protein ratio in prolonged calving to conception interval using receiver operating characteristic analyses., ISSN 0936-6768, Reproduction in Domestic Animals, 2008, 43:249–254
16. REIST, M., ERDIN, D., VON EUW, D., TSCHUEMPERLIN, K., LEUENBERGER, H., CHILLIARD, Y., HAMMON, H., M MOREL, C., PHILIPONA, C., ZBINDEN, Y., KUENZI, N., BLUM, J.W. Estimation of Energy Balance at the Individual and Herd Level Using Blood and Milk Traits in High-Yielding Dairy Cows., ISSN 0022-0302, *J. Dairy Sci*, 2002, 85:3314-3327
17. SCHWAB, CH.G., BRODERICK, G.A., *A 100-Year Review:* Protein and amino acid nutrition in dairy cows., ISSN 0022-0302, *J. Dairy Sci*., 2017, 100:10094–10112
18. STRZALKOWSKA, N., JÓŹWIK, A., BAGNICKA, E., KRZYZEWSKI, J., HORBAŃCZUK, K., PYZEL, B., HORBAŃCZUK, J.O. Chemical composition, physical traits and fatty acid profile of goat milk as related to the stage of lactation. ISSN 0860-4037, *Animal Science Papers and Reports*, 2009: 27(4):311-320
19. THORUP, V.M., EDWARDS, D., FRIGGENS, N.C. On-farm estimation of energy balance in dairy cows using only frequent body weight measurements and body condition score., ISSN 0022-0302, *J. Dairy Sci*., 2011, 95:1784–1793
20. VLAEMINCK, B, C. DUFOUR, A. M. VAN VUUREN, A. M., CABRITA, A.R.J., DEWHURST, R.J., DEMEYER D., FIEVEZ, V. Use of Odd and Branched-Chain Fatty Acids in Rumen Contents and Milk as a Potential Microbial Marker., ISSN 0022-0302, *J. Dairy Sci*., 2006, 88:1031-1042

Kontaktná adresa: Maskaľová Iveta, Department of Animal Nutrition and Husbandry, University of Veterinary Medicine and Pharmacy in Košice, Komenského 73, 041 81 Košice, Slovak Republic; E-mail: iveta.maskalova@uvlf.sk

RIZIKO PRENOSU ZOONOTICKÝCH PATOGÉNOV MLIEKOM Z POHĽADU JEDNÉHO ZDRAVIA

RISK OF ZOONOTIC PATHOGENS TRANSMISSION VIA MILK FROM THE ONE HEALTH PERSPECTIVE

Mojžišová Jana, Drážovská Monika, Kovalenko Anatolij

Katedra epizootológie, parazitológie a ochrany spoločného zdravia, Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, Komenského 73, 041 81 Košice, Slovenská republika

ABSTRACT

Milk-borne diseases are a unique set of infections that threaten all population groups, and account for 4% of all alimentary infections worldwide. Up to 60% of infectious diseases in humans originate from animals. Milk-producing animals are susceptible hosts for many viral, bacterial and parasitic pathogens, with all or part of the life cycle taking place in the animal and the infectious agent being excreted in the milk. The most important zoonotic pathogens are *Mycobacterium bovis, Brucella spp., Salmonella, Campylobacter, Listeria monocytogenes, Coxiela burnetii, Helicobacter pylori, Coxsackie virus, tick-borne encephalitis virus (TBE).* The global One Health approach provides an effective way of assessing the risk of zoonotic disease transmission through milk and implementing preventive measures that protect not only animal health but also human health, with appropriate diagnosis, therapy and control of the disease, and strict adherence to hygiene practices at all stages of milk production right through to distribution to the consumer.

Key words: zoonoses, milk, alimentary infections, One health

ÚVOD

Mlieko je potravina pre zdravie a výživu ľudí nesmierne prospešná, ale na druhej strane môže byť prameňom mnohých nákaz ohrozujúcich verejné zdravie. Na rozdiel od iných zoonotických infekcií, patogény prenášané mliekom ohrozujú všetky skupiny ľudí bez ohľadu na ich vek a profesiu. Informácie o výskyte nákaz, zastúpení jednotlivých druhov etiologických agensov, ich prežívaní v mlieku, mliečnych výrobkoch, rezistencii na antibiotiká a dezinfekčné postupy sú nevyhnutné z hľadiska vypracovania účinných opatrení na ochranu verejného zdravia. Pozornosť musíme sústrediť na celú epizootologickú/epidemiologickú triádu, ktorú predstavuje patogén, hostiteľ a životné prostredie (Kapoor et al., 2023). Koncepcia jedného

zdravia zdôrazňuje prepojenie zdravia ľudí so zdravím zvierat a environmentálnymi faktormi. Až 60 % infekčných chorôb ľudí pochádza od zvierat a podľa údajov WHO konzumácia mlieka je zodpovedná za 4 % všetkých chorôb z potravín, tzv. *foodborne diseases*. Tieto údaje nemusia zodpovedať skutočnosti, vzhľadom k tomu, že v mnohých rozvojových krajinách sú tieto nákazy, aj keď sa vyskytujú, nediagnostikované a neevidované. Riziko prenosu patogénov mliekom môže byť výrazne znížené preventívnymi opatreniami, ktoré, aby boli efektívne, vyžadujú spoluprácu veterinárneho lekára, chovateľa a spracovateľa mlieka a musia byť riešené aj na úrovni legislatívnej a administratívnej.

Našim cieľom bolo vypracovať prehľad najčastejšie sa vyskytujúcich zoonóz, ktorých pôvodcovia sa vylučujú mliekom a definovať najdôležitejšie kroky v prevencii ich prenosu z farmy až ku spotrebiteľovi z pohľadu koncepcie jedného zdravia.

MATERIÁL A METODIKA

V štúdii sme použili metódu zberu a porovnávania publikovaných údajov vedeckých prác a informačných portálov národných a medzinárodných epizootologických a epidemiologických organizácii. Na základe toho sme definovali najčastejšie riziká prenosu infekcií a odporučili opatrenia z pohľadu koncepcie jedného zdravia.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

V surovom mlieku sa nachádzajú baktérie, ktoré označujeme ako prospešná „dobrá“ mikroflóra a k nim patria predovšetkým druhy *Lactobacillus* spp., *Lactococcus* spp. *a Leuconostoc* spp. (Kapoor et al., 2023). Ich prítomnosť v mlieku je žiaduca. K najzávažnejším zoonotickým bakteriálnym patogénom vyskytujúcim sa v mlieku patria *Brucella* spp. (Piao et al., 2020), *Mycobacterium bovis* (Collins at al., 2022), *Campylobacter jejuni* (Davis et al., 2014), *Coxiella burnetii* (Signs et al., 2012), *Listeria monocytogenes* (Hanson et al., 2019), *Salmonella* (Robinson et al., 2020), *shigatoxin produkujúca E.coli* (Jones at al., 2019). Z vírusových patogénov je to najmä *vírus kliešťovej encefalitídy* (Cisak et al., 2010), *vírus hepatitídy A* (Bidawid et al., 2000), *vírus hepatitídy E* (Huang et al., 2016), *norovírus* (Yavarmanesh et al., 2015). Podľa údajov Svetovej zdravotníckej organizácie (WHO) ešte v roku 2018 infekcie spôsobené *Mycobacterium bovis* boli zodpovedné za 143 000 nových prípadov nákazy a 12 300 úmrtí (Chakaya et al., 2022). Najmä v rozvojových krajinách je touto mykobaktériou spôsobených 10-15 % tuberkulózy u ľudí (Ashford et al., 2001). *Mycobacterium bovis* prežíva v surovom nepasterizovanom mlieku, v syre a jogurte až 14 dní a až do 100 dní v masle vyrobenom z takého mlieka (de la Rua-Domenech, 2006). Aktuálny

výskyt bovinnej tuberkulózy v krajinách Európskej únie podľa údajov ADIS (Animal Disease Information System) uvádza tab.1.

Tabuľka č. 1, Výskyt bovinnej tuberkulózy (MTBC) v krajinách EÚ

Krajina/rok	2020	2021	2022
Rakúsko	6	6	3
Belgicko	1	5	1
Francúzsko	105	98	104
Nemecko	10	8	4
Maďarsko	7	4	4
Taliansko	7	13	12
Poľsko	7	5	4
Veľká Británia	7	-	-
Spain			7
Norway			1
Celkovo	**147**	**139**	**141**

Zdroj: https://food.ec.europa.eu/system/files/2023-01/ad_adns_overview_2022.pdf

Ďalšou významnou zoonózou je brucelóza. Výskyt *Brucella abortus* a *Brucella melitensis* v krajinách EÚ uvádza tab.2. a tab.3. Kompletné informácie o výskyte brucelózy u ľudí nie sú dostupné, ale predpokladá sa ročný nárast asi 5 000 000 nových prípadov (Jamir et al., 2020). Častým patogénom nepasterizovaného mlieka je aj *Campylobacter* spp. (Christidis et al., 2016), ktorý sa dostáva do mlieka fekálnou kontamináciou.

Tabuľka č. 2, Výskyt brucelózy *B. abortus* v krajinách EÚ

Krajina/rok	2020	2021	2022
Taliansko	5	4	7
Španielsko	1	-	-
Spolu	**6**	**6**	**7**

Zdroj https://food.ec.europa.eu/system/files/2023-01/ad_adns_overview_2022.pdf

Tabuľka č. 3, Výskyt brucelózy *B. melitensis* v krajinách EÚ

Krajina/rok	2020	2021	2022
Taliansko	4	1	1
Španielsko	-	9	-
Francúzsko	-	1	-
Cyprus	-	-	3
Spolu	**4**	**11**	**4**

Zdroj https://food.ec.europa.eu/system/files/2023-01/ad_adns_overview_2022.pdf

Z vírusových patogénov musíme venovať pozornosť najmä vírusu kliešťovej encefalitídy (*TBEV, tick borne encephalitis virus*), ktorý sa prenáša nielen kliešťami ale aj nepasterizovaným mliekom. Predovšetkým ovce a kozy, ktoré sa nakazia na pastvinách prostredníctvom kliešťov a majú bezpríznakový priebeh infekcie, vylučujú vírus v mlieku 7-10 dní po infikovaní. Na Slovensku sme u ľudí v roku 2020 zaznamenali 185 prípadov infekcie, v roku 2021 bolo zaznamenaných 97 prípadov a k augustu 2022 až 141 prípadov. Úrad verejného zdravotníctva SR v uplynulom roku potvrdil tri epidémie, dve v Banskobystrickom, jednu v Prešovskom kraji, kde predpokladaným prameňom nákazy boli výrobky z nespasterizovaného ovčieho mlieka.

Ale aj pasterizované mlieko môže byť prameňom zoonóz. Boli potvrdené epidémie spôsobené yersíniami, *Yersinia enterocolica* (Gruber at al., 2021; Sebastianski et al., 2022). Podobne aj *Listeria monocytogenes* dokáže prežiť proces pasterizácie (Fleming et al., 1985) a spôsobiť infekcie najmä u tehotných žien, detí a oslabených jedincov.

Jednotlivé patogény sa do mlieka dostávajú v ktoromkoľvek stupni od jeho produkcie, vylučovaním z infikovaného zvieraťa, a kontamináciou z prostredia v priebehu spracovania, distribúcie a vlastnej konzumácie (Quigley at al., 2013). Opatrenia na zabránenie prenosu patogénov mliekom musia byť preto komplexné a pokrývať každý krok vedúci od zvieraťa k človeku. Pri realizácii preventívnych a zdolávacích opatrení sa zameriavame na všetky tri zložky epizootologickej triády, identifikovanie prameňa nákazy a prerušenie epizootologického reťazca. Základom zdravého mlieka je zdravé zviera. Monitoring nákaz, pravidelné testovanie zvierat, prípadná imunizácia, prevencia výskytu vektorov a rezervoárov infekcie, vyraďovanie nakazených zvierat, vhodná terapia a prevencia vedú k udržaniu zdravého stáda. Hygiena životného prostredia, vhodná dezinfekcia a sanitácia, hygiena dojenia, udržiavanie čistoty dojacich zariadení, podmienky ustajnenia, výživy zvierat dokážu vo veľkej miere znížiť riziko prenosu infekcie. V procese transportu a spracovania mlieka môže dôjsť ku kontaminácii

mlieka z prostredia alebo ľudským faktorom, preto aj tieto postupy musia podliehať striktnej hygienickej kontrole.

ZÁVER

Zoonózy prenášané mliekom sú veľmi dôležitou témou pre veterinárnu medicínu s priamym dopadom na verejné zdravie. Sú jasným príkladom ako zdravie zvierat a zdravie životného prostredia ovplyvňuje zdravie človeka a tiež ako človek svojou intervenciou môže na rôznych stupňoch ovplyvniť prenos patogénov. Snaha o podporu vzájomného vzťahu: zdravé životné prostredie – zdravé zvieratá – zdraví ľudia, sa preniesla do vytvorenia vysoko aktuálneho konceptu „One health“, jeden svet – jedno zdravie. Kľúčom k dosiahnutiu vysokej kvality verejného zdravia a potravinovej bezpečnosti je zdieľanie najnovších poznatkov o výskyte zoonóz medzi dotknutými odborníkmi v humánnej a veterinárnej medicíne, farmácii a poľnohospodárstve na národnej a medzinárodnej úrovni.

POĎAKOVANIE

Práca vznikla za podpory projektu VEGA 1/0368/21.

POUŽITÁ LITERATÚRA

1. ASHFORD, D. A., et al. Epidemiology of selected mycobacteria that infect humans and other animals. Rev. Sci. Tech. Int. Off. Epizoot. 2021, 20, 325–337
2. BIDAWID, S., et al. Heat inactivation of hepatitis A virus in dairy foods. J. Food Prot. 2000, 63, 522–528.
3. CHAKAYA, J., et al. The WHO global tuberculosis 2021 report – not so good news and turning the tide back to End TB. Int. J. Infect. Dis. Int. J. Infect. Dis. 2022, 124(Suppl. 1), S26–S29.
4. CHRISTIDIS, T., et al. Campylobacter spp. prevalence and levels in raw milk: A systematic review and meta-analysis. J. Food Prot. 2016, 79, 1775–1783. doi: 10.4315/0362-028X.JFP-15-480
5. CISAK, E., (2010). Prevalence of tick-borne encephalitis virus (TBEV) in samples of raw milk taken randomly from cows, goats and sheep in eastern Poland. Ann. Agric. Environ. Med. AAEM. 2010, 17, 283–286.
6. COLLINS, ÁB., et al. Prevalence of Mycobacterium bovis in milk on dairy cattle farms: An international systematic literature review and meta-analysis. Tuberculosis 2022, 132:102166. doi: 10.1016/j.tube.2022. 102166

7. DAVIS, K. R., et al. Campylobacter jejuni infections associated with raw milk consumption — Utah. MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep. 2014, 65, 301–305. doi: 10.15585/mmwr.mm6512a1
8. DE LA RUA-DOMENECH, R. Human Mycobacterium bovis infection in the United Kingdom: Incidence, risks, control measures and review of the zoonotic aspects of bovine tuberculosis. Tuberculosis (Edinb.) 2006, 86, 77–109. doi: 10.1016/j.tube.2005.05. 002
9. FLEMING, D. W.,et al. Pasteurized milk as a vehicle of infection in an outbreak of Listeriosis. N. Engl. J. Med., 1985, 312, 404–407. doi: 10.1056/NEJM198502143120704
10. GRUBER, J. F., et al. Yersinia enterocolitica outbreak associated with pasteurized milk. Foodborne Pathog. Dis. 2021, 18, 448–454. doi: 10.1089/fpd.2020.2924
11. HANSON, H., et al. Listeria monocytogenes associated with pasteurized chocolate milk, Ontario, Canada. Emerg. Infect. Dis., 2019, 25, 581–584. doi: 10.3201/eid2503.180742
12. HUANG, F., et al. Excretion of infectious hepatitis E virus into milk in cows imposes high risks of zoonosis. Hepatology 2016, 64, 350–359. doi: 10.1002/hep.28668
13. JAMIR, T., et al.. Brucellosis in patients with pyrexia of unknown origin in Assam, India: A retrospective record review. Lancet Glob. Health 2020, 8:S28
14. JONES, G., et al. Outbreak of Shiga toxin-producing Escherichia coli (STEC) O26 paediatric haemolytic uraemic syndrome (HUS) cases associated with the consumption of soft raw cow's milk cheeses, France, March to May 2019. Eurosurveillance 2019, 24:1900305. doi: 10.2807/1560-7917.ES.2019.24.22.1900305
15. KAPOOR S. et al. Milk –borne diseases through the lens of one health, Front.Microbiol., 2023, 14:1041051, doi10.3389/fmicb2023.1041051
16. PIAO, D., et al. Emerging brucellosis outbreaks associated with unpasteurized milk in China. China CDC Wkly. 2020, 2, 888–890. doi: 10.46234/ccdcw2020.242
17. QUIGLEY, L., et al. The complex microbiota of raw milk. FEMS Microbiol. Rev. 2013, 37, 664–698
18. ROBINSON, E., et al. Outbreak of Salmonella Newport associated with internationally distributed raw goats' milk cheese, France, 2018. Epidemiol. Infect. 2020, 148:e180. doi: 10.1017/ S0950268820000904
19. SEBASTIANSKI, M., et al. Disease outbreaks linked to pasteurized and unpasteurized dairy products in Canada and the United States: A systematic review. Can. J. Public

Health Rev. Can. Sante Publique 2022, 113, 569–578. doi: 10.17269/s41997-022-00614-y

20. SIGNS, K. A., et al. Q fever cluster among raw milk drinkers in Michigan, 2011. Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am., 2012, 55, 1387–1389. doi: 10.1093/cid/cis690
21. YAVARMANESH, M., et al. Occurrence of noroviruses and their correlation with microbial indicators in raw milk. Food Environ. Virol. 2015 7, 232–238. doi: 10.1007/s12560-015-9185-5

Kontaktná adresa: Mojžišová Jana**,** Department of Epizootology, Parasitology and One Health Protection, University of Veterinary Medicine and Pharmacy in Košice, Komenského 73, 041 81 Košice, Slovak Republic; E-mail: jana.mojzisova@uvlf.sk

KVALITA MÄKKÝCH SLADKÝCH KOZÍCH SYROV OBOHATENÝCH O BYLINKY DIVOKÉHO CESNAKU

QUALITY OF SOFT RENNET GOAT CHEESES ENRICHED WITH WILD GARLIC HERB

Najgebauer-Lejko Dorota, Pluta-Kubica Agnieszka, Domagała Jacek, Walczycka Maria

Department of Animal Product , Faculty of Food Technology, University of Agriculture in Krakow, Balicka 122, 30-149 Krakow, Poland

ABSTRACT

The present study was established to estimate the effect of wild garlic (*Allium ursinum* L.) addition on the selected quality features of soft rennet cheeses produced from goat milk. Dried leaves of wild garlic were added to cheese grain in a dose of 0.5% (w/w) before filling molds and whey dripping. Fresh cheeses were analysed for basic chemical composition, whereas other characteristics such as: degree of proteolysis (OPA value) and lipolysis (FFA), antioxidant properties (anti-radical power against DPPH radical [ARP] and ferric reducing ability parameter [FRAP]), microbiological and sensory quality were determined in fresh (week 0) and stored (week 2) cheese samples. Obtained results revealed that fortification with wild garlic resulted in higher contents of total solids, including protein and ash. Generally, microbiological quality of cheeses was not affected by the supplementation with herbs. All cheese samples were free from spoilage microorganisms. On the other hand, addition of wild garlic increased antioxidant parameters measured using FRAP method. Herbal cheeses were also more prone to proteolysis and lipolysis as indicated by the higher OPA values and FFA content when compared to non-supplemented cheeses.

Key words: goat cheese, chemical composition, sensory and microbiological quality, antioxidant properties, proteolysis and lipolysis

INTRODUCTION

Although goat milk is not significantly different from cow milk in terms of the basic chemical composition and sensory properties such as flavor, and appearance, it has its unique physicochemical, biochemical, and nutritional characteristics compared to cow and other species milk (Park, 2017). Despite the similar protein content, goat milk contains slightly less total casein, but higher non-protein nitrogen than the bovine milk. Goat milk has also been

known for its beneficial and therapeutic effects on the people who suffer from cow milk allergy (Park, 2017; Ribeiro and Ribeiro, 2010).

The largest producers of goat milk in the world are France, Spain, Greece and the Netherlands (Górska, 2015). Currently, there is a wide range of offered products from goat's milk - from drinking milk and cream (pasteurized or UHT), through fermented milks, milk concentrates, butter, rennet and curd cheeses to sweets and infant formulas. However, it is estimated that approximately 85% of goat milk is used for the production of various types of cheeses, of which 60% are fresh cheeses, 30% are semi-hard cheeses and 10% are cottage cheeses. Numerous varieties of goat's milk cheese are produced worldwide, but France boasts the greatest variety of goat cheeses and the most famous French goat (chevre) soft cheeses are Crottin de Chavignol, Saint-Maure, Valençay, Selles-sur-Cher and Cabécou de Rocamadour (Górska, 2015). In Poland, due to the exceptional quality characteristics many of these products have entered on the ministerial List of Traditional Products. Wallachian goat cheese, bundz, bryndza as well as white and smoked ripening goat cheeses from Bieszczady and Podkarpackie voivodeship are some of the examples (Kawęcka i Sikora, 2019).

Wild (bear) garlic (*Allium ursinum* L.) is an edible plant that grows wild or is cultivated and has been used for many years in folk medicine, cuisine and for supplementation of many food-stuffs, particularly in Northern and Central Europe and North Asia. Wild garlic (especially leaves) contains many bioactive substances, such as vitamins, minerals, volatiles, as well as potent antimicrobial and antioxidant compounds (Sobolewska et al., 2015). Diiferent types of single or mixed herbs, including wild garlic, are added to specific fresh and ripening cheeses, e.g. Turkish Otlu peynir, Polish Koryciński Cheese or Cheese With a Forest Note to impart flavor and to prolong shelf-life (Najgebauer-Lejko et al. 2022).

The aim of the present study was to estimate the influence of wild garlic (*Allium ursinum* L.) addition to the cheese curd in a dose of 0.5% (w/w), on the selected physicochemical features of soft rennet cheeses produced from goat milk.

MATERIAL AND METHODS

Soft rennet cheese was produced from goat milk purchased from family organic farm „Figa" (Mszana, Poland) using a previously described method of production with minor modifications (Pluta-Kubica et al., 2022). The curd was separated into two groups prior to molding. Half of it was intended for production of natural, plain cheese (P). The rest of the curd was gently mixed with wild garlic leaves (5 g/kg of the curd) (WG). After filling cylindrical molds cheeses were left overnight for self-pressing. All cheeses were individually packed in LLDPE film.

The cheeses were analysed for contents of water (ISO 5534:2004), fat (ISO 3433:2008), protein, ash and NaCl (AOAC, 2007). A pH-meter was used to assess the acidity of cheese. Color, external appearance, texture, odor and taste were evaluated by trained panelists using a 5-point scale (from 1 – the least desirable, to 5 – the most desirable). The overall quality was calculated using the following indices of importance: 0.15, 0.20, 0.15, 0.25 and 0.25, respectively (Baryłko-Pikielna and Matuszewska, 2014). *Lactococcus* count (Ong and Shah, 2009), yeast and mold count (PN-ISO 21527-1:2009), and coliform count (PN-ISO 4832:2007) were determined aerobically by the plate count technique. The degree of proteolysis was evaluated using o-phthaldialdehyde (OPA) spectrophotometric assay and lipolysis by estimation of the free fatty acid (FFA) content. Antioxidant capacity of cheese was assessed by means of two methods: ferric reducing antioxidant parameter (FRAP, performed on aqueous-ethanolic cheese extract) and anti-radical power against DPPH radical (ARP, performed after incubation of cheese sample with methanolic DPPH solution) (Najgebauer-Lejko et al., 2022). Cheese where tested when fresh and after two weeks of storage at 4 °C, except for chemical composition which was analysed only on fresh samples All chemical analyses were done in triplicates and results were subjected to the statistical analysis – two-way ANOVA or test t (chemical composition) (Statistica, 13.3, TIBCO Software Inc., USA) at $p \leq 0.05$.

RESULTS AND DISCUSSION

Goat milk used for cheese production was characterised by 3.37% average fat content and 3.14% average protein concentration, has normal pH and acidity as well as sensory properties. Obtained herbal cheeses when compared to the plain cheeses contained less moisture 55.49 g/100 g (P – plain cheese) vs. 49.03 g/ 100 g (WG – cheese with wild garlic); higher content of protein: 20.88 vs. 18.55 and ash: 2.63 vs. 2.23 (g/100 g) and similar concentration of fat (22.58 - 24.50 g/100 g); and salt (0.66-0.77 g/100 g). Lower moisture content in herbal cheese may result from more intensive processing during mixing of the cheese grains with herbs, which promoted whey drainage.

Microbiological quality of cheese was not affected by the wild garlic fortification: the number of lactococci fluctuated in the range of 8.5-8.6 log cfu/g for fresh cheeses and decresed during storage to the level of 7.8-7.9 log cfu/g. Spoilage microorganisms, such as yeast, molds and coliform bacteria were not detected in any of the cheese samples. Fresh cheeses with and without herbs did not differ in terms of pH (~4.8), whereas after storage pH of herbal cheese was by 0.1 unit lower than for the plain cheese.

According to sensory panelist addition of wild garlic herb to cheeses had statistically significant and negative effect on the color, external appearance, texture but the average notes given to herbal cheeses were generally higher than 4.0 indicating good sensory quality of the

tested products. Regarding the taste and odor as well as calculated overall sensory quality no significant differences between both cheese types were stated. The same was reported in the study of Pluta-Kubica et al. (2022) in which addition of dried leaves of bear garlic did not significantly influence sensory characteristics of soft rennet cheeses produced from cow milk.

Comparison of both cheese types provided information that addition of wild garlic promoted lipolysis and proteolysis in cheeses. The average content of free fatty acids (FFA) in the herbal cheese (24.9 meq/kg fat) was significantly higher than in the plain one (22.5 meq/kg fat). No increase in the FFA concentration was observed during storage, moreover significant decrease was noticed for herbal cheese after two weeks. The effect of the herbal additive was even more pronounced in the degree of cheese proteolysis as an increase of OPA value by 60-100% upon supplementation of cheese with bear garlic by was observed and this value incresed with storage time. These results confirm results our previous studies on cow and sheep cheeses supplemented with wild garlic (Najgebauer-Lejko et al. 2022, 2023) and are consistent with findings of Coşkun and Tunçtürk (2000), who reported that wild garlic addition in the pickled form to cheese grain promoted proteolysis and lipolysis in rennet ripened herby cheese.

It was expected that addition of wild garlic herb, rich in many antioxidant substances, to the goat cheese would increase antioxidant capacity of the final product. However, only as regards ferric reducing ability power (FRAP) significant improvement was achieved (0.20 vs. 0.47 mMFe^{2+}/100 g cheese, respectively in the plain cheese and herbal cheese), whereas the anti-radical activity (ARP) against 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical was not statistically significantly affected by the herb supplementation. This was in agreement with the results of our previous studies performed on the soft, rennet ovine cheeses fortified with wild garlic and in opposite to the conclusion made by Çelik et al. (2008) that thiol-type antioxidant substances from wild garlic are not able to react sufficiently in the FRAP assay. Moreover, they are also not consistent with the results of antioxidant assays obtained while analyzing cow milk cheeses upon wild garlic supplementation (Najgebauer-Lejko et al., 2022). Antioxidant capacity of wild garlic cheeses determined by the FRAP method was also subjected to significant changes during two-week storage as almost 50% decrease of the FRAP value was observed in this period. On the contrary, this was not observed for the plain cheeses.

CONCLUSION

Supplementation of soft rennet goat cheeses with dried bear garlic leaves increased antioxidant parameters measured using FRAP method and degree of proteolysis and lipolysis of the final products. Results of microbiological and sensory analyses revealed that cheeses

with wild garlic are safe and of high sensory. Therefore, it can be successfully added to fresh soft cheeses as functional additive.

ACKNOWLEDGMENT

This research was financially supported by the Ministry of Science and Higher Education of the Republic of Poland.

REFERENCES

1. AOAC. 2007. Official Methods of Analysis of AOAC International (18th Ed.). Chapter 33. Dairy Products.
2. Baryłko-Pikielna N., Matuszewska I. 2014. Rozdział 10. Metody sensorycznej analizy opisowej. Wydawnictwo Naukowe PTTŻ, Kraków.
3. Çelik S.E., Özyürek M., Altun M., Bektaşoğlu B., Güçlü K., Berker K.I., Özgökçe F., Apak' R. (2008) Antioxidant capacities of herbal plants used in the manufacture of Van herby cheese: 'Otlu peynir'. *Int. J. Food Prop.*, *11*, 747-761.
4. Coşkun, H.; Tunçtürk, Y. (2000). The effect of *Allium* sp. on the extension of lipolysis and proteolysis in Van herby cheese during maturation. *Nahrung, 44*, 52-55.
5. Górska J. (2015). Produkty kozie: Rynek produktów kozich na świecie. Forum Mleczarskie Biznes, 1/2015. https://www.forummleczarskie.pl/raporty/587,rynek-produktow-kozich-na-swiecie (Access on-line 23.04.2023)
6. ISO3433:2008. 2008. Cheese – Determination of fat content – Van Gulik method. Int. Organ. Stand. Geneva, Switz. 3433.
7. ISO 5534:2004. 2004. Cheese and processed cheese — Determination of the total solids content. ISO, Geneva, Switz.
8. Najgebauer-Lejko D., Pluta-Kubica A., Domagała J., Turek K., Duda I., Golian J. (2022). Effect of bear garlic addition on the chemical composition, microbiological quality, antioxidant capacity, and degree of proteolysis in soft rennet cheeses produced from milk of Polish Red and Polish Holstein-Friesian cows. *Molecules*, *27*(24), 8930.
9. Ong L., Shah N.P.(2009). Probiotic Cheddar cheese: Influence of ripening temperatures on survival of probiotic microorganisms, cheese composition and organic acid profiles. LWT Food Sci. Technol., 42, 1260–1268.
10. Park, Y. W. (2017). Goat milk–chemistry and nutrition. In: Park Y. W., Min D., Haenlein G.F.W., Wendorff W.L. (Eds.) *Handbook of milk of non-bovine mammals*, 2nd ed., Wiley Online Library, 42-83.

11. Pluta-Kubica A., Najgebauer-Lejko D., Domagała J., Štefániková J., Golian J. (2022). The effect of cow breed and wild garlic leaves (Allium ursinum L.) on the sensory quality, volatile compounds, and physical properties of unripened soft rennet-curd cheese. *Foods,* 3948. doi:10.3390/ foods11243948.
12. PN-ISO 21527-1:2009. Microbiology of Food and Animal Feeding stuffs—Horizontal Method for the Enumeration of Yeasts and Moulds—Part 1: Colony Count Technique in Products with Water Activity Greater than 0.95; International Organization for Standardization: Geneva, Switzerland, 2009.
13. PN-ISO 4832:2007. Microbiology of Food and Animal Feeding Stuffs—Horizontal Method for the Enumeration of Coliforms—Colony count Technique; International Organization for Standardization: Geneva, Switzerland, 2009.
14. Ribeiro, A. C., Ribeiro, S. D. A. (2010). Specialty products made from goat milk. *Small Ruminant Research*, *89*(2-3), 225-233.
15. Sikora J., Kawęcka A. (2015). Jakość produktu tradycyjnego z mleka koziego–sera podkarpackiego białego. *Wiadomości Zootechniczne*, *53*(4), 10-15.
16. Sobolewska D., Podolak I., Makowska-Was, J. (2015). Allium ursinum: Botanical, phytochemical and pharmacological overview. *Phytochem. Rev.,* 14, 81–97.

Contact address: Najgebauer-Lejko Dorota, Department of Animal Product Technology, Faculty of Food Technology, University of Agriculture in Krakow, Mickiewicza 21, 31-120, Krakow, Poland; E-mail: dorota.najgebauer-lejko@urk.edu.pl

VYUŽITÍ RAMANOVY SPEKTROSKOPIE PRO ROZLIŠENÍ KVĚTOVÝCH A LIPOVÝCH MEDŮ

DIFFERENTIATION OF FLOWER AND LIME HONEYS USING RAMAN SPECTROSCOPY

Pleva Boris, Pospiech Matej, Javůrková Zdeňka, Čaloudová Jana, Tremlová Bohuslava

Veterinární univerzita Brno, Palackého tř. 1946/1, 612 42 Brno, Česká republika

ABSTRACT

Linden honey is one of the most popular honeys among consumers, mainly because of its characteristic sensory properties. Determining the origin of honey is not easy and, in particular, there is a lack of rapid and non-destructive analyses. The aim of this work was to verify the possibility of determining lime honey by Raman spectroscopy. Eleven linden and 11 polyflower honeys were used and examined by melissopalynological analysis and Raman spectroscopy. The work confirmed the presence of characteristic Raman spectra in linden honeys, where the spectra characteristic of carbohydrates and proteins are particularly important for the determination. Less significant was the wave number 933 cm^{-1} which is characteristic for the fructose. Identification by component analysis was able to distinguish 55 % of the lime honeys as a distinct group and 45 % of the lime honeys, particularly those with a high content of lime pollen, were assessed as floral honeys by the first two factors.

Key words: *Tilia*, Czech Republic, honeydew, melissopalynology

ÚVOD

Lipový med patří mezi oblíbené medy, které jsou běžně produkovány v EU, včetně severnějších oblastí. Většina lipových medů pochází ze střední a východní Evropy (Persano Oddo a Piro 2004). Obliba lipových medů u spotřebitelů je dána jak jeho senzorickými vlastnostmi, tak také vysokým obsahem bioaktivních látek, s nimiž je tento med spojován. Lipový med je charakterizován především jako světlý až středně tmavý med se silnou až dřevitou, případně chemickou či svěží vůní. Chuťově je charakterizován jako středně sladký, málo kyselý, lehce až středně hořký s dlouhou perzistencí a adstringencií. Rychlost krystalizace je střední (Persano Oddo a Piro 2004). Specifické senzorické vlastnosti jsou dány zejména těkavými látkami, z nichž nejvýznamnější jsou 4-tert-butylphenol, 3,5-trimethylphenol, 4-tert-butylphenol, estragol, p-methylacetophenon, p-methylacetophenon, 8-p-menthene-1,2-diol, carvacrol, thymol, methyl(1-methylethenyl)benzen, p-cymen a 9-epoxy-1,4(8)-p-menthadien. I

když se jedná o látky vyskytující se v lipovém medu ve vysoké koncentraci, tak byly prokázány také v pampeliškových, levandulových, jetelových, řepkových a pohankových medech (Guyot et al. 1998). Rozdíl ve výsledném senzorickém profilu je tedy dán zejména jejich odlišnou koncentrací. Důvodem velké variability u lipových medů je mimo jiné také fakt, že lípa se řadí mezi významné medovicové rostliny, na kterých hostuje škůdce zdobnatka lipová (*Eucallipterus tiliae*). Dalším důvodem je existence většího množství druhů líp. Nejznámější druhy jsou *Tilia platyphyllos*, u nás rozšířená *T. cordata* a v jižních zemích také *Tilia tomentosa Moench* (Persano Oddo a Piro 2004; Ion et al. 2018). Z fyzikálně chemických parametrů by měl lipový med splňovat požadavek na obsah pylu lípy minimálně 10 %, elektrickou vodivost větší než 0,3 (mS/cm), poměr fruktózy a glukózy větší než 1 a barvu 11–55 Pfund (Beckh a Camps 2009). Z legislativních požadavků ještě musí splňovat obsah vody max 20 %, obsah sacharózy pod 5 % a hydroxymethylfurfural (HMF) pod 40. S ohledem na častý výskyt medovice na lípách je pro tento med výjimka týkající se maximální vodivosti, která může být i v případě jednodruhového lipového medu vyšší než 0,8 mS/cm. Všechny tyto zmíněné faktory mají vliv i na fyzikálně-chemické parametry, které je možné měřit také metodou Ramanovy spektroskopie, která je založena na měření rozptylu monochromatického světla po interakci s látkou. Měřeny jsou rotační, vibrační a nízkofrekvenční vlastnosti (Oroian a Ropciuc).

Cílem této studie bylo ověřit využití Ramanovy spektroskopie pro odlišení květových a lipových medů v botanických a klimatických podmínkách České republiky.

MATERIÁL A METODIKA

Pro analýzu bylo od hobby včelařů sesbíráno 11 lipových a 11 květových medů. Medy byly sesbírány v různých letech v období 2019 až 2021, tak aby byla zohledněna meziroční variabilita (Obrázek č. 1).

Melissopalynologická analýza byla provedena podle uznané metodiky ČR (Pospiech et al. 2021b). Vzorky byly vyšetřeny v duplikátu. Ve stručnosti, 5 g medu bylo rozpuštěno ve 20 ml temperované vody (40 °C), filtrováno přes 3 µm mikrocelulózový filtr (Millipore, GER). Takto zpracovaný vzorek byl zamontován na trvalý preparát, nasnímán mikroskopem Eclipse Ci-L (Nikon, JPN) motorizovaným stolkem Proscan III (Prior, GB) v náhodných pozicích a následně vyšetřen.

Ramanova spektroskopie byla provedena na Ramanově spektroskopu HR-TEC-X2-785 (StellarNet, USA) v rozsahu 300 až 2000 vlnového čísla (cm^{-1}). Pro refrakci byl použit laser (Ondax, GER) o vlnové délce 785 nm s výkonem 91 mW. Každý vzorek byl vyšetřen čtyřikrát. Před vlastním vyšetřením byl vzorek standardizován na 65° ± 0,5° brixů destilovanou vodou.

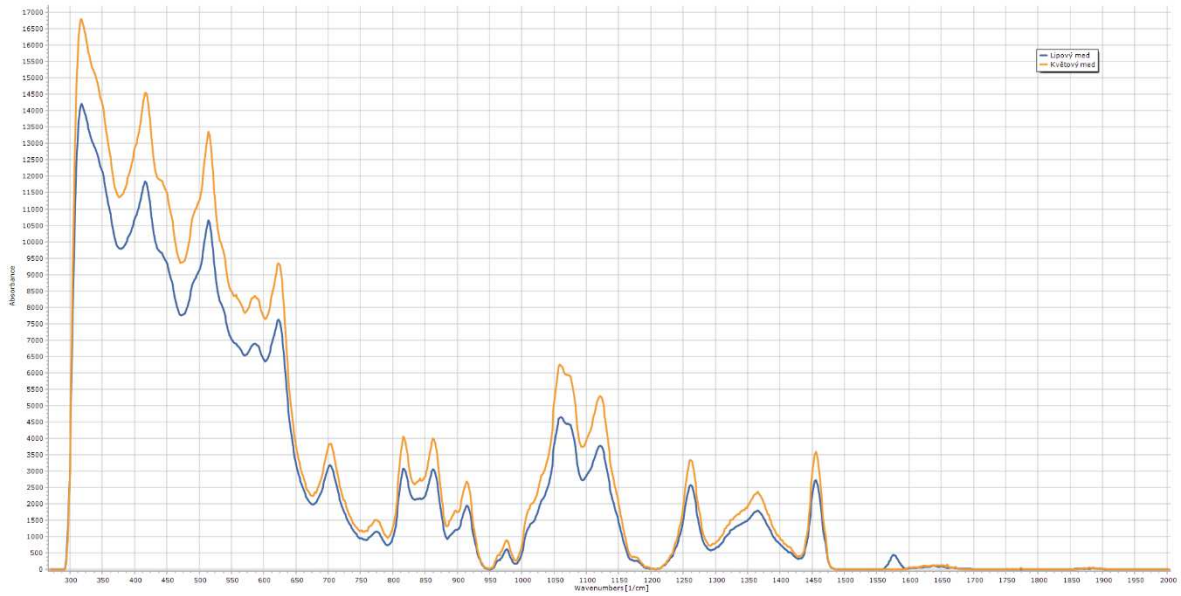
Data byla statisticky zpracována v programu Xlstat 2022 (Addinsoft, USA), s využitím testů faktorové analýzy pro vyhodnocení významných spekter Ramanova spektra a komponentní analýzy (PCA) pro určení korelačních vztahů mezi květovými a lipovými medy.



Obrázek č. 1, Odběrová místa medů, soukruží znamená více odběrů na jednom stanovišti

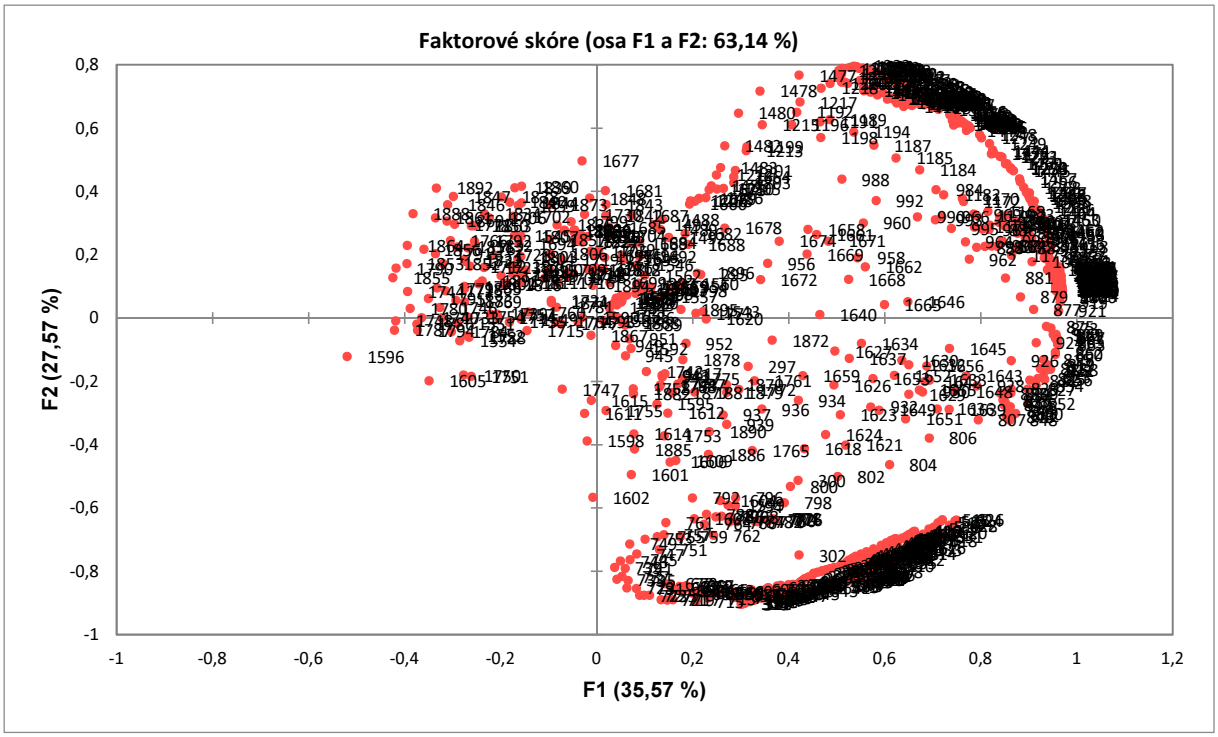
VÝSLEDKY A DISKUZE

Výstupem Ramanovy analýzy je spektrální křivka v rozsahu měřícího analyzátoru. Naměřená intenzita pro každé vlnové číslo je charakteristická pro některou z vlastností látek. Intenzitou je myšlen posun odezvy Ramanova spektroskopu od referenční hodnoty daný interakcí s analyzovanými látkami. Intenzita posunu je dána typem chemické látky, resp. její chemickou strukturou. U medů je důležitá zejména informace o obsažených sacharidech, která je v oblastech 300–650 cm^{-1} (glukóza a fruktóza), 790–856 cm^{-1} (glukóza), 911 a 933 cm^{-1} (fruktóza), 1028 cm^{-1} (glukóza, maltóza, sacharóza). Významnou oblastí specifickou zejména pro proteiny (vazba C-N) je oblast 1065–1127 cm^{-1}, 1265–1267 cm^{-1}. Oblast 1349 až 1461 cm^{-1} je typická pro skupiny OH, CH a CH_2 (Oroian a Ropciuc 2017). Spektrální záznam Ramanova spektra pro obě skupiny medů je zobrazen na Obrázku č. 2.



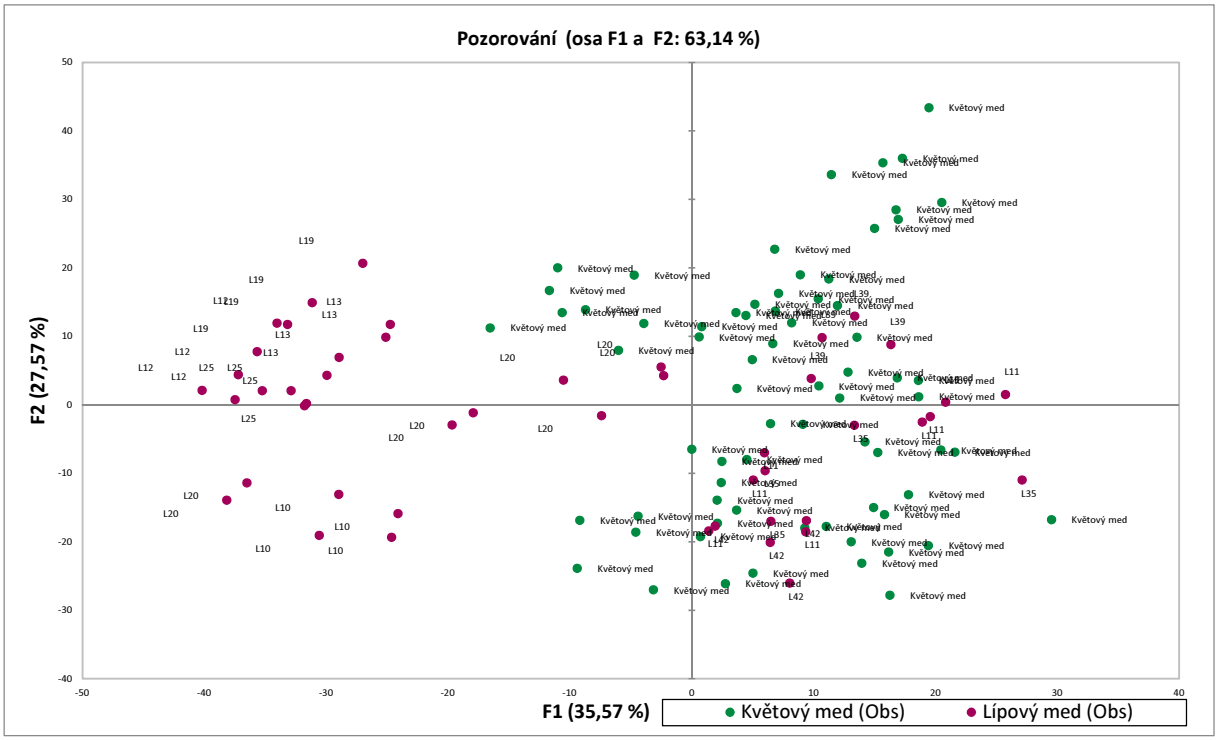
Obrázek č. 2, Záznam Ramanova spektra lipových a květových medů, křivky jsou průměrnou hodnotou měření

Námi naměřené Ramanovo spektrum je v souladu s výsledky měřeními jiných autorů (Goodacre et al. 2002; Oroian a Ropciuc 2017; Xagoraris et al. 2021) a všechna významná spektra byla také zaznamenána (Obrázek č. 2). Tato spektra byla faktorovou analýzou vyhodnocena jako významná a jsou obsažena v prvních dvou faktorech (F1 a F2), které reprezentují 63,14 vlastního čísla (Eigenvalue). První dva faktory jsou zobrazeny na Obrázku č. 3. Oblast 300–650 cm^{-1} je reprezentována zejména F2 a průměrná hodnota této oblasti je -0,78. Hodnoty nad 0,5, resp -0,5, představují velkou faktorovou zátěž (blízká 1), což znamená, že je daným faktorem významně ovlivněna a s dalšími faktory koreluje jen slabě. Oblast 790–856 cm^{-1} je charakterizována obzvlášť F1 (0,87), vlnové číslo 911 cm^{-1} je charakterizováno F1 (0,95), vlnové číslo 933 cm^{-1} F3 (-0,58) a vlnové číslo 1028 cm^{-1} je charakterizováno F1 (0,97). Významnost jednotlivých vlnových čísel k charakteristice jednotlivých medů byla tedy potvrzena s výjimkou vlnového číslo 933 cm^{-1}, které je pro charakterizaci méně významné. Specifické pro určení medu jsou ale také další obsahové látky. Výsledky měření Ramanova spektra poukazují zejména na proteiny, které jsou charakteristické v jiných oblastech Ramanova spektra než sacharidy. Pro srovnávané medy byla potvrzena významnost spektra 1065–1127 cm^{-1}, která je charakterizována F1 (0,95), dále také 1265–1267 cm^{-1} F1 (0,9). Oblast 1349–1461 cm^{-1}, která poukazuje na skupiny OH, CH a CH_2 byla charakterizovaná jak pro F1 (0,79), tak F2 (0,7). Korelace je tedy slabší, ale stále dostatečně silná pro využití na odlišení lipových medů od květových.



Obrázek č. 3, Faktorová analýza významných vlno čísel květových a lipových medů

Na základě faktorové analýzy tedy nebyla žádná vlnová čísla vyloučena z analýzy a pro ověření odlišení lipových a květových medů byla použita metoda PCA. Výsledek PCA je zobrazen na obrázku č. 4.



Obrázek č. 4, PCA analýza květových a lipových medů (L10 až L42 znamená lipový med s uvedeným procentem obsahu pylu lípy)

Větší část lipových medů (55 %) byla jednoznačně oddělena na základě PCA analýzy od medů květových. Pro tyto medy by tedy platilo, že je možné jejich odlišení od medů květových pomocí Ramanovy spektroskopie. Tento výsledek je v souladu s výsledky dalších autorů (Oroian a Ropciuc 2017), jenž průkaz lipových medů Ramanovou spektroskopií také potvrdili. Zmínění autoři však použili odlišné statistické zpracování (lineární diskriminační analýzu) a úspěšnost průkazu lipového medu byla 100 %. V naši studii byla část medů (45 %) svým složením podobná medům květovým (Obrázek č. 4) a na základě analýzy prvních dvou faktorů je nebylo možné rozlišit. V případě použití jiné metody, například metody lineární diskriminační analýzy, by bylo možné dosáhnout vyšší úspěšnosti srovnání. Na druhou stranu PCA analýza nepracuje s předpokladem uzavřené skupiny dat (předem definované skupiny), což pro medy, které jsou poměrně variabilní, může být zdrojem statistické chyby. Zajímavým výsledkem této studie je ale fakt, že lipové medy, které byly podobné medům květovým, měly vysoký podíl pylu lípy (35, 39, 45 %), kromě dvou medů s obsahem lípy pouze 11 %. Proměnlivost pylu lípy u lipových medů není zvláštností, protože lípa je málo pylodárná (Guyot et al. 1998; Persano Oddo a Piro 2004). Z tohoto důvodu je také těžší jejich identifikace melissopalynologickou analýzou než například u řepkového medu. Tento výsledek lze odůvodnit tak, že u těchto medů se jednalo skutečně o med z květu lípy bez příměsi medovice. Na tento fakt poukazuje také vyšší hodnota obsahu glukózy a fruktózy, než byla detekována u průměrných lipových medů naměřená ve specifických oblastech Ramanova spektra. Nižší obsah glukózy a fruktózy v lipových medech je na základě HPLC analýzy popisován také jinými autory (Persano Oddo a Piro 2004; Pospiech et al. 2021a). Naměřená intenzita Ramanova spektra u medů s obsahem pylu 11, 35, 39 a 45 % byla přibližně o 45 % vyšší než průměrná hodnota u medů lipových.

ZÁVĚR

Ramanova spektroskopie má velký potenciál v oblasti hodnocení medu, a to zejména díky rychlosti a nedestruktivnosti této metody. Metoda měří posun monochromatického světla, který se mění podle analyzované látky. V medu se jedná, podle charakteristických vlnových čísel, zejména o monosacharidy (glukózu a fruktózu), maltózu a také látky s amino skupinou (proteiny). Pro vzájemné odlišení lipových a květových medů mají význam všechna v literatuře popisovaná vlnová čísla s tím, že nejmenší vztah k odlišení má vlnové číslo 933 cm^{-1} (-0,58) charakteristické pro fruktózu. Část medů s vysokým obsahem pylu lípy nebylo možné od květových medů odlišit (45 %). Předpokládáme, že přesnější určení by bylo možné zejména u medů s vyšším podílem medovice, u kterých je změněn také sacharidový profil, což má větší vliv na Ramanovo spektrum. Pro zavedení této metody do praxe je k vyhodnocení výsledků

nutné využití jiné statistické metody, nebo použití kombinace vícerých metod než pouze Ramanovy spektroskopie.

PODĚKOVÁNÍ

Tato práce byla podpořena programem aplikovaného výzkumu Ministerstva zemědělství na období 2017 - 2025, ZEMĚ, číslo QK1920344 a projektem agentury International Visegrad Fund číslo 22220064.

POUŽITÁ LITERATURA

1. BECKH, G a G CAMPS. Neue Spezifikationen für Trachthonige. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau* [online], 2009, **105**(2), 105–110 [vid. 2021-04-30]. Dostupné z: http://www.tentamus.com/qsi-de/wp-content/uploads/sites/11/2018/01/30_DLR-2009-105-2-Sortenspezifikationen.pdf.
2. GOODACRE, Royston, Branka S. RADOVIC a Elke ANKLAM. Progress toward the rapid nondestructive assessment of the floral origin of European honey using dispersive Raman spectroscopy. *Applied Spectroscopy* [online], 2002, **56**(4), 521–527 [vid. 2021-04-11]. ISSN 00037028. Dostupné z: doi:10.1366/0003702021954980.
3. GUYOT, Christine, Amina BOUSETA, Vincent SCHEIRMAN a Sonia COLLIN. Floral Origin Markers of Chestnut and Lime Tree Honeys. *Journal of Agricultural and Food Chemistry ag* [online], 1998, **46**(2), 625–633 [vid. 2021-04-05]. ISSN 00218561. Dostupné z: doi:10.1021/jf9705101.
4. ION, Nicoleta, Răzvan COMAN a Viorel ION. MELLIFEROUS POTENTIAL OF SILVER LINDEN TREES (Tilia tomentosa Moench.) GROWING IN THE FORESTS FROM SOUTH ROMANIA. *Scientific Papers: Agronomy*, 2018, **61**(1), 474–480.
5. OROIAN, Mircea a Sorina ROPCIUC. Botanical authentication of honeys based on Raman spectra. *Journal of Food Measurement and Characterization 2017 12:1* [online]. **12**(1), 545–554 [vid. 2021-07-31]. ISSN 2193-4134, 2017, Dostupné z: doi:10.1007/S11694-017-9666-3.
6. PERSANO ODDO, Livia a Roberto PIRO. Main European unifloral honeys: descriptive sheets. *Apidologie* [online], 2004, **35**(Suppl. 1), S38--S81. ISSN 0044-8435. Dostupné z: doi:10.1051/apido:2004049.

7. POSPIECH, Matej, Zdeňka JAVŮRKOVÁ, Pavel HRABEC, Helena ČÍŽKOVÁ, Dalibor TITĚRA, Pavel ŠTARHA, Simona LJASOVSKÁ, Vojtěch KRUŽÍK, Tereza PODSKALSKÁ, Josef BEDNÁŘ, Pavla Kundríková BUREŠOVÁ a Bohuslava TREMLOVÁ. Physico-Chemical and Melissopalynological Characterization of Czech Honey. *Applied Sciences* [online], 2021a **11**(11), 4989 [vid. 2021-06-11]. ISSN 2076-3417. Dostupné z: doi:10.3390/app11114989.
8. POSPIECH, Matej, Pavel ŠTARHA, Josef BEDNÁŘ, Helena ČÍŽKOVÁ, Pavel HRABEC, Vojtěch KRUŽÍK, Zdeňka JAVŮRKOVÁ a Dalibor TITĚRA. *Metodika semiautomatického stanovení pylového profilu – melissopalynologická analýza medu*. Brno: VETUNI Brno, 2021b, ISBN 978-80-7305-858-6.
9. XAGORARIS, Marinos, Elisavet LAZAROU, Eleftheria H KAPARAKOU, Eleftherios ALISSANDRAKIS, Petros A TARANTILIS a Christos S PAPPAS. Botanical origin discrimination of Greek honeys: physicochemical parameters versus Raman spectroscopy. *Journal of the Science of Food and Agriculture* [online], 2021, **101**(8), 3319–3327 [vid. 2021-07-31]. ISSN 1097-0010. Dostupné z: doi:10.1002/JSFA.10961.

Kontaktní adresa: Pospiech Matej, Ústav hygieny a technologie potravin rostlinného původu, Veterinární univerzita Brno, Palackého tř. 1946/1, 612 42 Brno, Česká republika; E-mail: mpospiech@vfu.cz

PRÍSTROJOVÁ ANALÝZA MLIEKA V REÁLNOM ČASE

REAL TIME INSTRUMENTAL ANALYSIS OF MILK

Smutný Luboš [1], Smetana Pavel [1], Samková Eva [1], Lorenc František [1], Bedrníček Jan [1], Climová Natalie [1], Honesová Simona [1], Kuneš Radim [1], Lang Aleš [1], Hankovec Tomas [1], Černý Pavel [1,2], Poborská Anna [1], Kříž Pavel [1,2], Kernerová Naděžda [1], Bartoš Petr [1,2]

[1]Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Fakulta zemědělská a technologická

[2]Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Pedagogická fakulta

ABSTRACT

The basic components of milk (protein content, fat) as well as the amount by somatic cells are important quality indicators, according to which the price of milk is determined from customers, but also for professionals, who, according to them, can react to the health status of the dairy cow and its changes. Their determination in real time is currently not comprehensively solved. For that reason, we focused on their detection during milking. With the help of instrumental analysis and the reaction of the individual components of milk, it was found that the analysis using bioimpedance is the most suitable for our solution. Due to their proportions and different reactivity, it has been proven that the amount of somatic cells can be determined with the help of bioimpedance measurement, which is essential for the detection of incipient mastitis, and the protein and fat content can also be determined. The device can become part of an automated milking parlor, but it can also be connected to each branch of manual milking equipment.

Key words: milk; bioimpedance; analysis.

INTRODUCTION

Automated milking systems (AMS) provide high efficiency by milk management in developed countries (Kawasaki et al., 2008). Milk characteristics are frequently affected by individual conditions. They required to guarantee of milk quality. Contamination may result in the disposal of production volume and shorter production life (Auldist, 2002). Instrumental detection a prevent decries of quality important milk contents and health indicators of cows condition (fat and protein content, somatic cells count) focused on each one animal is very important (Brandt, 2010). The environmental source of contamination in milk is directly related to the use of pesticides or veterinary drugs in breeding practices, especially in animal food (Sifuentes Dos Santos et al., 2015). Contamination of milking equipment and accumulation of milk residues

from previous milking are dangerous. Bought two situations increase bacterial count (Driehuis and Vissers, 2009). Fat amount as a milk quality indicator can be associated with quality and quantity of feedstuff in terms of animal nutrition and lactation period. Milk fag globules size may vary with the milking time and lactation period (Silanikove et al., 2014). Low quality and insufficient space of facilities may be responsible for an increase by 13% in somatic cell count (SCC) and a reduction in milk fat by approximately 0.2% (Krawczel et al., 2009).

Health problem as mastitis caused significant economic losses and are one of the factors affecting quality of milk. Mastitis is caused by an infection in the interior tissues of teats. The somatic cells count is monitored by European Parliament and Council in the context of foodborne illness control (Bogdanovičová et al., 2016).

Fat content is indicator of cattle health condition because it is influenced by many factors such as management, nutrition, environmental factors, breeds, genetics, frequency of feed, stress, comfort, season). Reduction of fat content can be more than 0.4%and indicate structural fiber deficiency and rumen acidosis (Salfer et al., 2019; Hanuš et al., 2008; Rossow and Richardt, 2007). Free fatty acids (FFA) are dispersed in milk fat and their increase is one of indicators dairy cow metabolic problem. Normal and limit concentrations of FF in milk are shown in Table 1.

Table 1. Normal and limit concentration (mmol.$^{kg-1}$) of free fatty acid in milk (Silanikove et al., 2014; Hanuš et al., 2011; ČSN 57 0529, 1993)

Concentration	Reference
Normal concentration	5-12
Limit concentration (churning method)	13
Limit concentration (extraction method)	32

Protein content can be divided into 3 groups: casein, whey protein and non-protein nitrogen Urea composed 50% of the total non-protein nitrogen, protein nitrogen composed 80% of casein and 20% of whey protein. Total amount of protein considered about 2.8-3.5% (Steinshamn and Harstad, 2010). Different results considering by different breeds, stages of lactation, parities and analyses (Heinrichs et al., 2005). Other factors (management, genetics, environment, illnesses) can affect milk protein distribution. Fat/protein ratio (F/P) depends on breed, nutritional quality, metabolism, nutrient conversion and optimum ratio is between 1.2-1.4 – below 1.2 cattle have rumen acidosis, over 1.4 indicates energy deficit and ketosis (Navrátilová et al., 2012). F/P ratio depending on cattle breed (Table 2).

Table 2. Fat/protein (F/P) ratio depending on the dairy cattle breed (Richardt, 2004)

Breed	F/P ratio
Holstein	1.19
Brown Swiss	1.20
Ayshire	1.21
Guernsey	1.34
Jersey	1.28

Somatic cell count is typical indicator of udder health condition. The Excessive SCC have negative affect for quantity and also quality of milk (Franzoi, 2020). Somatic cells representing 80% of the cells in healthy quarters and 99% of the cells in mastitic quarters (Schukken et al., 2003). SCC increase 10-20 times by 1 hour during infection (Borecki et al., 2009). The limit of SCC for processing were established by European Commission to guarantee food quality and safety (Schukken et al., 2003) – in Table 3.

Table 3. Somatic cells count limits of European Commission for indicates of quarter health in 1 mL of milk (chukken et al., 2003)

Parameter	SCC in 1 mL of Milk
Healthy quarter	70,000-250,000
Infected quarter (limit for processing)	>400,000

Electrical conductivity (EC) of milk is mainly due to its soluble salt fraction and appear when Na^+ and Cl^- concentration increase in milk in case of mastitis (Prasanth et al., 2020). Proteins and peptides carry zero of little electrical current, fat amount reduces electrical conductivity of milk and microbial growth also decries this milk parameter (Halasa et al.,2007; Mucchetti et al., 1994). Lien et al. (2016) found a predictability of 30.7% for infected quarters and 90.8% for healthy quarters using the SAS Generalized Linear Model technique. Milk EC depends on the lactation period and it is necessary to make a series of measurements during each lactation period (Mucchetti et al., 1994). It is also important measure the temperature of milk, then mastitis may not appear in the whole udder (Lien et al., 2016). Factors affecting the EC of milk depending (increase) on number of lactation (Peaker, 1978) and days of lactation (Rossing et al., 1987), decline during milking (Maatje et al., 1983), is depending (very different) on breed (Rossing et al., 1987) and EC is decreasing with increase of fat in milk (Barth et al., 1999). The

traditional SCC measurement is long-time and expensive method. Zaninelli et al. (2016) placed a sensor for measuring EC at the base of each individual teat cup.

MATERIAL AND METHODS

Cattle: 12 cows (Samples Nr. 1-12), Holstein breed; Farm Opařany, Stádlec

Sample Nr. 1-6: 2nd lactation

Sample Nr. 7-12: 3rd lactation (sample Nr. 8: colostrum)

Milk: average sample obtained during milking – 50 mL

Measuring of electrical conductivity: 1 cell with 2 Pt-electrodes – Wheatstone bridge

Control measuring: NIRMaster – FT-NIR (Büchi, Switzerland) – Protein, Fat
DCC DeLaval (DeLaval, Sweden) – Somatic Cell Count

Each sample was after sampling doubled in 50 mL and tempered for 20 °C. First part was measured by NIRMaster. Second part was measured by testing device. Results were compared.

RESULTS AND DISCUSSION

Numeric values of fat and proteins were measured by FT-NIR a F/P Ratio was calculated. Electric conductivity for all samples were measured too. For comparation were these values converted on fat and proteins content and were F/P Ratio calculated. All results were compared in Table 4. Richardt (2004) stated F/p Ratio by Holstein cattle 1.19. Our results were measured in the interval 1.15-1.80 by testing device and 1.12-1.72 by NIRMaster. Navrátilová et al. (2012) wrote that results under 1.2 points on rumen acidosis and results over 1.4 points on energy deficit and ketosis. Sample Nr. 8 was colostrum and content of fat (8.46, 8.36 respectively) and proteins (4.70, 4.87 respectively) were on the level of this special type of calf diet after calving.

Table 4. Results Comparation of Milk of Holstein Breed and F/P Ratio

	Testing Device			NIRMaster		
Sample Nr.	**Fat**	**Protein**	**F/P Ratio**	**Fat**	**Protein**	**F/P Ratio**
1	5.46	3.45	1.58	5.39	3.45	1.56
2	5.26	3.75	1.40	5.12	4.27	1.20
3	4.47	3.90	1.15	4.62	4.04	1.14
4	4.86	3,39	1.43	4.69	3.79	1.23
5	4.77	3.50	1.36	4.83	4.03	1.20
6	4.50	3.85	1.17	4.70	4.21	1.12
7	4.02	3.37	1.19	3.98	3.05	1.30
8	8.49	4.70	1.80	8.36	4.87	1.72
9	4.15	3.53	1.17	4.02	3.42	1.18
10	4.27	3.07	1.39	4.37	3.17	1.38
11	3,94	3.04	1,30	3,75	2,95	1.27
12	4.44	3.33	1.33	4.31	3.31	1.30

CONCLUSION

Measurement of milk contents (fat, proteins, F/P Ratio) is very important for monitoring cattle management, economical results, cattle health and optimalisation of diet. Real-time getting of these values will be for managers very important. Results from testing device are close to values from FT-NIR technology but is important to continue with researching and to specify construction of testing device for relevant values.

ACKNOWLEDGEMENT

These results were realized under the auspices Ministery of Agriculture Czech Republic, project NAZV-ZEMĚ QK1910174.

REFERENCES

1. Auldist, M. (2002). Effect on processing characteristics. In Encyclopedia of Dairy Science; Academic Press: London, UK, pp. 2002–2006.
2. Bogdanovičová, K., Vyletělová-Klimešová, M., Babák, V., Kalhotka, L., Koláčková, I., Karpíšková, R. (2016). Microbiological quality of raw milk in the Czech Republic. Czech J. Food Sci., 34, p. 189–196.

3. Borecki, M., Szmidt, M., Pawlowski, M.K., Bebłowska, M., Niemiec, T., Wrzostek, P. (2009). A method of testing the quality of milk using optical capillaries. Photonics Lett. Pol., 1, p. 37–39.
4. Brandt, M., Haeussermann, A., Hartung, E. (2010). Invited review: Technical solutions for analysis of milk constituents and abnormal milk. J. Dairy Sci., 93, p. 427–436.
5. ČSN 57 0529: Raw Cow Milk for Dairy Factory Treatment and Processing; Czech Office for Standards, Metrology and Testing: Prague, Czech Republic, 1993.
6. Driehuis, F., Vissers, M. (2009). On-Farm Hygienic Milk Production. In Milk Processing and Quality Management; John Wiley: West Sussex, UK.
7. Franzoi, M., Manuelian, C.L., Penasa, M., De Marchi, M. (2020). Effects of somatic cell score on milk yield and mid-infrared predicted composition and technological traits of Brown Swiss, Holstein Friesian, and Simmental cattle breeds. J. Dairy Sci.,103, p. 791–804.
8. Halasa, T., Huijps, K., Østerås, O., Hogeveen, H. (2007). Economic effects of bovine mastitis and mastitis management: A review. Vet. Q., 29, p. 18–31.
9. Hanuš, O., Manga, I., Vyletělová, M., Genčurová, V., Kopecký, J., Jadelská, R. (2011). Význam sledování minoritních složek mléka pro zdraví zvířat a analytické možnosti jejich monitoringu. Mlékařské Listy, 127, p. 14–18.
10. Hanuš, O., Vegricht, J., Frelich, J., Macek, A., Bjelka, M., Louda, F., Janů, L. (2008). Analysis of raw cow milk quality according to free fatty acid contents in the Czech Republic. Czech J. Anim. Sci., 53, p. 17–30.
11. Heinrichs, J., Jones, C., Bailey, K. (2005). Milk components: Understanding the causes and importance of milk fat and protein variation in your dairy herd. Pa. State Univ. Dep. Dairy Anim. Sci., 5, p. 1–8.
12. Kawasaki, M., Kawamura, S., Tsukahara, M., Morita, S., Komiya, M., Natsuga, M. (2008). Near-infrared spectroscopic sensing system for on-line milk quality assessment in a milking robot. Comput. Electron. Agric., 63, p. 22–27.
13. Krawczel, P., Grant, R. \)2009). Effects of cow comfort on milk quality, productivity and behaviour. In Proceedings of the 48th Annual meeting, New Praque, MN, USA, pp. 15–24.
14. Lien, C.C., Wan, Y.N., Ting, C.H. (2016). Online detection of dairy cow subclinical mastitis using electrical conductivity indices of milk. Engin. Agr. Envir. Food, 9, p. 201–207.

15. Maatje, K., Rossing, W., Garssen, G.J., Pluygers, H.G. (1983). Automation of electrical conductivity measurements during milking. In Proceedings of the Symposium "Automation in Dairying", IMAG (Hrsg.),Wageningen, The Netherlands, pp. 89–100.
16. Mucchetti, G., Gatti, M., Neviani, E. (1994). Electrical Conductivity Changes in Milk Caused by Acidification: Determining Factors. J. Dairy Sci., 77, p. 940–944.
17. Navrátilová, P., Králová, M., Janštová, B., Přidalová, H., Cupáková, Š., Vorlová, L. (2012). Hygiena Produkce Mléka; Veterinární a Farmaceutická Univerzita Brno: Brno, Czech Republic.
18. Peaker, M. (1978). The Electrical Conductivity of Milk for the Detection of Subclinical Mastitis in Cows: Comparison of Various Methods of Handling Conductivity Data with the Use of Cell Counts and Bacteriological Examination. Brit. Vet. J., 134, p. 308–314.
19. Prasanth, P., Viswan, G., Bennaceur, K. (2020). Development of a low-cost portable spectrophotometer for milk quality analysis. Mater. Today Proc.
20. Richardt, W. (2004). Milk composition as an indicator of nutrition and health. Breeding, 11, p. 26–27.
21. Rossing, W.E., Benders, E., Hogewerf, P.H., Hopster, H., Maatje, K. (1987). Practical experiences with real-time measurements of milk conductivity for detecting mastitis. In Proceedings of the 3rd Symposium Automation in Dairying, Wageningen, The Netherlands, pp. 138–146.
22. Rossow, N., Richardt, W. (2007). Využití výsledků kontroly užitkovosti pro kontrolu výživy a látkové výměny. In Sano Encyklopedie; Sano—Moderní výživa zvířat: Domažlice, Czech Republic.
23. Salfer, I.J., Dechow, C.D., Harvatine, K.J. (2019). Annual rhythms of milk and milk fat and protein production in dairy cattle in the United States. J. Dairy Sci., 102, p.742–753.
24. Schukken, Y.H., Wilson, D.J., Welcome, F., Garrison-Tikofsky, L., Gonzalez, R.N. (2003). Monitoring udder health and milk quality using somatic cell counts. Vet. Res., 34, p. 579–596.
25. Sifuentes Dos Santos, J., Schwanz, T.G., Coelho, A.N., Heck-Marques, M.C., Mexia, M.M., Emanuelli, T., Costabeber, I. (2015). Estimated daily intake of organochlorine pesticides from dairy products in Brazil. Food Control, 53, p. 23–28.
26. Silanikove, N., Merin, U., Shapiro, F., Leitner, G. (2014). Milk metabolites as indicators of mammary gland functions and milk quality. J. Dairy Res., 81, p. 358–363.
27. Steinshamn, H., Harstad, O. (2010). Cow's diet and milk composition. In Improving the Safety and Quality of Milk; Woodhead Publishing: Cambridge, UK.

28. Zaninelli, M., Tangorra, F., Costa, A., Rossi, L., Dell'Orto, V., Savoini, G. (2016). Improved Fuzzy Logic System to Evaluate Milk Electrical Conductivity Signals from On-Line Sensors to Monitor Dairy Goat Mastitis. Sensors, 16, p. 1079.

Corresponding author: Pavel Smetana, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Fakulta zemědělská a technologická, Studentská 1668, 370 05 České Budějovice, Czech Republic; E-mail: smetana@fzt.jcu.cz

BIOLOGICKÝ VÝZNAM AVENANTRAMIDOV A ICH STANOVENIE V PRODUKTOCH OVSA

BIOLOGICAL IMPORTANCE OF AVENANTRAMIDS AND THEIR DETERMINATION IN OAT PRODUCTS

Sokol Jozef, Maliarová Mária, Tibor Maliar, Purdešová Andrea

Katedra chémie, Fakulta prírodných vied, Univerzita Sv. Cyrila a Metóda v Trnave, Nám. J.Herdu 2, 917 01 Trnava, Slovenská republika

ABSTRACT

Oats are a cereal rich on proteins, minerals, lipids, vitamins and bioactive phytochemicals, such as avenanthramides (AVN), which are unique for oats. They are low molecular weight polyphenolic amides produced in oats as phytoalexins. AVNs express strong antioxidant effects, but also anti-inflammatory and anti-proliferative effects. Oat products with AVN content are increasingly important also in reduction diets. In the work, 31 different world varieties of oats were analyzed. Avenanthramides (designated as avenanthramide 2c, 2p, 2f and total avenanthramides) were identified and quantified in oat extracts by the HPLC method. The oat samples were desintegrated and mixed in a methanol-water mixture and subsequently extracted by ultrasonic extraction at 55°C. Subsequently, they were centrifuged and an aliquot was taken for HPLC analysis. The samples were analyzed on a C18 phase column with gradient elution, where the following solutions were used: phase A 0.1% aqueous formic acid solution phase B 0.1% methanolic formic acid solution. UV detection at 320 nm. The content of total avenanthramides was highest in the varieties Racoon (723.28 mg/kg), Oliver (578.59 mg/kg) and Kamil (384.17 mg/kg).

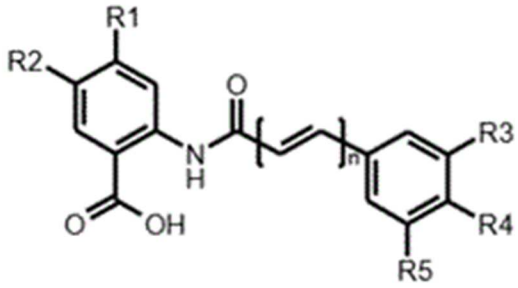
Kľúčové slová: avenantramidy, ovos, HPLC, analýza

ÚVOD

Ovos (*Avena sativa*) je obilnina, ktorej produkcia je na siedmom mieste medzi obilninami v obrábaných oblastiach. Obsahuje aj antioxidanty, ako vitamín E, fenolové kyseliny, flavonoidy, steroly a avenantramidy (AVN), ktoré sú pre ovos jedinečné. AVN sú nízkomolekulárne polyfenolové amidy produkované v ovse ako fytoalexíny (sekundárne metabolity) (Jágr, M. a kol., 2020, Triphati, V. a kol., 2018). AVN, prvýkrát opísané v roku 1989 Collinsom a kol., sú deriváty kyseliny hydroxyškoricovej a kyseliny antranilovej spojené

amidovou väzbou. Doteraz bolo popísaných približne 40 avenantramidov pozostávajúcich z týchto dvoch kyselín, pričom najviac zastúpené v ovse sú avenantramid A (2p), avenantramid B (2f) a avenantramid C (2c).

Obr. 1. Štruktúry troch majoritných avenantramidov



Avenanthramide	n	Substituent				
		R1	R2	R3	R4	R5
2p	1	H	OH	H	OH	H
2c	1	H	OH	OH	OH	H
2f	1	H	OH	OCH_3	OH	H

Podľa najnovšieho výskumu sa počet známych AVN zvýšil zahrnutím rôznych glykozidov a hexozidov (Jagr, M. a kol.). Vo vyšších koncentráciách sú prítomné najmä v zrnách ovsa – otrubách a vonkajších vrstvách zrna, ale môžu byť prítomné aj v iných častiach rastliny. AVN sú relatívne stabilné zlúčeniny v prostredí s kyslým až neutrálnym pH ale aj pod UV svetlom. V alkalickom pH (7-12) sa AVN 2f mierne rozkladá, AVN 2c sa rozkladá vo väčšej miere a nad pH 12 sa AVN 2c rozkladá úplne. Na druhej strane AVN 2p je v tomto rozsahu pH stabilný, z čoho vyplýva fakt, že stabilita AVN závisí od ich štruktúry (Boz, H., 2015). AVN sú silné, biologicky dostupné antioxidanty a majú protizápalové, tiež antifungálne a antibakteriálne vlastnosti (Collins a kol., 1989). Antioxidačná aktivita avenantramidov je 10–30-krát vyššia v porovnaní s typickými zložkami obsiahnutými v obilninách, ako napr. kyseliny ferulová, gentisová, vanilínová a vanilín. Spomaľujú až zastavujú oxidáciu lipidov a kyseliny linolovej v potravinách. Liu a kol. (2011) študovali antioxidačnú schopnosť kapsúl s obsahom AVN z ovsa na ľudský organizmus. Zistili, že extrakt z ovsa obsahujúci AVN vykazuje silnú antioxidačnú aktivitu. Spolu s vitamínom C pôsobia synergicky pri inhibícii oxidácie LDL (Chen, C.Y. a kol., 2004). Autori Landberg a kol., (2020) v ich *in vitro* štúdii poukazujú na schopnosť AVN inhibovať aktivitu lipoxygenázy. Štúdie *in vitro* naznačujú pre AVN dobrú „vychytávaciu“ aktivitu na intracelulárnej aj extracelulárnej úrovni, zvýšenie antioxidačnej

obrany buniek za prítomnosti AVN a zníženie poškodenia DNA vyvolaného ROS. Rovnako tak aj štúdie *in vivo* potvrdzujú antioxidačnú a ochrannú aktivitu AVN (Turrini, E. a kol., 2019).

Extrakcia fenolových zlúčenín je založená na použití rozpúšťadiel a predstavuje časovo náročné predanalytické úpravy. Ako najčastejšie rozpúšťadlo sa používa voda, nasleduje metanol, etanol, acetón a etylacetát. Voľba extrakčnej metódy závisí od vybraných fenolových zlúčenín, ako aj od samotnej matrice. Extrakcia ultrazvukom sa preukázala ako jedna z výhodnejších extrakcií a to čo sa týka času, ale aj obsahu stanovených polyfenolvých analytov (Kulichová a kol., 2018, *Zhang a kol.*2020, *Pridal a kol.,*(2018). Viacero autorov počas svojich štúdií preukázalo ako efektívne využitie metódy extrakcie pevnou fázou pre stanovenie polyfenolov a to jednak zo surových rastlinných extraktov, ale aj z klinických vzoriek biologického materiálu (Xia a kol., 2007; Chen a kol., 2018). Kvapalinová chromatografia najčastejšie využíva separáciu na reverzných fázach. Najčastejšie sú reverzné stacionárne fázy C18. Separáciu výrazne ovplyvňuje dĺžka kolóny, jej priemer, ako aj veľkosť častíc. Analyzované polyfenoly sú často detegované DAD detektorom (Tan a kol., 2008, Moldoveanu, S.C., David, V. 2013).

V práci sme sa zaoberali štúdiom biologicky aktívnych látok v ovse a vybraných produktoch ovsa so zameraním na obsah antioxidantov. Cieľom bolo stanovenie avenantramidov a kyseliny parakumarovej a kumarovej. prostredníctvom metódy vysokoúčinnej kvapalinovej chromatografie.

MATERIÁL A METODIKA

Vzorky ovsa poskytol Výskumný ústav rastlinnej výroby Piešťany. Jednotlivé odrody biologického materiálu sa líšia svojimi morfologickými, agronomickými, fytopatologickými a inými vlastnosťami. Odrody ovsa boli pestované vo Výskumno-šľachtiteľskej stanici Vígľaš-Pstruša (Slovensko). Genotypy ovsa plevnatého boli zberané v 2014 a 2015. Analyzovaných bolo 17 rôznych druhov odrôd ovsa. Okrem toho 6 komerčne dostupných
výrobkov – 4x ovsené vločky (Ravita, COOP Jednota, Vince a bezlepkový Kroner), 1x ovsená múka a 1x extrudovaný ovsený chlieb.

Príprava vzorky: Odvážená časť vzorky 0,3 g bola zmiešaná s 2 x 3 ml 70 % vodného roztoku metanolu a extrahovaná ultrazvukom 2 x 15 min pri 55 °C. Vzorky sa potom centrifugovali pri 6500 g počas 15 minút. Supernatant sa použil na HPLC analýzu. Supernatanty sa udržiavali pri -20 °C, kým sa neuskutočnila analýza HPLC.

HPLC analýza: HPLC separácia sa uskutočnila pomocou systému Waters HPLC vybaveného Separations Module alliance e2695, detektorom s fotodiódovým poľom Waters 2998, kolónou Waters Symmetry C18 (75 x 4,6 mm vnútorný priemer, 3,5 µm) a softvérom

Empower 3. Boli použité dve fázy: 0,1 % vodný roztok kyseliny mravčej (A) a 0,1 % metanolový roztok kyseliny mravčej (B). Gradient bol nelineárny: 0 – 8 min 26 % rozpúšťadla B, 8 – 18 min 42 až 45 % rozpúšťadla B, 18 – 21 min 100 % rozpúšťadla B. Použil sa prietok 1,0 ml/min. Teplota kolóny bola nastavená na 35 °C a vstrekovaný objem bol 20 ul. Detektor pracoval pri vlnovej dĺžke 320 nm.

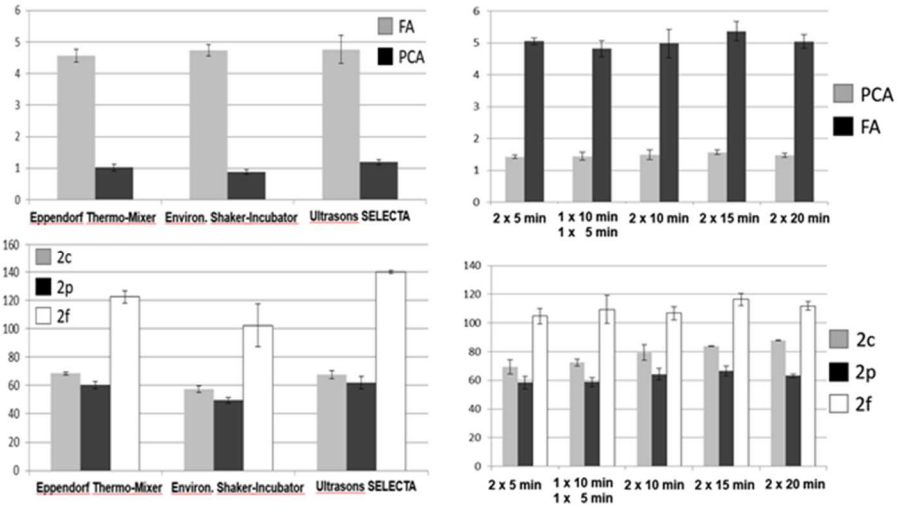
VÝSLEDKY A DISKUSIA

Štúdia nadväzovala na prácu Maliarová et al. (2015), kde boli optimalizované podmienky na extrakciu avenantramidov 2c, 2p a 2f z ovseného zrna. V našej práci boli porovnávané obsahy ovsených extraktov pri použití ultrazvuku, termomixéru (Eppendorf Thermo-Mixer) a inkubačného prístroja (Shaker-Incubaton). Ako najvýhodnejšia extrakcia pre stanovenie fenolových zlúčenín sa ukázala extrakcia podporovaná ultrazvukom (Obr. 2). Zároveň bola experimentálne preukázaná optimálna doba extrakcie podporovanej ultrazvukom a to v dvoch opakovaniach po dobu 15 minút. Táto extrakcia ukázala maximálny výťažok a krátky čas extrakcie. Výhody použitia extrakcie pomocou ultrazvuku sú publikované aj v štúdii Chemat a kol., (2017).

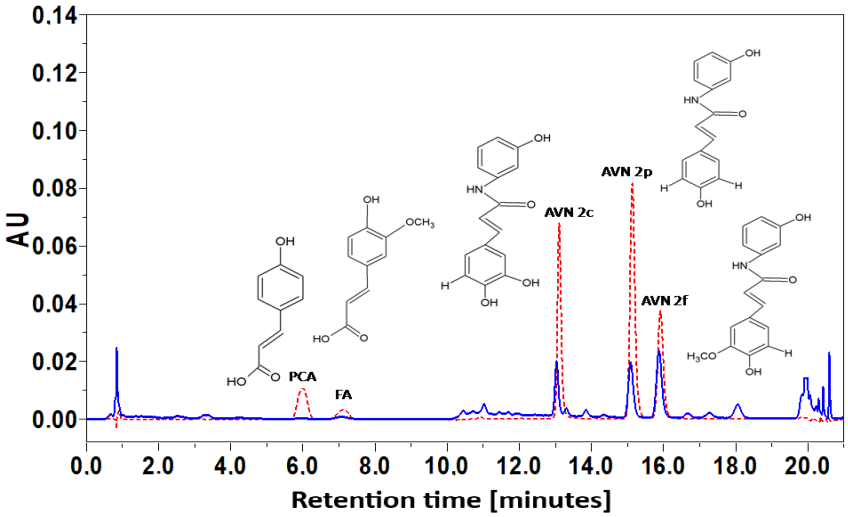
Okrem optimalizácie extrakčného postupu bola práca zameraná na vývoj metódy HPLC na separáciu a stanovenie dvoch fenolových kyselín (PA) a troch majoritných avenantramidov (AVNs - 2c, 2p, 2f) (Obr. 3.). Na separáciu fenolových zlúčenín bola použitá analytická kolóna Symmetry C18 (75 x 4,6 mm; 3,5 µm). Roztoky mobilnej fázy pozostávali z 0,1 % roztoku kyseliny mravčej v metanole a 0,1 % roztoku kyseliny mravčej v ultračistej vode. Gradient bol nelineárny. Experimentálne sa skúmal gradient elúcie, čo viedlo k vzniku pri účinnej separácii cieľových zlúčenín v čase analýzy menej ako 20 minút. Spektrofotometrická detekcia PA a AVN bola realizovaná DAD detektorom (v intervale 220 až 400 nm). Pre účely tejto štúdie bola zvolená vlnová dĺžka 320 nm

Namerané hodnoty fenolových zlúčenín v mg/kg sú uvedené v Tab. 1. Na základe uvedených analýz ovsené genotypy Racoon, Oliver, Kamil a 100 260 CN predstavujú významné odrody na účely pestovania a šľachtenia. Ide o genotypy, ktoré by v budúcnosti mohli zvýšiť výživové a zdravotné výhody ovsa. Okrem hodnotenia 17 ovsených odrôd, boli hodnotené aj obsahy fenolových zlúčenín v komerčne dostupných produktoch, ale aj v ovsenej múke a z nech extrudovaného ovseného chleba. Stanovené analyty boli v ovsenej múke a v ovsenom chlebe podobné. Toto zistenie naznačuje, že použitý technologický proces si zachováva kvalitu výživy spracovaného ovsa.

Obr. 2. Vplyv aplikácie ultrazvuku a časová optimalizácia pri extrakcii polyfenolov (FA – kys. ferulová, PCA – kys. *p*-kumarová, 2c – AVN 2c, 2p – AVN 2p, 2f – AVN 2f).



Obr. 3. Chromatogram polyfenolových zlúčenín – kyselina p-kumarová (PCA), kyselina ferulová (FA), Avenantramidy 2c, 2p, 2f (AVN 2c, AVN 2p, AVN 2f) (červená línia – štandard, modrá línia – vzorka)



ZÁVER

Ovos je obilnina s bohatým zdrojom zdraviu prospešných fytochemikálií. Táto štúdia obohacuje výskum zdrojov ovsa a poskytuje základ pre výber odrôd ovsa s vysokým obsahom AVN. Samotná analýza AVN pomocou HPLC-DAD bola rýchla, účinná a reprodukovateľná s dostatočnou citlivosťou. Pestovateľsky a šľachtiteľsky najzaujímavejšie vyšli genotypy Racoon, Oliver, Kamil a 100 260 C. Toto zistenie poskytuje spôsob výberu najlepších odrôd ovsa z rôznych kultivarov, čo je dôležité pre vývoj príbuzných ovsených produktov.

Tab. 1. Obsah fenolových zlúčenín (kys. *p*-kumarová PCA, kys. ferulová FA, Avenantramidy AVN 2c, AVN 2p, AVN 2f) v mg/kg v extraktoch ovsa siateho a v komerčne dostupných produktoch (CAP).

		PCA		FA		AVN 2c		AVN 2p		AVN 2f		AVNs
Rok zberu	**Odroda**	**m±STD**	**RSD (%)**	**m±STD**	**RSD (%)**	**m±STD**	**RSD (%)**	**m±STD**	**RSD (%)**	**m±STD**	**RSD (%)**	**S**
2014	Oliver	2.60±0.02 ***a***	0.76	5.72±0.09 ***a***	1.52	133.13±3.42 ***b***	2.57	153.31±3.31 ***b***	2.16	292.15±32.12 ***b***	10.99	578.59
	100 260 CN	1.39±0.04 ***b***	2.67	5.66±0.15 ***a***	2.66	109.91±7.55 ***d***	6.87	106.45±6.77 ***d***	6.36	138.75±7.43 ***d***	5.36	355.12
	Kamil	2.05±0.21 ***c***	10.3	4.72±0.53 ***b***	11.26	84.84±2.80 ***c***	3.30	118.38±4.42 ***c***	3.74	180.94±5.98 ***c***	3.31	384.17
	Racoon	1.78±0.18 ***d***	10.29	4.98±0.31 ***c***	6.20	288.22±11.38 ***a***	3.95	230.09±9.47 ***a***	4.11	204.98±6.29 ***a***	3.07	723.28
	Bayan 2	0.96±0.07 ***e***	7.63	5.37±0.25 ***d***	4.73	73.52±1.74 ***e***	2.37	66.60±2.11 ***e***	3.17	120.40±2.37 ***e***	1.97	260.52
	Hronec	1.08±0.01 ***f***	1.7	5.08±0.16 ***c***	3.16	52.93±2.19 ***g***	4.15	65.71±3.62 ***ef***	5.51	94.56±4.01 ***g***	4.25	213.19
	Dunajec	0.88±0.02 ***eg***	2.26	3.05±0.08 ***e***	2.77	62.58±1.36 ***f***	2.17	71.42±1.77 ***e***	2.48	103.62±1.16 ***fg***	1.12	237.62
	Avenuda	1.04±0.10 ***ef***	10.9	2.81±0.26 ***f***	9.11	74.25±4.12 ***e***	5.54	64.12±2.95 ***ef***	4.61	110.61±2.90 ***ef***	2.62	248.99
	Važec	0.78±0.05 ***gh***	6.74	2.51±0.13 ***g***	4.99	34.84±0.52 ***h***	1.50	25.45±1.37 ***h***	5.39	42.18±2.14 ***h***	5.07	102.46
	Tatran	0.88±0.01 ***egh***	0.36	2.40±0.03 ***g***	1.33	33.58±2.22 ***h***	6.61	31.37±0.44 ***g***	1.40	52.62±0.43 ***h***	0.81	117.57
2015	Avenuda	0.68±0.02 ***a***	2.25	4.55±0.04 ***a***	0.94	9.57±0.20 ***e***	2.13	3.92±0.10 ***e***	2.54	6.84±0.46 ***c***	6.79	20.33
	AC Percy	0.65±0.07 ***b***	11.10	3.13±0.19 ***b***	5.,95	10.30±0.58 ***e***	5.66	3.72±0.09 ***e***	2.34	4.39±0.38 ***d***	8.73	18.40
	Avenuda-Atego	0.57±0.02 ***c***	2.91	3.11±0.37 ***b***	11.90	15.27±1.56 ***d***	10.25	9.17±0.84 ***d***	9.11	9.74±1.23 ***b***	12.65	34.18
	Fussion	0.53±0.03 ***d***	5.55	2.54±0.08 ***c***	3.26	36.13±2.08 ***a***	5.75	24.29±0.50 ***a***	2.05	16.71±1.91 ***a***	11.46	77.12
	Racoon	Trace	-	2.43±0.04 ***c***	1.68	27.48±1.16 ***b***	4.21	21.50±0.41 ***b***	1.88	9.38±0.27 ***b***	2.84	58.35
	Expression	Trace	-	2.37±0.04 ***c***	1.84	20.52±2.47 ***c***	12.03	11.97±1.26 ***c***	10.48	6.37±0.58 ***c***	9.14	38.87
	Izák	0.79±0.03 ***e***	3.68	1.40±0.01 ***d***	1.05	9.15±0.39 ***e***	4.24	5.06±0.18 ***f***	3.50	5.21±0.51 ***d***	9.70	19.42
CAP	Kroner	1,03±0,11	10.99	6.27±0.54	8.63	6.97±0.05	0.76	4.39±0.33	7.52	6.00±0.35	5.80	17.36
	Ravita	0.88±0.10	10.84	5.66±0.53	9.32	32.31±2.77	8.58	15.33±1.12	7.28	34.64±2.09	6.05	82.28
	Jednota	0.74±0.06	8.29	4.65±0.50	10.68	22.04±1.82	8.27	10.18±0.81	7.94	21.39±1.96	9.17	53.61
	Vince	0.80±0.03	3.34	4.43±0.07	1.57	27.07±1.00	3.70	12.98±0.20	1.56	21.55±0.80	3.73	61.61
	Oatbred	1.32±0.11	8.63	3.72±0.25	6.70	48.61±2.04	4.20	64.73±2.60	4.01	75.28±2.39	3.18	188.62
	Flour	0.84±0.03	3.32	3.48±0.20	5.79	52.79±2.37	4.50	67.16±2.87	4.28	78.49±3.67	4.67	198.44

POĎAKOVANIE

Vydané s podporou „Operačného programu Integrovaná infraštruktúra pre projekt: Dlhodobý strategický výskum prevencie, intervencie a mechanizmov obezity a jej komorbidít, kód ITMS: 313011V344, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja“ a KEGA No. 025UCM-4/2021

POUŽITÁ LITERATÚRA

1. BOZ, H. 2015. Phenolic Amides (Avenanthramides) in Oats – A review. In *Czech Journal of Food Sciences*. ISSN 1805-9317, vol. 33, no. 5, p. 399-404
2. COLLINS, F.W. 1989. Oat phenolics: avenanthramides, novel substituted N-cinnamoylanthranilate alkaloids from oat groats and hulls. In *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. ISSN 1520-5118, vol. 37, p. 60-66.
3. CHEMAT, F. – ROMBAUT, N. – MEULLEMIESTRE, A. – TURK, M. – PERINO, S. – FABIANO-TIXIER, A. S. – ABERT-VIAN, M. 2017. Review of green food processing techniques. Preservation, transformation, and extraction. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol*. 41:357-377.
4. CHEN, C.Y. et al. 2004. Avenanthramides and phenolic acids from oats are bioavailable and act synergistically with vitamin C to enhance hamster and human LDL resistance to oxidation. In *Journal of Nutrition*. ISSN 1541-6100, vol. 134, p. 1459-1466.
5. CHEN, C. Y. – WANG, L. – WANG, R. – LUO, X. – LI, Y. – LI, J. – LI, Y. – CHEN, Z.: 2018. Phenolic contents, cellular antioxidant activity and antiproliferative capacity of different varieties of oats. *Food Chemistry*. 239:260-267.
6. JÁGR, M. et al. 2020. Comprehensive analysis of oat avenanthramides using hybrid quadrupole-Orbitrap mass spectrometry: Possible detection of new compounds. In *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. ISSN 1097-0231, vol. 34, no. 10, p. 1-20.
7. KULICHOVÁ, K. – MALIAROVÁ, M. – SOKOL, J. – LAŠÁKOVÁ, K. – HAVERLENTOVÁ, M. 2018. Determination of selected phenolic acid and majoritarian avenanthramides in different varieties of naked oats (*Avena sativa* L.) grown in Slovakia. *Nova Biotechnol Chim.* 17(2):132-139.
8. LANDBERG, R. et al. 2020. Avenanthramides as lipoxygenase inhibitors. In *Heliyon*. ISSN , vol. 6, p. 1-7.
9. LIU, S. et al. 2011. Antioxidant effects of oats avenanthramides on human serum. In *Agricultural Sciences in China*. ISSN 1671-2927, vol. 10, 1301-1305.
10. MALIAROVÁ, M. – MRÁZOVA, V. – HAVRLENTOVÁ, M. – SOKOL, J. 2015. Optimization of Parameters for Extraction of Avenanthramides from Oat (*Avena sativa* L.) Grain Using Response Surface Methodology (RSM). *J. Braz. Chem. Soc.* 26:11.
11. MOLDOVEANU, S.C., DAVID, V. 2013. Basic Information about HPLC. In *Essentials in Modern HPLC Separations*. Amsterdam, Netherlands: Elsevier. ISBN 978-0123850133

12. PRIDAL, A.A. 2018. Analysis of avenanthramides in oat products and estimation of avenanthramide intake in humans. In *Food Chemistry*. ISSN 0308-8146, vol. 253, p. 93-100.
13. TAN, X. J. – LI, Q. – CHEN, X. H. – WANG, Z. W. – SHI, Z. Y. – BI, K. S. – JIA, Y. 2008. Simultaneous determination of 13 bioactive compounds in Herba Artemisiae Scopariae (Yin Chen) from different harvest seasons by HPLC-DAD. *J Pharm Biomed Ana.l* 47(4–5):847.
14. TRIPATHI, V. et al. 2018. Avenanthramides of Oats: Medicinal Importance and Future Perspectives. In *Pharmacognosy Reviews*. ISSN 0976-2787, vol. 12, p. 66-71.
15. TURRINI, E. et al. 2019. Overview of the anticancer profile of avenanthramides from oat. In *International Journal of Molecular Sciences*. ISSN 1422-0067, vol. 20, no. 18, p. 1-23.
16. XIA, Y. Q. – GUO, T. Y. – ZHAO, H. L. – SONG, M. D. – ZHANG, B. H. – ZHANG, B. L. 2007. A novel solid phase for selective separation of flavonoid compounds. *J Sep Sci* 30(9):1300–1306.
17. ZHANG, Y. et al. 2020. Consumption of avenanthramides extracted from oats reduces weight gain, oxidative stress, inflammation and regulates intestinal microflora in high fat diet-induced mice. In *Journal of Functional Foods*. ISSN 1756-4646, vol. 65, p. 1-10.

Kontaktná adresa: Jozef Sokol, Katedra chémie, Fakulta prírodných vied, Univerzita Sv. Cyrila a Metóda v Trnave, Nám. J. Herdu 2, 917 01 Trnava, Slovenská republika; E-mail: jozef.sokol@ucm.sk

ZVYŠOVANIE BEZPEČNOSTI POTRAVÍN NA ZÁKLADE FYZIKÁLNOCHEMICKÝCH INTERAKCIÍ NEŽIADÚCICH ZLOŽIEK POTRAVÍN S MOLEKULAMI TYPU „FINGER PRINT“.

STRENGTHENING THE FOOD SAFETY ON THE BASE OF PHYSICO-CHEMICAL INTERACTIONS OF RISK FOOD COMPONENTS WITH FINGER-PRINT MOLECULES.

Šimko Peter, Kolarič Lukáš

Ústav potravinárstva a výživy, Fakulta chemickej a potravinárskej technológie, Slovenská technická univerzita v Bratislave, Radlinského 9, 812 37 Bratislava, Slovenská republika

ABSTRACT

The Annual State of Health in the Slovak Republic provides a concise and policy-relevant overview of health and health systems in the country to be elaborated by the OECD and the European Observatory on Health Systems and Policies, in cooperation with the European Commission. On the base of accessible data, dominant risks were identified as follows: obesity, poor nutritional habits in some social groups, resulting in frequent cardiovascular disease appearance and cancer to be brought about, apart from others, by eating habits. Frequency of occurrence of these illnesses results in has one of the highest cancer and cardiovascular mortality rates in the EU. The solution is minimisation of risk compounds (e.g. cholesterol, aflatoxin M1) contents in processed foods using modern elimination procedures based on van der Waals physico-chemical interactions, when finger print molecules are able to form so called „inclusion complex“ with risk compounds and these ones are readily eliminate by simple processes.

Key words: food safety; milk; cholesterol; aflatoxin M1

ÚVOD

Vo všeobecnosti panuje medzi odborníkmi zhoda, že výživa človeka má zásadný význam na zdravie a dĺžku dožitia človeka. Z tohto pohľadu možno konštatovať, že stav výživy obyvateľstve je dlhodobo neuspokojivý, nakoľko stredná dĺžka života na Slovensku patrí medzi najkratšie v Európe Slovensko má takisto jednu z najvyšších mier úmrtnosti na kardiovaskulárne ochorenia (KVO) a rakovinu v EÚ. Nárast obezity dospelých a mladistvých je na vzostupe a patrí medzi najvyššie v porovnaní s priemerom EÚ a to pre nesprávne stravovacie návyky a nízku úroveň fyzickej aktivity. To vo výsledku znamená, že stredná dĺžka

života obyvateľa SR oproti priemeru obyvateľov EÚ je až o 3,7 rokov nižšia, oproti krajinám s najvyššou strednou dĺžkou života (napr. Malta, Taliansko) je tento rozdiel ešte väčší a rovná sa až 5,7 rokom (OECD/European Observatory on Health Systems and Policies, 2021). Ako už bolo spomenuté, medzi závažné ochorenia, skracujúce život obyvateľstva SR sú KVO, ktoré sú spôsobené o.i. postupným ukladaním cholesterolu a *trans* nenasýtených a nasýtených mastných kyselín obsiahnutých v strave do kardiovaskulárneho systému a to až do okamihu, keď dôjde k úplnému jeho upchatiu, čo má za následok kolaps a smrť. Na základe štúdií vykonaných za účelom zistenia súvisu medzi cholesterolom prijatým v strave a rozvojom KVO niektorí autori dospeli k poznatku, že denný príjem cholesterolu a to predovšetkým v dlhodobom časovom horizonte je značným rizikovým faktorom (Larsson a kol., 2012). Na základe týchto poznatkov sa v mnohých krajinách sveta zaviedla hodnota odporúčaného denného príjmu cholesterolu na úrovni 300 mg, odporúčaná tiež Svetovou zdravotníckou organizáciou WHO (Albuquerque a kol., 2016). Táto hodnota je v súčasnej dobe aktuálna aj pre SR (Kukula a kol., 2020). Tento poznatok súvisí aj so skutočnosťou, že v populácii krajín, ktorých je denný príjem cholesterolu na úrovni 220 mg sa KVO vyskytujú v podstatne nižšej miere a stredná dĺžka života je podstatne dlhšia (napr. Malta, Taliansko, Španielsko a pod.).

Najnovšie informácie Európskej kardiologickej spoločnosti uvádzajú, že kľúčovým počiatočným javom KVO je viazanie komplexu nízkohustotného lipoproteínu (LDL) a cholesterolu spolu s ostatnými apolipoproteínmi na steny srdcových tepien. To potvrdilo aj niekoľko klinických skúšok, že čím sú nižšie hodnoty komplexu LDL cholesterolu v krvi, tým je nižšie riziko vzniku KVO. Spoločným znakom rôznych prejavov KVO je ateroskleróza. Ateroskleróza znamená prítomnosť tukových útvarov na stenách tepien a vyskytuje v dôsledku usadzovania modifikovaných lipoproteínov na stene tepien. Je definovaných sedem základných zdravotných návykov (fajčenie, fyzická aktivita, strava a telesná hmotnosť) a faktorov (celkový cholesterol, krvný tlak a plazmatická glukóza nalačno), ktoré sa podieľajú na kardiovaskulárnom zdraví (Bardagjy a Steinberg, 2019). Z epidemiologických štúdií je dobre známy negatívny vzťah medzi HDL cholesterolom a rozvojom ischemickej choroby srdca. Anti-aterosklerotické účinky HDL súvisia s ich úlohou pri odvádzaní cholesterolu, ako aj s ich protizápalovými, antioxidačnými, antiagregačnými, antikoagulačnými a profibrinolytickými vlastnosťami (Pérez-Méndez a kol., 2014). V kontexte vyššie uvedených skutočností je potom primárne potrebné poznať situáciu týkajúcu sa bilancie denného príjmu cholesterolu v populácii SR. Ako vyplýva z Tabuľky č. 1, priemerný denný príjem obyvateľa SR prekračuje odporúčanú hodnotu o 79 mg, pričom je dôvodné predpokladať, že u niektorých sociálnych skupín toto prekročenie môže byť aj dvojnásobné (Kukula a kol., 2020), čo dokumentujú aj poznatky zo zahraničia (Velíšek , 2009).

Tabuľka č.1 Bilancia priemerného denného príjmu cholesterolu obyvateľa SR v r. 2019 (Kukula a kol., 2020).

	A	B	C	D	E	F
Komodita	Spotreba [kg]	Obsah cholesterolu [mg/kg]	Denný príjem cholesterolu [mg]	Denný príjem cholesterolu [%]	Možné zníženie príjmu cholesterolu [mg]	Možné zníženie príjmu cholesterolu [%]
Mlieko a syry	173,6	130,0	61,8	16,3	1,2	0,4
Maslo	3,1	2690,0	22,8	6,0	0,4	0,1
Hovädzie mäso	5,2	950,0	13,5	3,6	13,5	4,6
Bravčové mäso	35,7	690,0	67,5	17,8	67,5	22,8
Bravčová masť	2,9	720,0	5,7	1,5	5,7	1,9
Hydinové mäso	26,9	730,0	53,8	14,2	53,8	18,2
Ryby	5,6	630,0	9,7	2,6	9,7	3,3
Vajcia	13,7	3840,0	144,1	38,0	144,1	48,7
Celkovo	266,7		379,0	100,0	295,9	78

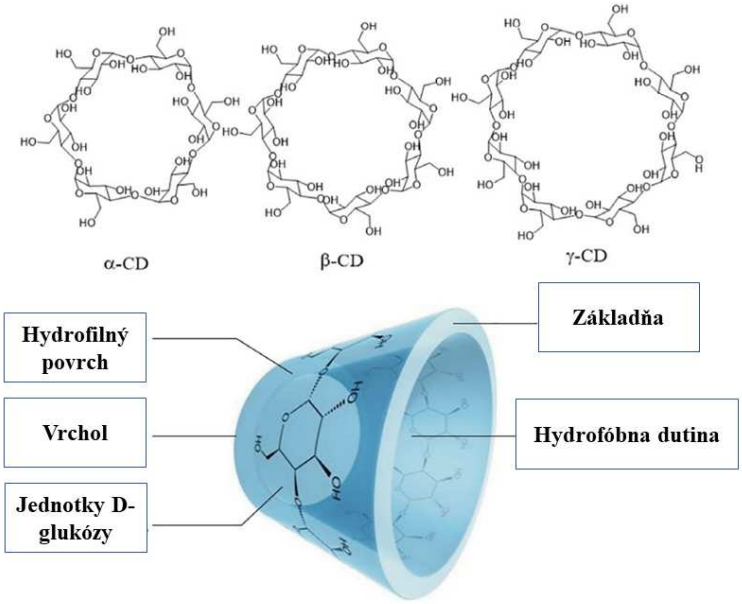
Na základe vyššie uvedených skutočností možno konštatovať, že by bolo potrebné upraviť hodnotu denného príjmu cholesterolu obyvateľstva SR tak, aby tento príjem súčasným požiadavkám zdravej výživy nasledovne

- Prvý prístup je založený na obmedzení spotreby potravín bohatých na cholesterol (mlieko a mliečne výrobky, mäso a vajcia), čo však môže negatívne ovplyvniť aj príjem esenciálnych zložiek potravín
- Znížiť pôvodnú koncentráciu cholesterolu v niektorých potravinách (mlieko a mliečne výrobky), čím by sa dosiahla odporúčaná výživová hodnota.

Ako vyplýva z Tabuľky č. 1, odstránením cholesterolu z mlieka a mliečnych výrobkov by bolo možné znížiť celkový denný príjem obyvateľa SR o 22 % na hodnotu 295,9 mg, čo by znamenalo zásadný posun riešenia tejto problematiky.

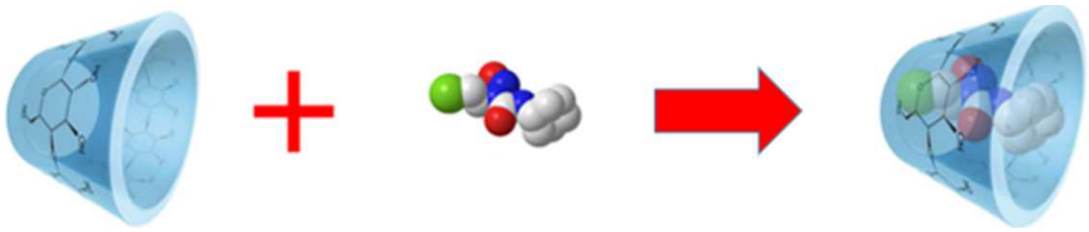
Cykodextríny ako „finger print“molekuly

Cyclodextríny (CDs) sú cyklické oligosacharidy v tvare zrezaného kužeľa zložené z molekúl D-glukózy, navzájom viazaných glykozidickou väzbou α-(1,4) v počte 6, 7 alebo 8 jednotiek, priemyselne získavaných degradáciou škrobu pomocou enzýmu glukozyltransferáza. Teleso molekuly CDs má amfifilný charakter, pričom vonkajšia časť molekuly je hydrofilná, zatiaľ čo vnútorná (dutina) časť molekuly má lipofilný (hydrofóbny) charakter (Crini, 2014). Chemická a priestorová štruktúra CDs je znázornená na Obrázku č. 1.



Obrázok č. 1. Chemická a priestorová štruktúra (α-, β- a γ-) cyklodextrínov. Zdroj: Tian a kol., 2020

Niektoré anorganické a organické soli, ako aj neutrálne (nepolárne) molekuly môžu s CDs vytvárať za určitých podmienok tzv. “inklúzne“ komplexy”, pričom nutnou podmienkou pre vznik tohto inklúzneho komplexu je vhodný rozmer molekuly a jej polarita (Cramer a kol., 1967). Intamolekulárne a intermolekulárne väzby vodíkovým môstikom ako aj van der Waalsove inerakcie zapríčiňujú konformačné zmeny inklúzneho komplexu vedúce k zníženiu jeho Gibbsovej (vnútornej) energie, čím dôjde k zvýšeniu jeho termodynamickej stability (Deng a kol., 2022). Schematicky je znázornený vznik inklúzneho komplexu na Obrázku č. 2.



Obrázok č. 2. Schéma vzniku inklúzneho komplexu na báze fyzikálno-chemickej interakcie „finger print“ molekuly s rizikovou látkou. Zdroj: Tian a kol., 2020.

V súčasnej dobe sú CDs využívané v potravinárskom priemysle predovšetkým ako natívny β-cyklodextrín (β-CD), ktorý je schválený ako prídavná látka do potravín s kódom E 459 legislatívou Európskej únie (Nariadenie Komisie č. 1333/2008) a to z rôznych dôvodov, napr. stabilizácia labilných zložiek potravín, postupné uvoľňovanie prchavých látok, eliminácia nežiadúcich organolepticky účinných látok, obohatenie potravín o prebiotický substrát, alebo elimináciu cholesterolu, aflatoxínu M1, či nežiadúcich pachov z mlieka a pod. (Crini, 2014; Matencio a kol., 2020; Kolarič a Šimko, 2022; Šimko a Kolarič, 2022; Ma a kol., 2022).

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Cholesterol je možné z mlieka alebo smotany odstrániť aplikáciou β-CD, keďže tento postup je vhodný na jeho selektívne odstránenie, pričom obsah ostatných nutričných a chuťových zložiek nie je výrazne ovplyvnený. Tento postup je teda výhodný oproti iným metódam, keďže dosahuje aj vysokú účinnosť, nakoľko miera odstránenia cholesterolu v mlieku a mliečnych výrobkoch pri použití β-CD dosahuje až 98 % (Galante a kol., 2017). Z výsledkov rôznych štúdií je zrejmé, že miera odstránenia cholesterolu z mlieka alebo smotany silne závisí od podmienok opracovania suroviny (rýchlosť, čas a teplota miešania, rýchlosť a čas odstreďovania, doba usadzovania a koncentrácia β-CD). Okrem toho sa uvádzajú rozdiely aj v porovnaní s mliekom a smotanou.

Optimalizácia podmienok opracovania mlieka a smotany s β-CD

Vplyv rýchlosti, času a teploty miešania vzorky s β-CD na mieru odstránenia obsahu cholesterolu z mlieka a smotany je ukázaný v Tab. 2. Odstránenie cholesterolu z mlieka bolo výrazne ovplyvnené rýchlosťou miešania. Štatisticky zaznamenané významné ($p < 0,05$) rozdiely boli medzi výsledkami získanými pri 480 a 600 rpm. Výsledky sa významne nelíšili pri 720, 840 a 960 rpm, čo naznačuje, že optimálna rýchlosť miešania začína pri 720 rpm.

Najvyššia účinnosť odstraňovania cholesterolu (73,3 %) však bola pozorovaná pri 840 rpm, preto bola táto rýchlosť nastavená ako najvhodnejšia. Rýchlosť miešania významne

ovplyvnila mieru odstránenia cholesterolu aj zo smotany. Štatisticky nevýznamný rozdiel pri $p < 0,05$ bol pozorovaný medzi 480 a 600 rpm s najvyššou hodnotou eliminácie cholesterolu pri 480 rpm (95,6 %). Naopak, vyššie otáčky spôsobili zníženie účinnosti odstraňovania cholesterolu. Výsledky sú podobné ako v iných štúdiách. Kwak a kol. (2001) miešali homogenizované mlieko s β-CD pri 800 rpm a dosiahli odstránenie cholesterolu až 78,2 % (1,0 % β-CD). Lee a kol. (1999) uviedli, že rýchlosť miešania pri 800 rpm je účinná na odstránenie 94,0 % obsahu cholesterolu v komerčnom mlieku pomocou β-CD (1,0 %), čo tiež podporili Lee a kol. (2007). Podľa Maskookiho a kol. (2013), aplikáciou rýchlosti miešania pri 700 rpm je možné pomocou β-CD v rovnakej koncentrácii odstrániť 67,7 % cholesterolu v homogenizovanom mlieku. Nižšiu rýchlosť miešania (530 rpm) uvádzajú Gianni a kol. (2020), pričom miera odstraňovania cholesterolu z mlieka sa pohybovala od 33 do 89 %. Podľa Kima a kol. (2004) nie je rýchlosť miešania dôležitým faktorom pri odstraňovaní cholesterolu z mlieka zosieťovaným β-CD, keďže pri rôznych rýchlostiach miešania nebol zaznamenaný významný rozdiel. V prípade smotany použili Ha a kol. (2010) rýchlosť miešania 350 rpm, na rozdiel od toho Lee a kol. (2012) a Jung a kol. (2013) až 1400 rpm, alebo Shim a kol. (2003) medzi 400 – 1200 rpm.

Čas miešania tiež ovplyvňoval konečnú mieru eliminácie cholesterolu z mlieka a smotany. Štatisticky významný rozdiel ($p < 0,05$) bol zaznamenaný medzi časom miešania mlieka 5 min a 10, 15 a 20 min. Najvyššia miera odstránenia cholesterolu z mlieka bola pozorovaná po 20 min miešania (79,8 %), ale podobné hodnoty boli sledované aj po 10 a 15 min (79,3 a 79,2 %). Najnižšia hodnota (73,0 %) bola pozorovaná pri čase miešania 5 min. Pri opracovaní smotany sa pozorovali podobné výsledky, kde najvyššia miera eliminácie cholesterolu (94,0 %) bola pri 20 min miešania. V porovnaní s týmto výsledkami uviedli mierne odlišné závery Lee a kol. (1999). Na základe ich údajov nebolo odstraňovanie cholesterolu z mlieka ovplyvnené časom miešania pri 5 až 20 min, ale bolo zaznamenané zníženie efektivity procesu po 25 min miešania. Podobný trend uviedli aj Alonso a kol. (2009), kde sa mierne zníženie miery eliminácie cholesterolu pozorovalo, keď sa čas miešania zvýšil na > 20 min pre 0,8 a 1,0 % β-CD. Vyššie uvedené výsledky naznačujú, že pri dlhších časoch miešania môže byť inkluzívny komplex medzi β-CD a cholesterolom nestabilný. Z ostatných štúdií teda možno usúdiť, že pre dostatočné odstránenie cholesterolu z mlieka alebo smotany je najvhodnejšia doba miešania medzi 10 a 20 min. Kwak a kol. (2003) uvádzajú, že 10-minútovou dobou miešania je možné odstrániť 79,3 % obsahu cholesterolu v mlieku pridaním β-CD (1,0 %), čo je podobné ako v tejto práci. Ahn a Kwak (1999) dosiahli najvyššie odstránenie cholesterolu v smotane pri dobe miešania 30 min. Tento čas bol použitý aj v iných štúdiách (Shim a kol., 2003; Jeon a kol., 2012; Galante a kol., 2017).

Okrem dôležitosti rýchlosti a času miešania sa teplota uvádza ako ďalší faktor ovplyvňujúci mieru odstránenia cholesterolu. Podľa Matencioniho a kol. (2020), najdôležitejšie faktory, ktoré je potrebné zvážiť v mechanizme interakcie CD/hosť sú štruktúra hosťujúcej molekuly, rozpúšťadlo a teplota. Medzi publikovanými výskumami sú zaznamenané rôzne výsledky. Podľa tejto práce neboli pozorované žiadne významné rozdiely ($p < 0,05$) medzi teplotami miešania mlieka 25, 40 a 50 °C, keď sa miera odstránenia cholesterolu menila na 79,3, 78,2 a 77,9 %. Odlišné výsledky boli však získané v prípade smotany, kde optimálna teplota miešania bola nad 40 °C. Lee, a kol. (1999) tiež uviedli, že sa nezistili žiadne rozdiely v odstraňovaní cholesterolu z mlieka pri rôznych teplotách, ale navrhli, že miešanie pri 10 a 25 °C má tendenciu zvyšovať odstraňovanie cholesterolu v porovnaní s nižšími teplotami. Odlišná teplota miešania bola použitá v štúdii Alonso a kol. (2009). Podľa nich miešanie vzorky mlieka s β-CD pri 4 °C postačí na odstránenie cholesterolu až do 95 %, čo je efektívne aj vzhľadom na udržanie kvality mlieka. Maskooki a kol. (2013) uvádza, že teplota miešania 20 °C je vhodnejšia ako 8 °C, pretože agregácie mliečnych lipoproteínov pri vyšších teplotách sú nižšie a následne je väčšia šanca na zachytenie molekúl cholesterolu v dutinách β-CD. Účinok agregácie mliečnych lipoproteínov môže hrať väčšiu úlohu pri opracovaní smotany, pretože smotana sa mieša s β-CD zvyčajne pri teplotách medzi 40 až 50 °C. Napr. Shim a kol. (2003), Ha a kol. (2010) a Lee a kol. (2012) použili teplotu miešania 40 °C a dosiahli efektívne odstránenie obsahu cholesterolu v smotane.

Porovnaním výsledkov získaných pre mlieko a smotanu možno teda vyvodiť nasledovné závery: 1. v oboch prípadoch rýchlosť miešania významne ovplyvnila mieru odstránenia obsahu cholesterolu, ale optimálna rýchlosť v mlieku bola pozorovaná pri 840 rpm, zatiaľ čo v smotane pri 480 rpm, pravdepodobne kvôli tomu, že nižší obsah cholesterolu v mlieku si vyžadoval vyššiu rýchlosť miešania s β-CD; 2. optimálny čas miešania bol podobný pre mlieko aj smotanu; 3. teplota miešania významne neovplyvnila výsledky v mlieku; avšak výsledky pre smotanu naznačujú, že optimálna teplota je nad 40 °C. Agregácie lipoproteínov, ktoré sú súčasťou membrány guľôčok mliečneho tuku, sú pri vyšších teplotách nižšie, a preto je zachytávanie molekúl cholesterolu do β-CD dutiny efektívnejšie. Ďalej pri vyšších teplotách lipidy dosahujú svoje teploty topenia, čo tiež zjednodušuje spojenie molekúl cholesterolu a β-CD (Maskooki a kol., 2013).

Tabuľka č. 1. Vplyv podmienok miešania mlieka (3,5 %) a smotany (30 %) s β-CD na mieru odstraňovania obsahu cholesterolu

Smotana [b]	Obsah cholesterolu [mg/kg] [a]	Miera odstránenia cholesterolu [%] [a]
Rýchlosť [rpm]		
360	321,54 ±2,99*	69,8 ±0,3*
480	43,65 ±4,09	95,6 ±0,4
600	50,85 ±1,59	95,2 ±0,2
720	153,53 ±2,74*	85,6 ±0,3*
840	121,19 ±3,18*	88,6 ±0,3*
Čas [min]		
5	169,61 ±11,94*	83,1 ±1,2*
10	161,12 ±34,44*	84,0 ±3,4*
20	59,84 ±2,78	94,0 ±0,3
30	91,50 ±21,23	90,9 ±2,1
Teplota [°C]		
25	391,72 ±18,12*	61,0 ±1,8*
40	65,25 ±6,14	93,5 ±0,6
50	68,28 ±10,81	93,2 ±1,1
Mlieko [c]		
Rýchlosť [rpm]		
480	54,63 ±2,20*	54,8 ±1,8*
600	48,58 ±2,21*	59,8 ±1,8*
720	38,66 ±4,13	88,0 ±3,4
840	32,24 ±1,34	93,3 ±1,1
960	34,32 ±2,75	71,1 ±3,5
Čas [min]		
5	34,35 ±3,13*	73,0 ±2,5*
10	26,43 ±0,75	79,2 ±0,6
15	26,46 ±0,72	89,2 ±0,6
20	25,76 ±2,62	79,8 ±2,0
Teplota [°C]		
25	26,53 ±0,84	79,2 ±1,8
40	27,20 ±1,09	98,2 ±0,6
50	27,00 ±0,69	77,9 ±1,1

Poznámka:

[a] Výsledky sú vyjadrené ako priemer ±smerodajná odchýlka, n = 3.

[b] Ostatné podmienky: koncentrácia β-CD 5 %, odstreďovanie 20 min pri 450 *g*, čas odležania 0 min.

[c] Ostatné podmienky: koncentrácia β-CD 1%, odstreďovanie 10 min pri 130 *g*, čas odležania 0 min.

*indikuje štatisticky významné rozdiely ($p < 0,05$).

ZÁVER

Mlieko a mliečne výrobky sú významnými potravinami v zdravej strave obyvateľstva. Na druhej strane je mliečny tuk bohatý na cholesterol, ktorý je rizikovým faktorom vzniku kardiovaskulárnych ochorení (KVO). KVO sú hlavnou príčinou úmrtnosti, najmä vo vyspelom svete, pričom dlhodobý vysoký denný príjem cholesterolu v strave je jedným z rizikových faktorov vzniku KVO. Keďže mlieko a mliečne výrobky sú konzumované vo veľkej miere, tak výroba výrobkov s nízkym obsahom cholesterolu by mohla účinne znížiť vysoký príjem cholesterolu, čo by bolo jedným z kritických krokov v prevencii KVO. Cieľom tohto príspevku bolo poskytnúť a predstaviť možnosti odstraňovania cholesterolu z mlieka a smotany aplikáciou β-cyklodextrínu (β-CD). V prípade optimalizácie parametrov opracovania mlieka a smotany s β-CD sa zistilo, že účinnosť odstraňovania cholesterolu ovplyvňovali najmä rýchlosť miešania a odstreďovania, doba usadzovania a koncentrácia β-CD. V mlieku bola najvyššia miera odstránenia (99,4 %) pozorovaná pri 1,5 % (w/w) β-CD, zatiaľ čo v smotane bola najvyššia miera (94,3 %) dosiahnutá pri 5 % (w/w) β-CD. Na zachovanie akceptácie zo strany spotrebiteľov by organoleptické profily takýchto produktov mali byť v optimálnom prípade rovnaké v porovnaní s pôvodnými. Počas experimentu bola dosiahnutá vysoká účinnosť odstraňovania cholesterolu v masle (95,6 %) aj tvarohu (97,9 %). Záverom sa dá teda konštatovať, že navrhovaný postup je vhodný pre výrobu nového sortimentu nízko-cholesterolových mliečnych výrobkov so značnými zdravotnými benefitmi pri prevencii KVO.

POUŽITÁ LITERATÚRA

1. AHN, J. - KWAK, H. S.: Optimizing cholesterol removal in cream using β-cyclodextrin and response surface methodology. *Journal of Food Science*, 1999, roč. 64, č. 4, s. 629 – 632.
2. ALBUQUERQUE, T.G. - OLIVEIRA, M.B.P.P. - SANCHES-SILVA, A. - COSTA, H.S.: Cholesterol determination in foods: Comparison between high performance and ultra-high performance liquid chromatography. *Food Chemistry*, 2016, roč. 193, s. 18 – 25.
3. ALONSO, L. - CUESTA, P. - FONTECHA, J. - JUAREZ, M. - GILLILAND, S. E.: Use of β-cyclodextrin to decrease the level of cholesterol in milk fat. *Journal of Dairy Science*, 2009, roč. 92, č. 3, s. 863 – 869.
4. BARDAGJY, A. S. – STEINBERG, F. M.: Relationship between HDL functional characteristics and cardiovascular health and potential impact of dietary patterns: A narrative review. *Nutrients*, 2019, roč. 11, Článok 1231, s. 1 – 15.

5. CRAMER, F. - SAENGER, W. - SPATZ, H. C. Inclusion compounds. XIX. The formation of inclusion compounds of α-cyclodextrin in aqueous solutions. Thermodynamics and kinetics. *Journal of American Chemical Society*, 1967, roč.89, s. 14–20.
6. CRINI, G.: A history of cyclodextrins. *Chemical Reviews*, 2014, roč. 114, č. 21, s. 10940 – 10975.
7. DENG, C. - CAO, C. - ZHANG, Y. - HU, J. - GONG, Y. - ZHENG, M. - ZHOU, Y. Formation and stabilization mechanism of β-cyclodextrin inclusion complex with C10 aroma molecules. *Food Hydrocolloids*, 2022, roč. *123*, 107013.
8. EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition, and Allergies (NDA): Scientific Opinion on Dietary Reference Values for fats, including saturated fatty acids, polyunsaturated fatty acids, monounsaturated fatty acids, trans fatty acids, and cholesterol. *EFSA Journal*, 2010, roč. 8, č. 3, s. 1 – 107.
9. GALANTE, M. - PAVÓN, Y. - LAZZARONI, S. - SOAZO, M. - COSTA, S. - BOERIS, V. – RISSO, P. – ROZYCKI, S.: Effect of cholesterol-reduced and zinc fortification treatments on physicochemical, functional, textural, microstructural and sensory properties of soft cheese. *International Journal of Dairy Technology*, 2017, roč. 70, č. 4, s. 533 – 541.
10. HA, H. J. - LEE, J. E. - CHANG, Y. H. - KWAK, H.-S.: Entrapment of nutrients during cholesterol removal from cream by crosslinked β-cyclodextrin. *International Journal of Dairy Technology*, 2010, roč. 63, č. 1, s. 119 – 126.
11. KOLARIČ, L. - ŠIMKO, P. Application of β-cyclodextrin in the production of low-cholesterol milk and dairy products. *Trends in Food Science & Technology*, 2022, roč. 119, s. 13-22.
12. KUKULA, M. - KOLARIČ, L. - ŠIMKO, P.: Decrease of cholesterol content in milk by sorption onto β-cyclodextrin crosslinked by tartaric acid, considerations and implications. *Acta Chimica Slovaca*, 2020, roč. 13, č. 2, s. 1 – 6.
13. KUMARI, A.: Chapter 7 – Cholesterol synthesis. *Sweet Biochemistry*, 2018, s. 27 – 31. ISBN 978-0-12-814453-4.
14. KWAK, H. S. - JUNG, C. S. - SEOK, J. S. - AHN, J.: Cholesterol removal and flavor development in cheddar cheese. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 2003, roč. 16, č. 3, s. 409 – 416.
15. LARSSON, S. C. - VIRTAMO, J. - WOLK, A. Dietary fats and dietary cholesterol and risk of stroke in women. *Atherosclerosis*, 2012, roč. 221, č.1, s. 282-286.

16. LEE, D. K. - AHN, J. - KWAK, H. S.: Cholesterol removal from homogenized milk with β-cyclodextrin. *Journal of Dairy Science*, 1999, roč. 82, č. 11, s. 2327 – 2330.
17. LI, L. H. - DUTKIEWICZ, E.P. - HUANG, Y.-C. - ZHOU, H.-B. - HSU, C.-C.: Analytical methods for cholesterol quantification. *Journal of Food and Drug Analysis*, 2019, roč. 27, č. 2, s. 375 – 386.
18. MACH, F. – BAIGENT, C. – CATAPANO, A.L. – KOSKINAS, K.C. – CASULA, M. – BADIMON, L. – CHAPMAN, M.J. – DE BACKER, G.G. – DELGADO, V. – FERENCE, B.A. – GRAHAM, I.M. – HALLIDAY, A. – LANDMESSER, U. – MIHAYLOVA, B. – PEDERSEN, T.R. – RICCARDI, G. – RICHTER, D.J. – SABATINE, M.S. – TASKINEN, M.R. – TOKGOZOGLU, L. – WIKLUND, O.: 2019 ESC/EAS Guidelines for the management of dyslipidaemias: lipid modification to reduce cardiovascular risk. *European Heart Journal*, 2020, roč. 41, č. 1, s. 111 – 188.
19. MASKOOKI, A. M. - BEHESHTI, S. H. R. - VALIBEIGI, S. - FEIZI, J.: Effect of cholesterol removal processing using β-cyclodextrin on main components of milk. *International Journal of Food Science*, 2013, roč. 2013, č. 5, s. 1 – 6.
20. PÉREZ-MÉNDEZ, Ó. – PACHECO, H. O. – MARTÍNEZ-SÁNCHEZ, C. – FRANCO, M.: HDL-cholesterol in coronary artery disease risk: Function or structure? *Clinica Chimica Acta*, 2014, roč. 429, s. 111 – 122.
21. Ma, Y. - Li, J. - Liu, Y. - Dou, N. - Mu, S. - Wei, X. - Jiang, Z. Lactitol and β-cyclodextrin alleviate the intensity of goaty flavor. *Journal of the Science of Food Agriculture*, 2022, roč. 103, s. 1588-1592.
22. MATENCIO, A. - NAVARRO-ORCAJADA, S. - GARCÍA-GARMONA, F. - LÓPEZ-NICOLÁS, J. M.: Applications of cyclodextrins in food science. A review. *Trends in Food Science & Technology*, 2020, roč. 104, s. 132 – 143.
23. NARIADENIE EURÓPSKEHO PARLAMENTU A RADY (ES) č. 1333/2008 zo 16. decembra 2008 o prídavných látkach v potravinách. *Úradný vestník Európskej únie*, L 354, 31.12.2008, s. 16 – 34.
24. OECD/European Observatory on Health Systems and Policies (2021), *Slovensko: Zdravotný profil krajiny 2021, State of Health in the EU*, OECD Publishing, Paris/European Observatory on Health Systems and Policies, Brusel. ISBN 9789264764095
25. SHIM, S. Y. - AHN, J. - KWAK, H. S.: Functional properties of cholesterol-removed whipping cream treated by β-cyclodextrin. *Journal of Dairy Science*, 2003, roč. 86, č. 9, s. 2767 – 2772.

26. ŠIMKO P. – KOLARIČ, L. Decrease in aflatoxin M_1 concentration in milk during cholesterol removal by application of β-cyclodextrin. *Toxins*, 2022, roč. 14, paper no.379.
27. TIAN, B. - XIAO, D. - HEI, T. - PING, R. - HUA, S. - LIU, J. The application and prospects of cyclodextrin inclusion complexes and polymers in the food industry: A review. *Polymer International*, 2020, roč. 69, s. 597-603.
28. VELÍŠEK, J. *Chemie potravin*, 2002, OSSIS, Tábor, Czech Republic. ISBN 80-86659-02-3.

POĎAKOVANIE

Tento príspevok vznikol ako výsledok riešenia projektu APVV-18-0061, ktorý finančne podporuje Agentúra pre podporu výskumu a vývoja.

Kontaktná adresa: Šimko Peter, Ústav potravinárstva a výživy, Fakulta chemickej a potravinárskej technológie, Slovenská technická univerzita v Bratislave, Radlinského 9, 812 37 Bratislava; Slovenská republika; E-mail: qsimko@stuba.sk

NOROVÍRUSY V POTRAVINÁCH RASTLINNÉHO PÔVODU: SKRYTÉ RIZIKO PRE NAŠE ZDRAVIE?

NOROVIRUSES IN PLANT-BASED FOODS: HIDDEN RISK FOR OUR HEALTH?

Šulejová Lucia, Jurovčíková Júlia

Veterinárny a potravinový ústav, Jánoškova 1611/58, 026 01 Dolný Kubín

ABSTRACT

In the period between 2013 and 2022, the State Veterinary and Food Institute (SVFI) examined 52 samples of fresh and frozen berry fruits (blueberries, blackberries, raspberries, strawberries, and mixed berries) and various types of leafy salads and vegetables as part of official food control for the presence of norovirus GI and norovirus GII. The aim of this testing was to provide information on the prevalence of these viruses in plant-based foods on the Slovak market and, ultimately, to ensure the microbiological safety of such foods for consumers. Out of the 52 tested samples, norovirus GI RNA was not detected in any of the samples, and norovirus GII RNA was detected in one sample of strawberries, representing a positivity rate of 1,9%.

Keywords: norovirus GI, norovirus GII, berries, plant-based food

ÚVOD

Norovírusy sú RNA vírusy z čeľade *Caliciviridae* vyznačujúce sa vysokou nákazlivosťou. Ich jediným rezervoárom je človek. K prenosu dochádza fekálno-orálnou cestou, kontaminovanými potravinami a nápojmi. Najčastejšími príznakmi norovírusovej infekcie je silná vodnatá hnačka, nevoľnosť, zvracanie, bolesti brucha, zvýšená telesná teplota. Rizikovými sú hlavne potraviny určené na ľudský konzum bez tepelného opracovania, ktoré účinne inaktivuje patogénne vírusy. Problémovými sú aj zmrazené produkty, ktoré majú dlhú trvanlivosť a môžu potenciálne viesť k zvýšenému vystaveniu infekčným vírusom. V roku 2021 bol norovírus v krajinách EÚ tretím najčastejšie hláseným agensom zodpovedným za epidémie v ktorých ochorelo 6545 ľudí.

MATERIÁL A METÓDY

V období od roku 2013 až do roku 2022 bolo odobratých inšpektormi regionálnych veterinárnych a potravinových správ 11 vzoriek rôznych druhov šalátov a zeleniny a 41 vzoriek čerstvého alebo zmrazeného ovocia. Vzorka poväčšine pozostávala z piatich spotrebiteľských

balení rovnakej šarže (subvzoriek) s celkovou hmotnosťou najmenej 125 g, pričom každá subvzorka bola predmetom analýzy zameranej na detekciu prítomnosti RNA norovírusu podľa pripravovanej, respektíve platnej medzinárodnej normy STN EN ISO 15216-2 (2019). Vzorka bola posúdená ako nevyhovujúca pre ľudský konzum v prípade, že bola zistená prítomnosť RNA norovírusu u jednej subvzorky.

VÝSLEDKY

Celkovo bolo vyšetrených 52 vzoriek čerstvého a zmrazeného bobuľového ovocia (čučoriedky, černice, maliny, jahody a zmesi bobúľ) a rôznych druhov listových šalátov a zeleniny. 43 vzoriek bolo pôvodom z členských štátov EÚ, 3 vzorky pochádzali z tretích krajín (Čína, Srbsko, Egypt) a pri 6 vzorkách nebola uvedená krajina pôvodu. Z tohto množstva vzoriek nebola RNA norovírusu GI zistená v žiadnej vzorke a RNA norovírusu GII bola zistená v jednej vzorke jahôd, čo predstavovalo 1,9 % pozitivitu (tab. 1).

Tabuľka č. 1, Prehľad vzoriek vyšetrených na detekciu prítomnosti RNA norovírusu genotyp GI a genotyp GI v období rokov 2013 -2022

Typ vzorky	Počet analyzovaných vzoriek	Pozitívne nálezy	
		norovírus genotyp GI	norovírus genotyp GII
čerstvý šalát	7	0	0
zmrazená zelenina	1	0	0
ostatné druhy zeleniny	3	0	0
hlbokozmrazené maliny	10	0	0
hlbokozmrazené jahody	8	0	**1**
hlbokozmrazené čučoriedky	5	0	0
hlbokozmrazená zmes ovocia	11	0	0
hlbokozmrazené višne	1	0	0
čerstvé jahody	3	0	0
čerstvé ovocie iné	3	0	0

ZÁVER

Ovocie a zelenina z tretích krajín ako je Čína, Srbsko a Egypt, boli v minulosti spájané s kontamináciou norovírusom a následnými epidémiami. Tieto prípady zvýšili obavy o bezpečnosť dovážaného ovocia z tretích krajín a podnietili prísnejšie kontroly pri dovoze.

V prípade čínskych jahôd, ktoré spôsobili v roku 2012 norovírusovú epidémiu, ktorá postihla okolo 11000 školákov vo východnej časti Nemecka, bola laboratórne potvrdená prítomnosť norovírusu. Tento prípad viedol k sprísneniu dovozu jahôd z Číny do Európskej únie (EÚ). Podobné problémy s malinami zo Srbska boli tiež zaznamenané v rokoch 2010 a 2011, kedy bolo zistených niekoľko prípadov norovírusových epidémií u ľudí po konzumácii srbských malín. Európska únia preto reagovala tým, že zvýšila kontroly na hraniciach a zaviedla prísnejšie požiadavky na bezpečnosť dovážaných potravín.

V prípade produktov z Egypta boli v minulosti tiež zistené prípady norovírusu. V práci (Elmahdy et al., 2022) sa udáva, že celkový priemerný výskyt norovírusu GI bol v jahodách 25 % a norovírusu GII bol až 40 %. Čo sa týka listovej zeleniny vyprodukovanej v Egypte, výskyt norovírusu GI a GII bol 20 % a 30 %.

V prípade ovocia pôvodom z EÚ sa výskyt norovírusu nemusí vyskytovať v rovnakej miere ako u dovozeného ovocia z tretích krajín. Všetky krajiny EÚ musia dodržiavať prísne normy na zabezpečenie bezpečnosti potravín, ktoré majú minimalizovať riziko kontaminácie potravín vrátane norovírusu. Avšak aj napriek týmto opatreniam môže dôjsť k prípadom kontaminácie potravín pochádzajúcich z členských štátov Európskej únie, ako sa stalo v prípade malín pôvodom z Poľska dovezených na fínsky trh, kde tieto spôsobili niekoľko epidémii v priebehu roku 2009.

POUŽITÁ LITERATÚRA

1. STN EN ISO 15216-2: Mikrobiológia potravinárskeho reťazca. Horizontálna metóda na stanovenie vírusu hepatitídy A a norovírusu polymerázovou reťazovou reakciou s priebežnou analýzou (RT-PCR). Časť 2: Metóda dôkazu (ISO 15216-2: 2019)
2. Food Manufacture. "Chinese strawberries: food safety threat?" (2014). Dostupné na: https://www.foodmanufacture.co.uk/Article/2014/07/04/Chinese-strawberries-food-safety-threat
3. EFSA Journal 2022;20(12):7666
4. Elmahdy M, Elmahdy AM, Shaheen A, Mahmoud L, Hammad I, Soliman E. "Detection of Norovirus and Hepatitis A Virus in Strawberry and Green Leafy Vegetables by Using RT-qPCR in Egypt." Food and Environmental Virology. 2022;14(1):1-12. doi: 10.1007/s12560-022-09516-1.
5. FoodNavigator. "German norovirus outbreak found to be from strawberries" (2012). Dostupné na: https://www.foodnavigator.com/Article/2012/10/10/German-norovirus-outbreak-found-to-be-from-strawberries#

6. Bernard H, Faber M, Wilking H, Haller S, Höhle M, Schielke A, Ducomble T, Siffczyk C, Merbecks SS, Fricke G, Hamouda O, Stark K, Werber D, on behalf of the Outbreak Investigation Team. "Large multistate outbreak of norovirus gastroenteritis associated with frozen strawberries, Germany, 2012." Euro Surveill. 2014;19(8):pii=20719. Dostupné online: http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=20719
7. Müller L, Schultz AC, Fonager J, Jensen T, Lisby M, Hindsdal K et al. "Separate norovirus outbreaks linked to one source of imported frozen raspberries by molecular analysis, Denmark, 2010-2011." Epidemiology and Infection. 2015 Aug 2;143(11):2299-2307. doi: 10.1017/S0950268814003409
8. Mäde D, Trübner K, Neubert E, Höhne M, Johne R. "Detection and typing of norovirus from frozen strawberries involved in a large-scale gastroenteritis outbreak in Germany." Food Environ. Virol. 2013;5:162-168.
9. Sarvikivi E, Roivainen M, Maunula L, Niskanen T, Korhonen T, Lappalainen M. "Multiple norovirus outbreaks linked to imported frozen raspberries." Epidemiol. Infect. 2012;140:260-267.

Kontaktná adresa: Šulejová Lucia, Veterinárny a potravinový ústav v Dolnom Kubíne, Štátny veterinárny a potravinový ústav, Jánoškova 1611/58, 026 01 Dolný Kubín; Slovenská republika; E-mail: lucia.sulejova@svpu.sk

HYGIENICKÁ KVALITA SUROVÉHO KOZIEHO MLIEKA NA SLOVENSKU

HYGIENIC QUALITY OF RAW GOAT´S MILK IN SLOVAKIA

Tomáška Martin, Drončovský Maroš, Kološta Miroslav

Výskumný ústav mliekárenský, a.s., Dlhá 95, 010 01 Žilina, Slovenská republika

ABSTRACT

Goat milk and its products are gaining popularity. The work presents results on the hygienic quality of raw goat's milk in Slovakia. 969 bulk and individual samples were tested in 2021 and 2022. The presence of residues of inhibitory substances was not detected in the milk. The geometric mean of the plate count was 54 000 CFU/mL. The geometric mean of the somatic cell counts was 1 081 000 /mL. The somatic cell counts increased at the end and at the beginning of the season. The hygienic quality of raw goat´s milk in Slovakia can be considered very good.

Key words: raw goat´s milk, somatic cells, microbiological quality, residues of antibiotics

ÚVOD

Surové kozie mlieko (ďalej len „SKoM“) sa teší medzi spotrebiteľmi na Slovensku zvýšenej popularite najmä pre jeho zdravotné a nutričné vlastnosti. Chov kôz má oproti chovu dojníc svoje špecifiká. Prevažne sú kozy chované v menších počtoch ako domáce hospodárske zvieratá, u ktorých sa kvalita mlieka v podstate netestuje. Existujú však aj väčšie kozie farmy s počtom niekoľko desiatok až stoviek kôz. Získané surové kozie mlieko sa vo veľkej miere spracováva priamo u jeho producentov na rôzne mliečne výrobky (pasterizované mlieko, rôzne druhy syrov, jogurty a pod.), ojedinele sa od producentov zváža na spracovanie do iných prevádzok. Informácie o kvalite SKoM nie sú tak dostupné, ako u surového kravského mlieka.

Legislatívne limity hygienickej kvality SKM sú v EÚ uvedené v Nariadení č. 853/2004 (2) pre celkový počet mikroorganizmov (ďalej len „CPM“) a prítomnosť rezíduí inhibičných látok (ďalej len „RIL“). Počet somatických buniek (ďalej len „PSB“) je v Európe nepovinný ukazovateľ, ale napríklad v USA bol zavedený limit pre PSB v kozom mlieku a to 1 000 000 /ml v triede kvality A (4).

Prezentované výsledky poskytujú rámcový obraz o hygienickej kvalite SKoM na Slovensku v sledovanom období 07/2021 – 10/2022. Okrem povinných znakov kvality (CPM, prítomnosť RIL) sa hodnotil aj PSB.

MATERIÁL A METODIKA

Na skúšanie boli odoberané vzorky surového kozieho mlieka od producentov, resp. spracovateľov z rôznych regiónov Slovenska. Celkovo bolo vzorkovaných 15 odberných miest. Odoberané boli individuálne aj bazénové vzorky, väčšina z nich bola konzervovaná Acidiolom. Vzorky boli po odbere transportované do skúšobného laboratória EXAMINALA vo Výskumnom ústave mliekárenskom, a.s. v Žiline (ďalej len „SL EXAMINALA“). Skúšanie vzoriek bolo vykonané do 24 až 72 hodín po odbere, pričom vzorky boli do vykonania skúšok uchovávané pri teplotách 1 – 8°C.

Prítomnosť RIL bola sledovaná pomocou testovacej súpravy Delvotest SP-NT (DSM, Holandsko) podľa postupu deklarovaného výrobcom a STN 57 0531 (6). Ako kontrolné vzorky sa použili negatívna kontrolná vzorka mlieka bez obsahu RIL a pozitívna kontrolná vzorka s obsahom penicilínu. Kontrolné vzorky boli konzervované rovnakým spôsobom ako vzorky na skúšanie.

CPM bol skúšaný určenou kultivačnou metódou podľa STN EN ISO 4833-1 (8). Ako kultivačné médium sa použila živná pôda GTK-M (Milcom, Česká republika).

PSB bol meraný na prietokovom cytometri Fossomatic 7 (FOSS, Dánsko) podľa STN EN ISO 13366-2 (7). Zariadenie bolo kalibrované certifikovaným referenčným materiálom „Somatické bunky v kozom mlieku“ (Milk and Dairy Laboratory Dr. Huefner, Nemecko) v trojmesačných intervaloch. Na rutinnú kontrolu sa používali vlastné pilotné vzorky z lokálneho surového kozieho mlieka, ako aj referenčné vzorky z Nemecka.

SL EXAMINALA sa v rámci uvedených skúšok pravidelne zúčastňovalo aj medzilaboratórnych porovnávacích meraní (SVÚ Jihlava, Česká republika; Milcom, Česká republika; Milk and Dairy Laboratory Dr. Huefner, Nemecko).

Všetky uvedené skúšky má SL EXAMINALA akreditované Slovenskou národnou akreditačnou službou podľa STN EN ISO/IEC 17 025 (9).

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Celkovo bolo testovaných 969 individuálnych, resp. bazénových vzoriek SKoM. V rámci celého súboru vzoriek bola prítomnosť RIL zistená len u štyroch vzoriek. Jednalo sa o jedného dodávateľa SKoM na začiatku sezóny. Pri analýze príčin eventuálneho výskytu RIL sa dospelo k záveru, že sa jedná o inhibíciu prirodzene sa vyskytujúcimi inhibítormi z mledziva, ktoré bolo podojené spolu s mliekom. Takže po vysvetlení tohto prípadu možno konštatovať, že prítomnosť RIL nebola v sledovanom období v SKoM dokázaná.

Tabuľka č. 1 dokumentuje sumárnu mikrobiologickú kvalitu SKoM. Tá bola pomerne vyhovujúca, keď až 76,9 % vzoriek malo hodnotu CPM menšiu ako 500 000 KTJ/ml, čo je

limit stanovený legislatívou pre surové kozie mlieko (2), ktoré sa ďalej tepelne nemusí ošetrovať. Pre mlieko, ktoré sa tepelne ošetruje, stanovuje legislatíva limit na úrovni 1 500 000 KTJ/ml. Tento limit spĺňalo až 89,1 % vzoriek. Geometrický priemer všetkých skúšaných vzoriek bol na úrovni 54 000 KTJ/ml, aritmetický priemer 300 000 KTJ/ml. Z týchto údajov je zrejmé, že hoci vzorky SKoM vo väčšine prípadov vyhoveli legislatívnym limitom, dosiahnuté priemerné hodnoty CPM v tomto mlieku boli vyššie, ako sa zisťujú u surového kravského mlieka, čo možno odôvodniť najmä úrovňou hygieny v procese získavania a dojenia mlieka.

Tabuľka č. 1, Distribúcia CPM vo vzorkách surového kozieho mlieka

Parameter	**Hodnota**
Geometrický priemer	$5{,}4x10^4$ KTJ/ml
Aritmetický priemer	$3{,}0x10^5$ KTJ/ml
Počet vzoriek < $1x10^3$ KTJ/ml	12,0 %
Počet vzoriek ($1x10^3$ – $5x10^5$) KTJ/ml	64,9 %
Počet vzoriek ($5{,}1x10^5$ – $1{,}5x10^6$) KTJ/ml	12,2 %
Počet vzoriek ($1{,}6x10^6$ – $3x10^6$) KTJ/ml	3,3 %
Počet vzoriek > $3x10^6$ KTJ/ml	7,6 %

Distribúcia PSB vo vzorkách SKoM je uvedená v tabuľke č. 2. V rozsahu merania 20 000 až 2 000 000/ml (je daný limitmi použitej kalibrácie analyzátora Fossomatic 7) bolo nameraných 79,9 % všetkých vzoriek mlieka, 20,1 % analyzovaných vzoriek mlieka bolo mimo merací rozsah. Do 1 000 000 PSB/ml bolo nameraných 46,8 % vzoriek. Geometrický priemer PSB dosiahol hodnoty 1 081 000 /ml, resp. aritmetický priemer 1 686 000 /ml. Z uvedených údajov je zrejmé, že namerané PSB v SKoM boli podstatne vyššie, ako sú zisťované u nenarušeného surového kravského mlieka. Nami namerané priemerné hodnoty boli však obdobné, ako boli zistené aj v iných štúdiách (1, 3).

Aj keď súvis medzi vyššími PSB a ochoreniam mliečnej žľazy u kôz nie je jednoznačný, pre spracovanie kozieho mlieka to môže byť dôležitý ukazovateľ, pretože sa preukázalo, že počty nad 600 000 /ml môžu negatívne ovplyvňovať technologické vlastnosti kozieho mlieka (5).

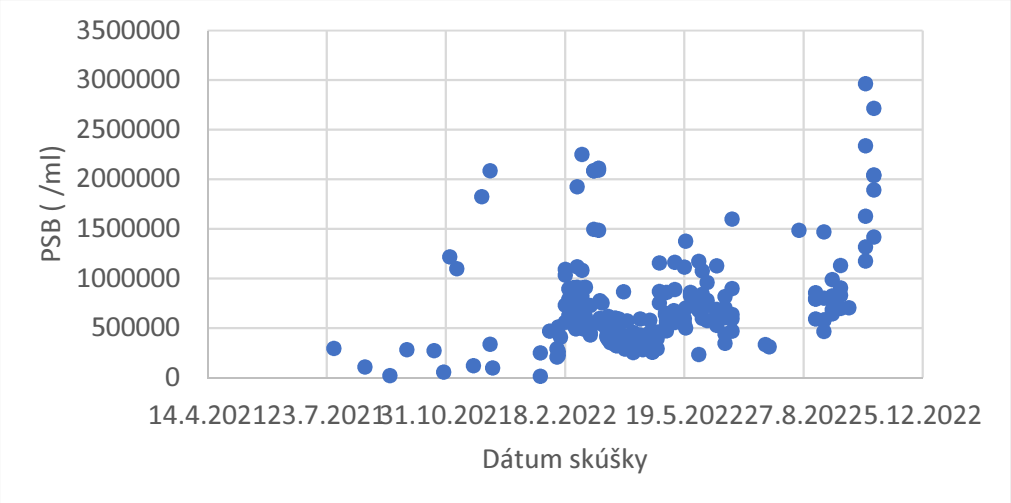
Tabuľka č. 2, Distribúcia PSB vo vzorkách surového kozieho mlieka

Parameter	Hodnota
Geometrický priemer	1 081 000 /ml
Aritmetický priemer	1 686 000 /ml
Počet vzoriek < 499 999 /ml	19,5 %
Počet vzoriek (500 000 – 999 999) /ml	27,3 %
Počet vzoriek (1 000 000 – 1 499 999) /ml	12,3 %
Počet vzoriek (1 500 000 – 1 999 999) /ml	20,8 %
Počet vzoriek >2 000 000 /ml	20,1 %

Na obrázku č. 1 je zobrazená dynamika zmeny PSB za sledované obdobie v bazénových vzorkách (n = 198) SKoM u vybraného producenta (Horný Hričov; stádo cca 60 kôz, krížence plemien Slovenská biela, Alpínska a Anglonúbijská koza; kozie mlieko spracováva vo vlastnej malej mliekarni na rôzne mliečne výrobky).

Z obrázku č. 1 vyplýva, že PSB dosahovali vyššie hodnoty na konci a začiatku sezóny. Najvyššia nameraná hodnota PSB sa blížila k hranici 3 000 000 /ml. Uvedený producent však ani pri takýchto vyšších hodnotách PSB nepozoroval pri spracovaní kozieho mlieka jeho zhoršené technologické vlastnosti. Zistené priemerné hodnoty PSB boli nižšie (geometrický priemer 600 000 /ml, resp. aritmetický priemer 744 000 /ml) ako tomu bolo v rámci nami vykonaného plošného monitoringu z rôznych regiónov Slovenska. Podobne aj mikrobiologická kvalita SKoM u tohto dodávateľa bola veľmi dobrá, keď geometrický priemer testovaného súboru vzoriek dosiahol hodnoty < 10 000 KTJ/ml, resp. aritmetický priemer 43 000 KTJ/ml.

Obrázok č. 1, PSB v surovom kozom mlieku u vybraného producenta



ZÁVER

Na základe dosiahnutých výsledkov možno konštatovať, že hygienická kvalita produkovaného surového kozieho mlieka je na Slovensku pomerne na dobrej úrovni. V bežne produkovanom mlieku neboli v podstate preukázané žiadne RIL. Väčšina analyzovaných vzoriek tiež spĺňala legislatívne limity, čo sa týka CPM.

PSB (ako nepovinného ukazovateľa kvality) dosahovali vyššie hodnoty, ktoré sú ale typické pre tento druh mlieka. Ďalšie zaoberanie sa s týmto ukazovateľom, ako indikátorom pre výber mlieka na ďalšie spracovanie a pre manažment zdravotného stavu dojných stád, má ale určite zmysel. Vyžaduje si hlbšie skúmanie vo vzťahu k technologickej kvalite SKM a z neho vyrábaných mliečnych výrobkov, ako aj z hľadiska eventuálnej prítomnosti mikroorganizmov podieľajúcich sa na vzniku zápalov vemien kôz.

Prezentované výsledky hygienickej kvality SKM nájdu svoje reálne uplatnenie aj v praxi, keď budú využité pri zavádzaní modernej rutinnej metódy na princípe laserovej prietokovej cytometrie v akreditovanom a autorizovanom SL EXAMINALA vo Výskumnom ústave mliekarenskom, a.s. v Žiline. Tým sa pre prvovýrobcov a spracovateľov SKM na Slovensku stanú výsledky o jeho kvalite ešte dostupnejšími, pretože doba skúšania mlieka sa skráti zo 72 hodín na niekoľko minút.

POĎAKOVANIE

Táto práca vznikla za podpory projektu APVV-20-0204 „Metóda pre hodnotenie mikrobiologickej kvality surového kozieho mlieka a aplikácia autochtónnych kyslomliečnych baktérií pri spracovaní nebovinných mliek.“

POUŽITÁ LITERATÚRA

1. BOGDANOVIČOVÁ, K. et al. Microbiological quality of raw milk in the Czech Republic. In *Czech Journal of Food Sciences*, 2016, vol. 3, p. 189-196.
2. Nariadenie Európskeho parlamentu a Rady (ES) č. 853/2004 z 29. apríla 2004, ktorým sa ustanovujú osobitné hygienické predpisy pre potraviny živočíšneho pôvodu.
3. NOVOTNÁ, L et. al. Methodology of under descrition and the effect on somatic cell count. in Czech White Shorhaiered goat breed. In *Medycyna Weterynaryjna*, 2018, vol. 74, p. 497-500.
4. PMO (2007): Grade „A“ Pasteurized milk ordinance. Public health Service, FDA, U. S. Department of health and Human Services, Washington, DC http://www.michigan.gov/documents/mda/MDA_DP07PMOFinal_251324_7.pdf Accessed Dec. 18, 2008

5. PODHORECKÁ, K. et al. Somatic cell count in goat milk: An indirect quality indicator. In *Foods,* 2021 vol. 10, 1046. doi: 10.3390/foods.10051046
6. STN 57 0531. Dôkaz a stanovenie antibiotík a sulfónamidov v surovom mlieku a tepelne ošetrenom mlieku, Úrad pre normalizáciu, metrológiu a skúšobníctvo Slovenskej republiky, 2001
7. STN EN ISO 13366-2. Mlieko. Stanovenie počtu somatických buniek. Časť 2: Návod na obsluhu zariadenia na elektronické počítanie častíc fluorescenčnou optickou metódou (ISO 13366-2: 2006), Úrad pre normalizáciu, metrológiu a skúšobníctvo Slovenskej republiky, 2007
8. STN EN ISO 4833-1. Mikrobiológia potravinárskeho reťazca. Horizontálna metóda na stanovenie počtu mikroorganizmov. Časť 1: Metóda počítania kolónií kultivovaných pri 30 °C zalievaním inokula (ISO 4833-1: 2013), Úrad pre normalizáciu, metrológiu a skúšobníctvo Slovenskej republiky, 2014
9. STN EN ISO/IEC 17 025. Všeobecné požiadavky na kompetentnosť skúšobných a kalibračných laboratórií (ISO/IEC 17025: 2017), Úrad pre normalizáciu, metrológiu a skúšobníctvo Slovenskej republiky, 2018

Kontaktná adresa: Tomáška Martin, Výskumný ústav mliekárenský, a.s., Dlhá 95, 010 01 Žilina, Slovak Republic; E-mail: tomaska@vumza.sk

POTRAVINY ROSTLINNÉHO PÔVODU – AKTUÁLNE TRENDY

PLANT ORIGIN FOOD – CURRENT TRENDS

Tremlová Bohuslava

Ústav hygieny a technologie potravin rostlinného původu, Veterinární univerzita Brno, Palackého tř. 1946/1, 612 42 Brno, Česká republika

ABSTRACT

Raw materials and food of plant origin are an important part of fulfilling the Farm to Fork strategy with regard to sustainable production, processing and consumption of food, reduction of food loss and waste. The meet the current demands of consumers with regard to lifestyle, health support and environmental protection.

Key words: plant origin food, technology, production, consumption, development

ÚVOD

Na vývoj výroby potravin mají vliv nové poznatky vědy a výzkumu, změny ve společnosti, ekonomice i stravovací návyky lidí. Nedávná doba sebou přinesla prohloubení znalostí o fyziologii výživy, nové technologie, postupy a typy výrobků (funkční potraviny, konvenience, potraviny na bázi geneticky modifikovaných organismů a biopotraviny), ale také nové nároky spotřebitelů. Změny v pracovní době (flexibilní, home office), rostoucí počet single domácností a další faktory vedou ke změnám ve vzorcích stravování. Mnoho lidí si uvědomuje důležitost svého zdraví, které je se stravováním úzce spjato. Spotřebitelé jsou také vnímavější k otázkám životního prostředí.

AKTUÁLNÍ STRATEGIE V OBLASTI POTRAVIN (nejen rostlinného původu)

Strategie „od zemědělce ke spotřebiteli“ (Farm to fork) pro spravedlivé, zdravé a ekologické potravinové systémy

Farm to Fork strategie je součástí European Green Deal, tj „Zelené dohody pro Evropu“, jejímž cílem je se stát prvním klimaticky neutrálním kontinentem. Farm to Fork strategie má za cíl vytvořit férový, zdravý a environmentálně udržitelný potravinový systém, který bude:

- mít neutrální nebo pozitivní dopad na životní prostředí
- zmírňovat změny klimatu a přizpůsobit se jeho změnám
- bojovat se ztrátou biodiversity

- zajistí potravinovou bezpečnost, veřejné zdraví a měl by zajistit, aby každý jedinec měl přístup k výživné, zdravé, bezpečné a udržitelné stravě
- zachovávat cenovou dostupnost potraviny při spravedlivých výnosech, podpora konkurenceschopnosti dodavatelského sektoru a podporovat spravedlivý obchod

V České republice navazují

Strategie bezpečnosti potravin a výživy 2030

Základní strategický dokument ČR o bezpečnosti potravin určuje základní priority státu v oblasti bezpečnosti potravin a výživy. Bezpečnost potravin je základním principem evropské potravinové politiky, který zaručuje ochranu zdraví spotřebitelů. Bezpečnost potravin zahrnuje hygienu výroby potravin, kontrolní mechanismy, monitoring potravních řetězců a bezpečnost krmiv a má logický přesah i do výživy populace.

Strategický rámec cirkulární ekonomiky ČR 2040

Cílem strategického rámce je dosáhnout toho, aby byla Česká republika dlouhodobě odolná vůči budoucím environmentálním hrozbám včetně změny klimatu a úbytku biodiverzity a rozvíjela celkově udržitelný společenský systém. Podstatou je udržet hodnotu výrobků, materiálů a zdrojů (včetně potravinových surovin a potravin) tak dlouho v ekonomickém cyklu, jak je to jen možné a minimalizovat tvorbu odpadu.

Koncepce environmentální bezpečnosti ČR 2021−2030 s výhledem do roku 2050.

Významný strategický dokument, který se věnuje přírodním a technologickým rizikům spojeným s životním prostředím. Některá rizika pro environmentální bezpečnost jsou v přímé souvislosti s potravinovým řetězcem, a naopak produkce potravin je spojena se vznikem značného množství produktů, které negativně ovlivňují životní prostředí. Všechny tyto aspekty se projevily v rostoucí spotřebě potravin rostlinného původu.

AKTUÁLNÍ POTRAVINÁŘSKÁ LEGISLATIVA

Evropská legislativa

NAŘÍZENÍ KOMISE (EU) 2021/382 ze dne 3. března 2021, kterým se mění **přílohy** nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) **č. 852/2004 o hygieně potravin**, pokud jde o:

- řízení potravinových alergenů
- přerozdělování potravin a
- kulturu bezpečnosti potravin

Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1333/2008 o potravinářských přídatných látkách

- Nařízení Komise (EU) 2022/63 - zákaz oxidu titaničitého (E 171) v potravinách
- Nařízení Komise (EU) 2022/141 - uhličitany sodné (E 500) a draselné (E 501)
- Nařízení Komise (EU) 2022/1023 - ovesný lecitin (E 322a) (kakaové a čokoládové výrobky)
- Nařízení Komise (EU) 2022/1037 - glykolipidy (E 246) (nápoje)

Nařízení Komise (ES) č. 1881/2006, kterým se stanoví maximální limity některých kontaminujících látek v potravinách

- Nařízení Komise (EU)2021/2142 - maximální limity opiových alkaloidů (maková semena)
- Nařízení Komise (EU)2022/1364 - maximální limity kyseliny kyanovodíkové
- Nařízení Komise (EU) 2022/1370 - maximální limity ochratoxinu A
- Nařízení Komise (EU) 2022/1393 - maximální limity delta-9-tetrahydrokanabinolu

V České republice dále

Zákon č. 174/2021 Sb., kterým se mění zákon č. 110/1997 Sb., o potravinách a tabákových výrobcích a o změně a doplnění některých souvisejících zákonů, ve znění pozdějších předpisů,
a další související zákony

Hlavní změny:

- zákaz dvojí kvality potravin
- zpřesnění oznamovací povinnosti provozovatele potravinářského podniku
- uvádění složení a alergenů na regálové etiketě
- úprava pravidel označování výrobce
- úprava pravidel nakládání s rozbalenými potravinami
- úprava pravidel pro vyřazování potravin
- zpřísnění podmínek pro používání označení „Česká potravina“,
- zpřesnění mechanismu pro poskytování potravin neziskovým organizacím maloobchodem, úprava pravidel kontroly

- *Vyhláška č. 56/2022 Sb., kterou se mění vyhláška č. 231/2016 Sb., o odběru, přípravě a metodách zkoušení kontrolních vzorků potravin a tabákových výrobků, ve znění vyhlášky č. 78/2018 Sb.*
- *Vyhláška č. 397/2021 Sb., o požadavcích na konzervované ovoce a konzervovanou zeleninu, skořápkové plody, houby, brambory a výrobky z nich a banány*

TRENDY V POTRAVINÁŘSKÝCH TECHNOLOGIÍCH

Biotechnologie jako technické aplikace či postupy používající biologický systém, účinný živý organismus nebo jeho části, k výrobě nebo modifikaci produktu – v produkci potravin rostlinného původu se jedná typicky o výrobu piva. Intenzivně se rozvíjejícím odvětvím biotechnologie jsou genetické manipulace u surovin a produktů rostlinného původu, zejména klasický přenos genů mezi organismy. Především v důsledku velmi přísné regulace transgenoze v EU jsou vyvíjeny nové techniky šlechtění rostlin pomocí manipulace s geny – nové techniky šlechtění (NBT). Biotechnologické postupy se uplatňují i při úpravě potravinářských odpadů ze zpracování potravin rostlinného původu.

Produkty získané **nanotechnologiemi** mají v oblasti potravin rostlinného původu uplatnění hlavně nepřímé – v prostředcích na ochranu rostlin, v doplňcích stravy, v potravinářských přídatných látkách, v senzorech a v materiálech přicházejících do styku s potravinami. Jsou velkým technologickým příslibem, ale na druhé straně nejsou známá ještě všechna rizika. Je třeba rozlišovat situace, kdy byly produkty (potraviny, obaly) vyrobeny pomocí nanotechnologií anebo kdy byly nanočástice přidány pro splnění účelu. Nanočástice mohou vznikat i při obvyklých technologických procesech. Významná je i otázka identifikace nanočástic v produktu.

Digitalizace v potravinářství

Investice do digitalizace procesů specifických pro potravinářský sektor má podstatný vliv na ekonomiku firmy a také relativně rychlou návratnost. Jako klíčová digitalizační technologie se v potravinářském průmyslu jeví Internet of Things (IoT), která s podporou senzorů přináší potravinářským podnikům takovou šíři a hloubku informací, jež významně změní způsob jejich podnikání v celém dodavatelském řetězci. Senzory mohou být využívány k monitorování výkonu zařízení či identifikaci jakýchkoliv anomálií, které mohou předznamenat výpadek či potřebu údržby. Speciálně pro firmy v segmentu potravinářské logistiky dodávající čerstvé potraviny, které vyžadují speciální chladicí zařízení či kontrolu vlhkosti, pak dokážou senzory monitorovat podmínky během přepravy a zasílat je v reálném čase.

Automatizace v potravinářství

Nejvyšším stupněm digitalizace výroby v potravinářském průmyslu je plná automatizace nejen plánování výroby a řízení výrobního procesu, ale také veškerých jednotlivých výrobních operací. Mezi řadu výhod plné automatizace potravinářských provozů patří především možnost vyladění výroby na velmi vysokou úroveň produktivity, zrychlení

celého výrobního procesu, navýšení kapacity produkce, detailní dokumentace a v neposlední řadě také minimální bezpečnostní rizika, především z hlediska možné kontaminace finálních produktů. Moderní informační systém přináší také silné nástroje na zajištění bezpečnosti a jakosti vyráběných potravin. Během samotné výroby je možné řídit každý krok technologického procesu a zajistit, že budou použity správné suroviny ve správném množství a že budou dodrženy odpovídající postupy, jako je například průběh tepelného opracování, fermentace, chlazení atd. Kontrolní systémy mohou také včas upozornit na případné odchylky od požadovaného procesu (způsobené například lidskou chybou) a navrhnout jejich řešení. **Výrobci potravin ve svých podnicích využívají průmyslové roboty, kteří** zvládnou řadu složitých specifických operací od měření hlávkových salátů přes rýhování housek až po plnění šálků obsahem. Průmysloví roboti na automatizovaných výrobních linkách dosahují velmi vysoké frekvence manipulace i s malými kousky potravin, jako jsou např. čokolády a sušenky. Zajímavé je využití vysoce technických prodejních automatů, které vyrábějí produkt přímo na místě – saláty, smoothies, čerstvá šťáva z ovoce apod.

Hydroponické farmy mohou mít podobu dnes už běžně dostupných domácích pěstebních boxů, kde stačí zasadit semínko a na mobilní aplikaci spustit některý z přednastavených programů pro různé typy rostlin, který už dohlédne na jejich zdárný růst (včetně automatického zalévání, hnojení, osvětlení, nastavení správného klimatu a monitoringu přes cloud). Nebo mohou mít podobu a velikost upravených přepravních kontejnerů. Ty už nabízejí sklizeň odpovídající produkci dvouakrové farmy. Oproti stejnému objemu rostlin pěstovaných na poli ovšem neuvolní ani desetinu skleníkových plynů a spotřebují o 90 % méně vody. Vrcholnou formou hydroponické pěstírny jsou mnohapatrové vertikální farmy. Ty umožňují pěstování potravin i na malém prostoru uprostřed zalidněných oblastí.

TRENDY VE VÝROBĚ POTRAVIN ROSTLINNÉHO PŮVODU

Výrobci potravin reagují zejména na **požadavky spotřebitelů a celospolečenské potřeby** (obezita). Jídlo se stalo životním stylem, zdrojem zážitků a někdy i způsobem sebevyjádření.

Dochází ke změnám receptur výrobků, tzv. **reformulaci složení potravin**, tak aby přinesla zlepšení z hlediska zdravotního a výživového, ale i senzorického, často jde o snížení obsahu cukru, soli a tuku. Tyto aktivity mohou jít i cestou inovací, tedy uvedením na trh nového výrobku s vylepšeným složením. Výrobce se však musí zároveň vyrovnat s legislativními požadavky, které upravují zejména informace na výrobku, týkající se složení, či změn složení.

TRENDY VE SPOTŘEBĚ POTRAVIN

Lidé (zejména mladší generace) se stále více zajímají o otázky životního prostředí, zdraví, společnosti a etiky. Jsou si vědomi silné souvislost mezi zdravím, kvalitou života a potravinami. Spotřebitel požaduje potraviny čerstvé, bezpečné, s rychlou přípravou, funkční (s obsahem zdraví prospěšných složek), získané udržitelným způsobem a také různé alternativy ke klasickým potravinám (mléko X nápoje z mandlí, ovsa, máku…). K déletrvajícím trendům patří mírně **stoupající** sumární **spotřeba obilovin, ovoce a zeleniny** (zvláště čerstvých, místních i exotických druhů), mléka a mléčných produktů, a naopak pokles spotřeby cukru a cukrovinek a alkoholických nápojů. Je zřejmý nárůst poptávky po potravinách produkovaných v systému ekologické nebo integrované produkce, s tím roste zájem výrobců a prodejců o tyto potraviny a také o lokální produkty. Existuje také významná skupina spotřebitelů, kteří se vyhýbají například lepku a laktóze. Vegetariánství (vč. veganství, konzumace raw produktů apod.) se stává významným stravovacím proudem, a to přináší zvyšující se zájem o potraviny rostlinného původu, např. o rostlinné nápoje, náhražky masa, čistě zeleninová jídla apod.

ZÁVER

Potravinářský průmysl zaznamenává velké změny v chování spotřebitelů související s odpovědnější a udržitelnější spotřebou, s tím souvisí zájem o potraviny rostlinného původu, o rostlinné alternativy živočišných produktů a také o produkty z netradičních surovin rostlinného původu. Zdá se, že příklon k rostlinné stravě není jen krátkodobý trend, ale trvalá změna stravování společnosti.

Kontaktná adresa: Tremlová Bohuslava, Department of Plant Origin Food Sciences, University of Veterinary Sciences Brno, Palackého tř. 1946/1, 612 42 Brno, Czech Republic; E-mail: tremlovab@vfu.cz

PŘIROZENÝ INHIBIČNÍ POTENCIÁL MLÉKA

NATURAL INHIBITORY POTENTIAL OF MILK

Vorlová Lenka[1], Bartáková Klára[1], Navrátilová Pavlína[1], Hanuš Otto[2], Nejeschlebová Hana[2], Samková Eva[3], Dluhošová Sandra [1]

[1]Ústav hygieny a technologie potravin živočišného původu a gastronomie, Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární univerzita Brno, Česká republika

[2]Výzkumný ústav mlékárenský Praha, Česká republika

[3]Jihočeská univerzita České Budějovice, Česká republika

ABSTRACT

Health safety is a key expected attribute of food and a condition for its placing on the market. At the same time, it is an essential parameter of food quality. The whole issue of related parameters is more extensive for food of animal origin, which has many specifics, not only in terms of their extraction, but also in terms of processing technologies. All this complex complex of activities can be influenced by inhibitory, biologically active substances, of exogenous or endogenous origin.

It is clear from a number of studies that the relationship of especially the quantitative representation of endogenous milk inhibitory substances is in negative correlation with the use of antibiotics in dairy farming and is a key issue for reducing all related negative impacts of residues of exogenous inhibitory substances on the health of human and animal populations. Significant complications in the production of dairy products are also not negligible.

In milk, as far as endogenous protective factors are concerned, these are mainly substances belonging to the soluble component of udder immunity: lactoferrin, lysozyme, lactoperoxidase, system, Ig, alpha-lactalbumin, proteoso-peptone and xanthine oxidase. Particularly interesting is the use of lactoferrin in the promotion and restoration of health, especially in the human population, but also the rapid determination of lactoferrin concentration as early indicator of mastitis.

Keywords: milk, lysozyme, lactoferrin, lactoperoxidase system

ÚVOD

Zdravotní nezávadnost je klíčovým očekávaným atributem potravin a podmínkou pro jejich uvádění na trh. Současně jde o zásadní parametr jakosti potravin. Celá problematika souvisejících parametrů je obšírnější u potravin živočišného původu, které mají mnohá

specifika, nejen z pohledu jejich získávání, ale i technologií zpracování. Celý tento složitý komplex činností může být ovlivněn inhibičními, biologicky aktivními látkami, exogenního či endogenního původu.

Z mnoha pohledů je problematická pouze skupina inhibičních látek exogenního původu, resp. reziduí veterinárních léčiv a sanitačních prostředků. Výsadou některých potravin živočišného původu je však přítomnost protektivních endogenních biologicky aktivních sloučenin, které přirozeně, po určitou dobu zajišťují jejich ochranu, zejména proti mikrobiální zkáze. Tyto sloučeniny jsou již řadu let studovány a postupně široce využívány. Mezi potraviny živočišného původu, které obsahují biologicky aktivní sloučeniny s řadou benefitních vlastností, patří vedle mléka i vejce. Z hlediska významu těchto sloučenin rozhodně první místo zaujímá mléko.

Endogenní inhibiční látky v mléce

Mléko je vybaveno širokým spektrem biologicky aktivních (ochranných) látek, které se do mléka dostávají nejen biosyntézou, ale i biodifuzí. Jedná se o látky bílkovinné povahy: laktoferin, lysozym, laktoperoxidázový systém, xantinoxidáza, imunoglobuliny, alfa-laktalbumin a proteoso-pepton. Účelem jejich přítomnosti v mléku je ochrana mléčné žlázy před infekcí, zvýšení obranyschopnosti mláděte a pozitivní ovlivnění mikrobiální jakosti (mikrobiomu) čerstvě nadojeného mléka.

Laktoferin

Nejvíce zájmu je věnováno, v kontextu výše uvedeného, syrovátkové bílkovině laktoferinu, zejména v kontextu alternativy pro léčbu mastitid. Jedná se o železo vázající multifunkční glykoprotein, který působí jako klíčová složka prvotní imunitní obrany savců proti atakům vnějšího prostředí, je považován za významnou složku vrozené imunitní odezvy. Je syntetizován epiteliálními buňkami mléčné žlázy (a dalšími exokrinními žlázami), zejména vysoká koncentrace se nachází v sekundárních granulích neutrofilů. U laktujících dojnic laktoferin snižuje riziko mastitid a působí jako selektivní antibiotikum. Laktoferin, vedle dalších bílkovin, mezi které patří mléčný amyloid A, haptoglobin a katelicidin je dlouhodobě zkoumán jako alternativní biomarker zejména subklinických mastitid.

Bovinní laktoferin vykazuje vysoký stupeň homologie s humánním laktoferinem (77 %). Nejvíce popsána je jeho antimikrobiální aktivita. Širokospektrální antimikrobiální efekt laktoferinu je možno vysvětlit několika mechanismy:

- izoluje železo nebo zbavuje bakterie železa (u některých patogenů základní faktor pro expresi růstových a virulentních faktorů),

- narušuje bakteriální metabolismus vazbou na strukturu bakteriální membrány→ porušuje její funkci a integritu,
- k některým virulentním faktorům bakterií má aktivitu podobnou proteázové antimikrobiální aktivitě,
- indukuje apoptosu hostitelských buněk některých intracelulárních patogenních baktérií,
- působí preventivně proti přilnutí bakterií k hostitelské buňce (patrně oligomanosidglykan váže bakteriální adhesiny), a tak preventivně brání interakci s buněčnými receptory hostitele.

Nejnovější studie přináší informace o vztahu mezi vrozenými imunitními faktory, tedy i laktoferinu a mikrobiotou normálního mléka, kde byla nalezena pozitivní korelace. Další nové studie se zabývají polymorfismy genu laktoferinu spojené s klinickou mastitidou.
Laktoferin v kombinaci s lysozymem vykazuje silnější bakteriostatické účinky proti *Pseudomonas aeruginosa*, *Listeria monocytogenes* a *E. coli*, methicillin-rezistentní *Klebsiela pneumoniae, Staphylococcus aureus.* Laktoferin taktéž inhibuje replikaci širokého spektra RNA a DNA virů, zahrnujíc herpes simplex virus, virus hepatitídy B a C, humánní cytomegalovirus, hantavirus, HIV, rotaviry, polioviry, adenoviry, a humánní papillomavirus.
Laktoferin má schopnost podporovat proliferaci, diferenciaci a aktivaci buněk imunitního systému a posilovat imunitní odpověď. Na druhou stranu laktoferin působí jako protizánětlivý faktor. Díky své antimikrobiální aktivitě a schopnosti vázat složky bakteriálních buněčných stěn (LPS) nebo jejich receptory, může laktoferin zabránit rozvoji zánětu a následnému poškození tkáně způsobenému uvolňováním prozánětlivých cytokinů a reaktivních forem kyslíku.

Podobně jako u zánětu má laktoferin schopnost modulovat produkci cytokinů u rakoviny a může vyvolat apoptózu a zástavu růstu nádoru in vitro, což rozšiřuje význam této sloučeniny pro humánní populaci. Jeho použití v léčbě onkologických pacientů je intenzivně studováno. Z publikovaných studií je zřejmé, že laktoferin může být internalizován do buněčného jádra, místa účinku většiny léků proti rakovině (používá se jako cílící ligand k dosažení aktivního dodávání protirakovinných léků do nádorové tkáně). Pokud jde o klinické studie, perorální konzumace 3 g/den bovinního laktoferinu významně ovlivnila růst adenomatózních polypů v tlustém střevě. Taktéž bylo prokázáno, že podávání lidského rekombinantního laktoferinu zvýšilo přežití v průměru 65 % pacientů s pokročilým stadiem nemalobuněčného karcinomu plic.

Lysozym

Další komponentou ochranného systému mléka je lysozym, nativní enzym, který je kombinací obou typů („c“ i „g“) s 3D strukturou podobnou alfa-laktalbuminu. Lysozym je považován za endogenní antibiotikum.

Kromě lýzy bakteriální buněčné stěny grampozitivních baktérií, vedoucí ke snížení bakteriální rezistence a odumírání (muramidasa → katalyzuje hydrolýzu β-(1→4)vazby mezi N-acetylmuramidovou kyselinou a N-acetylglukosaminem bakteriálních peptidoglykanů), působí synergicky v baktericidním působení s laktoferinem a imunoglobuliny.

Lysozym vykazuje i další aktivity, a to inaktivací některých virů, zvýšení efektu antibiotik, vykazuje protizánětlivý, antihistaminový, antitumorózní účinek; aktivace imunitních buněk. Při zahřátí na 75 °C/15 min. nebo 80 °C/15 s zůstává více než 75 % aktivity. Koncentrace lysozymu se liší u jednotlivých species. V mléce humánním je jeho koncentrace vyšší než v mléce bovinním (mléko kravské 0,4 mg/L; mléko humánní 0,4g/L), koncentrace stoupá v kolostru, současně se zvýšeným počtem somatických buněk, tedy i v mléce mastitídním.

Laktoperoxidáza (resp. laktoperoxidázový systém)

Do ochranného systému mléka patří i laktoperoxidáza, nativní enzym se širokou substrátovou specifitou, obsahující hemové železo, s vysokou koncentrací v bovinním mléce. Katalyzuje štěpení peroxidu vodíku na kyslík. Následně vznikající hypothiokyanátový anion, resp. hypothiokyanátová kyselina oxiduje sulfhydrilové skupiny mikrobiálních enzymů a jiných membránových proteinů, což vede k usmrcení či inhibici růstu širokého spektra mikroorganismů (bakterií, virů, hub, plísní a protozoí). Bakteriostatické účinky byly prokázány u *Listeria* spp., *Staphylococcus* spp. a *Streptococcus* spp.; baktericidní u *E.coli, Salmonella* spp., *Pseudomonas* spp., *Campylobacter* spp. a *H. pylori*. V mastitídním mléce je aktivita laktoperoxidázy zvýšená, avšak není tak účinná jako v mléce od zdravých dojnic kvůli vyšší koncentraci redukčních činidel a vyšší aktivitě katalázy.

Laktoperoxidázový systém je možno dle FAO/WHO použít pro konzervaci syrového mléka v zařízeních např. rozvojových zemí, kde není možné chlazení.

V neposlední řadě aktivita enzymu slouží jako průkaz vysoké pasterace mléka.

Novější studie uvádí i další látky mléka, které vykazují antibakteriální účinky, např. alfa-laktalbumin, proteoso-pepton a xantinoxidáza.

ZÁVĚR

Z řady studií je zřejmé, že vztah zejména kvantitativního zastoupení endogenních inhibičních látek mléka je v negativní korelaci s používáním antibiotik v chovu dojnic a je

klíčovou otázkou pro snížení všech souvisejících negativních dopadů reziduí exogenních inhibičních látek na zdraví humánní i animální populace.

Zejména zajímavé je použití laktoferinu v podpoře a obnově zdraví zejména humánní populace, ale i rychlé stanovení koncentrace laktoferinu jako časného indikátoru mastitíd.

PODĚKOVÁNÍ

Práce vznikla za finanční podpory projektu NAZV QK21010326.

POUŽITÁ LITERATURA

Dostupná u autora.

Kontaktní adresa: prof. MVDr. Lenka Vorlová, Ph.D., Ústav hygieny a technologie potravin živočišného původu a gastronomie, Fakulta veterinární hygieny a ekologie Veterinární univerzita Brno, Palackého tř. 1946/1 612 42 Brno, Česká republika; E-mail: vorloval@vfu.cz

SÚČASNÝ POKROK V ANALÝZE MIKROBIOTY SYROV

RECENT ADVANCES IN CHEESE MICROBIOTA ANALYSIS

Zagorchev Lyuben [1], Doytchinov Vesselin [1], Posheva Vilma [1], Teofanova Denitsa [1], Dimitrov Tsvetan [2], Dimov Svetoslav G. [1]

[1]Faculty of Biology, Sofia University „St. Kliment Ohridski“, 8 Dragan Tsankov blvd., 1164, Sofia, Bulgaria

[2]Non-governmental Organization “Green Cheese”, 5725, Tcherni Vit, Bulgaria

ABSTRACT

Cheese represents a unique ecosystem with a vast variety of microorganisms, contributing to its formation, and organoleptic properties. The microbial composition depends strongly on the milk source, method of production, and the microbiome of the surrounding environment in place of production. Major taxa include lactic acid bacteria and actinobacteria, along with several fungal genera. Although most of them are considered beneficial to human health, there is also a slight possibility for the development of pathogens, causing foodborne diseases. Therefore, it is of crucial importance to characterize the microbiota, especially of traditional and artisanal cheese products, in order to confirm safety and deepen the knowledge of the complex process of cheese production and to preserve certain local products with a limited scale of production. The current review summarizes the knowledge on cheese microbiota composition and formation, with a focus on contemporary molecular methods for the identification and characterization of microbial diversity.

Keywords: cheese, lactic acid bacteria, metagenomic analysis, microbiota, next-generation sequencing

1. OVERVIEW OF CHEESE PRODUCTION

Cheesemaking begins with the selection of milk. The milk is stored at 4°C, sometimes for days, and before being used in cheese making is usually heated at 50°C for 10-20 min to prevent some physicochemical changes that occur from the low temperatures. This raw milk is used directly for cheese making without a pasteurization step in many traditional and artisanal cheese products. In these cheeses, the wild microflora, presented in the milk is involved in the subsequent acidification and ripening steps (Tilocca et al., 2020). Raw milk is rarely used on an industrial scale, because the varying microflora may result in different end products and because of the possible presence of potential pathogens. In all cheeses, the initial step in the

processing of the milk is acidification, usually done *in situ* by adding a starter culture of homofermentative lactic acid bacteria (LAB) to the pasteurized milk (Bintsis, 2018). When using raw milk this step may be missing and acidification relies on the native LAB in milk. In the case of milk prepared below 40°C the LAB used are a mixed culture of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* and/or *L. lactis* subsp. *cremoris*, and for heating above 40°C, *Streptococcus thermophilus* and/or *Lactobacillus* spp. (*L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. delbrueckii* subsp. *lactis* or *L. helveticus*). Mesophilic *Leuconostoc mesenteroides* are also used. The correct acidification rate and time are key and influence most subsequent aspects of production, especially coagulation. The pH of the milk at the end of this stage is 4.6-5.1. Factors that influence acidification are the amount and species composition of added LAB, and the method of salting (Fox et al., 2004).

The next step is the coagulation of the milk protein casein to a gel (crosslink), which also includes the fat (Fox and McSweeney, 2017). It is achieved by limited proteolysis by special enzymes, acidification to pH 4.6 or acidification to pH 5.2 with heating to 90°C. The enzymes used are from the so-called rennet, which is a complex mixture of enzymes produced in the stomach of young ruminants. The liquid phase of milk that is not incorporated into this coagulant is called whey. After coagulation, the whey is separated from the coagulant in a process called syneresis, which is basically a dehydration process that produces the final curd of the cheese. The last operation is salting, which also contributes to syneresis (the shrinkage of gels accompanied by the separation of the liquid.) However, in some cheeses, the milk itself is salted at the beginning. Different salting techniques exist, but are broadly divided into dry salting and salting with brine (a salty water solution). Finally, the ripening step can range from two weeks (e.g. Mozzarella) to two years (e.g. Parmigiano-Reggiano) and is generally inversely proportional to the amount of moisture in the cheese. This step gives the cheese its characteristic organoleptic qualities and involves the catalytic activity of the coagulant, enzymes present in the raw milk (lipoprotein lipases, plasmin), and micro-organisms in the starter and secondary micro-organisms. Bacteria and fungi that enter the cheese from the raw milk, after pasteurization, from the environment during the ripening process or purposely added as a second starter are involved in ripening. The main biochemical changes associated with ripening are the metabolization of residual lactose (also citrate and lactate in some cheeses), lipolysis, and proteolysis. Secondary biochemical changes include the catabolism of the resulting amino acids, fatty acids, and lactic acid (to CO_2 and H_2O) or propionic, acetic, and butyric acid (to CO_2 and H_2) (Fox et al., 2017). There are numerous classification of cheese and no universal one exist, but probably the most simple and accurate is based on the moisture content

(McSweeney et al., 2017) and dividing cheese into very hard (< 25% moisture), hard (between 25 and 36% moisture), semihard (between 36 and 40% moisture) and soft (> 40% moisture).

2. CHEESE MICROBIOTA

Cheese microbiota consists of numerous bacterial and fungal taxa, which may differ in origin, in different kind of cheeses, and during the different stages of production and ripening (Gobbetti et al., 2018). Apparently, the added starter culture and the intrinsinc microbiota of the milk, especially in raw milk – produced cheese, are major factors in the establishment of the cheese ecosystem. However, the "house" microbiome, e.g., the complex microflora of the cheese-production facilities may also play a significant role in the formation of the cheese microbiota (Bokulich and Mills, 2013), by providing external microorganisms with the possibility to colonize the ripening product. All these factors provide a unique microbial composition of virtually every single traditional cheese, also determining nuances in organoleptic properties.

2.1 MAJOR BACTERIAL TAXA

Lactic acid bacteria

In the production of any type of cheese, except acid-coagulated cheeses, one of the initial steps relies on the action of mixed cultures of LAB, which convert the lactose in the milk into lactic acid. The main species involved in this process are *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus, Lactobacillus helveticus, Lactococcus lactis, Lactococcus cremoris, Streptococcus thermophilus* and *Leuconostoc cremoris* (Hayaloglu, 2016). Non-starter LAB are also involved in cheese ripening and are mainly represented by facultative, heterofermentative mesophiles, *Lacticaseibacillus casei, Lacticaseibacillus paracasei, Lacticaseibacillus rhamnosus, Lactiplantibacillus plantarum*, and *Latilactobacillus curvatus*, but obligate heterofermentative *Lactobacillaceae* members such as *Levilactobacillus brevis, Lentilactobacillus buchneri*, and *Limosilactobacillus fermentum* are also present (De Angelis et al., 2001). All genera name are adopted according to Zheng (Zheng et al., 2020). Thermophilic LAB (*L. helveticus, L. delbrueckii* subsp. *lactis*, *S. thermophilus*) are used at processing temperatures above 37°C and are characteristic of Italian and Swiss cheeses. Lactic acid bacteria also possess subtilase-like Ser proteinases in the cell envelope, capable of degrading casein and casein-derived proteins in milk (Kok and De Vos, 1994). Mesophilic and thermophilic lactobacilli, as well as *S. thermophilus*, are also involved in cheese ripening (Coolbear et al., 2008).

Some LAB such as *Lacticaseibacillus casei*, *Levilactobacillus brevis*, *S. thermophilus*, as well as *Leuconostoc mesenteroides*, *Propionibacterium freudenreichii*, some fungi and others, produce CO_2 (and sometimes H_2) on different substrates (mainly lactose, sometimes and/or

citrate) found in cheese (Mullan, 2000). This leads to specific changes in the rheological properties of the cheese, such as the appearance of "eyes" in the cheese.

Non-LAB bacteria

The genus *Halomonas* includes gram-negative, salt-tolerant bacteria identified on the surface of cheeses made from raw milk (Schornsteiner et al., 2014). Salt-tolerant species that survive brine residence have also been found to contribute to the palatability of cheese. Bacteria of this genus, including *H. venusta*, dominate the microflora of short-ripened cheeses, occur on surface-ripened cheeses and on the rind of Smear cheeses (Coton et al., 2012, Amato et al., 2012). *Staphylococcus equorum*, a gram-positive salt- and acid-tolerant bacterium is one of the dominant staphylococci of the surface microflora of Smear cheeses in the early stages of ripening (Irlinger et al., 2012). *Staphylococcus equorum* and *S. xylosus* synthesize orange-yellow pigments contributing to the orange, red, or brown coloration of the surface of smear cheeses (Bockelmann et al., 2005).

Actinobacteria

The genus *Corynebacterium* represents gram-positive, facultative anaerobes and asporogenous actinobacteria that are a significant part of the microflora of surface-ripened cheeses. *Corynebacterium variabile* and *C. casei* are the dominant species on the rind of smear cheese (Mounier et al., 2006). The genus *Brevibacterium* are gram-positive, immobile, often halophilic, catalase and proteinase-producing actinobacteria, of which *B. linens* and *B. aurantiacum* are one of the main secondary microorganisms in the production of smear cheeses and are responsible for their orange-red pigment (Motta and Brandelli, 2002). The genus *Arthrobacter* are aerobic actinobacteria that are responsible for the yellow coloration of some cheeses ripening with bacteria on the surface, and the species most represented there are *A. nicotianae, A. globiformis* and *A. Arilaitensis* (Monnet et al., 2010). This genus is found in 66% of cheese rinds. Strains of this genus are added as secondary cultures or fall on the cheese during production.

The genus *Propionibacterium* contains gram-positive, immobile, non-spore-forming actinobacteria that are added as secondary cultures most commonly in Swiss cheeses, where they are responsible for the formation of "eyes" in the interior, but also contribute to the flavor and aroma of some hard and semi-hard cheeses (Thierry and Maillard, 2002). Primarily, the species *P. freudenreichii* is used in cheese production and it is considered the most resistant to temperature stress of the entire genus. They release CO_2, H_2O, propionate and acetate during lactose metabolism due to a set of extracellular esterases.

2.2. YEASTS AND MOULDS

Besides LAB and actinobacteria, several fungal taxa are also important components of cheese microbiota. *Debaryomyces hansenii* is one of the dominant fungi involved in cheese ripening (LECLERCQ-PERLAT et al., 1999). The species is most characteristic of blue cheeses. The fungus may have a positive as well as a negative influence on the development of *Penicillium roqueforti* in blue cheeses, which is most likely strain-specific (Juszczyk et al., 2005). As a result of its low lipolytic and proteolytic activity, *D. hansenii* is not commonly used as a secondary culture, but enters the cheese during production and ripening.

Geotrichum candidum gives a velvety appearance to cheeses such as Camembert, Brie, Tellegio and others (Arteau et al., 2010) and is one of the earliest secondary organisms to colonize cheese during the ripening process. The species rapidly coats the surface of the cheese and prevents the development of undesirable fungi like *Aspergillus* and *Penicillium*. Aromatic compounds released from the fungus also possess antimicrobial properties, especially against *Listeria monocytogenes* (Naz et al., 2013). *Geotrichum candidum* is frequently identified in raw milk [159].

Of the order Mucorales, six species of the genus *Mucor* are found in cheeses [85], especially in semi-hard types and surface Smear cheeses [73]. Of these six species, *M. fuscus* and *M. lanceolatus* contribute to the color of cheese with a variety of mycelial color and asexual spores, but most often the color is gray. *Mucor circinelloides* has been described as a producer of red pigment (β-carotene) [86].

Moulds of the genus *Penicillium* are the main moulds purposely added as secondary starter cultures due to their positive effect on ripening [1]. They are also found in raw milk [88][73]. *Penicillium roqueforti* is added to blue cheeses and forms the characteristic blue 'veins'. This species has high genetic diversity and therefore strains with different shades of green and even white or brown conidia have been identified [91]. *Penicillium roqueforti* catabolizes lactic acid, resulting in an increase in pH and softening of the cheese [92]. It also releases ammonia and other volatiles during the hydrolysis of casein [92]. Typically, selected strains of *P. roqueforti* are inoculated directly into milk. *Penicillium camemberti* catabolizes the lactic acid in cheeses that mature with moulds such as Camembert and Brie to CO_2 and H_2O. It is the dominant mould on the surface of these cheeses.

Kluyveromyces lactis is a typical yeast for cheeses with ripening moulds on the surface [90] but also for the rind of smear cheeses [37][73]. The main characteristic of this species is the ability to ferment lactose and therefore it is commonly found in dairy products and not only in cheeses. It has also been documented to produce sulphur compounds contributing to the aromatic qualities of cheese [115]. *Yarrowia lipolytica* is commonly found on blue cheeses and cheeses

that ripen with moulds on the surface [37][73][166] and is even capable of displacing the other two dominant species on these cheeses, *D. hansenii* and *G. candidum* [58]. Its main contribution to ripening is its exceptional lipolytic activity (the highest of all cheese moulds) and production of volatile sulphur compounds [76][167].

3. BENEFITS OF CHEESE CONSUMPTION

The complex microbiota of cheese products is considered to possess a substantial beneficial health effect, either as a probiotic or due to the synthesis of a variety of biologically active peptides. Cheese products are a common source and delivery system of important probiotic bacterial strains, and may support viable probiotic microorganisms for an extended period of time, with significant variability between different types of cheese (Karimi et al., 2011). Bioactive peptides are usually released during cheese ripening, mainly as a result of the proteolytic activity of lactic acid bacteria on milk casein. These include peptides, up to 20 amino acids in sequence, with antibacterial, immunomodulatory, anti-hypertensive, antioxidant, and mineral-binding properties (Baptista and Gigante, 2021). Anti-hypertensive peptides were isolated from various cheese products, with a strong inhibitory activity on the angiotensin I-converting enzyme (ACE; peptidyldipeptide hydrolase, EC 3.4.15.1). For example, a thorough survey of several different kinds of cheese revealed the isolation of four ACE-inhibitory peptides with lengths between 9 and 13 amino acids and origin from α_{s1}-casein and β-casein (Saito et al., 2000). Similar peptides were identified in a variety of both commercial and traditional cheese (Sieber et al., 2010). Antioxidant peptides are relatively common in cheese and reported in a variety of cheese products (Santiago-López et al., 2018). Peptides with zinc-binding activities were also reported in cheese (Silva et al., 2012), although not frequently and further studies may be needed.

Lactic acid bacteria in cheese are also prominent producers of antibacterial peptides, collectively called bacteriocins. Unlike other biologically active peptides, bacteriocins are gene-encoded and translated into bacteria (Jin et al., 2019), usually with the function to suppress other bacterial species in the competition for resources (García-Bayona et al., 2019). They may vary in size and composition and are generally divided into 3 or 4 classes - Class I, the lanthionine-containing lantibiotics, Class II non-lanthionine heat-stable and Class III, thermolabile (Negash and Tsehai, 2020), as well as a fourth class of lipid or carbohydrate-containing bacteriocins (Simons et al., 2020). A recent review (Trejo-González et al., 2022) summarized the available data and established LAB from cheese products as a prominent source of bacteriocins, with soft cheese superior to hard cheese.

4. PATHOGENS AND FOOD SAFETY

Although generally regarded as a safe and beneficial food product, cheese can also become a source of unwanted, potentially harmful source of foodborne diseases. Pathogens can occur in cheese either from their presence in raw milk or via post-processing contamination due to failed sanitation (D'Amico and Donnelly, 2017). Many factors affect the possibility of a cheese product becoming unsafe, with ripened soft cheese, especially those, produced from raw milk, generally regarded as riskier for pathogen development. The major foodborne pathogen, found in cheese include *Salmonella enterica* (and *Salmonella* spp.), *Listeria monocytogenes* (and *Listeria* spp.), *Staphylococcus aureus*, and pathogenic strains of *Escherichia coli* (D'Amico and Donnelly, 2017, Kousta et al., 2010, de Oliveira et al., 2017). It should be noted, however, that if properly developed, the intrinsinc cheese microbiota has the full capacity to inhibit growth of potential pathogens.

Historical and recent outbreaks (the 1980s-2000s) of foodborne illness due to cheese consumption were summarized (Kousta et al., 2010) and revealed that the number of people affected varied between a few to several hundred with notably high mortality, caused by *L. monocytogenes*, followed by *S. enterica*. However, more recent outbreaks of listeriosis (Martinez-Rios and Dalgaard, 2018), salmonellosis (Robinson et al., 2020), etc., were also recorded, almost uniformly associated with cheese, produced from raw milk. Most of the cases were reported from developed countries, such as the USA, Canada, and the high-standard countries of the European Union, which is probably associated with better diagnostics and prophylaxis. The occurrence of the major pathogens was recorded in developing countries, such as Ethiopia (Keba et al., 2020). The prevalence of pathogen occurrence could reach up to 60-70% of the studied cheese samples, when produced from raw milk and is generally very low – 0 to 10% when produced from pasteurized milk (Kousta et al., 2010, Martinez-Rios and Dalgaard, 2018).

The pathogenic risk of cheese consumption may also extend beyond the major pathogens already discussed. Although relatively uncommon, cheese consumption – caused botulism was also recorded on several occasions (Chaidoutis et al., 2022). Cheese products may be also a source of mycotoxins (Kure and Skaar, 2019, Jiménez-Pérez et al., 2021), and even viruses, such as tick-borne encephalitis virus (TBEV) (Holzmann et al., 2009). Obviously, there is a need for a thorough analysis, especially of artisanal and traditional cheese products, produced from unpasteurized milk, which have to involve both genomic coverage of the microbiota and metabolic characterization for detection of potential toxins.

5. MOLECULAR APPROACHES IN THE CHARACTERIZATION OF CHEESE MICROBIOTA

The main approaches for studying microbial diversity are divided into culture-dependent and culture-independent methods, which are usually employed in combination (Temmerman et al., 2004). A summary of recent studies (since 2022) of microbial diversity in cheese is presented in Table 1. The culture-dependent methods rely on isolation and successful cultivation of microbial isolates on solid growth media, followed by DNA isolation, amplification and sequencing of a taxonomically-significant gene (i.e., 16S rDNA gene). Historically, culture-dependent identification may also rely on phenotypic characteristics, including microscopical investigation, growth and colony morphology, as well as biochemical characterization – metabolization of specific substrates. However, although much cheaper, such methods have low taxonomic resolution – usually up to genus level (Temmerman et al., 2004) and further limitations – some species, difficult to cultivate may be missed, wet lab work may be quite laborious, etc. Some recent comparative experiments in cheese clearly showed, that certain bacterial taxa may be missed by culture-dependent approaches (Carraro et al., 2011), leading to chronic underestimation of the presence of certain taxa in milk products.

Table 1. Representative studies of microbial diversity in cheese since 2022.

Cheese type	Country of origin	Approach	Reference
128 raw milk cheese with Protected Designation of Origin (PDO)	Italy	Shotgun sequencing	(Fontana et al., 2023)
Queijo Serra da Estrela PDO Cheese	Portugal	Culture-dependent 16S rRNA amplicon sequencing	(Rampanti et al., 2023)
São Jorge Cheese PDO Cheese	Portugal	16S rRNA amplicon sequencing	(Coelho et al., 2023)
13 raw milk cheese	Brazil	16S rRNA amplicon sequencing	(Erhardt et al., 2023)
Canestrato Pugliese PDO Cheese	Italy	Culture-dependent phenotypic	(Natrella et al., 2023)
Tulum Cheese	Turkiye	16S rRNA amplicon sequencing	(Gezginc et al., 2022)

Robiola di Roccaverano PDO Cheese	Italy	16S rRNA (bacteria) and 26S rRNA (fungi) amplicon sequencing	(Biolcati et al., 2022)
23 artisanal Cheeses	Brazil	Shotgun sequencing	(Kothe et al., 2022)
Idiazabal PDO Cheese	Spain	16S rRNA amplicon sequencing	(Santamarina-García et al., 2022)
Artisanal Cheese	Brazil	PCR-DGGE	(Ferreira et al., 2022)
49 Cheese samples	Ireland, Greece, Cyprus	16S rRNA amplicon sequencing	(Kamilari et al., 2022)
Valdeón Cheese	Spain	Culture-dependent phenotypic	(Diezhandino et al., 2022)
Feta and Kefalograviera Cheese	Greece	Culture-dependent phenotypic and 16S rRNA amplicon sequencing	(Tsigkrimani et al., 2022)
Cheddar	USA	16S rRNA amplicon sequencing	(Johnson et al., 2022)
20 different Cheese	Poland	PCR-DGGE	(Nalepa and Markiewicz, 2023)
19 different Cheese	Egypt	16S rRNA amplicon sequencing	(Ayaka et al., 2022)

Culture-independent approaches rely on isolation of total DNA of the sample and either direct cloning and sequencing of DNA fragments (shotgun cloning) or prior amplification of target DNA sequences with PCR and subsequent sequencing (amplicon sequencing) (Carraro et al., 2011). Prior amplification of target DNA sequences could be also combined with differential gradient gel electrophoresis (PCR-DGGE) to acquire specific fingerprints (Ercolini, 2004).

For taxonomical determination of prokaryotes, widely used is the gene for 16S ribosomal RNA localized in the small subunit of ribosomes, which has 9 hypervariable regions (V1-V9) of 30-100Bp. Sequencing of the entire gene, which has a size of about 1.5kbp for an entire bacterial community is most economic according to the Illumina platform, but it is limited by the length reads (50-300bp), and accurate assembly of very short reads in the context of the microbial

community requires large processing power (Kennedy et al., 2014). Therefore, sequencing only the hypervariable regions, which contain significantly more single nucleotide polymorphisms (SNPs) than other parts of the gene. The more conservative of these regions are used for classification to higher taxonomic levels, and the less conservative ones to genus and species level. For the taxonomical identification of eukaryotes, the 18S rRNA is used, which again contains nine hypervariable regions (Cappa and Cocconcelli, 2001), but some of these differ in conservativeness and length from those of 16S and therefore the use for taxonomical purposes is different from that in prokaryotes. The hypervariable regions in most bacteria are surrounded by conserved stretches, allowing the use of universal forward and reverse primers for sequencing of the desired hypervariable region by PCR. With the advance in bioinformatics and sequencing procedure, it is now possible to simultaneous reading of several of these regions, noting the one from which sequencing begins and the one where sequencing ends (e.g., V3-V4). Another marker, used in eukaryotes, especially for the classification of fungi is the Internal Transcribed Spacer (ITS) between rRNA genes in the primary rRNA transcript. In this transcript, ribosomal genes are located in the 18S, 5.8S order, 26S with ITS1 between 18S and 5.8S and ITS2 between 5.8S and 26S.

Most representative of the entire 16S rRNA sequence in the phylogenetic analyses are the V4, V5 and V6 regions (Yang et al., 2016). V3 is indicated as useful for taxonomic classification of pathogenic bacteria to genus or to species level, but other studies present it, along with V7, as a region giving lower phylogenetic resolution than V4-V6 (Yang et al., 2016, Chakravorty et al., 2007). The V4, V5, V7 and V8 regions are among the more conservative among the species and are used for classification to higher taxonomic levels such as type (Chakravorty et al., 2007). For 18S rRNA, V4 and V9 are the most commonly used, but V1, V2 and V3 are also applicable for metagenomic studies (Choi and Park, 2020). The greatest biological diversity is revealed by V2, V4 and V9, as a result of the higher variability of these regions relative to the others (Hadziavdic et al., 2014). ITS1 and ITS2 largely show similar results for their performance as taxonomic markers (Blaalid et al., 2013).

After processing of the obtained reads, including filtering of raw tags to remove sequences with errors, the effective tags are grouped into Operational Taxonomic Units (OTUs) at ≥ 97% nucleotide sequence similarity with database. One such unit can be conventionally taken as a species found in the sample, but actually represents a group of sequences with ≤ 3% variation among themselves. The representative sequences of each OTU are aligned taxonomically (Calle, 2019).

Alpha diversity represents the species diversity within a sample and is represented by six indices, all calculated with QIIME -Shannon, Simpson, Chao1, Ace, PD_whole_tree and

Goods_coverage (Calle, 2019). Shannon and Simpson take into account the number of species and their representativeness in the sample. Chao1 and ACE give an estimate of the actual number of species. PD_whole_tree is an index of phylogenetic diversity. Goods_coverage expresses what proportion (0-1) of all species are represented in the sample. Beta diversity represents the species diversity among at least two samples (Calle, 2019). Due to its high taxonomic resolution, it is widely employed in contemporary microbial diversity studies, including cheese products. Overall, culture-independent 16S rRNA amplicon sequencing seems to be the method of choice in contemporary microbial diversity studies in cheese (Table 1). However, other methods still remain valid and employed. The major focus is on bacterial diversity, rather than fungal and most contemporary studies of whole microbial diversity are oriented toward artisanal and raw milk cheese, with Protected Designation of Origin status.

CONCLUSION

Overall, the microbiota of well-known and often commercially produced in large quantities, cheeses is characterized and controlled to a large extent. The combination of milk pasteurization, addition of a starter culture and high quality sanitation control of the production facilities ensure a stable and predictable microflora, as well as similar quality of the final product. In contrast, traditional and artisanal raw-milk cheese products, most with PDO status, represent an unexplored variety and unique combinations of microbial taxa, contributing to the unique organoleptic properties of each individual cheese. The recent advance in molecular instrumentarium offers a unique opportunity for a large-scale characterization of this vast diversity of cheese products, helping to both better understand the molecular processes behind cheese production and to afirm the safety of such products for human consumption.

ACKNOWLEDGEMENTS

This research was funded by BULGARIAN NATIONAL SCIENCE FUND, grant number КП-06-66/6 from 13.12.2022

REFERENCES

1. AMATO, L., RITSCHARD, J. S., KURTZ, O., ARIAS-ROTH, E., LACROIX, C., SCHUPPLER, M. & MEILE, L. 2012. Microbial composition of defect smear–a problem evolving during foil-prepacked storage of red-smear cheeses. *International dairy journal,* 27**,** 77-85.

2. ARTEAU, M., LABRIE, S. & ROY, D. 2010. Terminal-restriction fragment length polymorphism and automated ribosomal intergenic spacer analysis profiling of fungal communities in Camembert cheese. *International Dairy Journal,* 20**,** 545-554.
3. AYAKA, N., HAJIME, T., TAKASHI, K. & BON, K. 2022. Microbial safety and biodiversity of bacterial communities in traditional Egyptian cheese types. *African Journal of Food Science,* 16**,** 203-214.
4. BAPTISTA, D. P. & GIGANTE, M. L. 2021. Bioactive peptides in ripened cheeses: Release during technological processes and resistance to the gastrointestinal tract. *Journal of the Science of Food and Agriculture,* 101**,** 4010-4017.
5. BINTSIS, T. 2018. Lactic acid bacteria as starter cultures: An update in their metabolism and genetics. *AIMS microbiology,* 4**,** 665.
6. BIOLCATI, F., FERROCINO, I., BOTTERO, M. T. & DALMASSO, A. 2022. The Bacterial and Fungal Microbiota of "Robiola di Roccaverano" Protected Designation of Origin Raw Milk Cheese. *Frontiers in Microbiology,* 12.
7. BLAALID, R., KUMAR, S., NILSSON, R. H., ABARENKOV, K., KIRK, P. & KAUSERUD, H. 2013. ITS 1 versus ITS 2 as DNA metabarcodes for fungi. *Molecular ecology resources,* 13**,** 218-224.
8. BOCKELMANN, W., WILLEMS, K., NEVE, H. & HELLER, K. 2005. Cultures for the ripening of smear cheeses. *International Dairy Journal,* 15**,** 719-732.
9. BOKULICH, N. A. & MILLS, D. A. 2013. Facility-specific "house" microbiome drives microbial landscapes of artisan cheesemaking plants. *Applied and environmental microbiology,* 79**,** 5214-5223.
10. CALLE, M. L. 2019. Statistical analysis of metagenomics data. *Genomics & informatics,* 17.
11. CAPPA, F. & COCCONCELLI, P. 2001. Identification of fungi from dairy products by means of 18S rRNA analysis. *International Journal of Food Microbiology,* 69**,** 157-160.
12. CARRARO, L., MAIFRENI, M., BARTOLOMEOLI, I., MARTINO, M. E., NOVELLI, E., FRIGO, F., MARINO, M. & CARDAZZO, B. 2011. Comparison of culture-dependent and-independent methods for bacterial community monitoring during Montasio cheese manufacturing. *Research in Microbiology,* 162**,** 231-239.
13. CHAIDOUTIS, E., KERAMYDAS, D., PAPALEXIS, P., MIGDANIS, A., MIGDANIS, I., LAZARIS, A. C. & KAVANTZAS, N. 2022. Foodborne botulism: A brief review of cases transmitted by cheese products. *Biomedical Reports,* 16**,** 1-7.

14. CHAKRAVORTY, S., HELB, D., BURDAY, M., CONNELL, N. & ALLAND, D. 2007. A detailed analysis of 16S ribosomal RNA gene segments for the diagnosis of pathogenic bacteria. *Journal of microbiological methods,* 69**,** 330-339.
15. CHOI, J. & PARK, J. S. 2020. Comparative analyses of the V4 and V9 regions of 18S rDNA for the extant eukaryotic community using the Illumina platform. *Scientific Reports,* 10**,** 6519.
16. COELHO, M. C., MALCATA, F. X. & SILVA, C. C. G. 2023. Distinct Bacterial Communities in São Jorge Cheese with Protected Designation of Origin (PDO). *Foods,* 12**,** 990.
17. COOLBEAR, T., CROW, V., HARNETT, J., HARVEY, S., HOLLAND, R. & MARTLEY, F. 2008. Developments in cheese microbiology in New Zealand—Use of starter and non-starter lactic acid bacteria and their enzymes in determining flavour. *International Dairy Journal,* 18**,** 705-713.
18. COTON, M., DELBÉS-PAUS, C., IRLINGER, F., DESMASURES, N., LE FLECHE, A., STAHL, V., MONTEL, M.-C. & COTON, E. 2012. Diversity and assessment of potential risk factors of Gram-negative isolates associated with French cheeses. *Food Microbiology,* 29**,** 88-98.
19. D'AMICO, D. J. & DONNELLY, C. W. 2017. Growth and survival of microbial pathogens in cheese. *Cheese.* Elsevier.
20. DE ANGELIS, M., CORSETTI, A., TOSTI, N., ROSSI, J., CORBO, M. R. & GOBBETTI, M. 2001. Characterization of non-starter lactic acid bacteria from Italian ewe cheeses based on phenotypic, genotypic, and cell wall protein analyses. *Applied and Environmental Microbiology,* 67**,** 2011-2020.
21. DE OLIVEIRA, C. A. F., CORASSIN, C. H., LEE, S. H., GONÇALVES, B. L. & BARANCELLI, G. V. 2017. Pathogenic bacteria in cheese, their implications for human health and prevention strategies. *Nutrients in Dairy and their Implications on Health and Disease.* Elsevier.
22. DIEZHANDINO, I., FERNÁNDEZ, D., COMBARROS-FUERTES, P., RENES, E., FRESNO, J. M. & TORNADIJO, M. E. 2022. Characteristics and proteolysis of a Spanish blue cheese made with raw or pasteurised milk. *International Journal of Dairy Technology,* 75**,** 630-642.
23. ERCOLINI, D. 2004. PCR-DGGE fingerprinting: novel strategies for detection of microbes in food. *Journal of microbiological methods,* 56**,** 297-314.

24. ERHARDT, M. M., OLIVEIRA, W. D. C., FRÖDER, H., MARQUES, P. H., OLIVEIRA, M. B. P. P. & RICHARDS, N. S. P. D. S. 2023. Lactic Bacteria in Artisanal Cheese: Characterization through Metagenomics. *Fermentation,* 9**,** 41.
25. FERREIRA, L. R., DE ALMEIDA, T. T., ANDRETTA, M., PERIN, L. M., CAMARGO, A. C., DE CARVALHO, A. F. & NERO, L. A. 2022. Further culture-independent characterization of the lactic microbiota of Serro artisanal cheese. *Brazilian Journal of Microbiology,* 53**,** 1593-1598.
26. FONTANA, F., LONGHI, G., ALESSANDRI, G., LUGLI, G. A., MANCABELLI, L., TARRACCHINI, C., VIAPPIANI, A., ANZALONE, R., VENTURA, M. & TURRONI, F. 2023. Multifactorial Microvariability of the Italian Raw Milk Cheese Microbiota and Implication for Current Regulatory Scheme. *Msystems,* 8**,** e01068-22.
27. FOX, P. F., GUINEE, T. P., COGAN, T. M., MCSWEENEY, P. L., FOX, P. F., GUINEE, T. P., COGAN, T. M. & MCSWEENEY, P. L. 2017. Biochemistry of cheese ripening. *Fundamentals of cheese science***,** 391-442.
28. FOX, P. F. & MCSWEENEY, P. L. 2017. Cheese: an overview. *Cheese***,** 5-21.
29. FOX, P. F., MCSWEENEY, P. L., COGAN, T. M. & GUINEE, T. P. 2004. *Cheese: chemistry, physics and microbiology, Volume 1: General Aspects*, Elsevier.
30. GARCÍA-BAYONA, L., GOZZI, K. & LAUB, M. T. 2019. Mechanisms of resistance to the contact-dependent bacteriocin CdzC/D in Caulobacter crescentus. *Journal of Bacteriology,* 201**,** e00538-18.
31. GEZGINC, Y., KARABEKMEZ-ERDEM, T., TATAR, H. D., DAĞGEÇEN, E. C., AYMAN, S. & AKYOL, İ. 2022. Metagenomics and volatile profile of Turkish artisanal Tulum cheese microbiota. *Food Bioscience,* 45**,** 101497.
32. GOBBETTI, M., DI CAGNO, R., CALASSO, M., NEVIANI, E., FOX, P. F. & DE ANGELIS, M. 2018. Drivers that establish and assembly the lactic acid bacteria biota in cheeses. *Trends in Food Science & Technology,* 78**,** 244-254.
33. HADZIAVDIC, K., LEKANG, K., LANZEN, A., JONASSEN, I., THOMPSON, E. M. & TROEDSSON, C. 2014. Characterization of the 18S rRNA gene for designing universal eukaryote specific primers. *PloS one,* 9**,** e87624.
34. HAYALOGLU, A. 2016. Cheese: Microbiology of Cheese. Reference module in food sciences. Amsterdam: Elsevier.
35. HOLZMANN, H., ABERLE, S. W., STIASNY, K., WERNER, P., MISCHAK, A., ZAINER, B., NETZER, M., KOPPI, S., BECHTER, E. & HEINZ, F. X. 2009. Tick-borne encephalitis from eating goat cheese in a mountain region of Austria. *Emerging infectious diseases,* 15**,** 1671.

36. IRLINGER, F., LOUX, V., BENTO, P., GIBRAT, J.-F., STRAUB, C., BONNARME, P., LANDAUD, S. & MONNET, C. 2012. Genome sequence of Staphylococcus equorum subsp. equorum Mu2, isolated from a French smear-ripened cheese. Am Soc Microbiol.
37. JIMÉNEZ-PÉREZ, C., ALATORRE-SANTAMARÍA, S., TELLO-SOLÍS, S., GÓMEZ-RUIZ, L., RODRÍGUEZ-SERRANO, G., GARCÍA-GARIBAY, M. & CRUZ-GUERRERO, A. 2021. Analysis of aflatoxin M1 contamination in milk and cheese produced in Mexico: a review. *World Mycotoxin Journal,* 14**,** 269-285.
38. JIN, X., YAO, J., FAN, H., CHE, Y., PAN, J., ZHANG, L., PAN, X., GELBIČ, I., HUANG, T. & GUAN, X. 2019. Heterologous expression and purification of Bt CspB, a novel cold-shock protein-like bacteriocin from Bacillus thuringiensis BRC-ZYR2. *World Journal of Microbiology and Biotechnology,* 35**,** 1-5.
39. JOHNSON, J., SELOVER, B., CURTIN, C. & WAITE-CUSIC, J. 2022. Nonstarter Bacterial Communities in Aged Cheddar Cheese: Patterns on Two Timescales. *Applied and Environmental Microbiology,* 88**,** e01939-21.
40. JUSZCZYK, P., WOJTATOWICZ, M., ZAROWSKA, B., CHRZANOWSKA, J. & MALICKI, A. 2005. Growth and sporulation of Penicillium roqueforti strains in the presence of yeasts selected as co-starters for cheese production. *Electronic Journal of Polish Agricultural Universities. Series: Biotechnology,* 8.
41. KAMILARI, E., TSALTAS, D., STANTON, C. & ROSS, R. P. 2022. Metataxonomic Mapping of the Microbial Diversity of Irish and Eastern Mediterranean Cheeses. *Foods,* 11**,** 2483.
42. KARIMI, R., MORTAZAVIAN, A. M. & DA CRUZ, A. G. 2011. Viability of probiotic microorganisms in cheese during production and storage: a review. *Dairy science & technology,* 91**,** 283-308.
43. KEBA, A., ROLON, M. L., TAMENE, A., DESSIE, K., VIPHAM, J., KOVAC, J. & ZEWDU, A. 2020. Review of the prevalence of foodborne pathogens in milk and dairy products in Ethiopia. *International dairy journal,* 109**,** 104762.
44. KENNEDY, K., HALL, M. W., LYNCH, M. D., MORENO-HAGELSIEB, G. & NEUFELD, J. D. 2014. Evaluating bias of Illumina-based bacterial 16S rRNA gene profiles. *Applied and environmental microbiology,* 80**,** 5717-5722.
45. KOK, D. J. & DE VOS, W. 1994. The proteolytic system of lactic acid bacteria. *Genetics and biotechnology of lactic acid bacteria***,** 169-210.

46. KOTHE, C. I., MOHELLIBI, N. & RENAULT, P. 2022. Revealing the microbial heritage of traditional Brazilian cheeses through metagenomics. *Food Research International,* 157**,** 111265.
47. KOUSTA, M., MATARAGAS, M., SKANDAMIS, P. & DROSINOS, E. H. 2010. Prevalence and sources of cheese contamination with pathogens at farm and processing levels. *Food control,* 21**,** 805-815.
48. KURE, C. F. & SKAAR, I. 2019. The fungal problem in cheese industry. *Current Opinion in Food Science,* 29**,** 14-19.
49. LECLERCQ-PERLAT, M.-N., OUMER, A., BERGERE, J.-L., SPINNLER, H.-E. & CORRIEU, G. 1999. Growth of Debaryomyces hansenii on a bacterial surface-ripened soft cheese. *Journal of Dairy Research,* 66**,** 271-281.
50. MARTINEZ-RIOS, V. & DALGAARD, P. 2018. Prevalence of Listeria monocytogenes in European cheeses: A systematic review and meta-analysis. *Food Control,* 84**,** 205-214.
51. MCSWEENEY, P. L., OTTOGALLI, G. & FOX, P. F. 2017. Diversity and classification of cheese varieties: an overview. *Cheese***,** 781-808.
52. MONNET, C., LOUX, V., GIBRAT, J.-F., SPINNLER, E., BARBE, V., VACHERIE, B., GAVORY, F., GOURBEYRE, E., SIGUIER, P. & CHANDLER, M. 2010. The Arthrobacter arilaitensis Re117 genome sequence reveals its genetic adaptation to the surface of cheese. *PloS one,* 5**,** e15489.
53. MOTTA, A. & BRANDELLI, A. 2002. Characterization of an antibacterial peptide produced by Brevibacterium linens. *Journal of Applied Microbiology,* 92**,** 63-70.
54. MOUNIER, J., GOERGES, S., GELSOMINO, R., VANCANNEYT, M., VANDEMEULEBROECKE, K., HOSTE, B., BRENNAN, N., SCHERER, S., SWINGS, J. & FITZGERALD, G. 2006. Sources of the adventitious microflora of a smear-ripened cheese. *Journal of Applied Microbiology,* 101**,** 668-681.
55. MULLAN, W. M. A. 2000. Causes and control of early gas production in cheddar cheese. *International Journal of Dairy Technology,* 53**,** 63-68.
56. NALEPA, B. & MARKIEWICZ, L. H. 2023. Microbiological Biodiversity of Regional Cow, Goat and Ewe Milk Cheeses Produced in Poland and Antibiotic Resistance of Lactic Acid Bacteria Isolated from Them. *Animals,* 13**,** 168.
57. NATRELLA, G., GAMBACORTA, G., SQUEO, G. & FACCIA, M. 2023. Impact of Milk Thermization on the Quality Characteristics of P.D.O. “Canestrato Pugliese” Ovine Hard Cheese. *Foods,* 12**,** 1080.

58. NAZ, S., GUEGUEN-MINERBE, M., CRETENET, M. & VERNOUX, J.-P. 2013. Aromatic amino acids as precursors of antimicrobial metabolites in Geotrichum candidum. *FEMS microbiology letters,* 344**,** 39-47.
59. NEGASH, A. W. & TSEHAI, B. A. 2020. Current applications of bacteriocin. *International Journal of Microbiology,* 2020.
60. RAMPANTI, G., FERROCINO, I., HARASYM, J., FOLIGNI, R., CARDINALI, F., ORKUSZ, A., MILANOVIĆ, V., FRANCIOSA, I., GAROFALO, C., MANNOZZI, C., MOZZON, M., OSIMANI, A. & AQUILANTI, L. 2023. Queijo Serra da Estrela PDO Cheese: Investigation into Its Morpho-Textural Traits, Microbiota, and Volatilome. *Foods,* 12**,** 169.
61. ROBINSON, E., TRAVANUT, M., FABRE, L., LARRÉCHÉ, S., RAMELLI, L., PASCAL, L., GUINARD, A., VINCENT, N., CALBA, C. & MEURICE, L. 2020. Outbreak of Salmonella Newport associated with internationally distributed raw goats' milk cheese, France, 2018. *Epidemiology & Infection,* 148**,** e180.
62. SAITO, T., NAKAMURA, T., KITAZAWA, H., KAWAI, Y. & ITOH, T. 2000. Isolation and structural analysis of antihypertensive peptides that exist naturally in Gouda cheese. *Journal of dairy science,* 83**,** 1434-1440.
63. SANTAMARINA-GARCÍA, G., HERNÁNDEZ, I., AMORES, G. & VIRTO, M. 2022. Characterization of Microbial Shifts during the Production and Ripening of Raw Ewe Milk-Derived Idiazabal Cheese by High-Throughput Sequencing. *Biology,* 11**,** 769.
64. SANTIAGO-LÓPEZ, L., AGUILAR-TOALÁ, J. E., HERNÁNDEZ-MENDOZA, A., VALLEJO-CORDOBA, B., LICEAGA, A. M. & GONZÁLEZ-CÓRDOVA, A. F. 2018. Invited review: Bioactive compounds produced during cheese ripening and health effects associated with aged cheese consumption. *Journal of dairy science,* 101**,** 3742-3757.
65. SCHORNSTEINER, E., MANN, E., BEREUTER, O., WAGNER, M. & SCHMITZ-ESSER, S. 2014. Cultivation-independent analysis of microbial communities on Austrian raw milk hard cheese rinds. *International Journal of Food Microbiology,* 180**,** 88-97.
66. SIEBER, R., BÜTIKOFER, U., EGGER, C., PORTMANN, R., WALTHER, B. & WECHSLER, D. 2010. ACE-inhibitory activity and ACE-inhibiting peptides in different cheese varieties. *Dairy Science & Technology,* 90**,** 47-73.
67. SILVA, R., LIMA, M., VIANA, J., BEZERRA, V., PIMENTEL, M., PORTO, A., CAVALCANTI, M. & LIMA FILHO, J. 2012. Can artisanal “Coalho” cheese from Northeastern Brazil be used as a functional food? *Food Chemistry,* 135**,** 1533-1538.

68. SIMONS, A., ALHANOUT, K. & DUVAL, R. E. 2020. Bacteriocins, antimicrobial peptides from bacterial origin: overview of their biology and their impact against multidrug-resistant bacteria. *Microorganisms,* 8**,** 639.
69. TEMMERMAN, R., HUYS, G. & SWINGS, J. 2004. Identification of lactic acid bacteria: culture-dependent and culture-independent methods. *Trends in Food Science & Technology,* 15**,** 348-359.
70. THIERRY, A. & MAILLARD, M.-B. 2002. Production of cheese flavour compounds derived from amino acid catabolism by Propionibacterium freudenreichii. *Le Lait,* 82**,** 17-32.
71. TILOCCA, B., COSTANZO, N., MORITTU, V. M., SPINA, A. A., SOGGIU, A., BRITTI, D., RONCADA, P. & PIRAS, C. 2020. Milk microbiota: Characterization methods and role in cheese production. *Journal of Proteomics,* 210**,** 103534.
72. TREJO-GONZÁLEZ, L., GUTIÉRREZ-CARRILLO, A.-E., RODRÍGUEZ-HERNÁNDEZ, A.-I., DEL ROCÍO LÓPEZ-CUELLAR, M. & CHAVARRÍA-HERNÁNDEZ, N. 2022. Bacteriocins produced by LAB isolated from cheeses within the period 2009–2021: a review. *Probiotics and Antimicrobial Proteins,* 14**,** 238-251.
73. TSIGKRIMANI, M., BAKOGIANNI, M., PARAMITHIOTIS, S., BOSNEA, L., PAPPA, E., DROSINOS, E. H., SKANDAMIS, P. N. & MATARAGAS, M. 2022. Microbial Ecology of Artisanal Feta and Kefalograviera Cheeses, Part I: Bacterial Community and Its Functional Characteristics with Focus on Lactic Acid Bacteria as Determined by Culture-Dependent Methods and Phenotype Microarrays. *Microorganisms,* 10**,** 161.
74. YANG, B., WANG, Y. & QIAN, P.-Y. 2016. Sensitivity and correlation of hypervariable regions in 16S rRNA genes in phylogenetic analysis. *BMC bioinformatics,* 17**,** 1-8.
75. ZHENG, J., WITTOUCK, S., SALVETTI, E., FRANZ, C. M., HARRIS, H. M., MATTARELLI, P., O'TOOLE, P. W., POT, B., VANDAMME, P. & WALTER, J. 2020. A taxonomic note on the genus Lactobacillus: Description of 23 novel genera, emended description of the genus Lactobacillus Beijerinck 1901, and union of Lactobacillaceae and Leuconostocaceae. *International journal of systematic and evolutionary microbiology,* 70**,** 2782-2858.

Contact address: Zagorchev Lyuben, Faculty of Biology, Sofia University "St. Kliment Ohridski" 8 Dragan Tsankov blvd., 1164, Sofia, Bulgaria; E-mail: lzagorchev@biofac.uni-sofia.bg

POSTERY

POSTERS

VÝSKYT A ETIOLÓGIA MASTITÍD V CHOVE OVIEC POČAS PASTEVNEJ SEZÓNY

OCCURRENCE AND ETIOLOGY OF MASTITIS IN SHEEP HERD DURING THE GRAZING SEASON

Arvaiová Juliana[1], Zigo František[1], Lacková Zuzana[1], Farkašová Zuzana[1], Halás Šimon[1], Ondrašovičová Silvia[2], Bak H. Kathrine[3], Paulsen Peter[3]

[1]Katedra výživy a chovu zvierat, Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, Komenského 73, Košice; [2]Katedra biológie a fyziológie, Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, Komenského 73, Košice; [3]Institute of Food Safety, Food Technology and Veterinary Public Health, University of Veterinary Medicine Vienna, Veterinaerplatz 1, Vienna 1210, Austria

ABSTRACT

The aim of this study is to monitor the occurrence of mastitis in sheep farming in eastern Slovakia, with an average number of 300 sheep with machine milking technology. The population of examined breeds mainly consisted of Improved Valachian, Lacaune and their hybrids. The complex examination consisted of: clinical examination of the mammary gland, California mastitis test and laboratory diagnostics of the collected milk samples, which was carried out in three phases: at the beginning (April), in the middle (June) and at the end of the milking season (September). The highest incidence of mastitis in the monitored herd was at the end of the milking season (33.3%) with a predominant share of subclinical form of mastitis (26.0%). In 61.7% and 20.0% of positive samples, coagulase-negative staphylococci and *S. aureus* were the most frequent bacterial pathogens of the mammary gland of ewes isolated during all three comprehensive examinations. Among the other bacterial agents that were most often isolated in the monitored herd were *Streptococcus sanguinis* (11.2%) and *Enterococcus faecalis* (7.1%). Tested Staphylococci for selected antibiotics using the disc diffusion method were mainly resistant to amoxicillin and penicillin (35.1%). A suitable combination of intramammary antibiotics for the treatment of mastitis infected sheep has been shown to be based on streptomycin and ciprofloxacin.

Key words: sheep, milking, mastitis, staphylococci

ÚVOD

Ovce chované za účelom produkcie mlieka sú vystavené zvýšenému riziku výskytu mastitídy – zápalu mliečnej žľazy, závažného ochorenia a najčastejšej príčiny brakovania oviec v súčasnosti. Mastitída vedie nielen k zvýšeným nákladom na zdravotnú starostlivosť, ale spôsobuje aj ďalšie významné ekonomické straty, ako sú znížená kvalita a produkcia mlieka, znehodnotené mlieko, ako aj zmeny vlastností mlieka pri výrobe syrov (Conington a kol., 2008; Tolone a kol., 2016). Najčastejšími pôvodcami mastitídy u bahníc sú *Staphylococcus aureus*, koaguláza-negatívne stafylokoky, streptokoky, *Escherichia coli*, *Mannheimia haemolytica* a *Trueperella* (Erskine, 2022). *Staphylococcus aureus* a *Streptococcus agalactiae* sú patogény spôsobujúce bolesť alebo opuch vemena, čo vedie k zmene vzhľadu a zloženia mlieka. Odhaduje sa, že výskyt klinickej mastitídy u oviec a kôz je na ročnej báze nižší ako 5%, zatiaľčo prevalencia subklinickej mastitídy predstavuje 5-30% (Contreras a kol., 2007). Takmer 60-70% antimikrobiálnych látok z celkového objemu aplikovaného na farmách je určených na prevenciu a liečbu mastitídy (Čobirka a kol., 2020). Mastitídu kategorizujeme ako klinické a subklinické ochorenie a môžu ju spôsobovať kontagiózne alebo enviromentálne patogény ovplyvňujúce zdravie a morfológiu vemena. Zo strany chovateľov je teda nevyhnutné uplatňovanie dobrého manažmentu farmy a dodržiavanie hygienických postupov v záujme zachovania zdravia u bahníc.

Cieľom štúdie na základe výsledkov troch komplexných vyšetrení v stáde 300 bahníc počas jednej sezóny strojového dojenia bolo identifikovať výskyt intramamárnych infekcií a vyhodnotiť podiel a etiológiu mastitíd s ich hlavnými bakteriálnymi pôvodcami.

MATERIÁL A METODIKA

Praktická časť štúdie bola realizovaná na farme Hrišovce s 300 ovcami v stáde nachádzajúca sa na východnom Slovensku. Chov tvoria zošľachtené valašky, ovce plemena lacaune a ich kríženci. Farma pozostáva z dvoch stajní, senníka, priestorov pre personál, dojárne a zbernej nádoby na mlieko. Obdobie dojenia začína v polovici marca po obahnení. Bahnice sú spočiatku dojené raz denne (v popoludňajších hodinách), keď sú ešte spolu s jahňatami. O mesiac neskôr, v polovici apríla, sú ovce vypustené na pastvu a dojenie začína dvakrát denne. Bahnice sú dojené dvakrát denne až do konca septembra, takže dojná sezóna trvá približne šesť mesiacov. Pred začiatkom dojenia sú zhromaždené mimo salaš a do dojárne Boumatic 2x12 sú vháňané po skupinách (Obrázok č. 1). Proces dojenia trvá v priemere od dvoch do maximálne štyroch minút na jednu bahnicu. Tlak v dojacom stroji je 40,5 kPa, frekvencia pulzov 120-140 za minútu.



Obrázok č. 1: Monitorovaná ovčia farma Hrišovce - dojenie

Zdroj: Zigo F. (2022)

Vyšetrenie oviec a odber vzoriek

Odber vzoriek bol realizovaný v priebehu troch komplexných vyšetrení na začiatku (apríl), v strede (jún) a na konci (september) dojnej periódy. Dôkladné vyhodnotenie zdravotného stavu vemena zahŕňalo klinické vyšetrenie, senzorickú analýzu mlieka zo strekov z každej štvrte vemena s následným hodnotením pomocou NK - testu.

Do jednotlivých vzoriek mlieka bol pridaný reagens a výsledok bol hodnotený ako negatívny, stopový alebo pozitívny (skóre 1 – 3) v závislosti od tvorby gélu vo vzorke mlieka podľa Fthenakisa (1995). Následne sa asepticky odobrali vzorky mlieka na bakteriologickú kultiváciu v súlade s usmerneniami National Mastitis Council (2001). Vzorky boli po schladení na 4 °C transportované do laboratória, kde boli nasledujúci deň podrobené analýze.

Laboratórne analýzy

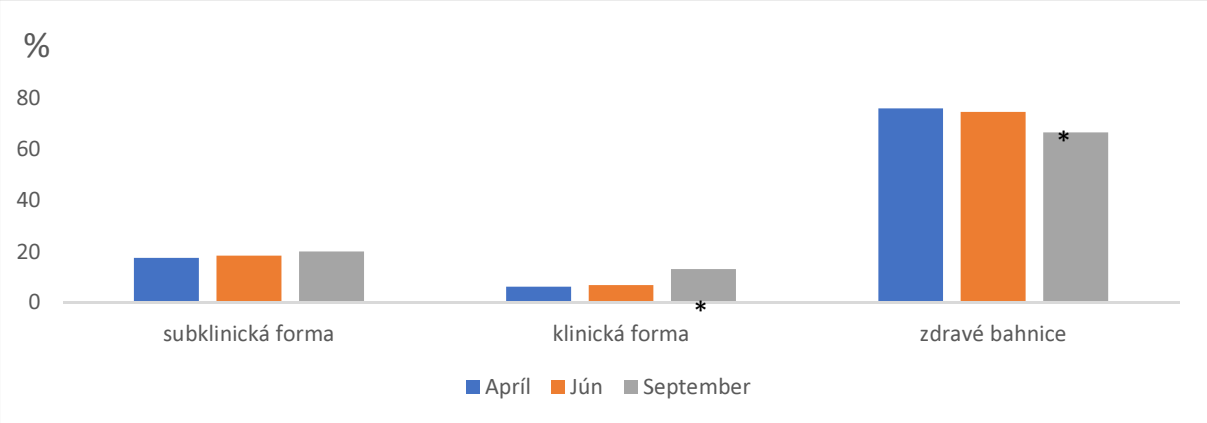
Na kultiváciu vzoriek mlieka (10 μL) boli použité rutinné postupy aplikované vo veterinárnej praxi ako sú Columbia Blood Agar Base s 5 % defibrinovanej krvi, stafylokoková živná pôda N° 110, Baird-Parkerov agar, Edwardsova živná pôda, Mac Conkey Agar (Oxoid, OXOID Ltd., Basingstoke, Hants, UK) a inkubácia pri teplote 37 °C počas 24 hodín. Okrem hodnotenia charakteristík rastu patogénov sa na identifikáciu bakteriálnych druhov použili aj iné testy: produkcia pigmentu a koagulázy, katalázová aktivita, hemolýza, farbenie podľa Grama a ďalšie faktory virulencie. U *Staphylococcus* spp. bol uskutočnený koagulázový test (Staphylo PK, ImunaPharm, SR). Suspektné kolónie *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp. a *Enterobacteriacae* spp. boli izolované na krvnom agare a kultivované pri teplote 37 °C počas 24 hodín a identifikované biochemicky pomocou STAPHYtestu, STREPTOtestu a resp. ENTEROtestu s použitím softvéru TNW Pro 7.0 (Erba-Lachema, CZ) s pravdepodobnosťou správneho označenia tohto druhu nad 90%. Patogény izolované zo vzoriek mlieka boli

testované diskovou metódou EUCAST (2011) *in vitro* vyhodnotením zón inhibície rastu na Mueller-Hintonovom agare po 24 hodinách inkubácie pri 37°C. Na test citlivosti stafylokokov voči 9 druhom antibiotík boli použité testovacie disky (OXOID Ltd., Basingstoke, Hants, UK). Výber antibiotík odráža škálu intramamárnych prípravkov na liečbu mastitídy dostupných na Slovensku. Antibiotiká použité v tejto štúdii boli ampicilín (AMP 10), amoxicilín (AML 25), cefoxitín (FOX 30), neomycín (N 10), novobiocín (NV 5), penicilín (P 10 U), streptomycín (S 10), ciprofloxacín (CIP 10) a tetracyklín (TE 10). Citlivosť alebo rezistencia testovaných baktérií sa interpretovala na základe referenčných zón v súlade s postupmi EUCAST (2011). Hodnota rezistencie bola vyhodnotená ako zanedbateľná (0,1%), veľmi nízka (0,1-1%), nízka (1-10%) stredná (10-20%), vysoká (20-50%), veľmi vysoká (50- 70%) a extrémne vysoká (>70%).

Rozdiely v prevalencii mastitídy a distribúcii bakteriálnych patogénov boli štatisticky analyzované pomocou chí-kvadrát testu. Závislosť jednotlivých znakov bola testovaná na hladine významnosti $\alpha = 0,05$, s kritickou hodnotou = 5,991.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Výskyt mastitídy v chovoch bahníc je mimoriadne variabilný. Incidencia mastitídy v tejto štúdii predstavovala na začiatku sezóny 23,8%, v strede 25,3% a na konci 33,3%. Vo všetkých troch prípadoch bola diagnostikovaná prevažne subklinická forma tohto ochorenia. K významnému nárastu počtu pozitívnych bahníc, ako aj prípadov klinickej mastitídy, došlo na konci dojného obdobia (Graf č.1).



Graf č.1: Výskyt mastidídy v priebehu 3 vyšetrení

Poznámka: Subklinická mastitída - nie sú pozorované žiadne príznaky, vemeno a mlieko sa javia ako normálne, ale infekcia je stále prítomná s pozitívnym skóre NKT (NK-test) a zvýšeným PSB (počet somatických buniek); Klinická mastitída – príznaky sa pohybujú od miernej po ťažkú s pozitívnym NKT skóre, vysokou hladinou PSB, pozitívnou bakteriologickou kultiváciou, zmenou konzistencie mlieka s prítomnosťou vločiek, zrazenín alebo hnisu a znížením alebo stratou produkcie mlieka s klinickými príznakmi, *Významný rozdiel $p < 0,05$, pri hladine významnosti $\alpha = 0,05$ (5 %); kritická hodnota $\chi 2 = 5,99$.

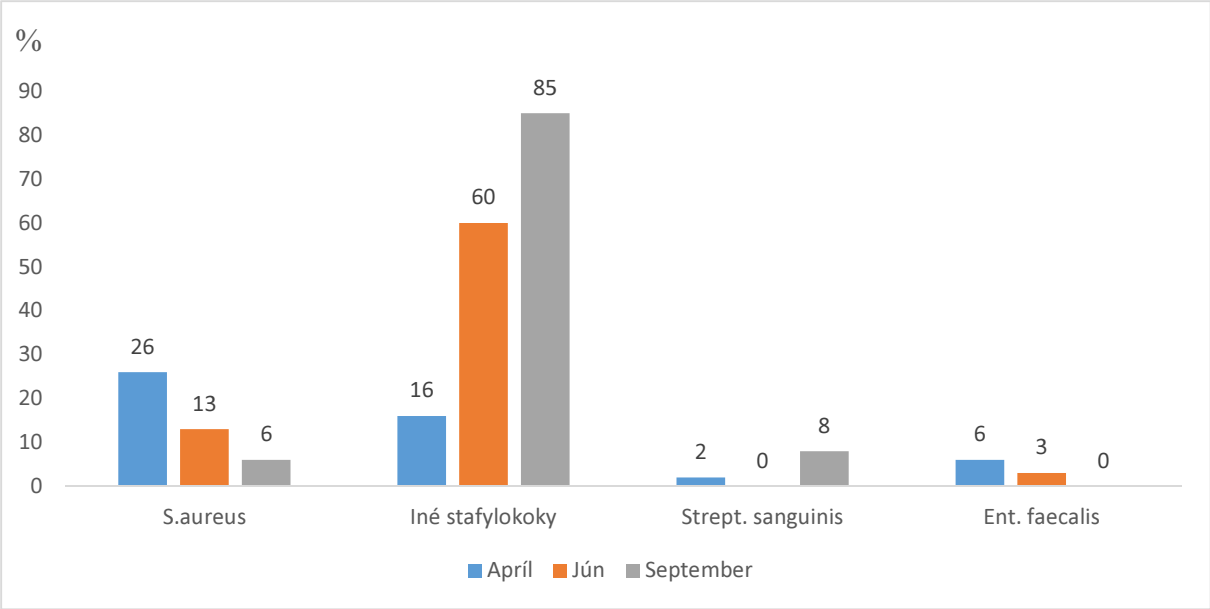
Koaguláza-negatívne stafylokoky (KNS) sú hlavnými patogénmi v chovoch bahníc a uvádzajú sa ako najčastejšie izolované patogény v prípadoch subklinickej mastitídy (Pyörälä a Taponen, 2009). V tejto štúdii bolo 225 (28,2%) vzoriek z 806 pozitívnych na bakteriálne patogény spôsobujúce mastitídu. Najčastejšie izoláty z pozitívnych vzoriek mlieka počas všetkých troch monitorovaných období boli streptokoky. KNS a *S. aureus* boli identifikované v 61,7% a 20% z celkového počtu pozitívnych vzoriek. Okrem toho, ďalšími významnými patogénmi pozitívnych vzoriek mlieka boli *Streptococcus sanguinis* (11,2%) a *Enterococcus faecalis* (7,1%) (Tabuľka č. 1).

Tabuľka č.1: Bakteriálne patogény spôsobujúce mastitídu vo všetkých troch vzorkách

Bakteriálne patogény	Apríl		Júl		September		Všetky tri vzorky	Všetky tri vzorky
	n	%	n	%	n	%	(n)	(%)
S. chromogenes	3	1.4	26	8.7	30	10.1	59	7.3
S. epidermidis	6	2.9	11	3.7	15	5.0	32	4.0
S. aureus	26	12.4	13	4.3	6	2.0	45	5.6
S. schleiferi	7	3.3	20	6.7	4	1.4	31	3.8
S. intermedius	0	0	3	1.0	19	6.4	22	2.7
Str. sanguinis	2	1.0	0	0	8	2.7	10	1.3
S. hyicus	0	0	0	0	17	5.7	17	2.1
Ent. faecalis	6	2.9	3	1.0	0	0	9	1.1
Celkom	**50**	**23.9**	**76**	**25.3**	**90**	**33.3***	**225**	**28.0**

Poznámka: * p <0,05 – významný rozdiel.

Graf č. 2 znázorňuje, ktoré patogény a v akom období boli zistené v troch odobratých vzorkách, bez ohľadu na klinickú alebo subklinickú mastitídu. *S. aureus* bol väčšinou zachytený na začiatku dojnej sezóny resp. v apríli, zatiaľ čo iné *Staphylococci* spp. boli častejšie zachytené na konci dojnej sezóny resp. v septembri. *Streptococcus sanguinis* bol identifikovaný väčšinou na konci obdobia dojenia, zatiaľ čo *Enterococcus faecalis* dominoval na jeho začiatku a následne ustupoval. Je dôležité poznamenať, že prevalencia *S. aureus* a *E. faecalis* klesá smerom ku koncu dojnej periódy, zatiaľ čo iné zistené patogény zrejme nesledujú tento trend.



Graf č.2: Výskyt identifikovaných patogénov

Nárast spotreby antibiotík vo veterinárnej a humánnej medicíne je v poslednom období sprevádzaný fenoménom nárastu bakteriálnej rezistencie. Odolnosť voči mastitíde je komplexná a multifaktoriálna vlastnosť a jej prejav závisí od genetických aj environmentálnych faktorov vrátane infekčného tlaku. Rezistencia na antibiotiká môže byť získaná buď spontánne sa vyskytujúcimi genetickými mutáciami, častejšie však horizontálnym prenosom mobilných prvkov DNA z darcovskej bunky na iný bakteriálny druh (Tolene a kol., 2016).

Zo všetkých testovaných pozitívnych vzoriek mlieka bola u stafylokokov pozorovaná vysoká rezistencia na novobiocín, penicilín a amoxicilín (35,1%) s najvyšším počtom bakteriálnych izolátov (Tabuľka č. 2). V štúdii uskutočnenej Kunzom a kol. (2011) sa zistilo, že zo 67 a 208 kmeňov *S. aureus* a KNS bolo 31,3 % a 8,2 % rezistentných na penicilín, 29,9% a 1,0% na ampicilín, 1,5% a 10,6% na erytromycín a 3,0% a 7,7% tetracyklín.

Izolovaný *S. aureus* z vyšetrených vzoriek mlieka vykazoval vysokú rezistenciu na penicilín -70%. Až 80% týchto baktérií bolo rezistentných aj na novobiocín, ale žiadna z nich nebola rezistentná na ampicilín. Vysokú rezistenciu na novobiocín, penicilín a amoxycilín vykazovalo 35,1% a strednú hodnotu rezistencie na ampicilín 17,4% zo všetkých testovaných KNS.

Mastitída je bežne popisovaná ako jeden z najväčších zdravotných rizikových faktorov mliekárenského priemyslu a hlavná príčina predčasného brakovania oviec. Fthenakis a kol. (1995) zaznamenali výskyt mastitídy u oviec medzi 4-50%. Tento výsledok koreluje s našou štúdiou, kde sa výskyt mastitídy pohyboval od 23,8% na začiatku dojnej sezóny do 33,3% na jej konci.

Výskyt mastitíd postihuje nielen bahnice, ale má aj významný ekonomický vplyv na chovateľa, keďže mastitídne mlieko nie je vhodné na konzumáciu.

Tabuľka č. 2: Rezistencia *Staphylococcus* spp. na testované antibiotiká

Antibiotiká		**AMP**	**AML**	**FOX**	**NEO**	**NV**	**P**	**S**	**CIP**	**TE**
Patogény	**n**	**%**	**%**	**%**	**%**	**%**	**%**	**%**	**%**	**%**
S. schleiferi	8	13	25	0	0	88	0	0	0	0
S. intermedius	3	33	100	0	0	0	100	0	0	0
S. hyicus	1	0	0	100	0	100	0	0	0	0
S. epidermidis	6	50	66	0	0	33	83	33	0	0
S. aureus	10	0	20	20	40	80	70	0	0	0
S. chromogenes	6	0	33	17	0	33	66	0	17	0
S. simulans	2	0	0	0	0	50	0	0	0	0
S. xylosus	1	0	0	100	0	100	0	0	0	0
Rezistencia (%)		**13.5**	**35.1**	**13.5**	**10.8**	**35.1**	**35.1**	**5.4**	**2.7**	**0**
Citlivosť (%)		**86.5**	**64.9**	**86.5**	**89.2**	**64.9**	**64.9**	**94.6**	**97.3**	**100**
Celkom (n)	37	5	13	5	4	13	13	2	1	0
Hodnota R *		**M**	**H**	**M**	**M**	**VH**	**VH**	**L**	**L**	**N**

Poznámka: AMP 10 – ampicilín, AML 25 – amoxycilín, FOX 30 – cefoxitín, N 10 – neomycín, Nv 5 – novobiocín, P 10 – penicilín, S 10 – streptomycín, CIP 10 – ciprofloxacín, TE 10- tetracyklín, *R hodnota rezistencie: N - zanedbateľná, VL - veľmi nízka, L - nízka, M - stredná, H – vysoká, VH - veľmi vysoká, EH - extrémne vysoká.

ZÁVER

Z výsledkov štúdie vyplýva, že najvyšší výskyt mastitíd v sledovanom stáde bahníc bol na konci dojnej sezóny (33,3%) s prevahou subklinických foriem (26,0%). V 61,7% a 20,0% pozitívnych vzoriek boli pri všetkých troch komplexných vyšetreniach izolované koagulázanegatívne stafylokoky a *S. aureus.* Medzi ďalšie najčastejšie izolované bakteriálne agensy v sledovanom chove patrili *Streptococcus sanguinis* (11,2%) a *Enterococcus faecalis* (7,1%). Stafylokoky testované na vybrané antibiotiká diskovou difúznou metódou boli rezistentné na amoxicilín a penicilín v 35,1% prípadov.

Antibiotická rezistencia je jedným z dôležitých problémov, s ktorými sa stretávame pri liečbe a kontrole mastitídy. Na stanovenie účinnosti lieku, ktorý možno použiť na úspešnú liečbu chorôb, by sa teda mali vopred vykonať testy citlivosti na antibiotiká. Správna izolácia a identifikácia pôvodcu ochorenia zohráva významnú úlohu v prevencii a kontrole

intramamárnej infekcie. Ako najúčinnejšia možnosť kontroly mastitídy sa v našej štúdii ukázala kombinácia streptomycínu, ciprofloxacínu a tetracyklínu.

POĎAKOVANIE

Táto práca bola podporená projektom VEGA 1-0162-23: Zníženie používania antibiotík v programoch kontroly mastitíd dojníc.

POUŽITÁ LITERATÚRA

1. CONINGTON, J. et al. Breeding for resistance to mastitis in United Kingdom sheep. In *Veterinary Record,* 2008, vol.162, no.12, p. 369-376. DOI: 10.1136/vr.162.12.369.
2. CONTRERAS, A. et al. Mastitis in small ruminants. In *Small Ruminant Research*, 2007, vol. 68, p. 145-153. DOI: 10.1016/j.smallrumres.2006.09.011.
3. ČOBIRKA, M. et al. Epidemiology and Classification of Mastitis. In *Animals,* 2020. 10(12), 2212. DOI: 10.3390/ani10122212.
4. ERSKINE, R. J. Mastitis in ewes. In *MSD Manual* [online]. 2022. Dostupné na internete: https://www.msdvetmanual.com/reproductive-system/mastitis-in-large-animals/mastitis-in-ewes.
5. FTHENAKIS, G. C. et al. California Mastitis Test and Whiteside Test in diagnosis of subclinical mastitis of dairy ewes. In *Small Ruminant Research,* 1995, vol.16, no. 3, p. 271-276.
6. KUNZ, F. et al. Von *Staphylococcus aureus* und Koagulase-negativen Staphylokokken isoliert aus Mastitismilchproben von Schafen und Ziegen. In *Schweizer Archiv für Tierheilkunde*, 2011, vol. 153, no.2, p. 63-69. DOI: 10.1024/0036-7281/a000152
7. NATIONAL MASTITIS COUNCIL. National Mastitis Council Recommended Mastitis Control Program. Verona: *Natl. Mastitis Counc. Ann. Mtg. Proc., Reno, NV. Natl. Mastitis Counc., Inc., WI*, 2001, p. 408. ISBN 978-0-309-06997-7.
8. PYÖRÄLÄ, S., – TAPONEN, S. Coagulase-negative staphylococci - Emerging mastitis pathogens. In *Veterinary Microbiology*, 2009, vol. 134, p. 3-8. DOI: 10.1016/j.vetmic.2008.09.015.
9. RASHEED, N. A., – HUSSEIN, N. R. *Staphylococcus aureus*: an overview of discovery, characteristics, epidemiology, virulence factors and antimicrobial sensitivity. In *European Journal of Molecular & Clinical Medicine*, 2021, vol. 8, no.3, p. 1160-1183.
10. SCOTT, P. R. Mammary Gland. Sheep medicine. In *CRC press*, 2015, p. 319-327. ISBN 978-1-4987-0015-3.

11. TOLONE, M. et al. Assessment of genetic variation for pathogen-specific mastitis resistance in Valle del Belice dairy sheep. In *BMC veterinary research,* 2016, vol. 12, p. 1-7.

Kontaktná adresa: Ing. Arvaiová Juliana, University of Veterinary Medicine and Pharmacy in Košice, Komenského 73, 041 81 Košice, Slovak Republic; E-mail: juliana.arvaiova@student.uvlf.sk

VLIV VYBRANÝCH FAKTORŮ NA KONCENTRACI LAKTOFERINU V KRAVSKÉM MLÉCE

INFLUENCE OF SELECTED FACTORS ON LACTOFERIN CONCENTRATION IN COW'S MILK

Bartáková Klára[1], Vorlová Lenka[1], Motalová Gabriela[1], Hanuš Oto[2], Nejeschlebová Hana[2], Samková Eva[3], Navrátilová Pavlína[1], Dluhošová Sandra[1]

[1]Ústav hygieny a technologie potravin živočišného původu a gastronomie, Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární univerzita Brno, Česká republika

[2]Výzkumný ústav mlékárenský Praha, Česká republika

[3]Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Česká republika

ABSTRACT

In this work, the content of lactoferrin in cow's milk was determined in different order and stage of lactation using reverse phase high-performance liquid chromatography with an ion-pairing agent. A total of 49 samples of raw cow's milk were collected from dairy cows from farms in the Czech Republic from August to November 2022. The average lactoferrin content was 123.73 ± 58.51 mg/l, the range of values varied from 39.80 mg/l to 250 .46 mg/l. No obvious, statistically significant trend of change in lactoferrin concentration depending on the order or stage of lactation was detected. Apparently, targeted monitoring of the amount of lactoferrin in milk from the same dairy cows in the same phases of individual lactations would be necessary, so that the influence of the sequence or phase of lactation could be correctly assessed. In the case of the results in this work, it is a pilot study where milk samples were taken in one period in a certain farm from all dairy cows that were currently lactating.

Key words: phase, order, lactation, chromatography

ÚVOD

Laktoferin je pro své antimikrobiální účinky řazen mezi přirozené inhibiční látky mléka. Zajišťuje ochranu mléčné žlázy před infekcí, chrání zažívací trakt mláďat a je schopen prodloužit trvanlivost čerstvého mléka. Má také nutriční význam, zejména pro své aminokyselinové složení a je i dobrým zdrojem železa (Madureira et al., 2007).

Jedná se monomerní glykoprotein schopný vázat železité ionty. Vykazuje bakteriostatickou a baktericidní aktivitu proti velkému počtu grampozitivních i gramnegativních bakterií. Tato aktivita je způsobena dvěma odlišnými mechanismy. První

mechanismus je založen na principu navázání a sekvestraci volného železa, čímž zabrání mikroorganismům k přístupu k tomuto základnímu substrátu pro jejich růst, a tím způsobí bakteriostatický účinek. Principem druhého mechanismu je přímá interakce laktoferinu s mikroorganismy a vyvolání baktericidního účinku. Laktoferin se naváže na bakteriální povrch, což způsobí uvolnění lipopolysacharidu z vnější membrány u gramnegativních bakterií a kyseliny lipoteichoové u grampozitivních bakterií, a to způsobí poškození a smrt buňky (Superti, 2020; Iglesias-Figueroa et al., 2018).

Cílem této práce bylo stanovení obsahu laktoferinu ve vzorcích kravského mléka pocházejících z různé fáze a pořadí laktace za účelem hledání závislostí množství laktoferinu na těchto faktorech.

MATERIÁL A METODIKA

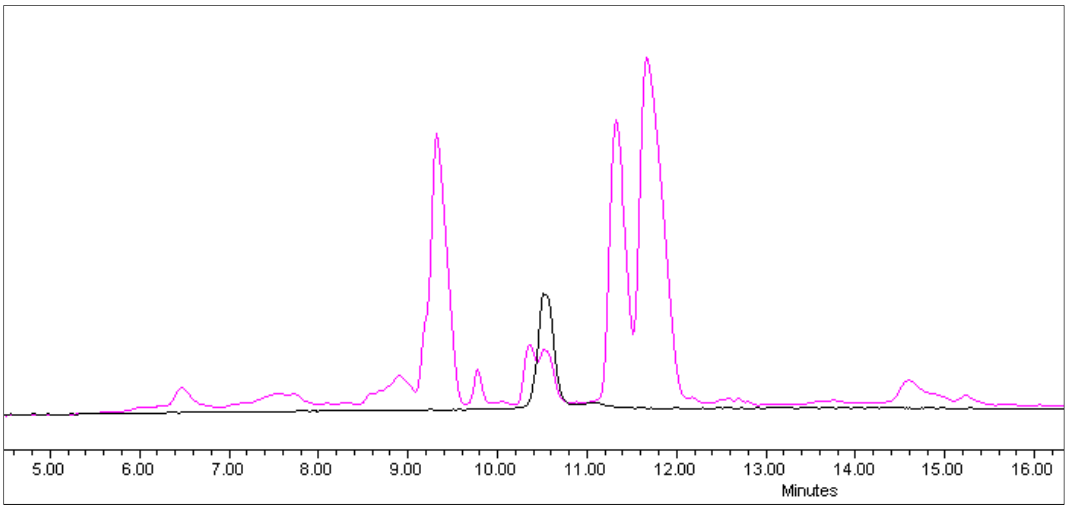
Jako materiál byly odebírány vzorky syrového kravského mléka od dojnic plemen Holštýnské a České strakaté z chovů v České republice. Celkem bylo analyzováno 49 vzorků, které byly odebírány od srpna do listopadu roku 2022, každý měsíc 12 nebo 13 vzorků. Mléko bylo cíleně odebíráno od dojnic, které byly v různé fázi (5.-18.den) a pořadí (1.-6.) laktace. Všechny vzorky byly zpracovány druhý den od odběru a mezitím byly uchovány v chladu.

Laktoferin byl stanoven spolu s ostatními syrovátkovými proteiny pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie na reverzní fázi s iontově párovacím činidlem (HPLC). Před stanovením byla z mléka mechanicky odstraněna tuková frakce s využitím odstředivky Hermle Z 326 K (Hermle Labortechnik, Německo). Odstředěné mléko bylo vysráženo pomocí 10% kyseliny octové do pH 4,6 s využitím pH metru Hanna pH 211 (Hanna Instruments, Rumunsko). Odstředěním v odstředivce Hettich EBA 20 (Hettich, Německo) byla získána syrovátka, která byla přefiltrována přes nylonový membránový filtr (0,22 µm) do chromatografických vialek.

HPLC stanovení proběhlo pomocí kapalinového chromatografu Alliance 2695 s PDA 2996 detektorem (Waters, USA) a kolonou Poroshell 300SB-C8, 2,1 x 75 mm, 5 µm (Agilent, USA). Mobilní fáze byla složena z vody, acetonitrilu a kyseliny trifluoroctové. Bylo použito gradientové eluce a průtok mobilní fáze byl 1,0 $ml.min^{-1}$ při teplotě kolony 50 °C. Analyty byly detekovány při 205 nm. Mez detekce pro laktoferin byla 1,5 mg/l. Pro sběr a vyhodnocování dat a chod kapalinového chromatografu byl použit software Empower 2 (Waters, USA). Kvantifikace laktoferinu byla provedena metodou vnějšího standardu s využitím standardu laktoferinu z kravského mléka (Sigma Aldrich, USA). Na obrázku č.1 je uvedena část chromatogramu zobrazující pík laktoferinu v analyzovaném vzorku mléka i ve standardním roztoku laktoferinu v retenčním čase 10,5 minut.

Statistické vyhodnocení bylo provedeno za použití F-testu a t-testu pro společné nebo různé rozptyly a Pearsonova korelačního koeficientu v programu Unistat 6.5 (Unistat, Velká Británie).

Obrázek č. 1: Část chromatogramu zobrazující pík laktoferinu (retenční čas 10,5)



Pozn.: Černá křivka = standard laktoferinu, Růžová křivka = vzorek mléka

VÝSLEDKY A DISKUSE

Průměrná koncentrace laktoferinu v analyzovaných vzorcích mléka byla 123,73 ± 58,51 mg/l, jak je zřejmé z tabulky č.1. Stanovené hodnoty se pohybovaly v širokém rozmezí od 39,80 mg/l do 250,46 mg/l, což odpovídá výsledkům uváděným v práci autorů Madureira et al. (2007), kteří uvádí rozmezí obsahu laktoferinu v kravském mléce ještě širší (20 až 350 mg/l). Autoři uvádí, že koncentrace laktoferinu je proměnlivá v závislosti na období laktace. Podobné hodnoty obsahu laktoferinu v kravském mléce uvádí také autoři Tsakali et al. (2019) (188,4 ± 13,2 mg/l) a Cheng et al. (2008) (115,4 ± 67,4 mg/l).

Tabulka č. 1: Obsah laktoferinu v kravském mléce

Koncentrace laktoferinu (mg/l)	
průměr	123,73
směrodatná odchylka (SD)	58,51
minimální hodnota	39,80
maximální hodnota	250,46

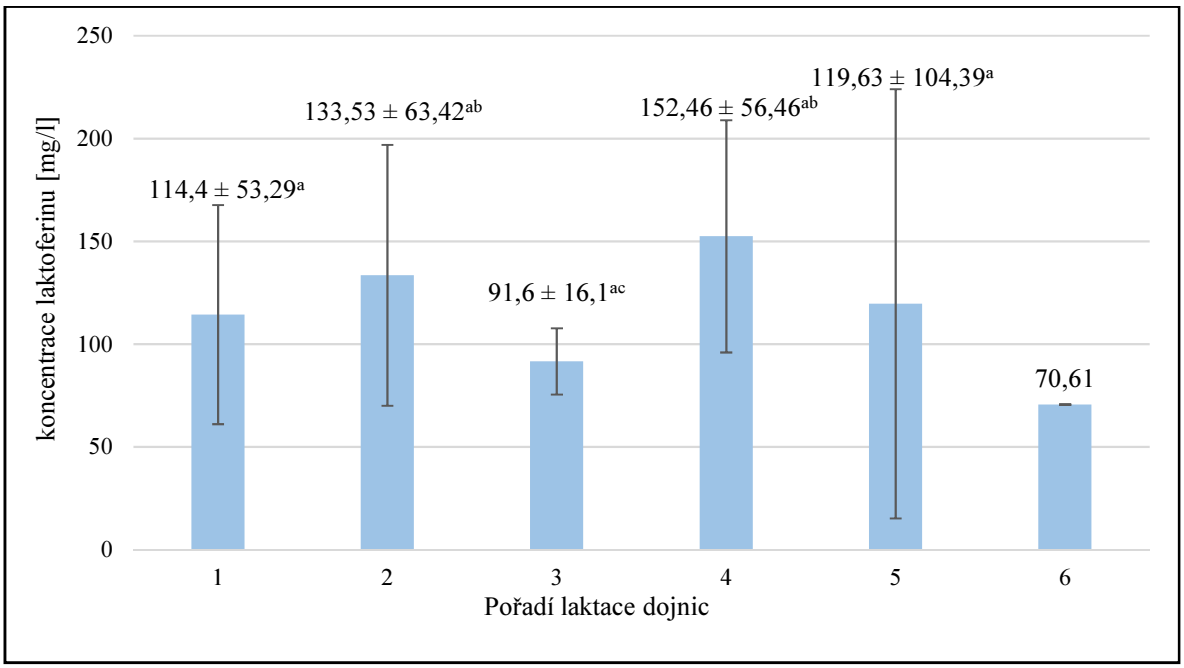
Graf č.1 zobrazuje závislost koncentrace laktoferinu na pořadí laktace. Z výsledků není zřejmý žádný trend zvýšení ani snížení vlivem pořadí laktace. Zřejmě by bylo třeba cílené sledování množství laktoferinu v mléce od stále stejných dojnic ve stejných fázích jednotlivých

laktací, aby mohl být vliv pořadí laktace správně posouzen. V případě výsledků v této práci se jedná o pilotní studii, kdy byly vzorky mléka odebírány v jednom období v určitém chovu od všech dojnic, které byly právě v laktaci. A pořadí laktace není jediným faktorem, který se významně podílí na ovlivnění obsahu laktoferinu v mléce a výsledky v této práci byly zřejmě ovlivněny i jinými faktory.

Musayeva et al. (2016) zjistili postupný pokles koncentrace laktoferinu spolu se zvyšujícím se pořadím laktace. Posuzovali pouze první až třetí laktaci dojnic. Množství laktoferinu v mléce z první laktace uvádí 80 ± 10 mg/l, ze druhé laktace 60 ± 10 mg/l a ze třetí 50 ± 10 mg/l.

Król et al. (2010) ve své studii uvádí podobný trend vývoje obsahu laktoferinu v jednotlivých laktacích jako v naší práci, tzn. žádný trend snížení ani zvýšení se zvyšujícím se pořadím laktace, nýbrž střídavý vzrůst a pokles. Nejblíže se našim výsledkům přiblížila průměrná koncentrace laktoferinu od dojnic ve třetí laktaci, tedy 99,50 ± 16,32 mg/l, kdy v naší práci bylo dosaženo 91,60 ± 16,10 mg/l.

Graf č. 1: Vliv pořadí laktace dojnic na obsah laktoferinu



Pozn.: 1. shodná písmena v horním indexu výsledných hodnot značí p > 0,05; rozdílná písmena značí p ≤ 0,05

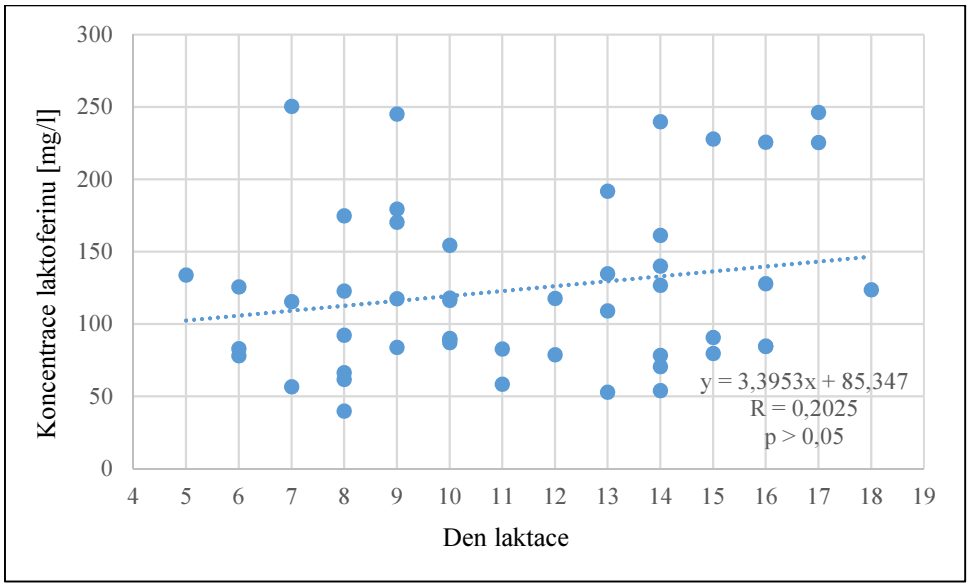
2. v šesté laktaci byl odebrán pouze jeden vzorek, proto není uvedeno SD ani statistické vyhodnocení

Graf č.2 znázorňuje závislost koncentrace laktoferinu na fázi laktace. Podobně jako u pořadí laktace není z výsledků zřetelný žádný trend. I když korelační koeficient regresní přímky je v kladné hodnotě, což značí vzrůstající charakter závislosti. To by znamenalo, že s rostoucí fází laktace stoupá i koncentrace laktoferinu. Ovšem vzrůst je velmi mírný, statisticky

nevýznamný ($p > 0,05$). Je však nutné zmínit, že byly hodnoceny výsledky pro velmi krátké období laktace, pouze do 18. dne. Studie, které zkoumají vliv fáze laktace na koncentraci laktoferinu v mléce, analyzují vzorky v průběhu celé laktace.

Brodziak et al. (2015) ve své práci rozdělili období laktace, které dosahovalo až do 305. dne po porodu, na 3 skupiny. Naše výsledky z laktace do 18.dne činí průměrně 123,73 ± 58,51 mg/l, první skupina v práci Brodziak et al. (2015) (≤ 120 dní laktace) vykazuje průměrnou koncentraci laktoferinu 103,47 ± 14,10 mg/l a s rostoucí fází laktace se koncentrace laktoferinu postupně zvyšuje.

Graf č.2: Vliv fáze laktace dojnic na obsah laktoferinu



ZÁVĚR

V této práci byl stanoven obsah laktoferinu v kravském mléce v různém pořadí a fázi laktace. Nebyl zjištěn žádný zřejmý, statisticky významný trend změny koncentrace laktoferinu v závislosti na pořadí či fázi laktace. Zřejmě by bylo třeba cílené sledování množství laktoferinu v mléce od stále stejných dojnic ve stejných fázích jednotlivých laktací, aby mohl být vliv pořadí či fáze laktace správně posouzen. V případě výsledků v této práci se jedná o pilotní studii, kdy byly vzorky mléka odebírány v jednom období v určitém chovu od všech dojnic, které byly právě v laktaci.

PODĚKOVÁNÍ

Práce byla finančně podpořena projektem NAZV QK21010326.

POUŽITÁ LITERATURA

1. BRODZIAK, Aneta, Jolanta KRÓL, Zygmunt LITWIŃCZUK, 2015. Whey protein content and fatty acids profile in milk of cows used in intensive and conventional production systems with regard to stage of lactation. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*. **39**(6), 745–750. DOI: 10.3906/vet-1509-48.
2. CHENG, Jiangbo, Jiaqi WANG, Dengpan BU, Guoli LIU, Changgong ZHANG, Hong-yu WEI, Liyi ZHOU a Jin-Zheng WANG, 2008. Factors Affecting the Lactoferrin Concentration in Bovine Milk. *Journal od Dairy Science*. **91**(3), 970–976. DOI: 10.3168/jds.2007-0689.
3. IGLESIAS-FIGUEROA, Blanca F., Edward A. ESPINOZA-SÁNCHEZ, Tania S. SIQUEIROS-CENDÓN, Quintín RASCÓN-CRUZ, 2018. Lactoferrin as a nutraceutical protein from milk, an overview. *International Dairy Journal*, **89**, 37–41. DOI: 10.1016/j.idairyj.2018.09.004.
4. KRÓL, Jolanta, Zygmunt LITWIŃCZUK, Aneta BRODZIAK a Joanna BARŁOWSKA, 2010. Lactoferrin, lysozyme and immunoglobulin G content in milk of four breeds of cows managed under intensive production systém. *Polish Journal of Veterinary Sciences*. **13**(2), 357–361.
5. MADUREIRA, Ana R., Cláudia I. PEREIRA, Ana M. P. GOMES, Manuela E. PINTADO a F. Xavier MALCATA, 2007. Bovine whey proteins – Overview on their main biological properties. *Food Research International*. **40**(10), 1197–1211.
6. MUSAYEVA, Kristina, Antanas SEDEREVIČIUS, Rasa ŽELVYTĖ, Ingrida MONKEVIČIENĖ, Danuta BELIAVSKA-ALEKSIEJŪNĖ a Sigita KERZIENĖ, 2016. Concentration of lactoferrin and immunoglobulin G in cows' milk in relation to health status of the udder, lactation and season. *Polish Journal of Veterinary Sciences*. **19**(4), 737–744. DOI: 10.1515/pjvs-2016-0093.
7. SUPERTI, Fabiana, 2020. Lactoferrin from Bovine Milk: A Protective Companion for Life. *Nutrients*. **12**(9), 2562. DOI:10.3390/nu12092562.
8. TSAKALI, Efstathia, Arhontoula CHATZILAZAROU, Dimitra HOUHOULA, Spiridon KOULOURIS, Jan TSAKNIS a Jan VAN IMPE, 2019. A rapid HPLC method for the determination of lactoferrin in milk of various species. *Journal of Dairy Research*. **86**(2), 238–241. DOI: 10.1017/S0022029919000189.

Kontaktní adresa: Bartáková Klára, Department of Animal Origin Food and Gastronomic Sciences, Faculty of Veterinary Hygiene and Ecology, University of Veterinary Sciences Brno, Palackého tř. 1946/1, 612 42 Brno, Czech Republic; E-mail: bartakovak@vfu.cz

ZASTOUPENÍ MASTNÝCH KYSELIN V ROSTLINNÝCH ANALOZÍCH MASA

FATTY ACID CONTENT IN PLANT MEAT ANALOGUES

Bartáková Klára, Pospíšil Jan, Kameník Josef, Bursová Šárka

Ústav hygieny a technologie potravin živočišného původu a gastronomie, Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární univerzita Brno, Česká republika

ABSTRACT

In this study, the fatty acids content in plant protein-based meat analogues (PBMA), was determined. A total of 42 PBMAs of various types were purchased in the market network. According to the information on the packaging, the products were divided into groups according to the type of oil or fat contained. The spectrum of fatty acids was determined after methylesterification of the sample using gas chromatography with flame ionization detection. The aim of the work was to compare the representation of fatty acids between individual types of products and also in the corresponding meat products.

The biggest difference was found in the content of saturated fatty acids, of which vegetable alternatives contained a statistically highly significant ($p<0.01$) lower amount (0.20-1.38 g/100g) than meat products (4.55-7.42 g /100g). The difference in the content of nutritionally important omega-3 unsaturated fatty acids is also interesting, where plant analogues that contained only rapeseed oil in their composition showed a content in the range of 0.245-0.718 g/100g, while meat products only 0.026-0.094 g/100g and vegetable analogues containing only sunflower oil 0.023-0.404 g/100g. It follows from the above that PBMA can be an interesting source of nutritionally important unsaturated fatty acids and that the type of fat used in the production of PBMA significantly affects the representation of fatty acids.

Key words: PBMA, unsaturated, saturated, omega-3

ÚVOD

Rostlinné analogy masných výrobků jsou v současné době na světě stále více produkovány s cílem dodat na trh alternativní výrobky na bázi rostlinných bílkovin připomínající svým charakterem maso a napodobující vzhled, barvu, texturu a chuť klasických produktů z masa, které ale byly získány jiným způsobem než představuje porážka jatečných zvířat (Windhorst, 2021). Řada dietárních doporučení zahrnuje omezení spotřeby klasických průmyslově zpracovaných masných výrobků z důvodů vysokého obsahu nasycených tuků (Aranceta-Bartrina et al., 2017). Řada analogů masných výrobků tak využívá rostlinné oleje

namísto nasycených živočišných tuků, případně rybí olej, výtažky z mořských řas či jejich kombinace (Alejandre et al., 2019).

V roce 2020 se celosvětově prodaly potraviny vyrobené z alternativních proteinů v hodnotě 13 miliard amerických dolarů. S očekávaným ročním růstem 3 % se celosvětová poptávka po bílkovinách pro lidskou výživu mezi lety 2020 až 2035 zvýší z 587 milionů tun na 872 milionů tun (Windhorst, 2021).

Alternativní produkty k masu na bázi rostlinných bílkovin se označují jako *plant protein-based meat analogues* (PBMA). K jejich výrobě se používají různé složky včetně vody, oleje, bílkovin izolovaných z rostlin, sacharidů, ochucovadel, barviv a pojiv (Zhou et al., 2021). Tyto složky se podílí na výsledném složení produktů. Zastoupení mastných kyselin v tucích použitých při výrobě PBMA ovlivňuje jejich nutriční vlastnosti a chemickou stabilitu. Nenasycené mastné kyseliny, zejména ω-3 polynenasycené, mají různé zdravotní přínosy, zejména schopnost podporovat zdraví srdce a mozku (McClements and Grossmann, 2021).

Cílem této práce bylo stanovit profil mastných kyselin v rostlinných analozích masných výrobků dostupných na trhu a vyhodnotit ve vztahu k druhu tuku použitého při výrobě dle údajů o složení produktů na obale. Profil mastných kyselin byl také porovnán s profilem mastných kyselin v běžných masných výrobcích odpovídajícího typu.

MATERIÁL A METODIKA

Jako materiál bylo v tržní síti v období červen-říjen 2022 zakoupeno celkem 42 vzorků PBMA různého typu nazývané např. jako vegan burger, vegi steak, nudličky ze sóje nebo vegetariánské kuličky určených buď k chladírenskému, nebo mrazírenskému skladování. K porovnání výsledků bylo zakoupeno 9 vzorků odpovídajících výrobků z masa nazývané na obale např. jako hovězí burger nebo vepřové karbanátky.

Ve výrobcích byl stanoven celkový obsah tuku pomocí metody ČSN ISO 1443 Stanovení celkového obsahu tuku.

Mastné kyseliny byly ve vzorcích stanoveny ve formě methylesterů mastných kyselin (FAME), které byly připraveny alkalickou hydrolýzou tuku varem produktu s methanolickým roztokem hydroxidu draselného a po následné úpravě pH roztoku reesterifikací za varu pod zpětným chladičem na příslušné FAME. Po zchlazení byly FAME extrahovány do n-hexanu (VWR International, Taiwan) vytřepáním na třepačce GFL 3005 (Gesellschaft für Labortechnik, Německo). Oddělený hexanový podíl byl přefiltrován přes vrstvu bezvodého síranu sodného (Honeywell/Fluka, Německo) do chromatografické vialky a následně analyzován s využitím plynové chromatografie s plamenově-ionizační detekcí na chromatografu HP 6890 (Agilent, USA). Jako nosný plyn bylo použito helium (Airproducts,

ČR), celkový průtok nosného plynu kolonou činil 1,2 ml.min^{-1}. Nastřikovaný objem vzorku pro analýzu činil 1 µl. K separaci methylesterů byla použita kapilární kolona HP-88 (Agilent, USA) o délce 100 m. Identifikace a kvantifikace mastných kyselin byla provedena metodou vnějšího standardu na základě srovnání se směsným standardem 37 methylesterů mastných kyselin Supelco 37 Component FAME Mix (Sigma-Aldrich, Německo) a standardy dalších FAME: methylester konjugované kyseliny linolové, methylester kyseliny cis-7,10,13,16-dokosatetraenové a kyseliny 4,7,10,13,16-dokosapentaenové. Jako vnitřní standard byla použita kyselina nonadekanová (vše Sigma-Aldrich, Německo).

Statistické vyhodnocení bylo provedeno za použití F-testu a t-testu pro společné nebo různé rozptyly a v programu Unistat 6.5 (Unistat, Velká Británie).

VÝSLEDKY A DISKUSE

Tabulka č.1 uvádí přehled druhů olejů použitých při výrobě PBMA podle údajů o složení výrobků na obalech. Nejvíce dominuje použití řepkového či slunečnicového oleje, bud samostatně (řepkový olej ve 13 výrobcích, slunečnicový olej v 10 výrobcích) nebo ve směsi obou olejů (v 7 výrobcích). V menší míře byl použit i kokosový olej, a to ve směsi s řepkovým olejem (v 5 výrobcích). V nejmenším počtu výrobků byl použit olej ze sojových bobů nebo klíčků (ve 3 výrobcích). Zajímavé je, že žádný produkt neobsahoval palmový olej, který je v současné době hojně využívaným tukem při výrobě potravin. Na trhu jsou dostupné i výrobky (analyzovali jsme 4 výrobky), které nemají uveden na obale žádný použitý tuk, což je potvrzeno i minimálním obsahem tuku, který se pohyboval v rozmezí 0,003-0,093 g/100g, zatímco ostatní PBMA obsahovaly 1,44-16,43 g/100g tuku. Obsah tuku v PBMA, které obsahují tuk, je srovnatelný s obsahem tuku v masných výrobcích odpovídajícího typu, který se pohyboval v rozmezí 4,33-17,85 g/100g, jak je uvedeno v tabulce č.2.

Podobné zastoupení olejů v PBMA produktech uvádí ve své práci Mayer Labba et al. (2022), kteří analyzovali 44 PBMA produktů dostupných na švédském trhu. 22 produktů neslo na svém obalu informaci o obsahu řepkového oleje, 7 produktů o použití slunečnicového oleje a 6 produktů o přídavku směsi řepkového a slunečnicového oleje. Podobně 3 výrobky neobsahovaly žádný přidaný tuk. Narozdíl od našich výsledků se na trhu ve Švédsku vyskytují i výrobky obsahující ve směsi s řepkovým olejem i palmový olej nebo máslo shea. Celkový obsah tuku se v PBMA výrobcích švédského trhu obsahujících přidaný olej pohyboval v rozmezí 7,2-17,5 g/100 g, ve výrobcích označených jako „bez tuku“ Mayer Labba et al. (2022) uvádí obsah tuku 2,2-2,7 g/100 g.

Tabulka č. 1: Přehled druhů olejů (dle údajů na obale) použitých při výrobě pbma

druh oleje ve složení PBMA	počet PBMA obsahujících příslušný olej
řepkový	13
slunečnicový	10
směs řepkový + slunečnicový	7
směs kokosový + řepkový	5
ze soj.bobů n. klíčků	3
žádný	4

Tabulka č. 2: Obsah tuku v pbma a masných výrobcích

obsah tuku (g/100g)	masné výrobky	alternativy masa	
		s tukem	bez tuku
průměr	13,21	8,77	0,033
směrodatná odchylka	4,62	3,55	0,042
min	4,33	1,44	0,003
max	17,85	16,43	0,093

Tabulka č.3 uvádí porovnání obsahu polynenasycených mastných kyselin (PUFA) v produktech PBMA a odpovídajících masných výrobcích. Průměrný obsah PUFA ve všech PBMA byl 2,34 ± 0,95 g/100 g, zatímco v masných výrobcích byl statisticky vysoce významně ($p < 0,01$) nižší (0,81 ± 0,65 g/100 g). Tato skutečnost odpovídá informaci uvedené v práci autorů McClements and Grossmann, (2021), že tuky suchozemských zvířat mívají relativně nízké hladiny PUFA, zatímco většina rostlinných tuků má vysoký obsah nenasycených tuků.

Podíl PUFA v PBMA dle obsaženého druhu oleje byl nejnižší v PBMA obsahující směs řepkového a slunečnicového oleje (1,57 ± 0,73 g/100 g), což je zajímavé, protože PBMA obsahující pouze řepkový nebo pouze slunečnicový olej obsahovaly podobné vyšší množství PUFA (2,20 ± 0,37 g/100 g, resp. 2,78 ± 1,33 g/100 g). Zřejmě širší rozmezí hodnot PUFA v PBMA obsahující slunečnicový olej (0,61-4,33 g/100 g) ovlivnilo hodnoty PUFA v PBMA se směsí uvedených olejů. Nejvyšší obsah byl zjištěn v PBMA obsahující spolu s řepkovým olejem i olej kokosový (3,31 ± 0,79 g/100 g).

Podobné výsledky zjistili Mayer Labba et al. (2022), a to nejnižší obsah PUFA v PBMA obsahující směs řepkového a slunečnicového oleje (průměrně 2,16 g/100 g) a nejvyšší obsah PUFA v PBMA se slunečnicovým olejem (průměrně 5,89 g/100 g).

Tabulka č. 3: Obsah polynenasycených mastných kyselin (PUFA) v pbma a masných výrobcích

obsah PUFA (g/100g)	masné výrobky	rostlinné alternativy souhrn	rostlinné alternativy dle druhu obsaženého tuku				
			Řepk. olej	Sluneč. olej	Řepk. + Sluneč. olej	Řepk. + Kokos. olej	Olej ze soj.bobů n. klíčků
průměr	**0,808**[a]	**2,338**[b]	2,200	2,778	1,574	3,312	2,096
SD	**0,649**	**0,949**	0,368	1,328	0,730	0,789	0,569
min	**0,324**	**0,606**	1,617	0,606	0,758	2,467	1,535
max	**1,506**	**4,367**	2,801	4,328	2,738	4,367	2,672

Pozn.: rozdílná čísla a,b u hodnoty průměru značí statistickou významnost rozdílů na hladině významnosti $p < 0,01$

Tabulka č.4 uvádí porovnání obsahu nutričně významných omega-3 PUFA v produktech PBMA a odpovídajících masných výrobcích. Průměrný obsah omega-3 ve všech PBMA byl 0,36 ± 0,23 g/100 g, zatímco v masných výrobcích byl statisticky vysoce významně ($p < 0,01$) nižší (0,055 ± 0,038 g/100 g). Tato skutečnost odpovídá informaci, kterou uvádí McClements and Grossmann, (2021), že některé rostlinné potravinářské oleje obsahují relativně vysoké hladiny kyseliny alfa-linolenové (ALA), což je ω-3 mastná kyselina. Z tohoto důvodu mohou být tyto oleje použity jako zdroj ω-3 mastných kyselin v potravinách rostlinného původu.

Podíl omega-3 PUFA v PBMA dle obsaženého druhu oleje byl nejnižší v PBMA obsahující pouze slunečnicový olej (0,13 ± 0,13 g/100 g), nejvyšší obsah byl zjištěn v PBMA obsahující pouze řepkový olej (0,50 ± 0,14 g/100 g).

Podobné výsledky zjistili Mayer Labba et al. (2022), a to nejnižší obsah omega-3 v PBMA obsahující pouze slunečnicový olej (< 0,1 g/100 g) a nejvyšší obsah v PBMA obsahující pouze řepkový olej (průměrně 0,6 g/100 g).

Tabulka č.5 uvádí porovnání obsahu nasycených mastných kyselin (SFA) v produktech PBMA a odpovídajících masných výrobcích. Průměrný obsah SFA ve všech PBMA byl 0,71 ± 0,25 g/100 g, zatímco v masných výrobcích byl statisticky vysoce významně ($p < 0,01$) vyšší (5,57 ± 1,02 g/100 g).

Podíl SFA v PBMA dle obsaženého druhu oleje byl nejnižší podobně jako u obsahu PUFA v PBMA obsahující směs řepkového a slunečnicového oleje (0,52 ± 0,22 g/100 g), nejvyšší obsah byl zjištěn v PBMA obsahující spolu s řepkovým olejem i olej kokosový (1,01 ± 0,12 g/100 g).

Tabulka č. 4: Obsah omega-3 polynenasycených mastných kyselin (omega-3 PUFA) v PBMA a masných výrobcích

obsah omega-3 MK (g/100g)	masné výrobky	rostlinné alternativy souhrn	rostlinné alternativy dle druhu obsaženého tuku				
			Řepk. olej	Sluneč. olej	Řepk. + Sluneč. olej	Řepk. + Kokos. olej	Olej ze soj.bobů n. klíčků
průměr	**0,055**[a]	**0,358**[b]	0,502	0,131	0,324	0,367	0,483
SD	**0,038**	**0,230**	0,143	0,132	0,241	0,298	0,181
min	**0,026**	**0,023**	0,245	0,023	0,054	0,106	0,335
max	**0,094**	**0,718**	0,718	0,404	0,695	0,703	0,685

Pozn.: rozdílná čísla a,b u hodnoty průměru značí statistickou významnost rozdílů na hladině významnosti $p < 0,01$

Podobné výsledky zjistili Mayer Labba et al. (2022), a to nejvyšší obsah SFA v PBMA se směsí řepkového a kokosového oleje (průměrně 2,0 g/100 g) a nejnižší obsah SFA v PBMA obsahující pouze řepkový olej (průměrně 0,8 g/100 g).

Tabulka č. 5: Obsah nasycených mastných kyselin (SFA) v PBMA a masných výrobcích

obsah SFA (g/100g)	masné výrobky	rostlinné alternativy souhrn	rostlinné alternativy dle druhu obsaženého tuku				
			Řepk. olej	Sluneč. olej	Řepk. + Sluneč. olej	Řepk. + Kokos. olej	Olej ze soj.bobů n. klíčků
průměr	**5,572**[a]	**0,708**[b]	0,735	0,717	0,518	1,005	0,569
SD	**1,023**	**0,246**	0,234	0,220	0,219	0,117	0,130
min	**4,554**	**0,204**	0,459	0,204	0,231	0,890	0,444
max	**7,421**	**1,383**	1,383	0,945	0,855	1,126	0,704

Pozn.: rozdílná čísla a,b u hodnoty průměru značí statistickou významnost rozdílů na hladině významnosti $p < 0,01$

ZÁVĚR

Největší rozdíl mezi produkty PBMA a masnými výrobky byl zjištěn v obsahu nasycených mastných kyselin, kterých rostlinné alternativy obsahovaly statisticky vysoce významně ($p<0,01$) nižší množství (0,20-1,38 g/100g) než masné výrobky (4,55-7,42 g/100g). Zajímavý je také rozdíl v obsahu nutričně významných omega-3 nenasycených mastných kyselin, kde rostlinné analogy, které ve složení obsahovaly pouze řepkový olej, vykazovaly obsah v rozmezí 0,245-0,718 g/100g, zatímco masné výrobky pouze 0,026-0,094 g/100g a

rostlinné analogy obsahující pouze slunečnicový olej 0,023-0,404 g/100g. Z uvedeného vyplývá, že PBMA mohou být zajímavým zdrojem nutričně významných nenasycených mastných kyselin a že druh použitého tuku při výrobě PBMA významně ovlivňuje zastoupení mastných kyselin.

PODĚKOVÁNÍ

Práce byla finančně podpořena projektem Interní tvůrčí agentury VETUNI č. 2022ITA24**.**

POUŽITÁ LITERATURA

1. ALEJANDRE, M., PASSARINI, D., ASTIASARÁN, I., ANSORENA, D. (2017). The effect of low-fat beef patties formulated with a low-energy fat analogue enriched in long-chain polyunsaturated fatty acids on lipid oxidation and sensory attributes. *Meat Science*, **134**, 7–13.
2. ARANCETA-BARTRINA, J., ARIJA-VAL, V., MAÍZ-ALDALUR, E., MARTÍNEZ-MUÑOZ, E., ORTEGA-ANTA, R.M., PÉREZ-RODRÍGO, C. (2017). *Nutrición Hospitalaria*. Senc, **33**(2), 1–21.
3. MAYER LABBA, I.-C., STEINHAUSEN, H., ALMIUS, L., BACH KNUDSEN, K.E., SANDBERG, A.-S. (2022). Nutritional Composition and Estimated Iron and Zinc Bioavailability of Meat Substitutes Available on the Swedish Market. *Nutrients*. **14**, 3903.
4. McCLEMENTS, D.J., GROSSMANN, L. (2021). The science of plant-based foods: Constructing next-generation meat, fish, milk, and egg analogs. *Comprehensive reviews in food science and food safety.* **20**, 4049-4100.
5. WINDHORST, H.-W. (2021). Liegt die Zukunft alternativer Proteine in Asien? *Fleischwirtschaft.* **101(**3), 46-50.
6. ZHOU, H., HU, Y., TAN, Y., ZHANG, Z., MCCLEMENTS, D. J. (2021). Digestibility and gastrointestinal fate of meat *versus* plant-based meat analogs: An *in vitro* comparison. *Food Chemistry.* **364**, 130439.

Kontaktní adresa: Bartáková Klára, Department of Animal Origin Food and Gastronomic Sciences, Faculty of Veterinary Hygiene and Ecology, University of Veterinary Sciences Brno, Palackého tř. 1946/1, 612 42 Brno, Czech Republic; E-mail: bartakovak@vfu.cz

VPLYV MACERÁCIE HROZNA NA ANTIOXIDAČNÉ VLASTNOSTI A OBSAH CELKOVÝCH POLYFENOLOV VO VÍNE

EFFECT OF GRAPE MACERATION ON THE ANTIOXIDANT AND THE CONTENT OF POLYPHENOLS IN WINE

Bartkovský Martin, Semjon Boris, Marcinčák Slavomír, Miščíková Alexandra

Katedra hygieny, technológie a zdravotnej bezpečnosti potravín, Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, Komenského 73, 041 81 Košice, Slovenská republika

ABSTRACT

The main goal of this study was to evaluate the effect of maceration on the quality parameters of Riesling Italian (2019). We followed 2 samples. The first sample was a control, it was produced by the classic reductive method. The second sample – experimental, was prepared by macerating the mash on the skins of ground berries of the same variety. Maceration on the peels took place for 2 weeks, and then the macerate was pressed and processed similarly to the control sample. We determined the total content of polyphenols, flavonoids, and the value of antioxidant activity.

Keywords: wine, maceration, antioxidant, polyphenols, quality

ÚVOD

Hrozno (*Vitis* spp.) patrí medzi celosvetovo najčastejšie pestovanú ovocnú plodinu. Približne 50 % hrozna sa používa na výrobu vína, jedna tretina sa používa ako čerstvé ovocie a zvyšok sa rafinuje na výrobu potravín, ako je džem, džús, atď. Konečné použitie sa v jednotlivých krajinách líši v závislosti od náboženského a politického záujmu regiónu. Macerácia zahŕňa obdobie, počas ktorého sú pevné látky hrozna, ako šupky, semená a, ak sú prítomné, stopky, v kontakte so šťavou (Shetty, 2004). Z fyzikálneho hľadiska sa fenolové zlúčeniny senzorického významu, ako sú antokyány, ktoré sú zodpovedné za farbu, a triesloviny získané zo semien a šupky (zodpovedné za vlastnosti pocitu v ústach, ako je adstringencia), ktoré sa extrahujú prostredníctvom procesu difúzneho prenosu hmoty. Extrakcia zo šupiek zahŕňa počiatočný únik z okrajov rozbitých buniek šupky, ku ktorému dochádza pri drvení, a pomalšiu koncentráciou riadenú difúziu cez pevné vrstvy, ku ktorej dochádza počas obdobia macerácie (Setford et al., 2017). Taníny pochádzajúce zo semien sa nachádzajú vo vnútornej a vonkajšej vrstve semien a majú nižšiu molekulovú hmotnosť, ale vyššiu

koncentráciu ako taníny získané zo šupky (Hanlin et al., 2011). Do vína sa extrahujú difúznym procesom, ale ich difúzia závisí od koncentrácie tanínu už prítomného vo víne, ako aj od procesu rozpúšťania, ktorý je nezávislý od koncentrácie (Setford et al., 2017). Macerácia a výroba etanolu tiež umožňujú solubilizáciu aróm a prekurzorov aróm, čo vedie k následným zmenám v prchavosti aróm. Fenoly boli široko študované a je potvrdené, že vykazujú rôzne biologické aktivity, ktoré by mohli byť prospešné pre ľudské zdravie. Je známe, že znižujú riziko vzniku rakoviny, srdcových chorôb a cukrovky, inhibujú agregáciu plazmatických krvných doštičiek, aktivitu cyklooxygenázy (COX) a uvoľňovanie histamínu, zároveň sú schopné pôsobiť antibakteriálne, antivírusovo, protizápalovo a antialergicky (Oak et al., 2005; Shetty, 2004). Výhody mnohých týchto účinkov čiastočne vyplývajú z antioxidačnej charakteristiky fenolových látok, preto je dôležité kvantifikovať, identifikovať a vyhodnotiť ich antioxidačnú aktivitu (Cevallos-Casals et al., 2010).

MATERIÁL A METODIKA

Pre prípravu vín sme použili surovinu od spoločnosti PIVNICA Orechová. Pre výskum bolo použitých 200 kg hrozna Rizling vlašský ročník 2019 o cukornatosti 22° Brix. Surovina bola rozdelená na dve polovice. Kontrolná vzorka bola pripravená štandardnou reduktívnou formou. Surovina pre prípravu kontrolnej vzorky bola spracovaná mlynkoodzrňovacím strojom, aby sme oddelili bobule od strapiny. Následne bola surovina lisovaná hydro-pneumatickým lisom Lancmann pri maximálnom tlaku 2,5 kPa. Takto získaný mušt bol prenesený do nerezových tankov a bol ošetrený pomocou disiričitanu draselného (Borkén) v množstve 3g/100L. Surovina pre pokusnú vzorku bola spracovaná mlynkoodzrňovacím strojom, aby sme oddelili strapinu od bobúľ. Následne boli namleté bobule prenesené do nerezovej nádoby (100 L nerezový tank s pneumatickým vekom), kde prebiehala macerácia po dobu 2 týždňov. Takto namleté bobule boli ošetrené disiričitanom draselným (Borkén) v hodnote 3g/100L. Macerácia prebiehala reduktívnou formou, tzn. bez prístupu kyslíka. Po uplynutí 2 týždňov boli bobule lisované podobne ako u kontrolnej vzorky a mušt bol ošetrený prídavkom disiričitanu draselného v hodnote 2g/100L. Stanovenie celkových polyfenolov sme vykonali použitím Folin-Ciocalteuovho činidla. Celkový obsah bol vyjadrený v g/l ekvivalentoch kyseliny gálovej, ktorá sa používa ako štandardná referencia (Gutiérrez-Escobar et al., 2021).

Celkový obsah flavonoidov bol hodnotený kolorimetrickou skúškou s dusitanom sodným a chloridom hlinitým. Obsah flavonoidov bol vyjadrený ako ekvivalent quercetínu na 1 ml vzorky. Princípom stanovovania antioxidačnej aktivity metódou DPPH je vznik radikálovej formy zlúčeniny DPPH. DPPH je 2,2-difenyl-1-pierylhydrazyl, stabilný voľný radikál, ktorý

vďaka svojej štruktúre môže byť akceptorom atómu vodíka, čím prechádza do formy stabilnej molekuly. Redukcia DPPH antioxidantom alebo radikálom, ktorá sa prejavila odfarbovaním roztoku sme merali spektrofotometricky pri vlnovej dĺžke 517 nm. Veľkosť antioxidačnej aktivity sme vyjadrili ako % inhibície DPPH (Paulová H. et al., 2004).

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Celkovo sme merali 2 vzorky (6 opakovaní pre každú vzorku) v časovom rozpätí 6 mesiacov od ukončenia fermentácie vína. Absorbancia a výsledná hodnota bola spriemerovaná. Z uvedenej tabuľky 1. vyplýva, že obsah celkových polyfenolov sa zvyšoval a vzorky, ktoré prešli macerációu vykazujú najvyššie hodnoty (0,413±0,022 g.l^{-1}). Polyfenoly sa vyskytujú vo veľkej miere v obalových vrstvách, šupkách, preto vínne extrakty macerovaného vína majú najvyššie hodnoty.

Tabuľka 1, Výsledky stanovenia obsahu polyfenolov vo vzorkách vín

	Polyfenoly g.l^{-1}	
	kontrola	**macerované**
1 mesiac	0,046±0,001^{a}	0,150±0,017^{b}
3 mesiac	0,072±0,010^{a}	0,329±0,001^{b}
6 mesiac	0,298±0,002^{a}	0,413±0,022^{b}

(^{a,b}) – štatisticky významný rozdiel medzi stĺpcami ($P<0,05$)

Podobne ako my aj výskum Bestulič et al. (2022) sledoval vplyv macerácie na podiel polyfenolických látok. V ich výskume mala kontrolná skupina 0,109 mg.l^{-1}, to bola nižšia hodnota ako v našom víne. Po fermentácii dosiahli hodnotu 0,183 mg.l^{-1}. Macerácia prebiehala po dobu 21 dní, pričom zaznamenali lineárny nárast hodnôt polyfenolov. Výsledky zvyšovania polyfenolov zaznamenal aj Perestrelo et al. (2020), kedy dosiahli až 3,37 mg.l^{-1} polyfenolov vo vzorkách po 14 dňovej macerácii. Sledovali taktiež vplyv ročníka na podiel polyfenolov keď v roku 2010 zaznamenali obsah 120,39 mg.l^{-1} a v roku 2015 až 134,40 mg.l^{-1}.

Rovnako ako pri predchádzajúcej metóde aj pri stanovovaní flavonoidov bolo meraných 12 vzoriek vínnych extraktov. Po prvom mesiaci obsah flavonoidov macerovaných vínnych extraktov predstavoval hodnotu 0,047±0,005 mg.l^{-1}. Po troch mesiacoch sa hodnota zvýšila na 0,075±0,006 mg.l^{-1}. Na poslednom meraní, po šiestich mesiacoch hodnota flavonoidov dosiahla hodnotu 0,074±0,001 mg.l^{-1}. Hodnoty flavonoidov nameraných vo vínnych extraktoch je uvedený v tabuľke 2.

Tabuľka 2, Výsledky stanovenia obsahu flavonoidov vo vzorkách vín

	Flavonoidy mg.l^{-1}	
	kontrola	**macerované**
1 mesiac	0,027±0,002^{a}	0,047±0,005^{b}
3 mesiac	0,038±0,007	0,075±0,006
6 mesiac	0,035±0,001^{a}	0,074±0,001^{b}

(^{a,b}) – štatisticky významný rozdiel medzi stĺpcami ($P<0,05$)

Najvýraznejší podiel katechínov a epikatechínu zaznamenali aj Perestrelo et al. (2020) a Bestulič et. al (2022). Pri ich výskumoch sa sledovali jednotlivé flavonoidy a stanovili ich podiel vo vzorkách vín. U macerovaných bol podiel najmä katechínu v rozmedzí 7,04-12,01 mg.l^{-1}. U epikatechínu bola najvyššia hodnota 30,9 mg.l^{-1}. Vieme tak povedať, že vyzrievaním macerációu a samozrejme klimatickými podmienky pestovania sa priamo zvyšujú významné flavonoidy s pozitívnymi účinkami na organizmus konzumenta.

Z tabuľky 3. vyplýva, že najväčšiu antioxidačnú aktivitu vykazoval vínny extrakt po prvom mesiaci od výroby (72,522 %). U všetkých vzoriek pozorujeme klesajúce hodnoty antioxidačnej aktivity v priebehu skladovania. Tento jav je očakávaný. Najnižšie hodnoty po 6. mesiacoch skladovania dosiahla kontrolná vzorka (49,140 %) v porovnaní s pokusnou vzorkou (62,324 %). Namerané hodnoty antioxidačných aktivít z vínnych vzoriek sme uviedli v tabuľke 3.

Tabuľka 3, Výsledky stanovenia obsahu antioxidačnej aktivity vo vzorkách vín

	Antioxidačná aktivita (%)	
	kontrola	**macerované**
1 mesiac	58,024±8,946	72,522±7,486
3 mesiac	53,255±6,455^{a}	64,258±7,326^{b}
6 mesiac	49,140±10,775^{a}	62,324±4,165^{b}

(^{a,b}) – štatisticky významný rozdiel medzi stĺpcami ($P<0,05$)

ZÁVER

Macerácia výrazne ovplyvnila podiel polyfenolov, flavonoidov a antioxidačnej aktivity. Extrahovaním vyššieho množstva polyfenolov a zvýšením antioxidačnej aktivity predpokladáme pozitívny vplyv pre ľudský organizmus. Najvýraznejšie zvýšenie hodnôt sme zaznamenali po 6 mesiacoch skladovania.

POĎAKOVANIE

Táto práca bola podporená Vedeckou grantovou agentúrou Ministerstva školstva, vedy, výskumu a športu Slovenskej republiky a Slovenskej akadémie vied projektom VEGA 1/0156/21.

POUŽITÁ LITERATÚRA

1. Bestulič E, Rossi S, Tomislav P, Horvat I, Lukič I, et al. 2022. Comparison of differentmaceration and non-maceration treatments for enhancement of phenolic composition, colourintensity, and taste attributes of Malvazijaistarska (*Vitisvinifera* L.) whitewines, Journal of Food Composition and Analysis 109 Elsevier.
2. Cevallos-Casals B. A., Cisneros-Zevallos L. 2010. Impact of germination on phenoliccontent and antioxidant activity of 13 edible seed species. Food Chemistry, 119, pp. 1485-1490
3. Gutiérrez-Escobar Rocío, Aliaño-González María José and Emma Cantos-Villar. 2021. Wine Polyphenol Content and Its Influence on Wine Quality and Properties: A Review. Molecules (Basel, Switzerland), 26(3), 718
4. Hanlin R. L., Kelm M. A., Wilkinson K. L., Downey M. O. 2011. Detailed characterization of proanthocyanidins in skin, seeds, and wine of Shiraz and Cabernet Sauvignon wine grapes (Vitisvinifera). Journal of Agricultural and Food Chemistry. Scops
5. Oak M. H., El Bedoui J., Schini-Kerth V. B. 2005. Antiangiogenicproperties of natural polyphenols from redwine and green tea Journal of Nutritional Biochemistry, 16, pp. 1-8.
6. Paulová Hana, Bochoráková Hana, Táborská Eva. 2004. Metody stanovení antoxidační aktivity přírodních látek in vitro. Chem. Listy 98, Biochemický ústav Lékařské fakulty Masarykovy univerzity, 2004
7. Perestrelo R, Silva C, Silva P. Câmara JS. 2018. UnravelingVitisvinifera L grape maturity markersbased on integration of terpenic pattern and chemometric methods. Microchemical Journal, Devoted to the Application of Micro techniques in all Branches of Science;142. [online] 2018
8. SetfordPatrick C., Jeffery David W., Grbin Paul R., Muhlack Richard A. 2017. Factors affecting extraction and evolution of phenolic compounds during red wine maceration and the role of processmodelling. Trends in Food Science&Technology. Elsevier.

9. Shetty K. 2004. Review. Role of proline-linked pentosephosphate pathway in biosynthesis of plant phenolics for functional food and environmental applications: A review. Process Biochemistry, 39, pp. 789-803

Kontaktná adresa: Martin Bartkovský, Mgr., PhD., Katedra hygieny, technológie a zdravotnej bezpečnosti potravín, Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, Komenského 73, 041 81 Košice; E-mail: martin.bartkovsky@uvlf.sk

POUŽITIE FT-NIR SPEKTROSKOPU NA ANALÝZU ZÁKLADNÉHO CHEMICKÉHO ZLOŽENIA SYROV VYROBENÝCH Z OVČIEHO A KOZIEHO MLIEKA

THE USE OF FT-NIR SPECTROSCOPY TO ANALYSIS THE BASIC CHEMICAL COMPOSITION OF CHEESES MADE FROM SHEEP AND GOAT MILK

Benešová Lucia[1], Jakabová Silvia[2], Čurlej Jozef[2], Čapla Jozef[2], Zajác Peter[2], Golian Jozef [2]

[1]Výskumné centrum AgroBioTech, Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovenská republika

[2] Ústav potravinárstva, Fakulta biotechnológie a potravinárstva, Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovenská republika

ABSTRACT

The basic chemical composition of ten cheeses made from sheep and goat milk was studied. FT-NIR spectroscopy was used to determine the fat, protein, salt, pH value, and dry matter content of the cheese samples. The dry matter, fat, salt, pH value, and protein content differed significantly among all cheese samples ($p < 0.05$). The highest fat content was determined in the sample of sheep's milk cheese (42.188 ± 0.080%) and the lowest fat content was determined in a sample of goat's milk cheese (24.189 ± 0.099%). The sample of sheep's milk cheese had the highest content of proteins (33.418 ± 1.018%), whereas the lowest protein content was observed in cheese from goat milk (20.589 ± 0.093%). The results of the dry matter measured variable ranged between the highest content of in cheese from sheep milk (74.990 ± 0.044%) and the lowest content in cheese from goat milk (51.997±0.027 %). A strong linear correlation was found between the lipid and dry matter content of the fish samples ($R = 0.9689$). Principal component analysis extracted three major groups, which differentiate the analyzed samples based on their protein, fat, and dry matter content.

Key words: chemical composition, fat content, protein content, sheep cheese, goat cheese

ÚVOD

Syr je komplexná zmes vody, bielkovín, tuku, iónov a rôznych chemických zlúčenín. Počas fázy zreniam, syr prechádza zložitým radom chemických, bakteriálnych a enzymatických reakcií, ktoré sú zodpovedné za rozklad proteínovej matrice a definitívne za vývoj textúry a senzorických vlastností, ktoré sú typické pre zrelý syr (Pollard et al., 2003). Tradičné metódy

fyzikálnej a chemickej analýzy majú určité obmedzenia v dôsledku skutočnosti, že sú drahé a náročné na prácu, takže potravinársky priemysel má záujem hľadať hlavné kompozičné a kvalitatívne znaky, ktoré sa dajú určiť online a v reálnom čase. Zdá sa, že ide o priemyselnú potrebu, ale môže to byť aj príležitosť na charakterizáciu a následne na zhodnotenie miestnych syrov vyrábaných malými mliekarňami. Záujem spotrebiteľov sa stále viac orientuje na vlastnosti, ktoré môžu mať vplyv na ľudské zdravie, ako je napríklad zloženie tuku (González-Martín et al., 2020). Použitie nízkonákladových techník, ako je blízka infračervená spektroskopia (NIRS), by mohlo pomôcť malým mliekarňam zlepšiť kontrolu procesu a následne kvalitu výroby syra. Rastúci záujem o vývoj inštrumentálnych techník je zameraný viac objektívne, rýchlejšie a lacnejšie hodnotenie kvality syra. V ideálnom prípade sú takéto techniky tiež neinvazívne a nedeštruktívne (Parrini et al., 2020). Blízka infračervená spektroskopia sa ukázala ako spoľahlivá technika na predpovedanie charakteristík zloženia a kvality rôznych potravín (Ozen and Mauer, 2002) a vykazuje značné výhody vzhľadom na tradičnú analytickú techniku, pokiaľ ide o jednoduchosť manipulácie so vzorkou a je prípravu. Holroyd (2013) v štúdii tvrdí, že syr je najťažším mliečnym výrobkom na analýzu pomocou NIRS kvôli heterogénnym vlastnostiam a veľkej variabilite druhov syrov. V nedávnom prehľade (De Marchi et al., 2018) niekoľko štúdií zvažovalo aplikáciu infračervených technológií ako NIRS a strednú infračervenú spektroskopiu na predpovedanie chemického zloženia syrov a mliečnych výrobkov a na overenie alebo diskrimináciu mliečnych výrobkov. Okrem toho niekoľko štúdií skúmalo použitie NIRS ako nástroja na predpovedanie zloženia mastných kyselín v syre: Manuelian et al. (2017) študoval obsah minerálov a profil mastných kyselín európskych komerčných syrov pomocou spektroskopie transmitancie a González-Martín (2017) pracoval na syroch s použitím ovčieho, kozieho a kravského mlieka zmiešaného s rôznymi percentami.

Cieľom tejto štúdie bolo zhodnotiť výkonnosť FT-NIR spektroskopie na určenie chemického zloženia syrov zo surového ovčieho a kozieho mlieka z malých miestnych mliekarní.

MATERIÁL A METODIKA

Všetky vzorky syrov boli získané z maloobchodných predajní. Do tejto štúdie bolo zahrnutých 10 vzoriek syrov vyrobených z ovčieho a kozieho mlieka. Varianty vzoriek C.3 boli všetko ovčie polotvrdé a tvrdé zrejúce syry. Varianty vzoriek B.3 3 boli všetko kozie polotvrdé a tvrdé zrejúce syry s výnimkou vzorky D.1.2, čo bol parený syr vyrobený z kozieho mlieka. Čerstvé vzorky sa strúhali pomocou elektrického strúhaču Concept ES 1000 (Concept, Česká republika) a zlisovali do 90 mm Petriho misiek. Vzorky syrov (tabuľka 1) sa analyzovali

pomocou spektroskopu FT-NIR Tango (Bruker Optics, Nemecko). Z každej zmesi sa naplnilo 10 Petriho misiek. Merania sa uskutočňovali trojmo. Štatistická analýza údajov bola vykonaná v XLSTAT (v. 2020.4.1 Addinsoft, Francúzsko). Distribúcia údajov bola overená pomocou Shapiro-Wilk testu (p = 0,05). Údaje boli testované pomocou štatistického testu ANOVA, aby sa určili významné rozdiely vo vybraných parametroch (obsah tuku, bielkovín, soli, sušiny a pH). Na sumarizáciu a vizualizáciu informácií v našom súbore údajov, ktoré obsahujú pozorovania popísané viacerými korelovanými kvantitatívnymi premennými bola použitá analýza hlavných komponentov (PCA).

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Priemerné hodnoty a štandardné odchýlky chemického zloženia pre syry vyrobené z ovčieho a kozieho mlieka sú uvedené v tabuľke č. 1. Nakoľko vypočítaná p hodnota (0,119) bola vyššia ako p = 0,05 potvrdilo sa, že údaje pochádzajú z normálneho rozloženia. Testom lineárnej regresie sa zistila silná lineárna korelácia medzi obsahom lipidov a sušiny vo vzorkách rýb (R = 0,9689).

Tabuľka č. 1, Približné zloženie analyzovaných druhov syrov z ovčieho a kozieho mlieka

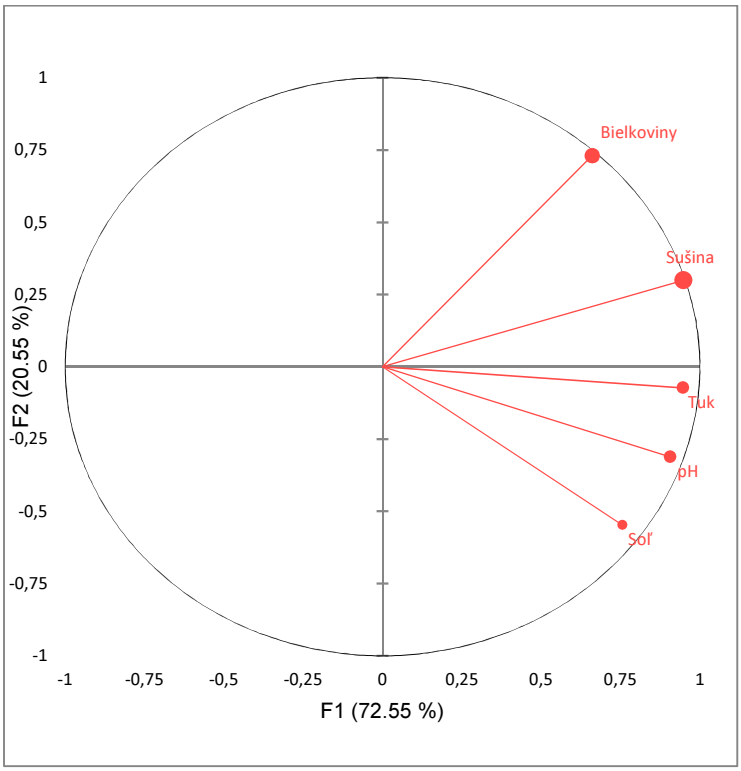
Vzorky		Bielkoviny	Tuk	Sušina	Soľ	pH
Syry z ovčieho mlieka	C.3.1	25,56 ± 0,07h	33,22 ± 0,02d	63,71 ± 0,06g	1,81 ± 0,05e	6,06 ± 0,02d
	C.3.2	27,23 ± 0,01g	26,47 ± 0,10b	70,98 ± 0,09d	3,23 ± 0,02a	6,78 ± 0,00a
	C.3.3	30,23 ± 0,05d	42,19 ± 0,08a	73,85 ± 0,05c	2,56 ± 0,04c	6,60 ± 0,02b
	C.3.4	25,10 ± 0,04i	30,62 ± 0,05e	63,22 ± 0,11h	1,78 ± 0,02ef	5,64 ± 0,03f
	C.3.5	33,03 ± 0,03b	35,48 ± 0,03c	74,56 ± 0,0b2	2,67 ± 0,07b	6,15 ± 0,02c
	C.3.6	33,42 ± 0,02a	36,47 ± 0,03b	74,99 ± 0,04a	2,55 ± 0,03c	6,18 ± 0,00c
Syry z kozieho mlieka	B.3.1	30,41 ± 0,01c	26,59 ± 0,01h	62,84 ± 0,03i	1,24 ± 0,05h	5,74 ± 0,02g
	B.3.2	29,72 ± 0,05e	30,04 ± 0,07f	65,81 ± 0,12e	1.73 ± 0.07f	5,93 ± 0,02e
	B.3.3	29,22 ± 0,05f	29,48 ± 0,08g	65,07 ± 0,10f	1,58 ± 0,04g	5,92 ± 0,02e
	D.1.2	20,59 ± 0,09j	24,19 ± 0,10i	51,99 ± 0,03j	2,15 ± 0,02d	5,59 ± 0,02h

Poznámka: a, b, c, d, e, f, g, h, i, j znamená, že riadky s rôznym písmenom sú štatisticky odlišné (Tukeyho test, p <0,05).

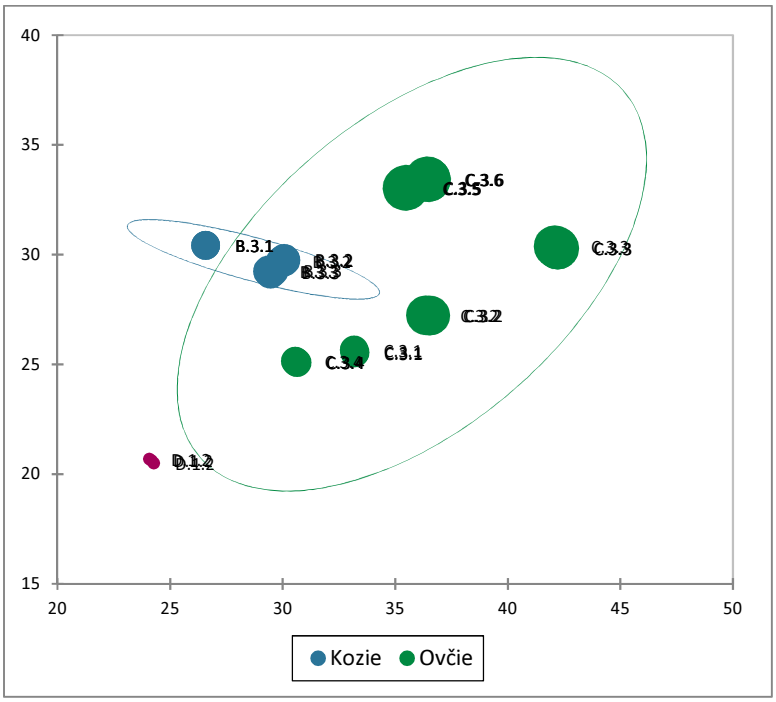
Najvyšší obsah tuku bol stanovený vo vzorke syra z ovčieho mlieka (42,19 ± 0,08 %) a najnižší obsah tuku bol stanovený vo vzorke syra z kozieho mlieka (24,19 ± 0,10 %). Najvyšší obsah bielkovín mala vzorka syra z ovčieho mlieka (33,42 ± 1,02 %), naopak najnižší obsah bielkovín bol zaznamenaný v syre z kozieho mlieka (20,59 ± 0,09 %). Výsledky sušiny sa pohybovali medzi najvyšším obsahom v syre z ovčieho mlieka (74,99 ± 0,04 %) a najnižším obsahom v syre z kozieho mlieka (51,99 ± 0,03 %). Najvyšší obsah soli bol vo vzorke syru z ovčieho mlieka (3,23 ± 0,02 %) a najnižší obsah v syre z kozieho mlieka (1,24 ± 0,05 %). Hodnota pH bola najvyššia (6,78 ± 0,00 %) v syroch z ovčieho mlieka a najnižšia (5,59 ± 0,02 %) v syroch z kozieho mlieka. Priemerné hodnoty chemického zloženia boli v súlade s hodnotami uvádzanými pre iné podobné druhy syrov získaných priemyselným procesom (Salvadori del Prato, 2001). Parrini et al. (2020) analyzovali FT-NIR spektroskopiou syry Erborinato a Marzolino, ktoré vykazovali vysokú variabilitu vlhkosti, bielkovín a tuku, zatiaľ čo Stracchino bol menej variabilný produkt. Väčšiu variabilitu pozorovanú v prípade syra Erborinato možno pripísať vlastnostiam mlieka, keďže farma na výrobu tohto druhu syra používala zmes ovčieho a kozieho mlieka. Napriek tomu iné faktory, ako sú špecifické techniky výroby syra a absencia štandardizovaných protokolov kontroly výroby v rámci každej farmy, mohli mať vplyv na úroveň variability.

Analýza hlavných komponentov syrov vyrobených z ovčieho a kozieho mlieka (obrázok 1 a 2) bola použitá na štatistické vyhodnotenie údajov chemického zloženia. Výsledky PCA mapy analýzy syrov Bartlettovho testu naznačujú, že údaje boli pravdepodobne faktorizovateľné (Chí-kvadrát (pozorovaná hodnota = 181,225), Chí-kvadrát (kritická hodnota = 18,307) a $p \leq 0,05$. Kaiser-Meyer-Olkin (KMO) test primeranosti odberu vzoriek ukázal strednú vhodnosť údajov pre úplný model (KMO = 0,621) PCA ukazuje, že 93,10 % celkových variácií premenných možno zoskupiť a vysvetliť pomocou prvých dvoch hlavných komponentov (PC), s vlastnými hodnotami 3,628 a 1,027. PC1 predstavuje 72,55 % a opisujú ju parametre bielkoviny, sušina, tuk, pH a soľ, zatiaľ čo PC2 predstavuje 20,55 %.

Obrázok č. 1, Vyhodnotenie chemického zloženia syrov z ovčieho a kozieho mlieka pomocou PCA



Obrázok č. 2, Vyhodnotenie chemického zloženia syrov z ovčieho a kozieho mlieka pomocou PCA



ZÁVER

FT-NIR spektroskopia a multidimenzionálna analýza dát boli v tejto štúdii užitočným a efektívnym nástrojom na hodnotenie chemického zloženia vzoriek syrov z ovčieho a kozieho mlieka. Implementácia FT-NIR pri kontrole kvality týchto syrov by mohla byť prospešnou metódou vďaka jednoduchej nedeštruktívnej príprave vzorky, jednoduchosti použitia a rýchlym výsledkom. Táto metóda by sa mohla použiť ako náhrada laboratórnych analytických techník používaných v potravinárskom priemysle, ako sú skríningové analýzy, ktoré sa bežne používajú ako súčasť každodennej rutiny. Prezentovaná štatistická metóda PCA aplikovaná na výsledky FT-NIR spektroskopie ukázala hodnotné výsledky so vzťahmi a koreláciami v určených premenných každej skupiny vzoriek prostredníctvom multidimenzionálnych biplotov extrahovaných komponentov. Chemické zloženie syrov z ovčieho a kozieho mlieka dostupných v maloobchodných predajniach poskytuje cenné informácie z hľadiska výživy.

POĎAKOVANIE

Táto práca bola podporená projektom VEGA 1/0239/21. Táto publikácia vznikla vďaka podpore v rámci Operačného programu Integrovaná infraštruktúra pre projekt: Dopytovo-orientovaný výskum pre udržateľné a inovatívne potraviny, Drive4SIFood 313011V336, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

POUŽITÁ LITERATÚRA

1. DE MARCHI, M. et al. Invited review: Use of infrared technologies for the assessment of dairy products - Applications and perspectives. In *Journal of Dairy Science*. ISSN 1525-3198, 2018, vol. 101, p. 10589-10604.
2. GONZÁLEZ-MARTÍN, M. I. et al. The determination of fatty acids in cheeses of variable composition (cow, ewe's, and goat) by means of near infrared spectroscopy. In *Microchemical Journal*. ISSN 0026-265X, 2020, vol. 156, p. 104854.
3. HOLROYD, S. E. Review: The use of near infrared spectroscopy on milk and milk products. In *Journal of Near Infrared Spectroscopy*. ISSN 1751-6552, 2013, vol. 21, no. 5, p. 311-322.
4. MANUELIAN, C. L. et al. Prediction of minerals, fatty acid composition and cholesterol content of commercial cheeses by near infrared transmittance spectroscopy. In *International Dairy Journal*. ISSN 0958-6946, 2017, vol. 71, p. 107-113.
5. OZEN, B. F. et al. Detection of hazelnut oil adulteration using FT-IR spectroscopy. In *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. ISSN 1520-5118, 2002, vol. 50, p. 3898-3901.

6. PARRINI, S. et al. Near-infrared spectroscopy to assess chemical composition of sheep and goat cheeses. In Acta fytotechn zootechnica. ISSN 1336-9245, 2020, vol. 23, p. 97-104.
7. POLLARD, A. et al. Textural changes of natural Cheddar cheese during the maturation process. In *Journal of Food Science*. ISSN 1750-3841, 2003, vol. 68, p. 2011-2016.
8. SALVADORI DEL PRATO, O. Trattato di Tecnologia Casearia. In *Dairy Technology*. Bologna: Edagricole-New Business Media, 2001.

Kontaktná adresa: Benešová Lucia, AgroBioTech Research Centre, Slovak University of Agriculture in Nitra, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovak Republic; E-mail: lucia.benesova@uniag.sk

MOLEKULÁRNA CHARAKTERIZÁCIA BIOFILM PRODUKUJÚCICH *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* IZOLOVANÝCH ZO SUROVÉHO OVČIEHO SYRA

MOLECULAR CHARACTERIZATION OF BIOFILM- FORMING *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* COLLECTED FROM RAW OVINE CHEESE

Bujňáková Dobroslava, Karahutová Lívia

Institute of Animal Physiology, Centre of Biosciences of the Slovak Academy of Sciences, Šoltésovej 4-6, 040 01 Košice, Slovakia

ABSTRACT

Despite food safety criteria for some specific foodborne pathogens, the prevalence of *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) in raw milk cheese is high. Raw milk-based cheese can harbour enterotoxin-producing *S. aureus* causing staphylococcal food poisoning and next staphylococcal-associated risks related to consumer safety are biofilm production and antibiotic resistance. The aims of present study were to explore biofilm-forming ability of ovine raw cheese-associated *S. aureus* together with the presence of 17 biofilm- and enterotoxin-related genes, and antibiotic susceptibility profiles. Our results showed that 32% of ovine cheeses harboured *S. aureus*, 90% were biofilm producers, 62% had enterotoxigenic potential and 17% were methicillin-resistant. The methicillin-resistant isolates negative for *mec*A were PCR-positive for *bla*Z and were classified into 5 different spa types (t179, t216, t1773, t12029 and t13487). The 80% isolates were *agr*I or *agr*II-positive. Four biofilm-associated genes namely *clf*A, *cna*, *bbp* and *fnbp*A were detected only in *agr*-positive strains. Therefore, for improving the microbiological quality of ovine cheese more attention should be paid to hygiene practices during the process of cheese manufacturing.

Key words: *Staphylococcus aureus*; biofilm; resistance; enterotoxins; spa typing

ÚVOD

Syry vyrobené z nepasterizovaného mlieka tradičnými výrobnými metódami môžu obsahovať *Staphylococcus aureus (S. aureus)*. Najmä stafylokoky, ktoré produkujú toxíny, tvoria biofilm a sú multirezistentné predstavujú problém pre farmárov a verejné zdravie.

Tvorba biofilmu a virulentných faktorov u *S. aureus* je regulovaná prostredníctvom agr lokusu, ktorý riadi produkciu 23 známych faktorov virulencie vrátane MSCRAMM (Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules) slúžiacich na prichytenie u hostiteľa a únik pred jeho imunitným systémom. Hlavnými sú proteín spojený s biofilmom, zhlukovacie

faktory, proteíny viažuce fibronektín, proteín viažuci kostný sialoproteín, povrchové faktory regulované železom, proteíny serín aspartát atď. (Toledo Silva a kol., 2021). Ďalšími mechanizmami akumulácie/dozrievania biofilmu sú polysacharidová intercelulárna adhézia/polyN-acetylglukózamín (PIA/PNAG) kódovaná operónom icaADBC alebo proteíny nezávislé od PIA (Kogan a kol., 2006). Okrem toho lokus agr reguluje expresiu polysacharidových kapsúl a extracelulárnych toxínov (ako sú hemolyzíny, enterotoxíny atď.) (Rossi a kol., 2021). Ďalším problémom je zvyšovanie rezistencie na antibiotiká. Obzvlášť znepokojujúce sú meticilín-rezistentné *S. aureus* (MRSA), ktoré sú odolné voči väčšine beta-laktámov. Ich účinnosť je znížená v dôsledku syntézy β-laktamázy, ktorá je kódovaná génom *blaZ* (Olsen a kol., 2006). Ďalší mechanizmus rezistencie na β-laktámy, je rezistencia na meticilín/oxacilín, sprostredkovaná proteínom viažucim penicilín s nízkou afinitou (PBP2a) a kódovaná prostredníctvom *mec*A (Sawant a kol., 2009).

Našim cieľom bolo určiť výskyt *S. aureus* v syre vyrobenom zo surového ovčieho mlieka, detekovať gény MSCRAMM; PIA/PNAG; gény pre produkciu toxínov, detekovať prítomnosť MRSA v syroch a určiť ich genetickú diverzitu prostredníctvom spa typizácie.

MATERIÁL A METODIKA

Vyšetrili sme 92 vzoriek syra od miestnych farmárov zo západného Slovenska na prítomnosť *S. aureus*. Vzorky boli kultivované na agare so soľou manitolu (Oxoid, Basingstoke, GBR) a UriSelect agare (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) po dobu 48 hodín pri 37 °C. Kolónie boli identifikované pomocou MALDI-ToF MS (Matrix-Assisted Laser Desorpce/Ionization – Time of Flight Mass Spectrophotometry) (Bruker Daltonics, Bremen, DEU). DNA izolátov bola extrahovaná z nočných kultúr pomocou komerčnej súpravy (Qiagen, DEU). Izoláty boli testované pomocou PCR na gény kódujúce povrchové proteíny ukotvené v bunkovej stene (CWA), gény kódujúce transportéry železa (NEAT), gény kódujúce stafylokokové enterotoxíny A–E, transportér ferisiderofórov, alfa hemolyzín a proteínové gény spojené s biofilmom podľa metodík popísaných v práci Karahutová a Bujňáková, 2023. Schopnosť tvorby biofilmu bola hodnotená spektrofotometricky s použitím testu na mikrotitračných platničkách (Thermo ScientificTM, Roskilde, DNK) podľa metodiky popísanej v práci Karahutová a kol. (2021). Detekcia antimikrobiálnej rezistencie bola uskutočnená podľa Gattringera a kol. (2002) s použitím Gram pozitívnej súpravy slovenského automatizovaného diagnostického systému Bel-MIDITECH (Bel-MIDITECH sro, Bratislava, SVK). Na detekciu rezistencie na meticilín u MRSA sme použili gény pre *mec*A (Strommenger a kol., 2003) a *blaZ* (Martineau a kol., 2000). Izoláty MRSA sme podrobili spa typizácii podľa pokynov uvedených na http://www.spaserver.ridom.de.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Prítomnosť *S. aureus* bola potvrdená u 32% testovaných syrov. Pre porovnanie v štúdii autorov Výrostková a kol. (2021) zo slovenského kozieho a ovčieho syra boli identifikované *S. aureus* u 43% izolátov.

Viac ako polovica izolátov boli silný (15/29; 51,7%) a stredný (7/29; 24,1%) producenti biofilmu, 3 kmene (10,3%) biofilm netvorili. Nezistili sme prítomnosť génu *ica*A, ale *fcv* sa našiel u 13 izolátov a často sa vyskytoval u silných producentov biofilmu (60%). Hoci PIA určite predstavuje hlavný mechanizmus tvorby biofilmu u *S. aureus*, mnohé štúdie zamerané na biofilm preukázali existenciu alternatívnych foriem nezávislých od PIA (Kogan a kol., 2006).

Expresia faktorov virulencie kódovaná lokusom agr bola zistená u 80% (*agr*I = 70%; *agr*II = 10%). Jarraud a kol. (2002) uvádza, že kmene kódujúce *agr*I a *agr*II spôsobujú ochorenia sprostredkované enterotoxínmi. Štúdie tiež uvádzajú, že medzi izolátmi z mastitíd prevláda *agr*I a že skupina *agr*II je viac spojená s izolátmi odolnými voči antimikrobiálnym látkam (Moise-Broder a kol., 2004). Expresia determinantov virulencie pod agr kontrolou by mohla buď brániť bakteriálnej kondícii alebo jej pomáhať (Shopsin a kol., 2008). Thompson a Brown (2017) monitorovali súvislosť medzi génmi virulencie, rezistenciou a prítomnosťou agr a zdôraznili význam agr operónu pri infekciách spôsobených *S. aureus*, a že agr negatívne kmene môžu predstavovať rezervoár pre rezistenciu na glykopeptidy a komplikovať tak liečbu infekcie. U našich 6 agr negatívnych izolátov nebola pozorovaná žiadna rezistencia na vankomycín alebo teikoplanín, avšak dva z týchto kmeňov vykazovali rezistenciu na aminoglykozidy a dva boli identifikované ako MRSA.

Zo siedmich génov kódujúcich MSCRAMM boli štyri detegované iba u agr pozitívnych kmeňov (*clf*A (78,2%); *cna* (60,8%); *bbp* (13%); *fnbp*A (91,3%). Viacej sa vyskytovali gény z rodiny NEAT. *Isd*A a *isd*B gény boli detegované u agr pozitívnych aj agr negatívnych kmeňov.

Izoláty *S. aureus* boli vyšetrené aj na prítomnosť 5 génov zodpovedných za produkciu enterotoxínov (*sea, seb, sec, sed, see*), až s 62% pozitivitou. Vo väčšine izolátov sa vyskytoval gén *sea*, nasledoval *seb*, *sec* a *sed*.

Najvyššie frekvencie rezistencie boli zaznamenané na fluorochinolóny (konkrétne ciprofloxacín a moxifloxacín) (48%) a rifampicín (38%). Interpretované odčítanie antibiogramu odhalilo 5 MRSA izolátov, pozitívnych na *blaZ* a negatívnych na *mec*A. MRSA izoláty sme podrobili spa typizácii na preskúmanie ich genetickej diverzity a zistili prítomnosť 5 rôznych spa-typov - t179, t216, t1773, t12029, t13487. Niektoré spa typy boli popísané u izolátov z mastitíd (t1773, t12029, t13487) (Azzi a kol., 2020; Cvetnić a kol., 2021;

Schabauer a kol., 2018); niektoré sa spájajú z humánnymi izolátmi (t179, t216) (Silva a kol., 2020; - Becker a kol., 2017).

ZÁVER

Naše výsledky jasne ukazujú, že mikrobiálna kvalita a bezpečnosť nepasterizovaného syra vyrobeného zo surového ovčieho mlieka nie je celkom dobrá. Až 32% vyšetrených syrov bolo pozitívnych na prítomnosť *S. aureus*. 80% izolátov bolo pozitívnych na agr lokus, 62% na gény zodpovedné za produkciu enterotoxínov. Takmer 76% *S. aureus* tvorilo silný alebo stredný biofilm, 17% bolo MRSA s génom *blaZ* a boli klasifikované do 5 spa typov: t179, t216, t1773, t12029, t13487. Dva z nich (t179, t216) sú spájané s humánnymi izolátmi a poukazujú na možnú kontamináciu od spracovateľov mlieka. Aby sa zaručila vyššia kvalita a bezpečnosť takýchto produktov, je potrebné zvýšiť hygienu pri ich spracovaní.

POĎAKOVANIE

Táto práca bola podporená VEGA grantom [2/0010/21].

POUŽITÁ LITERATÚRA

1. AZZI, O. et al. Spa-Typing and Antimicrobial Susceptibility of *Staphylococcus Aureus* Isolated from Clinical Sheep Mastitis in Médéa Province, Algeria. In *Small Ruminant Research.* 2020, vol. 192, p. 106168.
2. BECKER, K. et al. *Staphylococcus Aureus* from the German General Population Is Highly Diverse. In *International Journal of Medical Microbiology*. 2017, vol. 307, no. 1, p. 21–27.
3. CVETNIĆ, L. et al. Multi Locus Sequence Typing and Spa Typing of *Staphylococcus Aureus* Isolated from the Milk of Cows with Subclinical Mastitis in Croatia. In *Microorganisms*. 2021, vol. 9, no. 4, p. 725.
4. GATTRINGER, R. et al. Evaluation of MIDITECH Automated Colorimetric MIC Reading for Antimicrobial Susceptibility Testing. In *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2002, vol. 49, no. 4, p. 651–59.
5. JARRAUD, S. et al. Relationships between *Staphylococcus Aureus* Genetic Background, Virulence Factors, Agr Groups (Alleles), and Human Disease. In *Infection and Immunity*. 2002, vol. 70, no. 2, p. 631–41.
6. KARAHUTOVÁ, L. et al. Antibiotic Resistant and Biofilm-Associated *Escherichia Coli* Isolates from Diarrheic and Healthy Dogs. In *Microorganisms*. 2021, vol. 9, no. 6, p. 1334.

7. KARAHUTOVÁ, L. et al. Occurrence and Molecular Surveillance of Pathogenesis Risk-Associated Factors in *Staphylococcus Aureus* Recovered from Raw Sheep's Milk Cheese. In *Small Ruminant Research*. 2023, vol. 222, p. 106967.
8. KOGAN, G. et al. Biofilms of Clinical Strains of Staphylococcus That Do Not Contain Polysaccharide Intercellular Adhesin. In *FEMS Microbiology Letters*. 2006, vol. 255, no. 1, p. 11–16.
9. MARTINEAU, F. et al. Correlation between the Resistance Genotype Determined by Multiplex PCR Assays and the Antibiotic Susceptibility Patterns of *Staphylococcus Aureus* and *Staphylococcus Epidermidis*. In *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 2006, vol. 44, no. 2, p. 231–38.
10. MOISE-BRODER, P. A. et al. Accessory Gene Regulator Group II Polymorphism in Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus* Is Predictive of Failure of Vancomycin Therapy. In *Clinical Infectious Diseases*. 2004, vol. 38, no. 12, p. 1700–05.
11. OLSEN, J. E. et al. Diversity and Evolution of *BlaZ* from *Staphylococcus Aureus* and Coagulase-Negative Staphylococci. In *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2006, vol. 57, no. 3, p. 450–60.
12. ROSSI, B. F. et al. Short Communication: Association between the Accessory Gene Regulator (Agr) Group and the Severity of Bovine Mastitis Caused by *Staphylococcus Aureus*. In *Journal of Dairy Science*. 2021, vol. 104, no. 3, p. 3564–68.
13. SAWANT, A. et al. Antimicrobial Susceptibility of Coagulase-Negative Staphylococcus Species Isolated from Bovine Milk. In *Veterinary Microbiology*. 2009, vol. 134, no. 1–2, p. 73–81.
14. SCHABAUER, A. et al. The Relationship between Clinical Signs and Microbiological Species, Spa Type, and Antimicrobial Resistance in Bovine Mastitis Cases in Austria. In *Veterinary Microbiology*. 2018, vol. 227, p. 52–60.
15. SHOPSIN, B. et al. Prevalence of Agr Dysfunction among Colonizing *Staphylococcus Aureus* Strains. In *The Journal of Infectious Diseases*. 2008, vol. 198, no. 8, p. 1171–74.
16. SILVA, V. et al. Emergence of Community-Acquired Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus* EMRSA-15 Clone as the Predominant Cause of Diabetic Foot Ulcer Infections in Portugal. In *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious* Diseases. 2020, vol. 39, no. 1, p. 179–86.
17. STROMMENGER, B. et al. Multiplex PCR Assay for Simultaneous Detection of Nine Clinically Relevant Antibiotic Resistance Genes in *Staphylococcus Aureus*. In *Journal of Clinical Microbiology*. 2003, vol. 41, no. 9, p. 4089–94.

18. THOMPSON, T. A. et al. Association between the Agr Locus and the Presence of Virulence Genes and Pathogenesis in *Staphylococcus Aureus* Using a Caenorhabditis Elegans Model. In *International Journal of Infectious Diseases*. 2017, vol. 54, p. 72–76.
19. TOLEDO-SILVA, B. et al. Bovine-Associated Non-Aureus Staphylococci Suppress *Staphylococcus Aureus* Biofilm Dispersal *in Vitro* yet Not through Agr Regulation. In *Veterinary Research*. 2021, vol. 52, no. 1, p. 114.
20. VÝROSTKOVÁ, J. et al. Antimicrobial Resistance of *Staphylococcus Sp*. Isolated from Cheeses. In *Animals*. 2021, vol. 12, no. 1, p. 36.

Kontaktná adresa: Dobroslava Bujňáková, Institute of Animal Physiology, Centre of Biosciences of the Slovak Academy of Sciences, Šoltésovej 4-6, 040 01 Košice, Slovakia; E-mail: dbujnak@saske.sk

DOHĽADÁVANIE POZITÍVNEHO NÁLEZU LISTÉRIE Z NEPASTERIZOVANÉHO OVČIEHO SYRA

TRACEABILITY OF LISTERIA FROM POSITIVE SHEEP CHEESE MADE FROM UNPASTEURIZED MILK

Cabanová Lenka, Škuntová Oľga

Veterinárny a potravinový ústav, Jánoškova 1611/58, 026 01 Dolný Kubín

ABSTRACT

Official control plays an important role in food placing at the retail for the final consumer. It consists of the control provided directly on place in plant – it means control of technology, raw materials, premises and staff, and consequently the control of the final product. The main reason is to prevent placement unsafe food on market.

Inspectors of State veterinary and food administration provide official food controls of animal and plant origin. Their activity is of a great importance not only in ensuring the food quality but also, if any problem in the production occurs, they help the producer to eliminate the risk. The producer provides its own control checks to the inspectors to suggest the best way to eliminate the risk and to recommend the corrective actions. Cooperation between inspector, producer and the laboratory, which provides laboratory analyses is required and closely related.

Keywords: official control, final product, traceability, positive *Listeria*

ÚVOD

Bežná úradná kontrola u výrobcu čerstvého ovčieho syra, ktorý bol vyrobený z nepasterizovaného ovčieho mlieka, odhalila pozitívny nález na dôkaz patogénu *Listeria monocytogenes*, a to v jednej vzorke z piatich podvzoriek. Nakoľko však potravinová legislatíva (Nariadenie Komisie 2073/2005 o mikrobiologických kritériách pre potraviny) v kategórii 1.2. vyžaduje, aby v žiadnej z piatich podvzoriek nebola dokázaná prítomnosť listérií, vzorka, ktorá je určená na priamy konzum je v takom prípade považovaná za nevyhovujúcu a celá výrobná šarža je preto označená ako potravina nebezpečná pre ľudské zdravie. Na základe nevyhovujúceho nálezu preto inšpektori riešia situáciu priamo vo výrobe a spolu s ním podniknú ďalšie kroky, jednak na identifikáciu rizika a jednak na došetrenie pôvodcu vo výrobku.

MATERIÁL A METÓDY

Potravina, ktorá bola identifikovaná ako nebezpečná, bola vyrobená z mlieka, ktoré neprešlo ďalším tepelným ošetrením. Výrobca syra preto poslal ďalší vyrobený syr a zároveň 6 surových ovčích mliek, ktoré odoberal od šiestich rôznych dodávateľov na ďalšie spracovanie. Všetky zaslané vzorky boli vyšetrované na dôkaz prítomnosti baktérií *Listeria monocytogenes* (LM) podľa platnej medzinárodnej normy STN EN ISO 11290-1.

V priebehu nasledujúcich vyšetrení boli identifikovaní dvaja dodávatelia surového ovčieho mlieka, ktorí patrili do kompetencie dvoch rôznych Regionálnych veterinárnych a potravinových správ (RVPS). Počas troch mesiacov boli okrem mliek a finálnych výrobkov vyšetrované aj stery z prevádzky.

VÝSLEDKY

Z výsledkov, ktoré získal Veterinárny a potravinový ústav v Dolnom Kubíne vyplýva, že počas danej situácie boli na vyšetrenie zaslané vzorky zo štyroch rôznych subjektov :

1. Výsledky úradnej kontroly, ktoré odoberali inšpektori RVPS (1 pozitívna vzorka)
2. Výsledky výrobcu ovčieho syra, u ktorého bola zachytená *Listeria monocytogenes* (vzorky surových ovčích mliek, vzorky finálnych výrobkov (syrov, bryndze, údeného syra, a vzorky sterov z prevádzky) – spolu 32 vzoriek / 5 pozitívnych
3. Výsledky od prvého dodávateľa ovčieho mlieka (nadojené mlieka, stery z dojenia, mliečne filtre) – spolu 47 vzoriek / 16 pozitívnych
4. Výsledky od druhého dodávateľa mlieka (odoberané inšpektormi RVPS) – 3 pozitívne mlieka

Výsledky jednotlivých subjektov spolu s dátumami dodania sú uvedené v Tab. 1-4 :

Tab. 1 : Úradná vzorka, prvá pozitívna na dôkaz LM

Popis vzorky	Dat.dodania	LM
Ovčí syr čerstvý krájaný	30.6.2022	**dokázaná 1**/5

Tab. 2 : Výsledky výrobcu finálnych výrobkov

Popis vzorky	Dat.dodania	LM
Ovčí syr čerstvý	14.7.2022	nedokázaná
SOM -1	14.7.2022	**dokázaná**
SOM -2	14.7.2022	**dokázaná**
SOM -3	14.7.2022	nedokázaná
SOM -4	14.7.2022	nedokázaná
SOM -5	14.7.2022	nedokázaná
SOM -6	14.7.2022	nedokázaná
Ster - kaďa na mlieko	21.7.2022	nedokázaná
Ster - špirála pastéra	21.7.2022	nedokázaná
Ster - čerpadlo	21.7.2022	nedokázaná
Ster - šatka na hrudu	21.7.2022	nedokázaná
Ster - váha - plošinka	21.7.2022	nedokázaná
Ster - bednička	21.7.2022	nedokázaná
Ster - miešadlo - bryndza	21.7.2022	nedokázaná
Surové ovčie mlieko č. 1	18.8.2022	**dokázaná**
Surové ovčie mlieko č. 2	18.8.2022	**dokázaná**
Ster - vypúšťacia hadica	25.8.2022	nedokázaná
Ster - vnútro tanku na mlieko	25.8.2022	nedokázaná
Ster - syrárska vaňa	25.8.2022	nedokázaná
Ster - hadica na odpadovú srvátku	25.8.2022	nedokázaná
Ster - sud na mlieko ovčia srvátka	25.8.2022	nedokázaná
Ster - špirála pastéra	25.8.2022	nedokázaná
Ster - kaďa oštiepky	25.8.2022	nedokázaná
Ster - kanál zrejúci sklad	25.8.2022	nedokázaná
Ster - mlynec na bryndzu	25.8.2022	nedokázaná
Ster - plnička bryndzová	25.8.2022	**dokázaná**
Ovčí syr čerstvý - hruda z pasterizovaného syra	25.8.2022	nedokázaná
Ovčí syr čerstvý krájaný, zo surového mlieka	25.8.2022	nedokázaná
100% Ovčia bryndza nepasterizovaná	25.8.2022	nedokázaná
Ovčí syr údený vyrobený zo surového mlieka	31.8.2022	nedokázaná
Ster č.1 - stôl pri vážení bryndze	31.8.2022	nedokázaná
Ster č.2 - stroj na plnenie bryndze	31.8.2022	nedokázaná

Tab. 3 : Výsledky prvého dodávateľa mlieka

Popis vzorky	Dat.dodania	LM
Surové ovčie mlieko	20.7.2022	nedokázaná
Surové ovčie mlieko	20.7.2022	**dokázaná**
Surové ovčie mlieko č.2 - zelená farba - pripúšťané ovce	25.7.2022	nedokázaná
Surové ovčie mlieko č.1 - stádo po okotení	25.7.2022	**dokázaná**
Surové ovčie mlieko č.3 - modrá farba	25.7.2022	nedokázaná
Surové ovčie mlieko č.4- bez označenia sprejom	25.7.2022	**dokázaná**
Surové ovčie mlieko - vzorka č. 1 stádo produkčné	2.8.2022	**dokázaná**
Surové ovčie mlieko - vzorka č. 2 stádo, ktoré sa pripúšťa	2.8.2022	nedokázaná
Surové ovčie mlieko - vzorka č.1 stádo produkčné	9.8.2022	**dokázaná**
Surové ovčie mlieko - vzorka č.2 stádo, ktoré sa pripúšťa	9.8.2022	nedokázaná
Surové ovčie mlieko vz.č.4 - bez spreja (120 oviec)	16.8.2022	**dokázaná**
Surové ovčie mlieko vz.č.3 - modrý sprej (100 oviec)	16.8.2022	**dokázaná**
Surové ovčie mlieko vz.č.2 - zelený sprej (100 oviec)	16.8.2022	nedokázaná
Surové ovčie mlieko vz.č.1 - červený sprej (100 oviec)	16.8.2022	nedokázaná
Surové ovčie mlieko - modrý sprej	25.8.2022	**dokázaná**
Surové ovčie mlieko - bez označenia sprejom farebným	25.8.2022	nedokázaná
Surové ovčie mlieko - iné ovce	25.8.2022	**dokázaná**
Ster č.1 - násadec na struky	25.8.2022	nedokázaná
Ster č.2 - tenká mliečna hadica	25.8.2022	nedokázaná
Ster č.3 - zberná nádoba	25.8.2022	nedokázaná
Ster č.4 - výpustný ventil	25.8.2022	nedokázaná
Ster č.5 - hrubá mliečna hadica	25.8.2022	nedokázaná
Ster č.6 - veľká mliečna hadica	25.8.2022	nedokázaná
Ster č.7 - výpustný ventil na tanku	25.8.2022	**dokázaná**
Ster č.8 - nasávacia hadica na dezinfekčný roztok	25.8.2022	nedokázaná
Ster č.9 - mliečny tank - stena	25.8.2022	nedokázaná
Ster č.10 - tesniaca guma tanku	25.8.2022	nedokázaná
Filter použitý pri dojení oviec označených modrým sprejom	25.8.2022	**dokázaná**
Filter použitý pri dojení oviec sprejom bez označenia	25.8.2022	nedokázaná
Surové ovčie mlieko - ovce z neprodukčného stáda	31.8.2022	nedokázaná
Surové ovčie mlieko - ovce z produkčného stáda	31.8.2022	nedokázaná
Surové ovčie mlieko - ovce označené modrým sprejom 1	31.8.2022	nedokázaná
Surové ovčie mlieko - ovce označené modrým sprejom 2	31.8.2022	**dokázaná**
Surové ovčie mlieko - ovce označené modrým sprejom 3	31.8.2022	**dokázaná**
Surové ovčie mlieko - ovce označené modrým sprejom 4	31.8.2022	nedokázaná
Filter použitý pri dojení oviec z neprodukčného stáda	31.8.2022	nedokázaná
Filter použitý pri dojení oviec ostatných - z produkčného stáda	31.8.2022	nedokázaná
Filter používaný pri dojení oviec označ. modrým sprejom 1	31.8.2022	nedokázaná
Filter použitý pri dojení oviec označ. modrým sprejom 2	31.8.2022	**dokázaná**

Pokračovanie tabuľky 3: Výsledky prvého dodávateľa mlieka

Filter používaný pri dojení oviec - označené modrým sprejom 3	31.8.2022	nedokázaná
Filter používaný pri dojení oviec - označené modrým sprejom 4	31.8.2022	nedokázaná
Surové ovčie mlieko č.1	8.9.2022	nedokázaná
Surové ovčie mlieko č.2	8.9.2022	**dokázaná**
Surové ovčie mlieko č.3	8.9.2022	nedokázaná
Surové ovčie mlieko č.1	16.9.2022	nedokázaná
Surové ovčie mlieko č.2	16.9.2022	**dokázaná**
Surové ovčie mlieko	21.9.2022	nedokázaná

Tab.4: Výsledky od druhého dodávateľa mlieka

Popis vzorky	Dat.dodania	LM
Surové ovčie mlieko	2.8.2022	**dokázaná**
Surové ovčie mlieko	19.9.2022	**dokázaná**
Surové ovčie mlieko (ovce po preliečení)	16.12.2022	**dokázaná**

ZÁVER

Dohľadávanie zdroja kontaminácie v prevádzke alebo v chove je vždy náročný proces. Vyžaduje si znalosť nielen problematiky ale aj technológií, spôsobu chovu, zdravotného stavu zvierat a aj možných spôsobov eliminácie rizika. V poslednom období sa v mnohých krajinách pristupuje ku charakterizácii kmeňov *L. monocytogenes* spôsobujúcich kontaminácie prevádzok pomocou molekulárnej typizácie. Celogenómové sekvenovanie (WGS) predstavuje veľmi účinný nástroj nielen pri dohľadávaní zdrojov a ciest kontaminácie, ale aj pri identifikácii perzistentnej kontaminácie v prostredí prevádzok (3). VPÚ v Dolnom Kubíne je sídlom Národného referenčného laboratória (NRL) pre *L. monocytogenes* už od roku 2007. Metóda celogenómového sekvenovania bakteriálnych genómov bola zavedená v roku 2020. Jej využitie bolo zhrnuté v rozsiahlej štúdií izolátov *L. monocytogenes* v zbierke NRL, kde sa okrem distribúcie jednotlivých klonov *L. monocytogenes* v potravinárskom sektore sledovala aj možnosť záchytu potenciálnej perzistencie izolátov v jednotlivých prevádzkach (4).

Každá súčasť potravinového reťazca sa ~~tak~~ musí vysporiadať vlastným spôsobom s pozitívnym nálezom listérií. V konečnom dôsledku je však najdôležitejšie zabezpečiť, aby sa spotrebiteľ mohol spoľahnúť na to, že ak si zakúpi výrobok, je tento zdravotne bezpečný a nepredstavuje pre jeho zdravie žiadne riziko.

POUŽITÁ LITERATÚRA

1. Nariadenie Komisie (ES) č. 2073/2005 z 15. novembra 2005 o mikrobiologických kritériách pre potraviny, v znení neskorších predpisov
2. STN EN ISO 11290-1: Horizontálna metóda na dôkaz a stanovenie počtu baktérií *Listeria monocytogenes* a iných druhov Listeria. Časť 1: Metóda dôkazu
3. Moura A, Criscuolo A, Pouseel H et al. Whole genome-based population biology and epidemiological surveillance of *Listeria monocytogenes*. Nat Microbiol 2016;2:16185.
4. Kubicová Z, Roussel S, Félix B, Cabanová L. Genomic diversity of *Listeria monocytogenes* isolates from Slovakia (2010 to 2020). Front Microbiol 2021;12:729050.

Kontaktná adresa: Štátny veterinárny a potravinový ústav, Jánoškova 1611/58, 02601 Dolný Kubín, Slovenská republika, E-mail: lenka.cabanova@svpu.sk; olga.skuntova@svpu.sk

VPLYV PODÁVANIA ORGANICKÉHO ZINKU A ZMESI RASTLÍN NA OBSAH STOPOVÝCH PRVKOV A OXIDAČNÚ STABILITU MÄSA JAHNIAT

THE EFFECT OF DIETARY ORGANIC ZINC AND HERBAL MIXTURE ON TRACE MINERAL CONTENT AND OXIDATIVE STABILITY OF LAMB MEAT

Čobanová Klaudia, Kucková Katarína, Grešáková Ľubomíra

Ústav fyziológie hospodárskych zvierat, Centrum biovied, Slovenská akadémia vied v. v. i., Šoltésovej 4-6, 040 01 Košice, Slovenská republika

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the effects of dietary organic zinc and/or medicinal plants mixture (*Artemisia absinthium* L., *Fumaria officinalis* L., *Malva sylvestris* L., *Matricaria chamomilla* L.) on the microelements (Zn, Fe, Cu, Mn) concentration and lipid oxidation in muscles of lambs. Twenty-eight male lambs (Improved Valachian) were randomly divided into four groups (n=7). Animals in the control group were fed an unsupplemented basal diet (BD: barley - 350 g/day/animal and meadow hay - 700 g/day/animal). Lambs of the second group had BD enriched with a zinc chelate of amino acid hydrate (70 mg Zn/kg of diet) and the BD of the third group was supplemented with the herbal mixture (100 g/day/animal). Animals in the fourth group received the combination of both additives. After 70 days of the experiment samples of muscles *(m. longissimus dorsi*, *m. semitendinosus*) were immediately stored in a refrigerator at 4°C for determination of lipid peroxidation in fresh meat samples on day 0, 3 and 7 of storage. Dietary zinc and/or herbal supplementation did not influence microelements concentration in the muscles of lambs. Our results indicate that simultaneous administration of dietary organic zinc and herbs may improve the oxidative stability of lamb meat.

Key words: meat, lamb, microelements, oxidative stability

ÚVOD

V posledných rokoch sa čoraz častejšie začali používať organické minerálne zdroje (komplexy, cheláty alebo proteináty) vo výžive zvierat kvôli potenciálne väčšej absorpcii a biovyužiteľnosti Zn z týchto zdrojov v porovnaní s tradične používanými anorganickými formami. Zinok zohráva dôležitú úlohu v antioxidačnom obrannom systéme, preto je zachovanie jeho adekvátnych koncentrácií v organizme nevyhnutné. Zinok chráni bunkové membrány pred oxidačným poškodením stabilizáciou sulfhydrylových skupín, inhibuje prooxidačné enzýmy, zvyšuje aktivitu antioxidačných enzýmov a je taktiež silným induktorom

metalotioneínu, ktorý má dôležitú úlohu v regulácii homeostázy zinku a taktiež pri antioxidačnej ochrane buniek tým, že vychytáva reaktívne formy kyslíka (Marreiro 2017).

Fytogénne kŕmne aditíva majú široké spektrum biologických a zdraviu prospešných účinkov, za ktoré sú zodpovedné ich bioaktívne zložky, ktoré majú vďaka svojej chemickej štruktúre predovšetkým antioxidačné, antibakteriálne a imunomodulačné účinky (Upadhaya a kol., 2017). Rastlinné extrakty bohaté na polyfenoly sa využívajú aj za účelom zlepšenia kvality produktov živočíšneho pôvodu, aby sa predchádzalo oxidácii lipidov zodpovednej za zhoršenie kvality mäsa tým, že negatívne ovplyvňuje jeho farbu, štruktúru, chuť, arómu aj jeho nutričnú hodnotu (Serra a kol. 2021).

Cieľom experimentu bolo sledovať účinnosť podávania organického zinku a/alebo zmesi liečivých rastlín na minerálny status a oxidáciu lipidov vo svalovine jahniat.

MATERIÁL A METODIKA

Dvadsaťosem kastrovaných barančekov (Zošľachtená valaška) vo veku 5 mesiacov bolo individuálne umiestnených v kotercoch počas 30 dňovej adaptačnej periódy a boli kŕmené rovnakou bazálnou diétou (BD), ktorá bola zložená z 350 g jačmeňa a 700 g sena/deň/zviera. Následne boli zvieratá náhodne rozdelené do štyroch skupín (7 zvierat/skupina) podľa príjmu experimentálnych diét, pričom ich priemerná hmotnosť bola 22,6±2,94 kg. Prvá skupina (Kontrola) dostávala nesuplementovanú BD, druhá skupina (Zn) mala BD suplementovanú organickým zinkom (Zn chelát s aminokyselinami-hydrát) v dávke 70 mg/kg diéty, tretia skupina (ZR) dostávala BD obohatenú o zmes sušených liečivých rastlín v dávke 100 g/zviera/deň, a štvrtá skupina (Zn+ZR) bola kŕmená BD obohatenou o kombináciu obidvoch aditív. Zmes rastlín (ZR) pozostávala z kvetu rumančeka kamilkového (33%), kvetu slezu lesného (33%), vňate zemedymu lekárskeho (33%) a vňate paliny pravej (1%). Na konci 70 dňového experimentu boli zvieratá humánne usmrtené a boli im odobrané vzorky chrbtového svalu (*m. longissimus dorsi* - MLD) a stehenného svalu (*m. semitendinosus* - MST), ktoré boli ihneď po odbere vákuovo zabalené, označené a uložené v chladničke pri teplote 4 °C pre stanovenie lipidovej peroxidácie v čerstvých vzorkách mäsa a na 3. a 7. deň ich uskladnenia.

Lipidová peroxidácia v svalovine bola hodnotená meraním koncentrácie malondialdehydu (MDA), ktorý je sekundárnym produktom oxidácie lipidov, použitím modifikovanej spektrofluorometrickej metódy podľa Jo a Ahn (1998). Princíp tejto metódy je založený na reakcii kyseliny 2-tiobarbiturovej (TBA) s MDA. Výsledky sú vyjadrené v mg/kg tkaniva. Obsah stopových prvkov bol meraný pomocou atómového absorpčného spektrometra (AAS, Shimadzu AA-7000, Kyoto, Japonsko) podľa Grešákovej a kol. (2016). Samotnému meraniu predchádzala mineralizácia vzoriek tkanív mokrým rozkladom v zmesi 65 % kyseliny

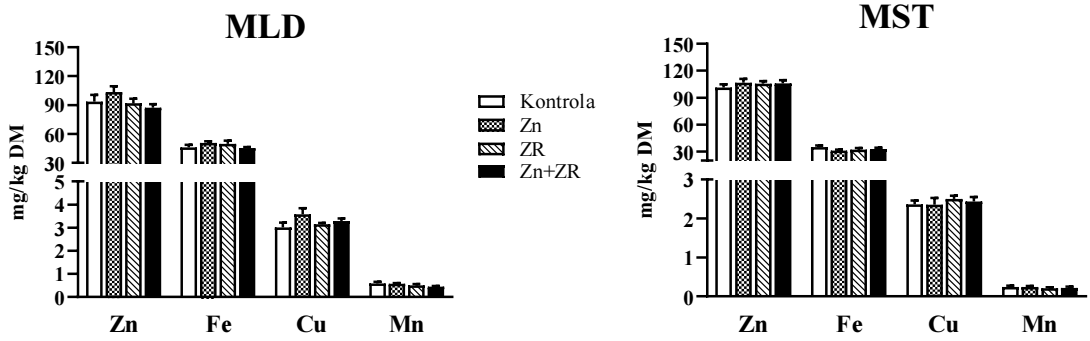
dusičnej a 30 % peroxidu vodíka v pomere 3:1 za použitia mikrovlnného zariadenia Speedwave MWS4 (Berghof Company, Nemecko).

Na štatistické vyhodnotenie analyzovaných parametrov bol použitý štatistický softvér GraphPad Prism 8.4.2. (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Na vyhodnotenie výsledkov minerálneho statusu v tkanivách bola použitá jednocestná ANOVA s Tukey post-testom pre zistenie štatisticky významného rozdielu medzi skupinami. Na zistenie vplyvu prijímanej diéty, doby skladovania mäsa alebo ich vzájomnej interakcie na zmeny lipidovej peroxidácie sme použili dvojcestnú analýzu variancie (ANOVA) s Tukey post-testom. Výsledky sú uvedené ako priemer hodnôt a štandardná chyba priemeru (SEM).

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Výsledky nášho experimentu ukázali, že koncentrácia stopových prvkov vo svaloch nebola ovplyvnená príjmom experimentálnych diét (Obrázok č. 1). Získané výsledky depozície mikroelementov vo svaloch ukázali, že príjem organickej formy Zn chelátu s aminokyselinami pri celkovej koncentrácii Zn v diéte do maximálneho povoleného množstva v EÚ (120 mg Zn/kg celkového krmiva) pre ovce, pravdepodobne nespôsobuje nežiaduce interakcie s inými stopovými prvkami počas ich absorpcie v tráviacom trakte. Tento výsledok môže naznačovať, že organické zdroje Zn v diétach zvierat na rozdiel od anorganických solí môžu zabezpečiť lepší prísun minerálov do tkanív vďaka ich vyššej biovyužiteľnosti, najmä kvôli využívaniu odlišných transportných mechanizmov počas absorpcie a menšej interakcii s inými minerálmi a zložkami krmiva v gastrointestinálnom trakte (Goff 2018).

Obrázok č. 1, Koncentrácia stopových prvkov (Zn, Fe, Cu, Mn) v chrbtovom (MLD) a stehennom svale (MST) jahniat

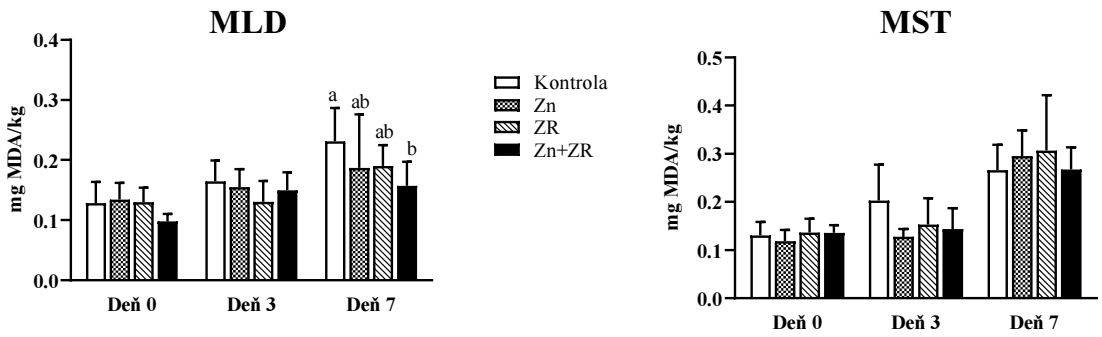


Obsah a typ polyfenolov prítomných v krmive môže mať špecifický vplyv na akumuláciu mikroelementov v tkanive (Fiesel a kol. 2015). Naše výsledky ukázali, že príjem

zmesi liečivých rastlín obsahujúcich 36 mg/g DM celkových polyfenolov a 7 mg/g DM flavonoidov nemal negatívny vplyv na absorpciu stopových prvkov.

Oxidácia lipidov je hlavnou nemikrobiálnou príčinou zhoršenia kvality mäsa a degradácia lipidov začína hneď po usmrtení zvierat. Jedná sa o komplexný proces, ktorý zahŕňa viaceré mechanizmy, ktoré sa vzájomne ovplyvňujú (Domínguez a kol. 2019). V našom experimente boli oxidačné zmeny tukov mäsa, ktoré sú vyjadrené ako množstvo MDA (hlavný sekundárny rozkladný produkt oxidácie tukov), počas chladiarenského skladovania (4 °C, 7 dní) ovplyvnené časom skladovania (P<0,001) v obidvoch testovaných svalovinách (MLD, MST), pričom dochádzalo k nárastu koncentrácie MDA (Obrázok č. 2). Príjem experimentálnych diét ovplyvnil koncentráciu MDA vo svalovine MLD (P=0,024), kde boli na siedmy deň uskladnenia pozorované signifikantne nižšie hodnoty vo svalovine jahniat dostávajúcich súčasne Zn aj ZR oproti svalovine kontrolných zvierat (P<0,05). Jang a kol. (2008) udávajú, že suplementácia diét extraktom liečivých rastlín zvýšila obsah polyfenolov a ich sekundárnych metabolitov v kuracom mäse, čo naznačuje, že by mohli pôsobiť preventívne voči oxidácii lipidov, keďže bola preukázaná aj lepšiu oxidačná stabilita mäsa. Natalello a kol. (2022) zistili, že suplementácia diét organickým Zn zlepšila oxidačnú stabilitu bravčového mäsa, avšak mechanizmus účinku zinku je potrebné presne objasniť.

Obrázok č. 2, Koncentrácia malondialdehydu (MDA) v čerstvom svale (MLD a MST) jahniat a počas uskladnenia pri 4 °C po dobu 7 dní



ZÁVER

Záverom môžeme konštatovať, že príjem diét suplementovaných zinkom a/alebo zmesou liečivých rastlín nemal vplyv na koncentráciu stopových prvkov vo svalovine jahniat. Naše výsledky naznačujú, že súčasné podávanie organického zinku a rastlinných nutraceutík má potenciál zlepšovať oxidačnú stabilitu jahňacieho mäsa.

POĎAKOVANIE

Táto práca bola podporená Agentúrou na podporu výskumu a vývoja APVV-21-0301.

POUŽITÁ LITERATÚRA

1. DOMÍNGUEZ, R. et al. A comprehensice review on lipid oxidation in meat and meat products. In *Antioxidants*. ISSN 2076-3921, 2019, vol. 8, no. 10, p. 429.
2. FIESEL, A. et al. Effects of polyphenols-rich plant products from grape or gop as feed supplements on iron, zinc and copper status in piglets. In *Archives of Animal Nutrition.* ISSN 1477-2817, 2015, vol. 64, no. 9, p. 276-284.
3. GOFF, J.P. Invited review: Mineral absorption mechanisms, mineral interactions that affect acid–base and antioxidant status, and diet considerations to improve mineral status. In *Journal of Dairy Science*. ISSN 1525-3198, 2018, vol. 101, no. 4, p. 2763-2813.
4. GREŠÁKOVÁ, Ľ. et al. Dietary manganese source does not affect Mn, Zn and Cu tissue deposition and the activity of manganese-containing enzymes in lambs. In *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*. ISSN 1878-3252, 2016, vol. 38, p. 138-143.
5. JANG, A. et al. Antioxidative potential of raw breast meat from broiler chicks fed a dietary medicinal herb extract mix. In *Poultry Science*. ISSN 1349-0486, 2008, vol. 87, no. 11, p. 2382-2389.
6. JO, C. et al. Fluorometric analysis of 2-thiobarbituric acid reactive substances in turkey. In *Poultry Science*. ISSN 1525-3171, 1998, vol. 77, no. 3, p. 475-480.
7. MARREIRO, D. et al. Zinc and oxidative stress: current mechanisms. In Antioxidants. ISSN 2076-3921, 2017, vol. 6, no. 2, p. 24.
8. NATALELLO, A. Effect of different levels of organic zinc supplementation on pork quality. In *Meat Science*. ISSN 1873-4138, 2022, vol. 186, 108731.
9. SERRA, V. et al. Dietary polyphenol supplementation in food producing animals: Effects on the quality of derived products. In *Animals*. ISSN 2076-2615, 2021, vol. 11, p. 401.
10. UPADHAYA, S. et al. Efficacy of phytogenic feed additive on performance, production and health status of monogastric animals–a review. In *Annals of Animal Science*. ISSN 2300-8733, 2017, vol. 17, no. 4, p. 929-948.

Kontaktná adresa: Čobanová Klaudia, Institute of Animal Physiology, Centre of Biosciences, Slovak Academy of Sciences, v.v.i., Šoltésovej 4-6, 040 01 Košice, Slovak Republic; E-mail: boldik@saske.sk

VPLYV OBSAHU ŤAŽKÝCH KOVOV NA ANTIOXIDAČNÉ VLASTNOSTI ZELENEJ KÁVY *C. ARABICA* DOPESTOVANEJ VO VYBRANÝCH OBLASTIACH AFRIKY

EFFECT OF HEAVY METALS CONTENT ON ANTIOXIDANT PROPERTIES OF GREEN *C. ARABICA* GROWN IN SELECTED AREAS OF AFRICA

Demianová Alžbeta, Bobková Alica, Poláková Katarína, Lidiková Judita, Bobko Marek, Jurčaga Lukáš, Belej Ľubomír, Harangozo Ľuboš, Mesárošová Andrea

Ústav potravinárstva, Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre, Trieda A. Hlinku 2, 747 96 Nitra, Slovenská republika

ABSTRACT

The research aimed at determining the total antioxidant capacity (TAC), polyphenol content (TPC), and their correlation with specific metals detected in selected green coffees grown in different areas of Africa (regions of Ethiopia such as Harrar, Yirgacheffe, Sidamo, and Djimmah), which are known for producing high-quality *C. arabica* beans. Average TAC ranged from 61.03% to 72.18% of DPPH inhibition, and TPC reached a concentration level 42.07-74.45 g GAE.kg^{-1}. The concentration of determined metals in Ethiopian coffee samples was in the following order: Fe>Mn>Cu>Zn>Ni>Co>Cr. Pb was identified only in the sample from Sidamo Bensa (3Z) and Cd in the sample from Sidamo Bensa (3Z) and Djimmah (4Z). Furthermore, we observed a negative correlation of Ni with total antioxidant capacity and polyphenol content and a positive correlation of Cd, Cr with TAC. The results suggest that specific antioxidants in green coffee beans might play a role in defending against stress caused by the presence of metals.

Key words: green coffee, antioxidant capacity, polyphenols, heavy metals

ÚVOD

Celosvetovo je káva považovaná za ekonomicky významnú komoditu. Najväčší podiel na trhu má *Coffea arabica*, ktorá sa pre mnohé krajiny nachádzajúce sa v tzv. kávovom páse (oblasť pestovania kávy medzi Obratníkmi Raka a Kozorožca) stala najvzácnejším vývozným artiklom (Sualeh *et al*., 2020). Len v prípade Etiópie predstavuje jej predaj 5% HDP. Okrem toho, je produkcia kávy životne dôležitou príležitosťou pre podnikanie a prispieva k zníženiu chudoby v mnohých rozvojových regiónoch (Abu, 2015).

Dnes je *C. arabica* pestovaná v oblastiach Centrálnej Ameriky, Južnej Ameriky, Ázie a Afriky. Práve Afrika, konkrétne Etiópia, sa považuje za jej pravlasť. Táto krajina disponuje rôznorodou genetickou základňou komodity, čo v kombinácii s prírodnými faktormi podporujú produktivitu a kvalitu kávy (Sualeh *et al*., 2020; Worku *et al*., 2023). Dnes sa v Etiópii pestujú kávy výberovej kvality v oblastiach ako Harar (východná časť krajiny), Yirgacheffe (južná časť krajiny), ale aj v oblastiach Jimma, Gore, Tepi, Bebeka (juhozápadná časť krajiny) (Worku *et al*., 2023). V každej z týchto pestovateľských oblasti Etiópie je tiež niekoľko plantážnych lokalít, ktoré sa môžu líšiť environmentálnych atribútoch ako nadmorská výška, teplota, zrážky alebo pôda, čo ovplyvňuje kvalitu kávy a biochemické zloženie, ako obsah kofeínu, trigonelínu, chlorogenových kyselín, ale aj iných látok, ktorým sa pripisuje antioxidačný účinok (Bertrand *et al*., 2012, Mehari *et al*., 2016).

Podľa Mohiuddin *et al*. (2011) sú ťažké kovy definované ako prvky, ktoré majú vysokú atómovú hmotnosť a veľmi vysokúhustotu, ktorá je najmenej päťkrát väčšia ako hustota vody. Sú to stabilné prvky, t. j. nemôžu byť metabolizované v tele, a sú bioakumulatívne. Kontaminácia ťažkými kovmi je globálnym nebezpečenstvom, ktoré sa začalo priemyselnou revolúciou a je výsledkom najmä poľnohospodárskych postupov prostredníctvom aplikácie organických hnojív, minerálov a pesticídov na poľnohospodársku pôdu (Carolin *et al*., 2017). V posledných rokoch dosiahla úroveň znečistenia v Etiópii alarmujúcu úroveň, čo so sebou nesie aj riziká v podobe zhoršovania kvality poľnohospodárskej pôdy či nežiadúce účinky na organizmus (Gebreyohannes a Gebrekidan, 2018).

Cieľom práce bolo sledovať obsah ťažkých kovov v zelenej káve *C. arabica* výberovej kvality, pochádzajúcej z celosvetovo známych pestovateľských oblastí Etiópie (Sidamo, Yirgacheffe, Harrar a Djimmah) a pozorovať prípadnú koreláciu s obsahom polyfenolových zlúčenín, respektíve ich v vplyv na antioxidačnú kapacitu zelenej kávy.

MATERIÁL A METODIKA

Analyzovali sme vzorky zelenej kávy *Coffea arabica* výberovej kvality z pestovateľských oblastí Etiópie. Vzorky dodala spoločnosť FIDELIS s.r.o.. Detailný popis analyzovaných vzoriek je uvedený v nasledujúcej Tabuľke č. 1. Pri meraní TAC a TPC sme extrakty pripravili pomocou metodiky Bobková *et al*., (2020).

Tabuľka č. 1, Popis analyzovaných vzoriek *C. arabica*

ID	Krajina pôvodu	Región	Nadmorská výška (m n.m.)	Varieta	Pozberové spracovanie
1Z	Etiópia	Yirgacheffe- Gedeo Mateku Shento	2000-2200	Heirloom	mokré
2Z		Harar	1500-2000		suché
3Z		Sidamo Bensa Daye Wuro Tebelo	1850-2070		mokré
4Z		Djimmah	1500-1800		suché
5Z		Sidamo, Yeppo Village, Masha	1680-1875		mokré
6Z		Sidamo	1900-2200		mokré

Stanovenie Celkového obsahu polyfenolov (TPC)

Celkový obsah polyfenolov (TPC) sme stanovovali pomocou Folin-Ciocalteuovho činidla spektrofotometrickou metódou podľa Lachmana *et al.,* (2003). Nami zvolený objem destilovanej vody sme napipetovali do 50 ml odmernej banky. Následne sme pridali 0,05 ml vzorky a 2,5 ml nariedeného roztoku Folin-Ciocalteuovho činidla (Sigma-Aldrich, Švajčiarsko). Po trojminútovom státí sme pridali 5 ml 20% vodného roztoku Na_2CO_3 (Centralchem, Bratislava, Slovakia) a premiešali. Objem sme po rysku (50 ml) doplnili destilovanou vodou. Takto pripravené roztoky sme nechali stáť 2 hodiny. Kalibračná krivka (Graf 1), s čerstvo pripravenými štandardnými roztokmi kyseliny galovej bola pripravená zároveň so vzorkou. Pomocou spektrofotometra sme zmerali absorbanciu roztokov (λ = 765 nm). Z každej vzorky sme meranie opakovali štyri krát. Výsledky TPC sú vyjadrené ako ekvivalent kyseliny galovej g. GAE kg^{-1} v suchej hmote.

Stanovenie Celkovej antioxidačnej kapacity (TAC)

Celkovú antioxidačnú kapacitu (TAC) sme stanovali spôsobom zhášania voľných radikálov podľa metódy Brand-Williamsa *et al.,* (1995) s modifikáciami podľa Bobková *et al.,* (2020).

Stanovenie obsahu ťažkých kovov

Na analytických váhach sa odvážili presne 1 g homogenizovanej vzorky. Odvážená vzorka bola umiestnená do mineralizačnej patróny a zaliata 5 cm^3 redestilovanej vody a 5 cm^3 koncentrovanej kyseliny dusičnej. Uzavretá patróna bola mineralizovaná v mikrovlnnom digestore MARS X-press (USA). Po mineralizácii boli získané minerály filtrované cez kvantitatívny filtračný papier MUNKTELL 390,84 $g.m^{-2}$ (zelený) do 50 ml odmerných baniek

a následne zmiešané s destilovanou vodou až po značku. Meranie prebehlo pomocou VARIAN AA 240FS (Austrália). Použitý štandard: viacprvkový štandard pre GF AAS (16 prvkov) Merck (Nemecko). Opakovateľnosť stanovenia: odchýlka max 3 %; prietoky plynov: vzduch: 13,5 $l.min^{-1}$, acetylén: 2,0 $l.min^{-1}$. Ortuť bola meraná vo vzorke priamo bez úpravy na prístroji AMA 254 (Česká republika) pomocou atómovej absorpčnej spektrometrie s použitím techniky tvorby pár ortuti, vlnová dĺžka Hg - 253,65 nm; detekčný limit—1,5 $ng.kg^{-1}$ sušiny.

Tabuľka č. 2, Parametre mineralizácie

Fáza	Výkon (W)	Výkon (%)	Čas (min)	Teplota (°C)
Inicializácia (Dosiahnutie špecifických podmienok)	800	90	15	160
Mineralizácia (Udržanie špecifických podmienok)	800	90	0	160
Chladenie	–	–	–	–

Tabuľka č. 3, Podmienky pri AAS- Atómová absorpčná spektroskopia

Prvok	Detekčný limit (mg L^{-1})	Citlivosť (mg L^{-1})	Vlnová dĺžka (nm)
Cd	0,001	0,01	228,8
Pb	0,02	0,1	217,0
Cu	0.002	0,03	324,8
Zn	0.006	0,008	213,9
Co	0.005	0,05	240,7
Cr	0.003	0,04	357,9
Ni	0.008	0,06	232,0
Mn	0.003	0,02	279,5
Fe	0.005	0,04	241,8

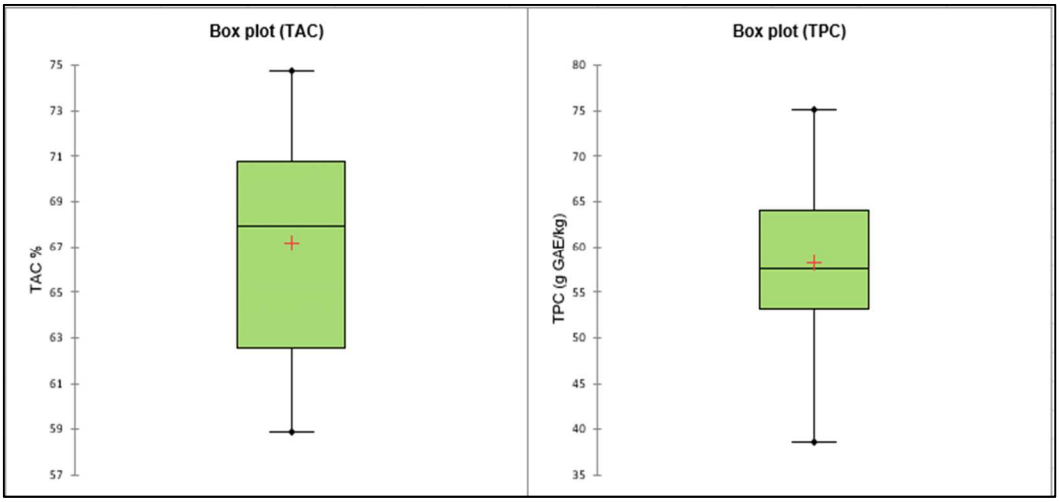
Štatistické spracovanie

Štatistické analýzy boli vykonané pomocou Microsoft Office Excel 365 pre iOS a Addinsoft 2022, XLSTAT, New York, USA.

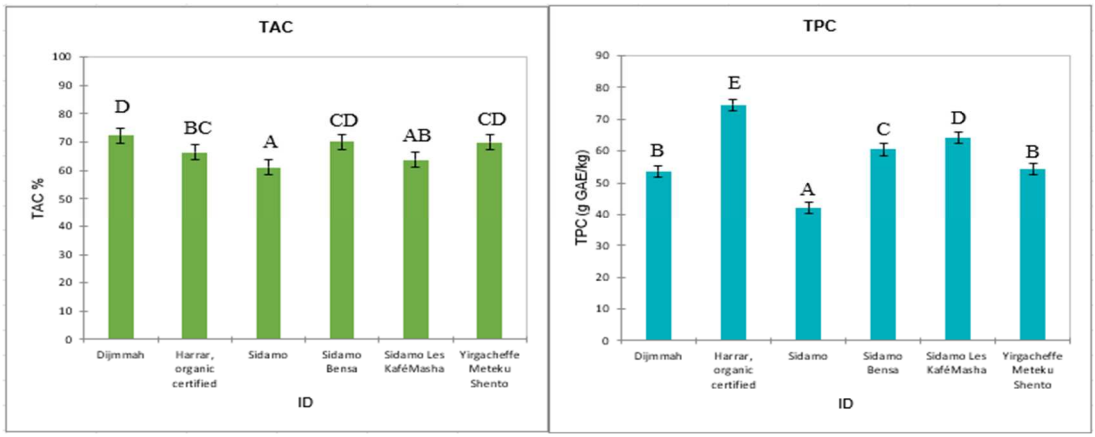
VÝSLEDKY A DISKUSIA

Viacerí autori, vrátane Palmieri *et al*. (2018) vo svojich výskumoch demonštrovali, že zelená káva je zdroj antioxidantov. Antioxidačné účinky zelenej kávy pripisujú obsahu polyfenolových zlúčenín, ako sú chlorogenové kyseliny, najmä 5-O-CQA, 4-O-CQA a 3-O-CQA.

Celková antioxidačná kapacita závisí od viacerých faktorov. Jedná sa najmä o botanický pôvod (*Coffea arabica/Coffea canephora*), spôsob prípravy extraktu, použité rozpúšťadlo, ale aj geografický pôvod (Masek *et al*., 2020). Priemerné hodnoty pre TAC a TPC v nami analyzovaných vzorkách sú zobrazené na nasledujúcom Obrázku č.1 a č. 2



Obrázok č. 1. Box plot Celkovej antioxidačnej kapacity (TAC) a Celkového obsahu polyfenolov (TPC) zelenej kávy z oblastí Afriky



Obrázok č. 2. Porovnanie obsahu TAC a TPC pomocou ANOVA Duncanovho testu. **Legenda –** Hodnoty s rôznymi indexami sa od seba signifikantne líšia (α=0,5).

Všetky analyzované vzorky boli variety Heirloom. Na základe našich výsledkov môžeme konštatovať, že najnižšiu TAC dosiahli vzorky zelenej kávy Sidamo (6Z), dopestované v 1900-

2200 m n.m., spracované mokrým pozberovým spracovaním. Naopak, najvyššie hodnoty dosiala vzorka z Djimmah (4Z), na úrovni 72,18% inhibície DPPH. Na základe ANOVA Duncanovho testu (Obrázok 2) môžeme zhodnotiť, že TAC vzorky 6Z sa signifikantne nelíšila od vzorky Sidamo les Kafé Masha (5Z). Podobnosti sme zaznamenali aj medzi vzorkami Sidamo Bensa a Yirgacheffe Meteku Shento. Najvyššiu priemernú koncentráciu polyfenolov sme pozorovali vo vzorke Harrar organic certified (2Z), na úrovni 74,45 g GAE.kg^{-1}. Autori Asfaw a Tefera (2020) zamerali svoj výskum na detekciu TPC vo výberovej káve z Etiópie. Ich výsledky boli v intervale of 58 do 64 g GAE.kg^{-1} v suchej hmote. Avšak, nami analyzované vzorky Sidamo (6Z) a Djimmah (4Z) vykazovali nižšie hodnoty TPC ako 58 g GAE.kg^{-1} v suchej hmote. Mehari *et al*. (2020) uviedli, že spomedzi nimi analyzovaných vzoriek z viacerých oblastí Etiópie, mali vzorky z regiónu Harrar najnižšie koncentrácie TPC, no zároveň dodávajú, že environmentálne faktory mikrolotu pestovania môžu ovplyvniť dané hodnoty, čo je v súlade s našimi výsledkami.

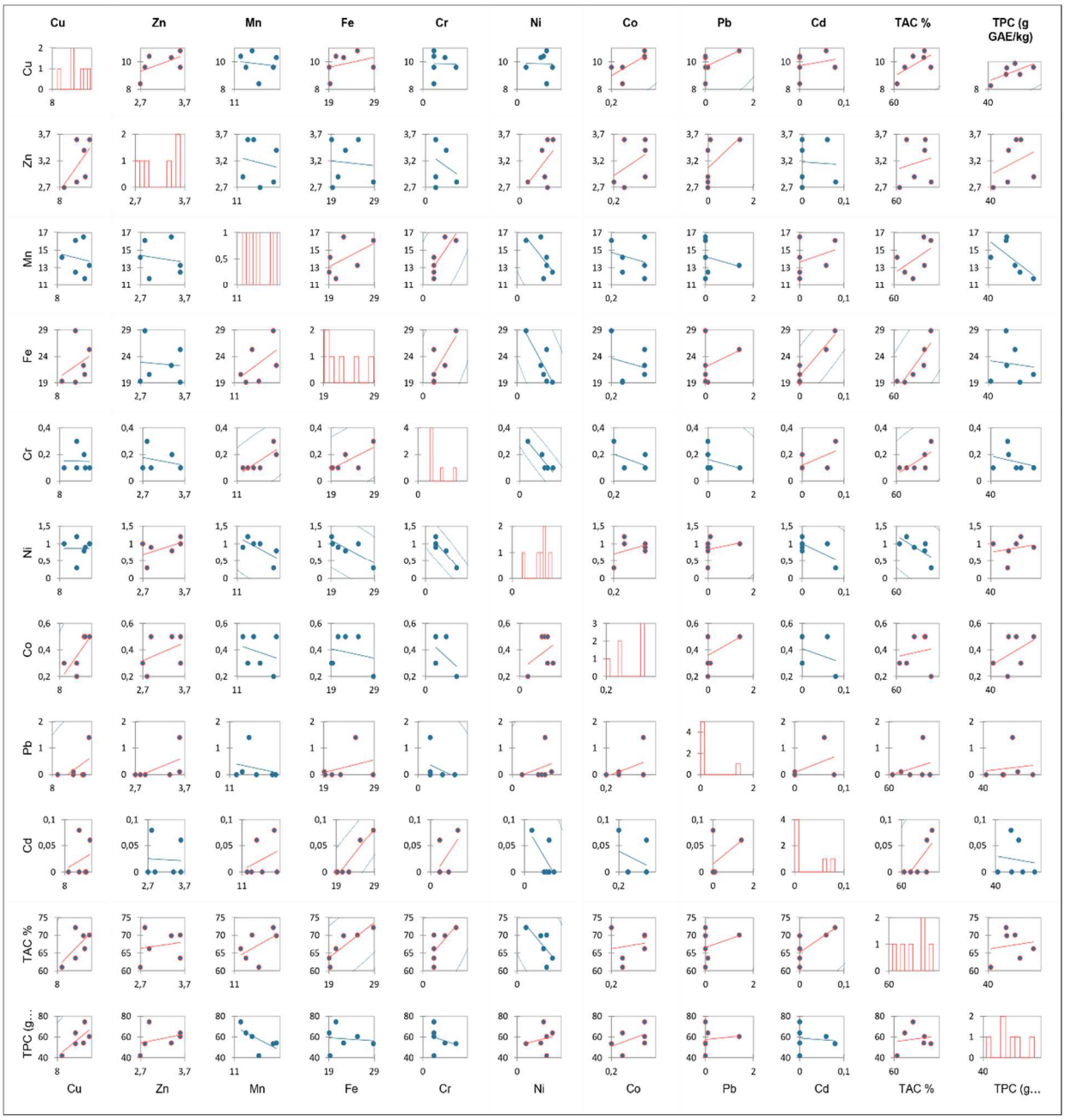
Analýza obsahu kovov preukázala, že najviac zastúpeným vo všetkých vzorkách bolo železo, v intervale od 19,10 (Sidamo Masha) do 28,80 (Djimmah) mg.kg^{-1}. Kovy boli zastúpené v nasledovnom poradí: Fe>Mn>Cu>Zn>Ni>Co>Cr. Podobné hodnoty uviedli aj Gure a Chandravanshi (2017). Olovo bolo identifikované len vo vzorke z oblasti Sidamo Bensa. Kadmium bolo identifikované nad detekčný limit len vo vzorkách Sidamo Bensa a Djimmah Výsledky AAS sú uvedené v nasledujúcej Tabuľke č. 4 v mg.kg^{-1}.

Tabuľka č. 4 Výsledky analýzy obsahu kovov v zelenej káve

ID	Región	Cu	Zn	Mn	Fe	Cr	Ni	Co	Pb	Cd
1Z	Yirgacheffe	10,30	3,40	16,50	22,30	0,20	0,80	0,50	ND	ND
2Z	Harrar	10,40	2,90	11,80	20,60	0,10	0,90	0,50	ND	ND
3Z	Sidamo Bensa	10,80	3,60	13,30	25,30	0,10	1,00	0,50	1,40	0,06
4Z	Djimmah	9,60	2,80	16,10	28,80	0,30	0,30	0,20	ND	0,08
5Z	Sidamo Masha	9,60	3,60	12,50	19,10	0,10	1,20	0,30	0,10	ND
6Z	Sidamo	8,40	2,70	14,20	19,30	0,10	1,00	0,30	ND	ND

Legenda: Výsledky sú uvedené v mg.kg^{-1}. ND: nedetekovateľné množstvo pod 0,001 mg.kg^{-1}.

Na zistenie vzťahov medzi obsahom jednotlivých kovov, celkovou antioxidačnou kapacitou a celkovým obsahom polyfenolov sme použili korelačnú analýzu (Pearson's Correlation Test). Výsledky sú zobrazené na nasledujúcom Obrázku č. 3.



Obrázok č. 3. Výsledky Pearsonovej korelačnej analýzy medzi obsahom kovov, TAC a TPC

Výsledky preukázali slabú negatívnu koreláciu obsahu Cd s Celkovým obsahom polyfenolov a silnú pozitívnu koreláciu s TAC. Podobné výsledky boli pozorované aj v práci Li *et al*. (2020). Tiež sme pozorovali pozitívnu koreláciu Cr a TAC (hodnota korelačného koeficientu 0,707), Fe a TAC (hodnota korelačného koeficientu 0,868) a Cd a TAC (hodnota korelačného koeficientu 0,730). Naše zistenia sú v súlade s Marquéz-García *et al.* (2012), ktorí uvádzajú, že kadmium zvyšuje obsah flavonoidov a antioxidačnú kapacitu. Naše zistenia môžu teda naznačovať, že určité antioxidanty zohrávajú úlohu v obrane proti stresu spôsobeného prítomnosťou kovov.

ZÁVER

Cieľom tejto práce bolo stanovenie antioxidačných vlastností, obsahu polyfenolových zlúčenín a obsahu kovov vo vzorkách zelenej výberovej kávy druhu *Coffea arabica*. Analyzované vzorky pochádzajúce z Etiópie boli variety Heirloom. Naše výsledky preukázali, že obsah TAC a TPC môže byť ovplyvnený environmentálnymi faktormi, ako je nadmorská výška či mikroklíma daného regiónu. Najvyššiu úroveň TAC sme zaznamenali vo vzorke z oblasti Djimmah, naopak, najnižšiu vo vzorke z oblasti Sidamo, dopestovanú v nadmorskej výške 1900-2200 m n. m.. Analýza obsahu kovov preukázala, že koncentrácia kovov vo vzorkách etiópskej kávy bola v nasledujúcom poradí: Fe> Mn> Cu> Zn> Ni> Co> Cr. Pb bolo identifikované len vo vzorke od Sidamo Bensa (3Z) a Cd vo vzorke Sidamo Bensa (3Z) a Djimmah (4Z). Tiež sme pozorovali negatívnu koreláciu Ni s celkovou antioxidačnou kapacitou a negatívnu koreláciu Fe, Cd, Cr s celkovým obsahom polyfenolov. Naše výsledky naznačujú, že určité antioxidanty v zelených kávových zrnách môžu zohrávať úlohu v obrane proti stresu spôsobeného prítomnosťou kovov.

POĎAKOVANIE

Táto práca vznikla vďaka podpore Ministerstva školstva, vedy, výskumu a športu SR, projektom VEGA 1/0734/20 a KEGA 001SPU-4/2023.

POUŽITÁ LITERATÚRA

1. SUALEH, A., TOLESSA, K., MOHAMMED, A. (2020). Biochemical composition of green and roasted coffee beans and their association with coffee quality from different districts of southwest Ethiopia. *Heliyon*, 6(12), e05812. https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e05812
2. ABU, T. (2015). Ethiopia Coffee Annual Report/Coffee Annual Report, *Grain Report Number* ET-1514, Grain Report Assessment of Commodity and Trade by USDA USA
3. WORKU, M., ASTATKIE, T., BOECKX, P. (2023). Quality and biochemical composition of Ethiopian coffee varied with growing region and locality. *Journal of Food Composition and Analysis*, 115. https://doi.org/10.1016/j.jfca.2022.105015
4. BERTRAND, B., BOULANGER, R., DUSSERT, S., RIBEYRE, F., BERTHIOT, L., DESCROIX, F., JOËT, T. (2012). Climatic factors directly impact the volatile organic compound fingerprint in green Arabica coffee bean as well as coffee beverage quality. *Food Chemistry*, 135(4), 2575–2583. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.06.060
5. MEHARI, B., REDI-ABSHIRO, M., CHANDRAVANSHI, B. S., COMBRINCK, S., ATLABACHEW, M., & MCCRINDLE, R. (2016). Profiling of phenolic compounds

using UPLC–MS for determining the geographical origin of green coffee beans from Ethiopia. *Journal of Food Composition and Analysis*, 45, 16–25. https://doi.org/10.1016/j.jfca.2015.09.006

6. MOHIUDDIN, K. M., OGAWA, Y., ZAKIR, H. M., OTOMO, K., SHIKAZONO, N. (2011). Heavy metals contamination in water and sediments of an urban river in a developing country. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 8(4), 723–736. https://doi.org/10.1007/bf03326257
7. CAROLIN, C. F., KUMAR, P. S., SARAVANAN, A., JOSHIBA, G. J., NAUSHAD, Mu. (2017). Efficient techniques for the removal of toxic heavy metals from aquatic environment: A review. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 5(3), 2782–2799. https://doi.org/10.1016/j.jece.2017.05.029
8. GEBREYOHANNES, F., GEBREKIDAN, A. (2018). Health risk assessment of heavy metals via consumption of spinach vegetable grown in Elalla River. *Bulletin of the Chemical Society of Ethiopia*, 32(1), 65. https://doi.org/10.4314/bcse.v32i1.6
9. LACHMAN, J., PRONĚK, D., HEJTMÁNKOVÁ, A., DUDJAK, J., PIVEC, V., FAITOVÁ, K. 2003. Total polyphenol and main flavonoid antioxidants in different onion (Allium cepa L.) varieties. In *Horticultural Science*, 30(4), 142–147. https://doi.org/10.17221/3876-hortsci
10. BRAND-WILLIAMS, W., CUVELIER, M. E., & BERSET, C. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. In *LWT - Food Science and Technology*, 28(1), 25–30. https://doi.org/10.1016/s0023-6438(95)80008-5
11. BOBKOVÁ, A., HUDÁČEK, M., JAKABOVÁ, S., BELEJ, Ľ., CAPCAROVÁ, M., ČURLEJ, J., BOBKO, M., ÁRVAY, J., JAKAB, I., ČAPLA, J., & DEMIANOVÁ, A. 2020. The effect of roasting on the total polyphenols and antioxidant activity of coffee. *In Journal of Environmental Science and Health, Part B*, 55(5), 495–500. https://doi.org/10.1080/03601234.2020.1724660
12. PALMIERI, M. G. S., CRUZ, L. T., BERTGES, F. S., HÚNGARO, H. M., BATISTA, L. R., DA SILVA, S. S., FONSECA, M. J. V., RODARTE, M. P., VILELA, F. M. P., & AMARAL, M. da P. H. do. (2018). Enhancement of antioxidant properties from green coffee as promising ingredient for food and cosmetic industries. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 16, 43–48. https://doi.org/10.1016/j.bcab.2018.07.011
13. MASEK A, LATOS-BROZIO M, KAŁUŻNA-CZAPLIŃSKA J, ROSIAK A, CHRZESCIJANSKA E. Antioxidant Properties of Green Coffee Extract. *Forests*. 2020; 11(5):557. https://doi.org/10.3390/f11050557

14. MEHARI, B., CHANDRAVANSHI, B. S., REDI-ABSHIRO, M., COMBRINCK, S., MCCRINDLE, R., & ATLABACHEW, M. (2020). Polyphenol contents of green coffee beans from different regions of Ethiopia. *International Journal of Food Properties*, 24(1), 17–27. https://doi.org/10.1080/10942912.2020.1858866
15. ASFAW, G., TEFERA, M. 2020. Total polyphenol content of green, roasted and cooked Harar and Yirgacheffee Coffee, Ethiopia. In *Journal of Applied Sciences and Environmental Management*, 24(1), 187. https://doi.org/10.4314/jasem.v24i1.27
16. GURE, A., CHANDRAVANSHI, B.S. 2017. Metals in green coffee beans from major coffee-growing regions of Ethiopia. In *Chemistry International.*
17. LI, Z.; LI, Z.; HUANG, Y.; JIANG, Y.; LIU, Y.; WEN, W.; LI, H.; SHAO, J.; WANG, C.; ZHU, X. 2020. Antioxidant Capacity, Metal Contents, and Their Health Risk Assessment of Tartary Buckwheat Teas. ACS Omega , 5, 9724–9732.
18. MÁRQUEZ-GARCÍA, B.; ÁNGELES FERNÁNDEZ-RECAMALES, M.; CÓRDOBA, F. Effects of Cadmium on Phenolic Composition and Antioxidant Activities of Erica andevalensis. J. Bot. 2012, 2012, 936950.

Kontaktná adresa: Demianová Alžbeta, Institute of Food Sciences, Slovak University of Agriculture in Nitra, Trieda A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovak Republic; E-mail: xdemianova@uniag.sk

PRÍTOMNOSŤ ENTEROKOKOV – ŽIADUCA, ČI NEŽIADUCA SÚČASŤ ZREJÚCICH SYROV

PRESENCE OF ENTEROCOCCI – A DESIRABLE OR UNDESIRABLE COMPONENT OF RIPENED CHEESES

Dudriková Eva, Hanzelová Zuzana

Katedra hygieny, technológie a zdravotnej bezpečnosti potravín, Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, Komenského 73, 041 81 Košice, Slovenská republika

ABSTRACT

Cheeses belong to the group of foods that offer consumers many nutritionally important substances. A specific group of bacteria that play a role in cheese production is the genus *Enterococcus*, and representatives of this genus are generally referred to as controversial microorganisms because of their positive and negative influence in cheese production. Enterococci are able to produce biogenic amines in food. Enterococci demonstrate abilities to acquire antimicrobial resistance through the exchange of resistance-coding genes transmitted by transposons and plasmids.

Key words: enterococci, biogenic amins, antibiotic resistance

ÚVOD

V ostatných rokoch aj v našich zemepisných šírkach predstavujú syry významný zdroj výživných látok a to nielen vápnika, ale aj ďalších významných komponentov, ako sú napr. bielkoviny a taktiež ich môžeme zaradiť do skupiny potravín, ktoré laická, ale aj odborná verejnosť pomenúvava ako tzv. funkčné potraviny. Súčasné spotrebiteľské trendy smerujú k silnému dôrazu na rovnováhu vo vzťahu potraviny – zdravie. Nedávno sa objavila v diskusiách o nerovnováhe medzi jedlom a zdravím nová klasifikácia založená na striktnom pomenovaní termínom "ultra-spracované potraviny". Termín vytvorený Monteirom klasifikuje potraviny podľa ich spôsobu spracovania počas výroby do štyroch skupín (Monteiro et al. 2010, 2012, 2015). Zástancovia tohto nového termínu ho používajú na označenie spracovania potravín ako jednej z príčin niektorých neprenosných ochorení, ktoré môžu veľmi intenzívne ovplyvňovať úroveň zdravia populácie (napr. obezita, diabetes mellitus typ 2, onkologické ochorenia, atď.) (Monteiro et al. 2012, Moubarac et al. 2014). Systém klasifikácie potravín pomenovaný ako NOVA zahŕňa štyri triedy potravín so zvyšujúcou sa intenzitou spracovania. Potraviny, ktoré patria do prvej skupiny podľa klasifikácie NOVA sú označované ako nespracované alebo

minimálne spracované potraviny. Patria sem okrem iných aj čerstvé a pasterizované mlieko, fermentované mliečne výrobky, ovocie, zelenina, vajcia, čaj, káva a ďalšie. Práve syry, pri výrobe ktorých je použitá alebo čistá mliekarenská kultúra (napríklad smotanová), alebo prirodzená mikrocenóza mlieka (pri výrobe syrov z nepasterizovaného mlieka), môžeme zaradiť podľa kategórizácie NOVA do prvej skupiny.

PRÍNOS SYROV PRE NAŠE ZDRAVIE

Syry patria do skupiny potravín, ktoré ponúkajú konzumentom veľa nutrične významných látok. Prítomné baktérie, ktoré sú súčasťou syrárskych kultúr sú potrebné pre správnu technológiu výroby syrov a taktiež sú zdrojom metabolitov, vplývajúcich na ľudské zdravie, sú neustále predmetom vedeckého skúmania. V priebehu zrenia syra sa množia baktérie mliečneho kvasenia (zahŕňajú aj niektoré probiotické kmene) a dokážu ovplyvniť pozitívne črevný mikrobióm a následne aj celý organizmus (Herian 2021). Pri dlho zrejúcich syroch je množstvo laktózy minimálne až nulové a pre časť populácie trpiacich laktózovou intoleranciou sú vhodnou alternatívou mliečnych výrobkov a nepredstavujú pre nich riziko zhoršenia ich zdravotného stavu, pri súčasnom naplnení ich nutričných potrieb z hľadiska esenciálnych aminokyselín a vápnika. Ako uvádzajú Petyaev a Bashmakov (2012), Herian (2021), syry sú významným kľúčom k odhaleniu tzv. francúzskeho paradoxu, ktorý napriek tomu, že obyvatelia Francúzska konzumujú trojnásobne vyššie množstvo tučných syrov v porovnaní s obyvateľmi SR, výskyt ochorení srdca je u nich nižší. Týka sa to najmä ischemickej choroby srdca, a taktiež výskytu obezity. Predpokladá sa, že vyššie percento syrov v strave by mohlo byť kľúčom k znižovaniu výskytu obezity a kardiovaskulárnych ochorení, ktoré sú napriek zvyšujúcej sa incidencii onkologických ochorení stále v SR najčastejšou príčinou úmrtí.

ENTEROKOKY – PRIRODZENÁ SÚČASŤ ZREJÚCICH SYROV

Špecifickú skupinu baktérii, ktoré zohrávajú úlohu pri výrobe syrov predstavuje rod *Enterococcus* a zástupcovia tohto rodu bývajú vo všeobecnosti označované za kontroverzné mikroorganizmy z dôvodu ich pozitívneho i negatívneho vplyvu pri výrobe syrov (Lauková et al. 2017, Bondi et al. 2020). Enterokoky hrajú dôležitú úlohu pri produkcii určitých typov syrov a fermentovaných údenín vyrábaných v stredozemskej oblasti. Prostredníctvom ich lipolytickej a proteolytickej aktivity prispievajú k rozvoju žiaducich organoleptických vlastností (Silva et al. 2016, Silvetti et al. 2019). Mnohé enterokoky sú normálnou súčasťou intestinálneho traktu človeka a zvierat. Môžu byť izolované taktiež z pôdy, vody, rastlín a hmyzu. I keď sa predpokladá, že ich prítomnosť je najmä výsledkom fekálneho znečistenia (Pilipčinec et al. 2019). Druh *E. faecium* bol v roku 2008 zaradený do skupiny ESKAPE (akronym pre

Enterococcus faecium, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumanni*, *Pseudomonas aeruginosa* a *Enterobacter* spp.) (Rice 2008), ktorá zahŕňa vysoko významné a rezistentné nozokomiálne patogény vyžadujúce pozornosť súčasnej klinickej mikrobiológie (Pogue et al. 2015, Mulani et al. 2019). Napriek tomu, že boli enterokoky izolované z pestrej škály infekcií rôznych živočíchov a v porovnaní s ich klinickým významom pre človeka, je výskyt enterokokov vo veterinárnom klinickom materiáli sporadický a menej významný. Enterokoky boli opísané ako pôvodcovia mastitíd kráv (Nonnemann et al. 2019, Różańska et al. 2019) a oviec a kôz (Marogna et al. 2010, Mona a Hams 2021).

Enterokoky sa vyskytujú a rastú v rôznych syroch, zvlášť špeciálne vyrábaných zo surového alebo pasterizovaného kozieho, ovčieho, alebo kravského mlieka. Najčastejšie detekované druhy enerokokov v kravskom, ovčom a kozom mlieku sú *Enterococcus faecium, E. faecalis, E. hirae* a/alebo *E. durans* (Lauková et al. 2021). Vyššie počty kontaminujúcich enterokokov sú obyčajne výsledkom zlej hygieny počas výroby syrov a môžu viesť k zhoršeniu senzorických vlastností niektorých syrov (Greifová et al. 2003a). Enterokoky sa uplatňujú v technológii výroby mnohých typov syrov: Kefalotyri a Feta (Grécko), Tetilla (Španielsko), Caciotta, Fontina, Venaco a Cebreira (Taliansko), Kaškaval (Bulharsko), Kraški ovčji sir (Slovinsko), Ras a Domiatti (Egypt). Do tejto skupiny patrí aj naša bryndza. Na jednej strane vysoké hodnoty enterokokov vyplývajú z nedostatočnej hygieny počas výroby syrov vedú k zhoršeniu senzorických vlastností niektorých druhov výrobkov, na druhej strane hrajú v mnohých prípadoch významnú úlohu pri zrení a vývoji arómy. Dominantné zastúpenie a prežívanie enterokokov v mnohých syroch počas zrenia je zapríčinené širokým rozpätím rastových teplôt, vysokou toleranciou ku koncentráciám solí a kyselín. Pre zrenie syrov je významná proteolytická aktivita enterokokov, ktorá je vyššia ako u iných baktérií mliečneho kysnutia. Enterokoky uvoľňujú typické aromatické látky ako sú acetoín, acetaldehyd a diacetyl (Seman et al. 2005).

ŽIADUCE A NEŽIADUCE VLASTNOSTI ZÁSTUPCOV RODU ENTEROCOCCUS

Mnohé enterokoky izolované z mliečnych produktov produkujú bakteriocíny (enterocíny), ktoré zabraňujú kazeniu potravín. Vyznačujú sa inhibičnou aktivitou nielen proti saprofytom a rôznym baktériám kaziacim potraviny (napr. produkujúcich sliz), ale aj proti patogénom (*Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens, Clostridium difficile* a *Clostridium botulinum*). Na základe týchto poznatkov sa začali enterokoky používať aj ako štartovacie kultúry pri výrobe rôznych typov syrov (Mozarella, Camembert, Chedar, Fontina a i.), resp. začali sa pridávať do potravín aj izolované enterocíny (Ebringer 2002). V štúdii Lauková et al. (2020), ktorá sa

venuje danej problematike ohľadom mlieka, bol v slovenskom surovom kozom mlieku identifikovaný *Enterococcus mundtii* EM ML2/2 s bakteriocinogénnym potenciálom a ako sa v tejto práci ďalej uvádza, bakteriocínový potenciál druhov *Enterococcus mundtii* izolovaných zo slovenského surového kozieho mlieka nebol predtým zistený, takže ide o originálny príspevok, ktorý môže stimulovať doplnkový výskum a aplikačné štúdie.

Medzi látky, ktorých prítomnosť môže pôsobiť negatívne na ľudské zdravie patria biogénne amíny. Enterokoky sú schopné v potravinách produkovať biogénne amíny. Termostabilné amíny tyramín, histamín, fenyletylalanín, kadaverín a putrescín, ktoré sú produkované a môžu zapríčiniť alergické reakcie alebo dokonca aj otravu jedlom (Różańska et al 2013). Tvorba biogénnych amínov v syroch je závislá od koncentrácie aminokyselín alebo peptidov, ktoré účinkujú ako prekurzory ich tvorby, prítomnosti baktérií schopných dekarboxylovať aminokyseliny, pH, koncentrácie soli, vodnej aktivity, doby zrenia a skladovania, množstva mikroorganizmov a od prítomnosti kofaktorov ako pyridoxalfosfát (je vo veľkom množstve prítomný v syroch). Podmienkou vzniku toxického množstva amínov v syroch je proteolýza, ktorá je pri zrení syrov považovaná za jeden z najdôležitejších pochodov ovplyvňujúcich kvalitu syra. Na proteolýze mliečnych bielkovín sa podieľajú natívne proteázy z mlieka, proteázy zákysových kultúr, syridlové enzýmy, proteázy kontaminujúcej mikrocenózy, ale hlavne baktérie štartovacích kultúr (*Lactococcus lactis, Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *E. faecalis a E. faecium*) (Greifová et al. 2003b, Benkerroum 2016, Barone et al. 2018). Vo vysokých koncentráciách sa biogénne amíny môžu prejaviť ako látky nežiaduce a vyvolávať psychoaktívne alebo vazoaktívne účinky. Symptómami po konzumácií biogénnych amínov vo vysokých koncentráciách sú zvracanie, dýchacie problémy, potenie, rýchle búšenie srdca, migrény, hypotenzia alebo hypertenzia. Patria medzi ukazovatele bakteriálneho kazenia a preto sa ich výskyt sleduje hlavne v potravinách (Kohajdová et al. 2008).

ENTEROKOKY AKO REZERVOÁR ANTIBIOTICKEJ REZISTENCIE

Enterokoky demonštrujú schopnosti k získaniu antimikrobiálnej rezistencie prostredníctvom výmeny génov kódujúcich rezistenciu prenášaných transpozónmi a plazmidmi (Różańska et al. 2013). Výraznejšia antimikrobiálna rezistencia u enterokokov môže byť následkom nadmerného použitia antimikrobiálnych látok u zvierat. Zistilo sa, že na farmách, kde sa používali antimikrobiálne látky, bola hlásená signifikantne vyššia úroveň rezistencie baktérií izolovaných u zvierat a ľudí (Šustáčková et al. 2004, Hershberger et al. 2005). Druhy rodu *Enterococcus* sú prirodzene rezistentné na cefalosporíny, na nízku koncentráciu väčšiny ďalších beta-laktámov, na nízke koncentrácie aminoglykozidov, sulfonamidov, klindamycínu,

quinupristínu a dalfopristínu. Navyše *E. casseliflavus* a *E. gallinarum* majú prirodzenú rezistenciu na nízku koncentráciu vankomycínu (Hollenbeck a Rice 2012). *U E. faecalis* je rezistencia ku klinicky dosiahnuteľným koncentráciám aminoglykozidov prirodzená, bola pripisovaná nízkej permeabilite bunkovej steny pri tomto type molekúl. Táto rezistencia pri nízkych koncentráciách môže byť prekonaná kombináciou aminoglykozidov s penicilínom (Gilmore et al. 2014). Medzi získané rezistencie enterokokov patria rezistencia na chloramfenikol, erytromycín, tetracyklín, fluorochinolóny, glykopeptidy a na vysokú koncentráciu klindamycínu, aminoglykozidov a beta-laktámov (Hollenbeck a Rice 2012, García-Solache a Rice 2019).

ZÁVER

Enterokoky sa svojho prívlastku kontroverzné baktérie v oblasti výroby syrov zatiaľ nezbavili, stále však prichádzajú ďalšie nové údaje o ich pozitívnych vlastnostiach pri samotnej výrobe syrov, ale taktiež ich blahodárnom vplyve na ľudské zdravie. Výsledky štúdií nám ukazujú, že pri detailnom preskúmaní možných rizík, ktoré boli uvedené v prehľade článku, je možné ich obozretné používanie v budúcnosti v syrárskom priemysle. Naďalej je však potrebné zvážiť nebezpečenstvo najmä ohľadom šírenia génov antibiotickej rezistencie, ktoré s tým môže byť asociované.

POUŽITÁ LITERATÚRA

1. BARONE, C. – BARBERA, M. – BARONE, M. – PARISI, S. – ZACCHEO A. Biogenic amines in cheeses: Types and typical amounts. In: Chemical evolution of nitrogen-based compounds in mozzarella cheeses. SpringerBriefs in Molecular Science. Springer, 2018. 41 p. ISBN 978-3-319-65739-4.
2. BENKERROUM, N. Biogenic amines in dairy products: Origin, incidence, and control Means. In *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. ISSN 15414337, 2016, vol. 15, p. 801-826.
3. BONDI, M. – LAUKOVA, A. – DE NIEDERHAUSERN, S. et al. Controversial aspects displayed by enterococci: Probiotics or pathogens? In *Biomed Res Int*. [online]. 2020, vol. 20 [cit. 2023-01-24].Dostupné na internete: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7115139/pdf/BMRI2020-9816185.pdf.
4. EBRINGER, L. Enterococci in foods – Functional and safety aspects. In *Bulletin československej spoločnosti mikrobiologickej*, ISSN 0009-0646, 2002, vol. 43, p. 89-94.

5. GARCÍA-SOLACHE, M. – RICE, L.B. The Enterococcus: A model of adaptability to its environment. In *Clin. Microbiol. Rev*. ISSN 0893-8512, 2019, vol. 32, e00058-18.
6. GILMORE, M.S. – CLEWELL, D.B. – YASUYOSHI, I. et al. *Enterococci from commensals to leading causes of drug resistant infection*. Boston: Massachusetts Eye and Ear Infirmary, 2014. 508 p.
7. GREIFOVÁ, M. – GREIF, G. – LEŠKOVÁ, E. et al. Enterokoky, ich hodnotenie v mliekarenskej technológii. In *Mliekarstvo*. ISSN 1210-3144, 2003a, vol. 34, p. 42-45.
8. GREIFOVÁ, M. – GREIF, G. – NOVOROĽNÍKOVÁ, B. et al. Biogénne amíny v mliekarenských výrobkoch a ich tvorba enterokokmi. In *Mliekarstvo*. ISSN 1210-3144, 2003b, vol. 34, p. 31- 33.
9. HERIAN K. *Výroba syrov*. Žilina: OZ Vidiecky parlament na Slovensku. 2021. 208 s. ISBN: 978-80-973886-1-4.
10. HERSHBERGER, E. – OPREA, S.F. – DONABEDIAN, S.M. et al. Epidemiology of antimicrobial resistance in enterococci of animal origin. In *J Antimicrob Chemother*. ISSN 1460-2091, 2005, vol. 55, p. 127-130.
11. HOLLENBECK, B. L. – RICE, L. B. Intrinsic and acquired resistance mechanisms in *Enterococcus*. In *Virulence*. ISSN 2150-5608, 2012, vol. 3, p. 421-569.
12. KOHAJDOVÁ, Z. – KAROVIČOVÁ, J. – GREIF, G. Biogénne amíny v potravinách. In *Potravinárstvo*, ISSN 1337-0960, 2008, vol. 2, p. 30-49.
13. LAUKOVÁ, A. – TOMÁŠKA, M. – KMEŤ, V. et al. Slovak local ewe's milk lump cheese, a source of beneficial *Enterococcus durans* strain. In *Foods.* ISSN 2304-8158, 2021, vol. 10, 3091.
14. LAUKOVÁ, R. – SZABÓOVÁ, P. – PLEVA, L. et al., "Decarboxylase-positive *Enterococcus faecium* strains isolated from rabbit meat and their sensitivity to enterocins." In *Food Science & Nutrition*. ISSN 2048-7177, 2017, vol. 5, no. 1, p. 31-37.
15. MAROGNA, G. – ROLESU, S. – LOLLAI, S. – TOLA, S. – LEORI, G. Clinical findings in sheep farms affected by recurrent bacterial mastitis. In *Small Ruminant Res.* ISSN 0921-4488, 2010, vol. 88, p.119-125.
16. MONA, E-Z. – HAMS, M. Antimicrobial resistance, virulence genes and biofilm formation in Enterococcus species isolated from milk of sheep and goat with subclinical mastitis. In *PLoS One*. ISSN 1932-6203, 2021, vol. 16 [cit. 2023-04-19]. Dostupné na internete: https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0259584.

17. MONTEIRO, C.A. – CANNON, G. – LEVY, R.B. – CLARO, R. – MOUBARAC, J.C. – MARTINS, A.P. The food system. Processing the big issue for disease, good health, well-being. In *World Nutr*. ISSN 1743-7075, 2012, vol. 3, p. 527-69.
18. MOUBARAC, J.C. – PARRA, D.C. – CANNON, G. – MONTEIRO, C.A. Food Classification Systems Based on Food Processing: Significance and Implications for Policies and Actions: A Systematic Literature Review and Assessment. In *Curr Obes Rep*. ISSN 2162-4968, 2014, vol. 3, p. 256-72.
19. MULANI, M. S. – KAMBLE, E. E. – KUMKAR, S. N. et al. Emerging Strategies to Combat ESKAPE Pathogens in the era of antimicrobial resistance: A Review. In *Front Microbiol.* ISSN 1664-302X, 2019, vol. 10, p. 539.
20. NONNEMANN, B. – LYHS, U. – SVENNESEN, L. et al. Bovine mastitis bacteria resolved by MALDI-TOF mass spectrometry. In *J Dairy Sci*, ISSN 1525-3198, 2019, vol. 102, p. 2515-2524.
21. PETYAEV, I.M. – BASHMAKOV, Y.K. Could cheese be the missing piece in the French paradox puzzle? In *Med Hypotheses*. ISSN 0306-9877, 2012, vol. 79, p. 746-9.
22. PILIPČINEC, E. – PISTL, J. – ŽILKA N. et al. *Špeciálna bakteriológia, Gram-pozitívne baktérie*. Košice: Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, 2019. 328 p. ISBN 978-80-8077-632-9.
23. POGUE, J. M. – KAYE, K. S. – COHEN, D. A. – MARCHAIM, D. Appropriate antimicrobial therapy in the era of multidrug-resistant human pathogens. In *Clin Microbiol Infect*. ISSN: 1198-743X, 2015, vol. 21, p. 302-12.
24. RICE, L. B. Federal funding for the study of antimicrobial resistance in nosocomial pathogens: no ESKAPE. In J Infect Dis. ISSN 1537-6613, 2008, vol. 197, p. 1079-8.
25. RÓŻAŃSKA, H. – LEWTAK-PIŁAT, A. – KUBAJKA, M. – WEINER, M. Occurrence of Enterococci in Mastitic Cow's Milk and their Antimicrobial Resistance. In *J Vet Res*. ISSN 2450-8608, 2019, vol.63, p. 93-97.
26. RÓŻAŃSKA, H. – LEWTAK-PIŁAT, A. – KUBAJKA, M. – WEINER, M. Occurrence of Enterococci in Mastitic Cow's Milk and their Antimicrobial Resistance. In *J Vet Res*. ISSN 2450-8608, 2019, vol.63, p. 93-97.
27. SEMAN, M., NOGOVÁ, P., TRUPL, J., 2005: Pohľad na enterokoky vo svetle súčasných poznatkov. In *Bulletin Československé spoločnosti mikrobiologickej*, ISSN 0009-0646, vol. 46, p. 16-34.

28. SILVA, N. – IGREJAS, G. – GONÇALVES, A. – POETA, P. Commensal gut bacteria: distribution of Enterococcus species and prevalence of *Escherichia coli* phylogenetic groups in animals and humans in Portugal. In *Ann Microbiol*. ISSN 1869-2044, 2012, vol. 62, p. 449-459.
29. SILVETTI, T. – MORANDI, S. – BRASCA M.: Does *Enterococcus faecalis* from traditional raw milk cheeses serve as a reservoir of antibiotic resistance and pathogenic traits? In *Foodborne Pathog Dis*. ISSN 1556-7125, 2019, vol. 16, p. 359-367.
30. ŠUSTÁČKOVÁ, A. – NÁPRAVNÍKOVÁ, E. – NAVRÁTILOVÁ, P. et al. 2004. *Potraviny živočišního původu jako vektor rezistence k antibakteriálním látkam*. In Zborník z medzinárodného vedeckého seminára „Aktuálne problémy riešené v agrokomplexe“(CD-ROM) Nitra : SPU, 2004, s. 328-345, ISBN 80-8069-488-6.

Kontaktná adresa: Dudriková Eva, Department of Food Hygiene, Technology and Safety, University of Veterinary Medicine and Pharmacy in Košice, Komenského 73, 041 81 Košice, Slovak Republic; E-mail: eva.dudrikova@uvlf.sk

VPLYV ZÁRUČNEJ DOBY NA KVALITU TVAROHOV

INFLUENCE OF THE SHELF LIFE ON THE QUALITY OF CURDS

Dudriková Eva, Zahumenská Jana, Výrostková Jana, Kováčová Mariana, Hanzelová Zuzana

Katedra hygieny, technológie a zdravotnej bezpečnosti potravín, Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, Komenského 73, 041 81 Košice, Slovenská republika

ABSTRACT

The work deals with the evaluation of the quality of curds at the time of their purchase and at the time of the end of the warranty period. Thirteen samples of curds were included into the experiment. The samples differed in the way of packaging and for fat content in the dry matter (fat, semi-fat, low fat or soft, defatted or soft). During storage at optimal temperatures, the samples retained the desired sensory properties throughout. The highest fat content was in smoked curd produced in Poland in sample no. 10 (17g). Statistical significance was demonstrated between the first day of purchase and the expiration date in the dry matter content ($t < 0.05$; $p = 0.002$) and between the fat content in the dry matter ($p = 0.03$). The highest salt content was in the sample of smoked cottage cheese (sample no. 10 - 1.053 %). The titration acidity was exceeded in two cases, in sample no. 8 and no. 10. Statistical significance was confirmed in the acidity parameter ($p=0.04$). We identified the growth of micromycetes in all cheese samples on the day of purchase. After storage in optimal conditions, the number of colony-forming units (CFU) of micromycetes decreased towards the expiration date in nine samples (69 %). Through microscopic observation, we identified the growth of the genus *Aspergillus* and *Penicillium* in the samples.

Keywords: curd, quality, shelf life

ÚVOD

Na kvalite mliečnych výrobkov sa podieľa množstvo faktorov. Jeho bezpečnosť je ovplyvnená zdravotným stavom dojníc a hygienickými podmienkami pri jeho získavaní. Ďalším faktorom je látkové zloženie mlieka. Kvalita je daná chemickým zložením, fyzikálnymi, zmyslovými, technologickými, kulinárskymi vlastnosťami, výživovou, hygienickou hodnotou a mikrobiálnou kontamináciou (Fox, 2004).

Hoci spotrebitelia všeobecne uprednostňujú čerstvé, minimálne priemyselne opracované potraviny, trh si súčasne vyžaduje veľmi trvanlivé výrobky, často na maximálnej

hranici, ktorú ešte vnútorné a vonkajšie prostredie príslušnej potraviny môže zabezpečiť. Za týchto okolností sa nedá úplne vylúčiť, že prítomné mikroorganizmy v nich niekedy prekonajú všetky bariéry vlastného výrobku i technologických postupov a spôsobia jeho hygienické narušenie (Piecková a kol., 2002).

Tvaroh je najrozšírenejší druh čerstvých syrov s nižšou sušinou, ktoré nezrejú a spravidla nemajú dlhú trvanlivosť (Keresteš a kol., 2016).

Základom výroby kyslých syrov je kyslé zrážanie mlieka. Okyslením mlieka pomocou kyslomliečnych kultúr alebo pridaním kyseliny vzniká pri určitej kyslosti mliečna zrazenina (Šnirc, Golian, 2016).

Tabuľka č. 1, Rozdelenie tvarohu podľa množstva tuku v sušine v hmotnostných percentách

Skupina syra	Tuk v sušine
tučný	najmenej 38 %
polotučný	najmenej 15 a menej ako 38
nízkotučný alebo jemný	najmenej 5 a menej ako 15
odtučnený alebo mäkký	10 a menej ako 25

Zdroj: Vyhláška č. 343/2016

MATERIÁL A METODIKA

V práci boli analyzované vzorky tvarohov (n = 13) zakúpené v obchodnej sieti v Košiciach od rôznych výrobcov. Z toho bolo 6 vzoriek slovenskej výroby (1 - 6), tri vzorky českej výroby (7 - 9) a štyri vzorky poľskej výroby (10 - 13). Vzorky sa odlišovali v spôsobe balenia (kelímok, zmršťovacia fólia, plastová fólia, vákuové balenie, ochranná atmosféra) a v obsahu tuku v sušine (tučný, polotučný, nízkotučný alebo jemný, odtučnený alebo mäkký) a boli analyzované v dvoch etapách, t. z. v deň ich zakúpenia a posledný deň uplynutia záručnej doby.

Vyšetrenie spočívalo v paralelnom odbere z každej vzorky. Vo vzorkách boli stanovované fyzikálno-chemické parametre (sušina sušením do konštantnej hmotnosti pri teplote 102 °C, tuk acidobutyrometrickou metódou za použitia butyrometra podľa van Gulika, tuk v sušine stanovený výpočtom, obsah solí priamou argentometrickou titráciou z výluhu tvarohu podľa Mohra, aktívna kyslosť-pH nameraná pomocou pH metra ImolaB pH7110 (WTW Nemecko), kyslosť titračnou metódou podľa Soxlet Henkela, vodná aktivita - a_w meraná na prístroji LabMaster-aw Novasina, Švajčiarsko).

Z mikrobiologického hľadiska sme stanovili počty mikroskopických vláknitých húb a kvasiniek na DRBC agare pri teplote 25 °C po dobu 5 dní. Vyšetreniu predchádzalo pripravenie desaťnásobných riedení podľa štandardných mikrobiologických metód.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Znaky kvality (vzhľad, konzistencia, farba, chuť, pach, vôňa) v rámci senzorickej analýzy nevykazovali po otvorení žiadne zmeny v skúmaných vzorkách. Vo vzorkách tvarohov sme nezaznamenali žiadne organoleptické zmeny v prvý a v posledný deň uplynutia doby trvanlivosti. Počas skladovania pri optimálnych teplotách si vzorky zachovali požadované senzorické vlastnosti po celý čas. Vo vzorkách odtučnených tvarohov (č. 4 a č. 8) bola konzistencia jemná pastovitá s menším množstvom uvoľnenej srvátky. U ostatných vzoriek bola konzistencia hrudkovitá bez prítomnej viditeľnej srvátky. Vzorka č. 6 prešla počas technológie výroby údením dymom z jelšového a bukového dreva, čo výrazne ovplyvnilo vôňu aj chuť, navyše farba sa pôsobením dymu zmenila z bielej na žltú.

Minimálna hodnota obsahu sušiny bola zistený vo vzorke č. 4 (v čase zakúpenia 16 %; v deň končiacej záručnej doby 16 %) a maximálna hodnota vo vzorke č. 10 (35,82 % / 36,48 %). Ku koncu dátumu spotreby hodnoty sušiny jemne klesali. V žiadnej vzorke však neboli zistené podlimitné hodnoty, ako sú uvedené výrobcom na obale.

Tabuľka č.2, Priemerné hodnoty obsahu sušiny, tuku a tuku v sušine vo vzorkách tvarohov

	Fyzikálny parameter (%)								
Vzorka 1 - 13	suš - obal	suš - 1.deň	suš - posledný deň	tvs - obal	tvs - 1.deň	tvs- posledný deň	tuk - obal	tuk - 1.deň	tuk - posledný deň
priemer	22,09	23,59	24,18	8,27	11,1	10,6	3,6	3,2	3,2
max. hodnota	28	35,82	36,48	38	46,1	45,2	17,0	16,5	16,5
min. hodnota	16	15,79	15,77	0,5	0,6	0,5	0,1	0,1	0,1
TTEST		p = 0,002					p = 0,03		

Zdroj: vlastná tabuľka (suš-sušina; tvs-tuk v sušine)

Najnižší obsah tuku bol detegovaný vo vzorke č. 4 (0,05g/0,05g), čo bol mäkký odtučnený tvaroh vyrobený na Slovensku a najvyšší obsah tuku v údenom tvarohu poľskej výroby vo vzorke č. 10 (17g/17g). Bola preukázaná štatistická významnosť medzi prvým dňom

od zakúpenia a dátumom spotreby v obsahu sušiny ($t < 0,05$; $p = 0,002$) a medzi obsahom tuku v sušine ($p = 0.03$).

Najvyšší obsah soli tak ako sme aj predpokladali, bol vo vzorke údeného tvarohu č. 10 (1,053 %/0,819 %). Obsah soli u ostatných vzoriek sa pohybovali v rozmedzí 0,058 % - 0,24 %.

Najvyššia hodnota pH bola stanovená u vzorky č. 1 (4,85/4,703). Titračná kyslosť bola prekročená v dvoch prípadoch, u vzorky č. 8 a č. 10 (172 °SH/192 °SH a 162 °SH/167 °SH), nakoľko literárne zdroje hovoria o rozpätí 85 - 100 °SH, v prípade konzumného tvarohu 120 - 160 °SH. Bola potvrdená štatistická významnosť v parametri kyslosť ($p=0,04$).

Tabuľka č. 3, Priemerné hodnoty aktívnej a titračnej kyslosti vo vzorkách tvarohov

	Fyzikálny parameter			
Vzorka 1 - 13	pH - 1.deň	pH - posledný deň	kyslosť - 1.deň (°SH)	kyslosť - posledný deň (°SH)
priemer	4,592	4,555	72,50	75,35
max. hodnota	4,851	4,748	88	96
min. hodnota	4,408	4,274	60	58,5
TTEST	p = 0,09		p = 0,04	

Zdroj: vlastná tabuľka (kyslosť-titračná kyslosť podľa Soxhlet-Henkela)

Sofková (2001) pripisuje vplyv technologického procesu a podmienok skladovania zmenám v titračnej kyslosti, a zároveň aj zmyslovým odchýlkam vo výrobkoch.

Aktivita vody (a_w) sa pohybovala v rozmedzí od 0,942-0,970. Najnižšia hodnota bola zistená vo vzorke údeného tvarohu. Minimálna hodnota aktivity vody potrebná pre rast mikroorganizmov bola 0,80. Z mikrobiologického hľadiska sme sa sústredili na výskyt mikromycét. Vďaka ich schopnosti prežívať aj v nepriaznivých podmienkach nízkych teplôt mikromycéty považujeme za indikátorové mikroorganizmy kontaminácie v mliečnych výrobkoch. Mikromycéty obľubujú kyslé prostredie, ktoré im všetky vyšetrované vzorky poskytli. Najvyššie množstvo mikromycét sa nachádza v substráte pri a_w 0,99 (Hines et al., 2000). Sanchis a Magan (2004) uvádzajú, že *Asperillus flavus* rastie od a_w 0,73. Podľa Malířa a kol. (2003) je minimálna a_w potrebná pre rast mikromycét 0,78 a optimálna a_w 0,95. Vo všetkých vzorkách tvarohov sme identifikovali rast mikromycét už v 1. deň zakúpenia.

Najvyšší počet mikromycét sme zaznamenali vo vzorke. č.1 a č. 9 v 1.deň zakúpenia ($3{,}09.10^3$ KTJ.ml^{-1}, $3{,}14.10^3$ KTJ.ml^{-1}). Po uskladnení v optimálnych podmienkach počet kolónií tvoriacich jednotiek (KTJ) mikromycét klesal ku blížiacemu sa dátumu spotreby u deviatich vzorkiek (69 %). Najvýraznejší pokles v raste mikromycét bol vo vzorke č. 1 a č. 9 o $2{,}46 - 2{,}49.10^3$ KTJ. ml^{-1} V štyroch vzorkách (30 %) sme však zaznamenali aj vzostup v počte mikromycét a najvýraznejší nárast bol vo vzorke č. 2 (t. j. o $3{,}86.10^3$ KTJ. ml^{-1}). Mikroskopickým pozorovaním sme identifikovali vo vzorkách rast rodov *Aspergillus* a *Penicillium.*

ZÁVER

Dátumom spotreby sa označujú potraviny, ktoré z mikrobiologického hľadiska podliehajú rýchlemu znehodnoteniu a teda konzumácia po uplynutí tohto dátumu môže pre spotrebiteľa predstavovať vážne ohrozenie jeho zdravia. Od potravín očakávame, že u nich nedôjde ani k mikrobiálnemu znehodnoteniu, ani k fyzikálnym, či chemickým zmenám, ktoré by sa prejavili zhoršením senzorických vlastností. Potraviny po uplynutí dátumu spotreby by sme teda ani naďalej konzumovať nemali.

Z analyzovaných vzoriek sme vyhodnotili ako nevyhovujúce z hľadiska obsahu sušiny a tuku v sušine vzorku č. 1 a vzorku č. 11, ktoré nedosahovali legislatívou stanovené minimálne množstvo sušiny a negatívna odchýlka bola vyššia ako 2 %. Ostatné vzorky tvarohu splnili kvalitatívne požiadavky.

Na základe porovnania výsledných hodnôt mikrobiologického vyšetrenia posudzujeme priaznivý vplyv skladovania pri optimálnych podmienkach pre zníženie rastu nežiaducich mikromycét, a tak udržanie kvality a zdravotnej bezpečnosti výrobkov počas doby ich trvanlivosti a bezprostredne po jej ukončení. Je dôležité nepodceniť podmienky skladovania mliečnych výrobkov.

POUŽITÁ LITERATÚRA

1. FOX, P., McSWEENEY, P., COGAN, T., GUINEE, T. 2004. Cheese Chemistry, Physics and Microbiology. 1 General Aspects, 2004. s. 431.
2. HYNES, E., OGIER, J. C., & DELACROIX-BUCHET, A. 2000. Protocol for the manufacture of miniature washed-curd cheeses under controlled microbiological conditions. *International Dairy Journal*, *10* (10), 733-737.
3. KERESTEŠ, J. A KOL. 2016. Mlieko vo výžive ľudí. Prvé vydanie. Bratislava : CAD PRESS, 2016. s.649. ISBN 978 – 80 – 88969 – 72 – 3.

4. MALÍŘ, F. ,OSTRÝ, V. 2003. Vláknité mikromycéty (plísně), mykotoxiny a zdraví člověka.Brno : Národní centrum ošetřovatelství a nelakařských zdravotnických oborů v Brně, 2003. s. 349, ISBN 80 – 701 – 3395 – 3.
5. PIECKOVÁ, E., VALÍK, Ľ., GÖRNER, F. Mikroskopické vláknité huby v jogurtoch. In: *Bulletin potravinárského výskumu (Bulletin of Food Research)*, roč.41,2002, č. 4. s. 291 – 301.
6. SANCHIS, V., MAGAN, N. 2004. Environmental conditions affecting mycotoxins. *Mycotoxins in food: Detection and control*, 174-189.
7. SOFKOVÁ, V. 2001. Hodnocení jakosti a zdravotní nezávadnosti mléčných výrobkt. In: *Mlékařské listy*, roč. 21, 2001, č. 58, s. 22-23.
8. ŠNIRC, J., GOLIAN, J. A KOL. 2016. Mlieko a mliečne výrobky, II.diel - Technológia výroby mliečnych výrobkov. Nitra : Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre,2016. s.254. ISBN 978 – 80 – 552 – 1451 – 1.

Kontaktná adresa: Eva Dudriková, Katedra hygieny, technológie a zdravotnej bezpečnosti potravín, Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, Komenského 73, 041 81 Košice, Slovenská republika; E-mail: eva.dudrikova@uvlf.sk

VPLYV MASTITÍD NA ZLOŽENIE A HLADINY MASTNÝCH KYSELÍN V KRAVSKOM MLIEKU

THE EFFECT OF MASTITIS ON THE COMPOSITION AND LEVELS OF FATTY ACIDS IN COW´S MILK

Farkašová Zuzana[1], Lacková Zuzana[1], Zigo František[1], Bartáková Klára[2], Vargová Mária[2], Arvaiová Juliana[1], Halás Šimon[1]

[1]Katedra výživy a chovu zvierat, Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, Komenského 73, 041 81 Košice, Slovenská republika

[2]Katedra veterinární hygieny a ekologie, Veterinární univerzita Brno, Palackého tř. 1946/1, 12 42 Brno, Česká republika

[3]Katedra verejného veterinárskeho lekárstva a welfare zvierat, Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, Komenského 73, 041 81 Košice, Slovenská republika

ABSTRACT

The aim of our experiment was to compare individual parameters and fatty acid levels in cow's milk samples from healthy and mastitis (subclinical, clinical) affected dairy cows. Of the total 156 dairy cows, 39 milk samples (25%) were from clinical mastitis, 33 samples (21.2%) were isolated from subclinical mastitis, and 84 samples (53.8%) came from healthy dairy cows. *S. chromogenes* 61.5%, *S. schleiferi* 38.5% from clinical mastitis, and *Aerococcus viridans* 90.9% and *S. schleiferi* 9.1% from subclinical mastitis were isolated from the samples. Differences were noted in the values or percentage of lactose where clinical mastitis caused a statistically significant reduction ($P < 0.05$) in lactose levels compared to healthy milk. There were also statistically significant differences in SCC values in milk of healthy dairy cows and dairy cows with clinical mastitis ($P < 0.001$), with average SCC in mastitis milk up to 23 times higher than in healthy milk. When comparing individual fatty acids, no significant differences were found between milk samples from healthy dairy cows compared to dairy cows affected by mastitis.

Key words: mastitis, SCC, fatty acids, milk, dairy cows

ÚVOD

Mastitída je zápalová reakcia vemena na invázne patogény, ktorú môžu spôsobiť klinické a subklinické formy ochorenia - najčastejšiemu a najnákladnejšiemu ochoreniu u dojníc (Halasa a kol., 2007).

Mastitída môže byť výsledkom infekcie rôznymi druhmi baktérií, ale hlavnými príčinami sú kmene *Streptococcus a Staphylococcus* (Lidiane a kol. 2012). Za hlavné patogény mastitíd sa považuje niekoľko bakteriálnych druhov, vrátane *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae, resp. Streptococcus uberis* a *Escherichia coli.* V posledných rokoch stúpa aj význam CNS ako pôvodcov subklinickej mastitídy u hovädzieho dobytka (Pyörälä a Taponen 2009).

Pri dojení prežúvavcov so zdravými vemenami je obsah bielkovín, tukov, sacharidov, podiel bielkovinových frakcií (vrátane kazeínov) faktormi ovplyvňujúcimi biologické a technologické vlastnosti mlieka. Tieto sú určené genetickými aj environmentálnymi faktormi (Barłowska a kol. 2012, Pecka a kol. 2013).

Mastitída sprevádzaná zvýšením počtu somatických buniek a zmenou zloženia bielkovín a koncentrácie solí a laktózy môže ovplyvniť zloženie mlieka a jeho fyzikálno-chemické a výrobné vlastnosti (Le Roux a kol. 2003, Santos a kol. 2004).

Vemeno kontaminované baktériami rodu *Streptococcus* môže spôsobiť dlhší čas koagulácie mliečnych bielkovín a vyšší podiel srvátkových bielkovín. Tiež pomer srvátkových proteínov ku kazeínom podlieha zvýšeniu (Leitner a kol., 2006). Zvýšenie priepustnosti bariéry krv-mlieko počas zápalového stavu má za následok zvýšený pohyb plazmatických bielkovín a krvných enzýmov, čo môže viesť k proteolýze mliečnych bielkovín (Forsback a kol. 2004). Mnohé kmene baktérií sa vyznačujú vlastnosťami psychrotrofných baktérií poškodzujúcich potravinárske výrobky. Fermentujú laktózu a môžu spôsobiť fermentáciu pseudokyseliny mliečnej čo je nežiaduce v priemysle výroby syra.

V mliečnom tuku bolo celkovo identifikovaných viac ako 400 jednotlivých mastných kyselín. Niektoré mastné kyseliny sa nachádzajú vo veľmi malých množstvách, ale prispievajú k jedinečnej a žiaducej chuti mliečneho tuku a masla. Napríklad C14:0 a C16:0 β-hydroxymastné kyseliny tvoria pri zahrievaní laktóny, čo zvyšuje chuť masla (Guetouache a kol., 2014).

Mastitída môže byť spojená so zmenami v zložení mastných kyselín v mlieku, ktoré môžu ďalej ovplyvniť organoleptické a zdraviu prospešné vlastnosti surového mlieka a syrových výrobkov. Predpokladá sa však, že niektoré patogény mliečnych žliaz spôsobujú významné zmeny v zložení mlieka (LeMarechal a kol., 2011).

Cieľom nášho experimentu bolo porovnať jednotlivé parametre a hladiny mastných kyselín vo vzorkách kravského mlieka od zdravých a mastitídou (subklinickou, klinickou) postihnutých dojníc.

MATERIÁL A METODIKA

Odber vzoriek a mikrobiologické vyšetrenie

Vyšetrované vzorky mlieka sme odobrali od dojníc na PD Nová Ľubovňa na východe Slovenska. Celkom bolo vyšetrených 156 kusov dobytka. Vzorky mlieka boli odobraté od dojníc počas večerného dojenia do sterilných nádob a boli transportované do laboratória pri teplote 4°C. Pred zberom mlieka bolo vemeno dezinfikované 70% etanolom. Mlieko bolo po odbere vyšetrené maštaľným NK testom na detekciu typu mastitídy (subklinická, klinická), a následne bakteriologickou kultiváciou na 5 % krvnom agare a na špeciálnych selektívnych pôdach. Izolované kmene boli identifikované pomocou dvoch rôznych identifikačných metód: na základe biochemických enzymatických vlastností baktérií STAPHYtest 24, STREPTOtest 24, ENTEROtest 12 s identifikačným programom TNW 7.0 (Erba-Lachema, Brno, Česká republika) s presnosťou detekcie viac ako 90,0% a na základe stanovenia proteínového spektra Maldi-Biotyperom (Bruker, USA), skóre v rozsahu (2,300-3,000) s vysokou pravdepodobnosťou identifikácie jednotlivých druhov.

Analýza fyzikálnych a chemických vlastností mlieka

Na stanovenie obsahu tuku, celkových bielkovín, laktózy a sušiny (DM) v mlieku bol použitý Infrared Milk Analyzer 150 (Bentley Instruments Inc., Chaska, MN, USA). Počet somatických buniek (SCC) vo vzorkách mlieka bol stanovený pomocou Somacount 150 (Bentley Instruments Inc., Chaska, MN, USA).

Stanovenie mastných kyselín

Mastné kyseliny boli vo vzorkách mlieka stanovené vo forme methylesterov mastných kyselín. K separácií methylesterov bola použitá kapilárna kolóna HP-88 (Agilent, USA) o dĺžke 100 m. Identifikácia a kvantifikácia mastných kyselín bola uskutočnená metódou vonkajšieho štandardu na základe porovnania so zmesným štandardom 37 methylesterov mastných kyselín Supelco 37 Component FAME Mix (Sigma-Aldrich, Nemecko) a štandardy ďalších FAME: methylester konjugované kyseliny linolovej, methylester kyseliny cis-7,10,13,16-dokosatetraenovej a kyseliny 4,7,10,13,16-dokosapentaenovej. Ako vonkajší štandard bola použitá kyselina nonadekanová (vše Sigma-Aldrich, Nemecko).

Štatistická analýza

Údaje boli vyhodnotené pomocou Microsoft Excel 2007. Na porovnanie jednotlivých hodnôt medzi skupinami bol použitý Studentov T-test. Za štatistický významné rozdiely boli považované hodnoty $P < 0,05$, $P < 0,01$, $P < 0,001$.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Z celkových vyšetrených vzoriek n = 156, bolo 39 vzoriek mlieka (25 %) z klinickej mastitídy, 33 vzoriek (21,2 %) bolo izolovaných zo subklinických mastitíd a 84 vzoriek (53,8 %) pochádzalo od zdravých dojníc. Zo vzoriek pozitívnych na niektorú formu mastitídy boli izolované baktérie *S. chromogenes* 61,5 % a *S. schleiferi* 38,5 % z klinickej mastitídy a *Aerococcus viridans* 90,9 % a *S. schleiferi* 9,1 % zo subklinickej mastitídy. V rámci experimentu boli porovnávané parametre v mlieku od zdravých dojníc so vzorkami mlieka z klinických a subklinických mastitíd.

Rozdiely boli zaznamenané v hodnotách resp. percentuálnom podiele laktózy, kde klinická mastitída spôsobila štatistický významné zníženie ($P < 0,05$) hladiny laktózy v porovnaní so zdravým mliekom (Tabuľka 1). Počet somatických buniek (PSB) vo vzorkách mlieka zdravých dojníc bol maximálne do 60.1000.ml^{-1}, pri subklinických mastitídach do 400.1000.ml^{-1} a klinických mastitídach v rozpätí od 400 – 5700.1000.ml^{-1}. V hodnotách PSB v mlieku zdravých dojníc a dojníc s klinickou mastitídou (Tabuľka 1) boli zaznamenané štatisticky významné rozdiely ($P < 0,001$).

Pecka-Kiełb a kol. (2016) vo svojej štúdii zaznamenali vplyv bakteriálnej infekcie vemena na zvýšenie PSB ($p < 0,01$), podiele tuku a sušiny. Vzorky mlieka kontaminované *S. uberis* boli charakterizované vyšším ($p < 0,05$) celkovým počtom baktérií a celkovým počtom bielkovín v porovnaní so vzorkami mlieka odobratými z neinfikovanej mliečnej žľazy. Naopak nepozorovali žiadny štatisticky významný vplyv prítomnosti baktérií na hladinu laktózy v mlieku.

Vasiľ a kol. (2016) vo svojej štúdií popisuje vplyv bakteriálnej infekcie na zvýšenie ($p < 0,05$) počtu somatických buniek a zníženie ($p < 0,01$) hladín bielkovín v mlieku v dôsledku mastitídy spôsobenej stafylokokmi.

Tabuľka č. 1 Porovnanie produkcie mlieka a jednotlivých parametrov v mlieku u dojníc so zdravou mliečnou žľazou a dojníc s rôznymi druhmi mastitíd

	Zdravé	Subklinická mastitída	Klinická mastitída	P
Mlieko (l)	14.4 ± 3.3	11.9 ± 1.6	8.6 ± 3.0	ns
Tuk (%)	3.64 ± 0.5	3.6 ± 0.7	3.92 ± 0.6	ns
Bielkoviny (%)	3.50 ± 0.23	3.5 ± 0.27	3.63 ± 0.26	ns
Laktóza (%)	4.93 ± 0.15^{A}	4.96 ± 0.24	4.72 ± 0.34^{a}	0,05
PSB (.1000.ml^{-1})	32 ± 16^{C}	88 ± 101	864 ± 1735^{c}	0,001

PSB – počet somatických buniek; ^{Aa} $P < 0,05$, ^{Cc} $P < 0,001$ štatisticky významné rozdiely medzi skupinami vyhodnotené Studentovým T-testom

Pri ostatných parametroch vrátane produkcie mlieka neboli zaznamenané štatisticky významne zmeny aj napriek tomu, že priemerná produkcia mlieka u dojníc s klinickou mastitídou bola skoro o polovicu nižšia ako produkcia mlieka u zdravých dojníc.

Kravské mlieko je veľmi variabilné, pokiaľ ide o obsah tuku. Táto frakcia je tvorená asi v 95% triacylglycerolmi, ktoré sú zložené z mastných kyselín, ktorých dĺžka reťazca a stupeň nasýtenia určujú nutričnú hodnotu mliečneho tuku. Nasýtené mastné kyseliny sa považujú za faktor nepriaznivo ovplyvňujúci ľudské zdravie, pretože prispievajú k rozvoju artérioskleróz (Pfeuffer a Schrezenmeir, 2000) a zvýšenej hladine cholesterolu v krvi, čo vedie k kardiovaskulárnym ochoreniam (Haug a kol., 2007).

Medzi nenasýtenými mastnými kyselinami majú n-3 priaznivé účinky na ľudský organizmus. Kyseliny n-3 pozitívne ovplyvňujú nervový systém a znižujú riziko cukrovky a kardiovaskulárnych ochorení. Dôležitým parametrom kvality mlieka je aj pomer nenasýtených mastných kyselín n-6:n-3. Ak je obsah prvej skupiny kyselín príliš vysoký, zvyšuje sa riziko zápalu, trombózy a autoimunitných symptómov (Mensink a kol., 2003).

Pomer medzi n-6:n-3 v našom experimente bol v prípade vzoriek mastitídneho mlieka 4 – 5:1, v mlieku od zdravých dojníc 3 – 4:1. Tieto rozdiely, však neboli štatisticky významné a preto nemôžme jednoznačne potvrdiť, že zápal mliečnej žľazy ovplyvňuje v negatívnom smere pomer n-6:n-3 v mlieku.

Osobitným miestom v zložení kravského mlieka je konjugovaná kyselina linolová (CLA). Kravské mlieko je hlavným zdrojom izomérov tejto zlúčeniny v ľudskej strave (Haug a kol., 2004).

V našom experimente pri porovnávaní jednotlivých mastných kyselín neboli zistené žiadne signifikantné rozdiely medzi vzorkami mlieka od zdravých dojníc v porovnaní s dojnicami postihnutými mastitídou (Tabuľka 2).

Významné (p □□0,05) zníženie podielu C13:0 a zvýšené hladiny C18:0, C18:1n7t a CLA boli pozorované v mlieku kontaminovanom *S. uberis* v porovnaní so zdravým kravským mliekom Pecka-Kiełb a kol. (2016). Podľa Vasiľ a kol. (2016) došlo k významnému (p □□0,05) zníženiu C8: 0, C10: 0 a celkového množstva nasýtených mastných kyselín v mlieku infikovaných kráv v porovnaní so zdravými. Výskum tiež odhalil vyššie (p □□0,01) hladiny C14: 0 a C20: 1 v mlieku zdravých kráv.

Tabuľka č. 2 Porovnanie hladín mastných kyselín v mlieku u dojníc so zdravou mliečnou žľazou a dojníc s rôznymi druhmi mastitíd

MUFA	Zdravé	Subklinická mastitída	Klinická mastitída	P
C 14, cis-9	5,55 ± 1,5	6,02 ± 1,91	5,55 ± 1,55	0,430
C 15, cis-10	0,12 ± 0,16	0,67 ± 0,12	0,08 ± 0,15	0,418
C 16, cis-9	13,73 ± 2,45	13,98 ± 2,5	13,8 ± 2,0	0,285
C 18, trans-9	2,2 ± 0,47	2,06 ± 0,5	2,31 ± 0,65	0,386
C 18, cis-9	152,25 ± 23,93	155,10 ± 25,87	157,67 ± 28,86	0,754
C 20, cis-11	0,14 ± 0,07	0,12 ± 0,1	0,15 ± 0,09	0,364
C 22, cis-13	0,05 ± 0,07	0,03 ± 0,04	0,03 ± 0,06	0,720
PUFA	Zdravé	Subklinická mastitída	Klinická mastitída	P
C 18:2, trans-9,12	0,59 ± 0,23	0,48 ± 0,18	0,61 ± 0,17	0,698
C 18:2, cis-9,12	12,35 ± 1,65	12,60 ± 2,98	12,78 ± 2,11	0,666
C 18:3, cis-6,9,12	0,34 ± 0,16	0,32 ± 0,16	0,38 ± 0,19	0,961
C 18:3, cis-9,12,15	3,36 ± 0,79	3,34 ± 1,11	3,5 ± 0,83	0,169
CLA	5,03 ± 0,81	4,75 ± 1,11	5,24 ± 1,24	0,337
C 20:2, cis-11,14	0,09 ± 0,06	0,08 ± 0,06	0,08 ± 0,06	0,540
C 20:3, cis-8,11,14	0,41 ± 0,15	0,44 ± 0,14	0,44 ± 0,15	0,629
C 22:2, cis-13,16	0,12 ± 0,04	0,09 ± 0,03	0,12 ± 0,05	0,123
C 20:5, cis-5,8,11,14,17	0,26 ± 0,08	0,28 ± 0,14	0,25 ± 0,08	0,554
SAFA	Zdravé	Subklinická mastitída	Klinická mastitída	P
C 4	12,0 ± 1,25	12,05 ± 2,46	11,58 ± 0,95	0,939
C 6	9,39 ± 0,90	9,3 ± 1,16	9,23 ± 1,24	0,778
C 8	6,44 ± 0,85	6,36 ± 0,91	6,38 ± 1,10	0,780
C 10	16,71 ± 2,87	16,26 ± 2,95	16,48 ± 3,38	0,635
C 11	0,21 ± 0,15	0,24 ± 0,18	0,2 ± 0,13	0,602
C 12	20,57 ± 3,72	20,38 ± 3,93	20,41 ± 4,24	0,877
C 13	0,635 ± 0,22	0,62 ± 0,27	0,55 ± 0,17	0,680
C 14	73,13 ± 8,26	71,55 ± 8,07	71,24 ± 10,71	0,554
C 15	7,87 ± 1,56	7,84 ± 1,96	7,56 ± 1,05	0,949
C 16	231,05 ± 25,46	233,73 ± 27,47	228,89 ± 19,37	0,750
C 17	4,47 ± 0,71	4,67 ± 0,79	4,36 ± 0,41	0,422
C 18	68,60 ± 13,27	67,18 ± 19,20	69,61 ± 13,25	0,768
C 20	0,93 ± 0,21	0,81 ± 0,16	0,96 ± 0,24	0,086

MUFA - mononenasýtené mastné kyseliny, PUFA – polynenasýtené mastné kyseliny, SAFA – nasýtené mastné kyseliny

ZÁVER

V rámci experimentu boli porovnávané parametre v mlieku od zdravých dojníc so vzorkami mlieka z klinických a subklinických mastitíd. Rozdiely boli zaznamenané v hodnotách laktózy, kde klinická mastitída spôsobila štatistický významné zníženie ($P < 0,05$) hladiny laktózy v porovnaní so zdravým mliekom. Rovnako v hodnotách PSB v mlieku zdravých dojníc a dojníc s klinickou mastitídou boli zaznamenané štatisticky významné rozdiely ($P < 0,001$), kde bol priemerný počet somatických buniek v mastitídnom mlieku mnohonásobne (23x) vyšší ako v mlieku zdravých dojníc. Pri porovnávaní hladín jednotlivých nasýtených a nenasýtených mastných kyselín sme nezaznamenali žiadne štatisticky významné rozdiely resp, zmeny v mastitídnom mlieku v porovnaní so zdravým mliekom. Vo vzorkách mlieka z mastitíd bol zistený vyšší pomer n-6:n-3, čo môže negatívne ovplyvniť kvalitu mlieka, avšak toto zvýšenie nebolo významné. Potvrdili sme, zvýšenie PBS v mastitídnom mlieku, rovnako zvýšenú hladinu laktózy a aj napriek tomu, že my sme nepotvrdili negatívny vplyv mastitíd na zloženie a pomer mastných kyselín v mlieku, na základe viacerých štúdií je možné predpokladať, že neliečená (subklinická, klinická) mastitída negatívne ovplyvňuje biochemické, kvalitatívne a nutričné vlastnosti kravského mlieka.

POĎAKOVANIE

Táto práca bola podporená projektmi APVV-22-0457 Bezantibiotické prístupy kontroly mastitíd dojníc so zvýšením hygieny prostredia na produkčných farmách, SAIA-2022-05-15-001: Vplyv patogénov mliečnej žľazy na produkciu a stupeň oxidačného stresu u dojníc a VEGA-1-0162-23 Zníženie používania antibiotík v programoch kontroly mastitíd dojníc a projektom KEGA 009UVLF-4/2021.

POUŽITÁ LITERATÚRA

1. Barłowska, J., Litwińczuk, Z., Brodziak, A., Chabuz, W. Effect of the production season on nutritional value and technological suitability of milk obtained from intensive (TMR) and Traditional Feeding system of cows. *J Microbiol Biotech Food Sci.*, 2012, 1: 1205-1220.
2. Forsbäck, L., Lindmark-Mansson, H., Andren, A., Svennersten-Sjaunja, K. Evaluation of quality changes in udder quarter milk from cows with low-to-moderate somatic cell counts. *Animal*. 2010, 4: 617-626.
3. Guetouache, M., Guessas, B., Medjekal, S. Composition and nutritional value of raw milk (Review). *Issues Biol. Sci. Pharm. Res*., 2014, 2: 115-122.

4. Halasa, T., Huijps, K., Osteras, O., Hogeveen, H. Eco-nomic effects of bovine mastitis and mastitis management: a review. *Vet Q,* 2007, 8, 29: 18-31.
5. Haug, A., Taugbol, O., Olsen, E.S., Biong, A.S., Harstad, O.M. Milk fat in human nutrition. Studies in dairy cows with special reference to CLA. *Animal Science Papers and Reports,* 2004: 223
6. Haug, A., Hostmark, A.T., Harstad, O.M. Bovine milk in human nutrition-a review. Lipids in Health and Disease 2007, 6: 25.
7. Hu, F.B., Stampfer, M.J., Manson, J.E., Rimm, E.B., Wolk, A., Colditz, G.A., Hennekens C.H., Willett, W.C. Dietary intake of {alpha}-linolenic acid and risk of fatal ischemic heart disease among women. American Journal of Clinical Nutrition 1999, 69(5), 890- 897.
8. Christie, W.W., Lipid analysis. Isolation, separation,identification and structural analysis of lipids. The isolation of lipids from tissues. Pergamon Press, Oxford, 1973, pp 39-40.
9. Christopherson, S.W., Glass, R.L. Preparation of milk fat methyl esters by alcoholysis in an essentially nonalcoholic solution. *J Dairy Sci*. 1969, 52: 1289-1290.
10. Leitner, G., Krifucks, O., Merin, U., Lavi, Y., Silanikove, N. Interactions between bacteria type, proteolysis of casein and physico-chemical properties of bovine milk. *Int Dairy J*., 2006, 16: 648-654.
11. LeMarechal, C., Thiéry, R., Vautor, E., Le Loir, Y. Mastitis impact on technological properties of milk and quality of milk products - A review. Dairy Sci. Technol., 2011, 91: 247-282.
12. Le Roux, Y., Laurent, F., Moussaoui, F. Polymorphonuclear proteolytic activity and milk composition change. *Vet Res*., 2003, 34: 629-645.
13. Lidiane, C.S., Pereira, I.A., Pribul, B.R., Oliva, M.S., Coelho, S.M., Souza, M.M. Antimicrobial resistance and detection of *mec*A and *bla*Z genes in coagulase-negative *Staphylococcus* isolated from bovine mastitis. *Pesq Vet Bras*. 2012, 32: 692-696.
14. Pecka, E., Zachwieja, A., Tumanowicz, J. Technological parameters of milk depending onthe cow housing system, nutrition system, age and number of somatic cells. *Przemysł Chemiczny*, 2013, 92: 1087-1091.
15. Pecka-Kiełb, E., Vasiľ, M., Zachwieja, A., Zawadzki, W., Elečko, J., Zigo, F., Illek, J., Farkašová, Z. An effect of mammary gland infection caused by *Streptococcus uberis* on composition and physicochemical changes of cows' milk. *Polish Journal of Veterinary Sciences,* 2016, 19, No. 1: 49–55.

16. Pfeuffer, M., Schrezenmeir, J. Bioactive substances in milk with properties decreasing risk of cardiovascular disease. British Journal of Nutrition, 2000, 84 (1), 155-159.
17. Pyörälä, S., Taponen, S. Coagulase-negative staphylococci – emerging mastitis pathogens. *Vet Microbiol*. 2009, 134: 3-8.
18. Santos, J.E., Cerri, R.L., Ballou, M.A., Higginbotham, G.E., Kirk, J.H. Effect of timing of first clinical mastitis occurrence on lactational and reproductive performance of Holstein dairy cows. Anim Reprod Sci., 2004, 80: 31-45.
19. Vasil, M., Pecka-Kiełb, E., Elečko, J., Zachwieja, A., Zawadzki, W., Zigo, F., Illek, J., Farkašová, Z. Effects of udder infections with *Staphylococcus xylosus* and *Staphylococcus warneri* on the composition and physicochemical changes in cows milk. *Polish Journal of Veterinary Sciences,* 2016, 19, No. 4: 841–848.

Kontaktná adresa: MVDr. Zuzana Farkašová, PhD., Department of Animal Nutrition and Husbandry, University of Veterinary Medicine and Pharmacy in Košice, Komenského 73, 041 81 Košice, Slovak Republic; E-mail: zuzana.farkasova@uvlf.sk

POTENCIÁL FYTOBIOTÍK V AKVAKULTÚRE

POTENTIAL OF PHYTOBIOTICS IN AQUACULTURE

Fečkaninová Adriána[1], Koščová Jana[2], Hudecová Patrícia[2]

[1]Katedra farmaceutickej technológie, farmakognózie a botaniky, [2]Katedra mikrobiológie a imunológie, Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, Komenského 73, 041 81 Košice, Slovenská republika

ABSTRACT

The use of phytobiotics to promote fish health, prevent as well as treat diseases, and improve aquaculture productivity is one of the main goals in aquatic animal nutrition. In conditions of intensive production, fish are exposed to high stress, which increases the incidence of diseases that cause a decrease in productivity. The massive use of antimicrobial agents in the treatment and prevention of diseases increases the selective pressure on microorganisms and encourages the natural emergence of bacterial resistance. Resistant pathogenic fish bacteria are a problem in the aquaculture sector, as well as in the case of the transfer of gene resistance to bacteria pathogenic to humans. Several alternative strategies have been proposed instead of the use of antimicrobials, while among the new safe solutions we also include the use of phytobiotics in aquaculture. Phytobiotics are plant extracts with bioactive compounds that have the potential to improve the immune status, increase weight gain, anti-stress and anti-parasitic effects in aquaculture. However, further research is needed to determine effective doses of phytobiotics for individual fish species, as well as side effects on target and non-target organisms, and the ecosystem.

Key words: herbal extracts, bioactive compounds, fish farming, antimicrobials

ÚVOD

Akvakultúra je neustále rastúce odvetvie a za posledných desať rokov sa stala dôležitou hospodárskou aktivitou v mnohých krajinách. V podmienkach intenzívnej produkcie sú ryby vystavené vysokému stresu, čím sa zvyšuje výskyt ochorení, ktorý spôsobuje pokles produktivity (Cruz a kol., 2012; Sica a kol., 2012). Bakteriálne ochorenia vo veľkej miere ohrozujú prosperitu chovu rýb (Austin a Austin, 2012). Negatívny vplyv na zdravotný stav rýb majú aj zmeny v chemizme vodného prostredia a skrmovanie nevhodného krmiva (Pokorný a kol., 2003; Lara-Flores, 2011). Masívne používanie antimikrobiálnych látok pri liečbe a prevencii chorôb zvyšuje selektívny tlak na mikroorganizmy a povzbudzuje prirodzený vznik

bakteriálnej rezistencie (Smith, 2008). Rezistentné patogénne baktérie rýb predstavujú problém tak v sektore akvakultúry, ako aj v prípade transferu génov rezistencie na baktérie patogénne pre ľudí (Carvalho a kol., 2012). Bolo navrhnutých niekoľko alternatívnych stratégií namiesto používania antibiotík, pričom medzi nové bezpečné riešenia zaraďujeme aj využitie fytobiotík, ktorých perspektíva v akvakultúre je sľubná.

Viaceré, doteraz uskutočnené štúdie potvrdzujú pozitívne účinky látok naturálneho pôvodu na patogény rýb. Na druhej strane, je však potrebné poznamenať aj to, že dané štúdie boli vykonávané prevažne v podmienkach *in vitro* a len čiastočne potvrdené *in vivo* experimentami. Z hľadiska overovania účinkov akýchkoľvek látok sa práve *in vivo* testovanie považuje za kľúčové, keďže mnohokrát sa u sľubne účinkujúcich látok naturálneho pôvodu testovaných *in vitro* ich účinky v *in vivo* podmienkach nepotvrdia.

Chemické zloženie fytobiotík môže ovplyvniť rôzne vonkajšie a vnútorné faktory: fyziologické variácie, podmienky prostredia, geografické a klimatické podmienky, genetické faktory a vývoj, podmienky skladovania, množstvo rastlinného materiálu a techniky extrakcie (Figueiredo a kol., 2008). Izolácia a identifikácia bioaktívnych zlúčenín sú dôležité pre presné určenie základného mechanizmu biologických účinkov fytobiotík u rýb. Je preto dôležité, aby štúdie, v ktorých sa hodnotí účinnosť fytoaditív, obsahovali podrobné informácie o chemickom zložení, vrátane percentuálneho zastúpenia majoritných, ale aj minoritných účinných látok obsiahnutých v rastline (Steiner a Syed, 2015).

VÝZNAM AKVAKULTÚRY

Z pôvodnej remeselníckej a drobnej činnosti sa akvakultúra rozvinula na technologicky vyspelé priemyselné odvetvie s plne integrovanými podnikmi (Komisia európskych spoločenstiev, 2009).

Moderná akvakultúra predstavuje hlavnú inováciu v oblasti výroby potravín z rýb a vodných živočíchov a je najrýchlejšie sa rozvíjajúcim odvetvím potravinárskej výroby s priemerným celosvetovým tempom rastu vo výške 6 až 8 % ročne, čím predbieha rast ľudskej populácie, ktorý je na úrovni 1,7 % (Komisia európskych spoločenstiev, 2009; Sampels a kol., 2014).

Propagácia zdravej výživy a prospešných účinkov konzumácie rýb a morských živočíchov vedie k pomalému zvyšovaniu spotreby produktov akvakultúry a rybolovu. Mäso rýb sa stáva obľúbeným vďaka svojej vysokej dietetickej hodnote, ktorá je daná vyšším podielom jednoduchších bielkovín, jemnosťou svalových vlákien, absenciou bielkovín spojivových tkanív (elastínu), priaznivým zložením tuku, vysokým obsahom lipofilných vitamínov a relatívne vysokým obsahom minerálnych látok. Najvýznamnejším zdrojom ω-3

polynenasýtených mastných kyselín (n-3 PUFA) je práve tuk rýb, ktorý obsahuje kyselinu dokozahexaénovú (DHA, 22:6 n-3) a kyselinu eikozapentaénovú (EPA, 20:5 n-3) (Handeland a kol., 2018).

Medzi známe účinky n-3 PUFA na ľudský organizmus patrí: neuroregulačný – vplyv na permeabilitu membrány a funkciu neurónov, prenos signálov medzi neurónmi (Bazinet a Layé, 2014); neuroprotektívny – prevencia demencie (Cederholm, 2017), tvorba neuroprotektínu D1 (Asatryan a Bazan, 2017); preventívny pri neuropsychiatrických poruchách – schizofrénia (Kim a kol., 2017; Behdani a kol., 2018), symptómy hyperkinetickej poruchy aktivity a pozornosti (ADHD) (Chang a kol., 2018a), depresia (Chang a kol., 2018b), bipolárna porucha (Gustavo a kol., 2017); hypolipidemický – znižovanie hladiny triacylglycerolov (Backes a kol., 2016); hypotenzívny – zlepšenie vazodilatácie a zníženie tlaku krvi (Colussi a kol., 2018); kardioprotektívny a antiarytmický – zvyšovanie stability kardiomyocytu (Weisman a kol., 2017); prevencia rakoviny – hrubého čreva (Danbara a kol., 2004; Calviello, 2005, Engelbrecht a kol., 2008), podžalúdkovej žľazy (Song a kol., 2011; Fukui a kol., 2013), pažeráka (Kubota a kol., 2013), žalúdka (Chun a kol., 2013), pečene (Lim a kol., 2009; Sun a kol., 2013; Zhang a kol., 2015), mliečnej žľazy (Horia a Watkins, 2005; Mahéo a kol., 2005; Barascu a kol., 2006), prostaty (Hu a kol., 2010), močového mechúra (Molinari a kol., 2011) a pľúc (Yao a kol., 2014).

Konzumácia rýb je zdraviu prospešná. Avšak počet voľne žijúcich rýb, vodných schránkovcov a kôrovcov na uspokojenie existujúceho dopytu nepostačuje. Udržateľný rybolov je úzko spojený s chovom rýb. Ak nechceme ohroziť dlhodobú budúcnosť voľne žijúcich populácií rýb, musia sa tieto dve činnosti dopĺňať. Len tak možno zabezpečiť dostatok rýb na uspokojenie požiadaviek rastúcej svetovej populácie. V EÚ sa dováža až 68 % produktov rybárstva, ktoré sú súčasťou našej stravy. Významná časť z nich pochádza z farmových chovov. Len 10 % vodných živočíchov určených na tunajšiu spotrebu sa chová v EÚ. Viac chovaných rýb na našich stoloch znamená nižší tlak na populácie voľne žijúcich rýb, menšiu závislosť od dovozu, viac pracovných miest a väčší rast našich miestnych ekonomík (Európska komisia, 2018).

Tak ako akákoľvek iná ľudská činnosť, aj akvakultúra sa musí riadiť udržateľne a zodpovedne. Environmentálne normy EÚ patria medzi najprísnejšie a najúčinnejšie na svete. Tým pádom chovatelia rýb zohrávajú ešte proaktívnejšiu úlohu pri ochrane životného prostredia (Európska komisia, 2018).

POTENCIÁL FYTOBIOTÍK V AKVAKULTÚRE

V akvakultúre boli pozorované rôzne účinky fytobiotík, ako napr. antistresový, stimulujúci rast a apetít, imunomodulačný a antipatogénny (tabuľka č. 1), v dôsledku prítomnosti rôznych bioaktívnych látok ako sú alkaloidy, terpenoidy, taníny, saponíny, glykozidy, flavonoidy, fenoly, steroidy a éterické oleje. Okrem toho, sú fytobiotiká šetrné k životnému prostrediu a ekologickejšie ako syntetické látky a je menej pravdepodobné, že vyvolajú rezistenciu v dôsledku vysokej rozmanitosti molekúl rastlinného extraktu (Jana a kol., 2018).

Tabuľka č. 1, Účinky fytobiotík v akvakultúre

Rastlina (latinské pomenovanie)	Rastlina (bežné pomenovanie)	Účinok	Zdroj
Allium sativum	cesnak	antimikrobiálny, stimulácia apetítu, zvýšenie rastu	Oh a kol., 2022
Cinnamomum verum	škorica	antimikrobiálny	Rattanachaikunsopon a Phumkhachorn, 2010
Cymbopogon citratus	citrónová tráva	antimikrobiálny, lepšia stráviteľnosť krmiva, zvýšenie rastu, zlepšenie imunitného status, antiparazitický	Al-Sagheer a kol., 2018 Gonazales a kol., 2020
Mentha piperita	mäta	antiparazitický	Costa a kol., 2020
Ocimum sanctum	tulsi	zvýšenie rastových prírastkov a prežívateľnosti plôdikov, zlepšenie konverzie krmiva	Sanishth a SI, 2019
Origanum vulgare	oregano	antimikrobiálny, zlepšenie imunitného statusu	Mabrok a Wahdan, 2018; Abdel-Latif a kol., 2020; Zhang a kol., 2020
Origanum sp.	oregano	antistresový	Bodur a kol., 2018
Thymus vulgaris	tymián	zvýšenie rastových prírastkov, zlepšenie imunitného systému, rezistencia voči *Aeromonas hydrophila*	Ghafarifarsani a kol., 2022
Zingiber officinale	zázvor	antistresový	Fazelan a kol., 2020

Zdroj: vlastná tabuľka

ZÁVER

Fytobiotiká poskytujú priaznivé účinky v akvakultúre tým, že zvyšujú príjem krmiva, mikrobiálnu rovnováhu, reakcie imunitného systému, antioxidačnú kapacitu a odolnosť vodných živočíchov voči chorobám. Zároveň, fytobiotiká poskytujú účinky podporujúce rast a konverziu krmiva. Tento článok demonštruje, že naturálne aditíva majú priaznivé účinky na vodné živočíchy a predstavujú možnú alternatívu nahradenia antibiotík za účelom zdravej a udržateľnej akvakultúry.

Na určenie potenciálnych vplyvov fytobiotík a ich mechanizmov účinku na vodné živočíchy, by sa malo brať do úvahy aj skúmanie genómov, metagenómov, transkriptómov, prípadne proteómov črevnej mikrobioty. Preto sú potrebné aj ďalšie štúdie transkriptomických profilov rýb na určenie a kvantifikáciu účinkov koncentrácií fytoaditív na imunitnú odpoveď, antioxidačný status a odolnosť voči chorobám. Okrem toho sú v tomto smere potrebné ďalšie výskumné plány spojené s komplexnými štúdiami využívajúcimi pokročilé metódy na charakterizáciu črevnej mikrobioty cieľových druhov rýb. Ďalší výskum je potrebný aj na preskúmanie možnosti kombinácie podávania fytobiotík s inými kŕmnymi aditívami (napr. probiotiká a prebiotiká) a na porovnanie ich účinkov s antibiotikami.

POĎAKOVANIE

Predkladaná práca vznikla s podporou projektu VEGA 1/0731/21.

POUŽITÁ LITERATÚRA

1. ABDEL-LATIF, H. M. R. – ABDEL-TAWWAB, M. – KHAFAGA, A. F. – DAWOOD, M. A. O. Dietary origanum essential oil improved antioxidative status, immune-related genes, and resistance of common carp (Cyprinus carpio L.) to *Aeromonas hydrophila* infection. In *Fish & Shellfish Immunology*, 2020, vol. 104, p. 1-7.
2. AL-SAGHEER, A. A. – MAHMOUD, H. K. – REDA, F. M. – MAHGOUB, S. A. – AYYAT, M. S. Supplementation of diets for Oreochromis niloticus with essential oil extracts from lemongrass (Cymbopogon citratus) and geranium (Pelargonium graveolens) and effects on growth, intestinal microbiota, antioxidant and immune activities. In *Aquaculture Nutrition,* 2018, vol. 24, no. 3, p. 1006-1014.
3. ASATRYAN, A. – BAZAN, N. Molecular mechanisms of signaling via the docosanoid neuropretectinD1 for celllular homeostasis and neuroprotection. In *Journal of Biological Chemistry.* ISSN 1083-351X, 2017, vol. 292, no. 30, p. 12390 –12397.

4. BACKES, J. et al. The clinical relevance of omega-3 fatty acids in the management of hypertriglyceridemia. In *Lipids in Health Disease*. ISSN 1476-511X, 2016, vol. 15, no. 1, p. 118.
5. BARASCU, A. et al. CDK1-cyclin B1 mediates the inhibition of proliferation induced by omega-3 fatty acids in MDA-MB231 breast cancer cells. In *The international Journal of Biochemistry and cell Biology*. ISSN 1357-2725, 2006, vol. 38, p. 196-208.
6. BAZINET, R. – LAYÉ, S. Polyunsaturated fatty acids and their metabolites in brain function and disease. In *Nature Reviews Neuroscience.* ISSN 1471-0048, 2014, vol. 15, p. 771–785.
7. BEHDANI, F. et al. Assessment of the efficacy of omega-3 fatty acids on metabolic and inflammatory parameters in patients with schizophrenia taking clozapine and sodium valproate. In *Psychiatry Research*. ISSN 0165-1781, 2018, vol. 261, p. 243-247.
8. BODUR, T. – LEÓN-BERNABEU, S. – NAVARRO, A. – TORT, L. – AFONSO, J. M. – MONTERO, D. Effects of new plant based anesthetics *Origanum* sp. and *Eucalyptus* sp. oils on stress and welfare parameters in *Dicentrarchus labrax* and their comparison with clove oil. In *Aquaculture,* 2018, vol. 495 p. 402-408.
9. CALVIELLO, G. et al. Docosahexaenoic acid enhances the susceptibility of human colorectal cancer cells to 5-fluorouracil. In *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*. ISSN 0344-5704, 2005, vol. 55, p. 12–20.
10. CARVALHO, D. E. – DAVID, S. G. – SILVA, J. R. *Health and environment in aquaculture.* Rijeka: InTech. 2012. 414 p. ISBN 978-953-51-0497-1.
11. CEDERHOLM, T. Fish consumption and omega-3 fatty acid supplementation for prevention or treatment of cognitive decline, dementia or Alzheimer's disease in older adults – any news? In *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*. ISSN 1363-1950, 2017, vol. 20, no. 2, p. 104-109.
12. COLUSSI, G. et al. Atrial fibrillation and its complications in arterial hypertension: The potential preventive role of omega-3 polyunsaturated fatty acids. In C*ritical Reviews in Food Science and Nutrition*. ISSN 1040-8398, 2018, p. 1-12.
13. COSTA, C. M. D. S. - DA CRUZ, M. G. - LIMA, T. B. C. - FERREIRA, L. C. - VENTURA, A. S. - BRANDÃO, F. R. - CHAGAS, E. C. - CHAVES, F. C. M. - MARTINS, M. L. - JERÔNIMO, G. T. Efficacy of the essential oils of Mentha piperita, Lippia alba and Zingiber officinale to control the acanthocephalan Neoechinorhynchus buttnerae in Colossoma macropomum. In Aquac. Rep. 2020, vol. 18, 100414.

14. DANBARA, N. et al. Conjugated docosahexaenoic acid is a potent inducer of cell cycle arrest and apoptosis and inhibits growth of colo 201 human colon cancer cells. In *Nutrition and Cancer*. ISSN 0163-5581, 2004, vol. 50, p. 71–79.
15. ENGELBRECHT, A. M. et al. Differential induction of apoptosis and inhibition of the PI3-kinase pathway by saturated, monounsaturated and polyunsaturated fatty acids in a colon cancer cell model. In *Apoptosis*. ISSN 1360-8185, 2008, vol. 13, p. 1368–1377.
16. EURÓPSKA KOMISIA. *Akvakultúra v EÚ.* [online 2018]. [cit. 2023.04.17]. Dostupné na internete: <https://ec.europa.eu/fisheries/inseparable/sk/farmed-eu>.
17. FAZELAN, Z. - VATNIKOV, Y. A. - KULIKOV, E. V. - PLUSHIKOV, V. G. - YOUSEFI, M. Effects of dietary ginger (*Zingiber officinale*) administration on growth performance and stress, immunological, and antioxidant responses of common carp (*Cyprinus carpio*) reared under high stocking density. In *Aquaculture*, 2020, vol. 518, 734833.
18. FIGUEIREDO, A.C. – BARROSO, J. G. – PEDRO, L. G. – SCHEFFER, J. J. C. Factors affecting secondary metabolite production in plants: Volatile components and essential oils. In *Flavour Fragr. J.*, 2008, vol. 23, p. 213–226.
19. FUKUI, M. et al. EPA, an ω-3 Fatty acid, induces apoptosis in human pancreatic cancer cells: Role of ROS accumulation, caspase-8 activation, and autophagy induction. In *Journal of Cellular Biochemistry*. ISSSN 1097-4644, 2013, vol. 114, p. 192–203.
20. GHAFARIFARSANI, H. - HOSEINIFAR, S. H. - SHEIKHLAR, A. - RAISSY, M. - CHAHARMAHALI, F. H. - MANEEPITAKSANTI, W. - FAHEEM, M. - DOAN, H. The Effects of Dietary Thyme Oil (*Thymus vulgaris*) Essential Oils for Common Carp (*Cyprinus carpio*): Growth Performance, Digestive Enzyme Activity, Antioxidant Defense, Tissue and Mucus Immune Parameters, and Resistance against Aeromonas hydrophila. In Aquaculture Nutrition, 2022, vol. 2022, 13 p.
21. Gonzales, A. P. P. F. – Yoshioka, E. T. O. – Mathews, P. D. – Mertins, O. – Chaves, F. C. M. – Videira, M. N. – Tavares-Dias, M. Anthelminthic efficacy of *Cymbopogon citratus* essential oil (Poaceae) against monogenean parasites of *Colossoma macropomum* (Serrasalmidae), and blood and histopathological effects. In *Aquaculture* 2020, vol. 528, 735500.
22. GUSTAVO, H. et al. Potential novel treatments for bipolar depression: ketamine, fatty acids, anti-inflammatory agents, and probiotics. In *CNS & Neurological Disorders – Drug Targets*. ISSN 1871-5273, 2017, vol. 16, no. 8, p. 858-869.

23. HANDELAND, K. The effects of fatty fish intake on adolescents' nutritional status and associations with attention performance: results from the FINS-TEENS randomized controlled trial. In *Nutrition Journal.* ISSN 1475-2891, 2018, vol. 17, no. 30, 12 p.
24. HORIA, E. – WATKINS, B. A. Comparison of stearidonic acid and α -linolenic acid on PGE2 production and COX-2 protein levels in MDA-MB-231 breast cancer cell cultures. In *Journal of Nutritional Biochemistry*. ISSN 0955-2863, 2005. vol. 16, p. 184-192.
25. HU, Y. et al. Syndeca*n*-1-dependent suppression of PDK1/Akt/bad signaling by docosahexaenoic acid induces apoptosis in prostate cancer. In *Neoplasia*. ISSN 1476-5586, 2010, vol. 12, p. 826–836.
26. CHANG, J. et al. Omega-3 polyunsaturated fatty acids in youths with attention deficit hyperactivity disorder: a systematic review and meta-analysis of clinical trials biological studies. In *Neuropsychopharmacology*. ISSN 1740-634X, 2018a, vol. 43, p. 534–545.
27. CHANG, J. et al. Polyunsaturated fatty acids and infflamatory markers in major depressive episodes during pregnancy. In *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry.* ISSN 0278-5846, 2018b, vol. 80, p. 273-278.
28. CHUN, K. S. et al. Chemoprevention of Gastrointestinal Cancer: The Reality and the Dream. In *Gut and Liver*. ISSN 1976-2283, 2013, vol. 7, no. 3, p. 137-149.
29. JANA, P. – KARMAKAR, S. – ROY, U. – PAUL, M. – BERA, A. K. S. Phytobiotics in aquaculture health management: A review. In *J. Entomol. Zool. Stud.,* 2018, vol. 6, no. 4, p. 1422-1429.
30. KIM, E. J. Low dietary intake of n-3 fatty acids, niacin, folate, and vitamin C in Korean patients with schizophrenia and the development of dietary guidlines for schizophrenia. In *Nutrition Research*. ISSN 0271-5317, 2017, vol. 45, p. 10-18.
31. KUBOTA, H. et al. Eicosapentaenoic acid modifies cytokine activity and inhibits cell proliferation in an oesophageal cancer cell line. In *Anticancer Resesrch*. ISSN 0250--7005, 2013, vol. 33, p. 4319–4324.
32. KOMISIA EURÓPSKYCH SPOLOČENSTIEV. *Oznámenie Komisie Európskemu parlamentu a Rade - Vytvoriť udržateľnú budúcnosť pre akvakultúru - Nový podnet pre stratégiu udržateľného rozvoja európskej akvakultúry.* [online]. Brusel, 2009. [cit. 2023.04.19]. Dostupné na internete: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=COM:2009:0162:FIN:SK:HTML>.
33. LARA-FLORES, M. The use of probiotic in aquaculture: an overview. In *Int. Res. J. Microbiol.* ISSN 2141-5463. 2011, vol. 2, no. 12, p. 471-478.

34. LIM, K. et al. ω-3 Polyunsaturated fatty acids inhibit hepatocellular carcinoma cell growth through blocking β-catenin and cyclooxygenase-2. In *Molecular Cancer Therapeurics*. ISSN 1535-7163, 2009, vol. 8, p. 3046–3055.
35. MABROK, M. A. E. – WAHDAN, A. The immune modulatory effect of oregano (*Origanum vulgare* L.) essential oil on *Tilapia zillii* following intraperitoneal infection with *Vibrio anguillarum*. In *Aquaculture International*, 2018, no. 26, p. 1147–1160.
36. MAHÉO, K. et al. Differential sensitization of cancer cells to doxorubicin by DHA: A role for lipoperoxidation. In *Free Radical Biology & Medicine*. ISSN 0891-5849, 2005, vol. 39, p. 742-751.
37. MOLINARI, R. The *n*3-polyunsaturated fatty acid docosahexaenoic acid induces immunogenic cell death in human cancer cell lines via pre-apoptotic calreticulin exposure. In *Cancer Immunology Immunotherapy*. ISSN 1432-0851, 2011, vol. 60, p. 1503–1507.
38. OH, H. Y. – LEE, T. H. – LEE, D.Y. – LEE, C. H. – SOHN, M.Y. – KWON, R. W. – KIM, J.G. – KIM, H. S. – KIM, K. D. Evaluation of Garlic Juice Processing Waste Supplementation in Juvenile Black Rockfish (*Sebastes schlegelii*) Diets on Growth Performance, Antioxidant and Digestive Enzyme Activity, Growth- and Antioxidant-Related Gene Expression, and Disease Resistance against *Streptococcus iniae*. Animals (Basel). In *Animals (Basel.),* 2022, vol. 12, no. 24, 3512.
39. POKORNÝ, J. et al. *Pstruhařství.* 3. vyd. Praha: Informatorium. 2003. ISBN 80-7333-022-9. 284 p.
40. RATTANACHAIKUNSOPON, P. – PHUMKHACHORN, P. Potential of cinnamon (*Cinnamomum verum*) oil to control *Streptococcus iniae* infection in tilapia (*Oreochromis niloticus*). In *Fish. Sci.*, 2010, vol. 76, no. 2, p. 287–293.
41. SAMPELS, S. et al. *Kvalita a gastronomie ryb a rybích výrobků.* 1. vyd. Vodňany: Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích. 2014. 247 s. ISBN 978-80-87437-85-8.
42. SANISHTH, S. – SI, Y. Effect of *Ocimum sanctum* (Tulsi) powder on the growth and survival in *Cirrhinus mrigala* fingerlings. In Journal of Entomology and Zoology Studies, 2019, vol. 7, no. 4, p. 239-244.
43. SMITH, P. Antimicrobial resistance in aquaculture. In *Reveu Scientifique Et Technique*. ISSN 0253-1933, 2008, vol. 27, no. 1, p. 243-264.
44. SONG, K. S. et al. ω-3-Polyunsaturated fatty acids suppress pancreatic cancer cell growth *in vitro* and *in vivo* via downregulation of Wnt/β-catenin signaling. In *Pancreatology*. ISSN 1424-3903, 2011, vol. 11, p. 574–584.

45. STEINER, T. – SYED, B. Phytogenic Feed Additives in Animal Nutrition. In Medicinal and Aromatic Plants of the World. Medicinal and Aromatic Plants of the World; Máthé, Á., Ed.; Springer: Dordrecht, The Netherlands; 2015, vol. 1, p. 403–423, ISBN 978-94-017-9810-5.
46. SUN, S. N. et al. Docosahexaenoic acid (DHA) induces apoptosis in human hepatocellular carcinoma cells. In *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*. ISSN 1936-2625, 2013, vol. 6, p. 281–289.
47. WEISMAN, D. et al. Effect of supplemented intake of omega-3 fatty acids on arrhytmias in patients with ICD: fish oil therapy may reduce ventricular arrhythmia. In *Journa of Interventional Cardiac Electrophysiology*. ISSN 1383-875X, 2017, vol. 49, no. 3, p. 255-261.
48. YAO, Q. H. et al. ω-3 polyunsaturated fatty acids inhibit the proliferation of the lung adenocarcinoma cell line A549 *in vitro*. In *Molecular Medicine Reperts*. ISSN 1791-2997, 2014, vol. 9, p. 401–406.
49. ZHANG, Y. et al. Eicosapentaenoic acid (EPA) induced apoptosis in HepG2 cells through ROS-Ca^{2+}-JNK mitochondrial pathways. In *Biochemical Biophysical Research Communications*. ISSN 0006-291X, 2015, vol. 456, p. 926–932.
50. ZHANG, R. – WANG, X. W. – LIU, L. L. – CAO, Y. C. – ZHU, H. Dietary oregano essential oil improved the immune response, activity of digestive enzymes, and intestinal microbiota of the koi carp, *Cyprinus carpio*. In *Aquaculture*, 2020, vol. 518, 734781.

Kontaktná adresa: Fečkaninová Adriána, Department of Pharmaceutical Technology, Pharmacognosy and Botany, University of Veterinary Medicine and Pharmacy in Košice, Komenského 73, 041 81 Košice, Slovak Republic; E-mail: adriana.feckaninova@uvlf.sk

VYBRANÉ ODRODY AKOSTNÝCH VÍN RÔZNEHO PÔVODU - KVALITA A ZDRAVOTNÁ BEZPEČNOSŤ

SELECTED VARIETIES OF WINES OF DIFFERENT ORIGIN - QUALITY AND HEALTH SAFETY

Fikselová Martina, Zeleňáková Lucia, Čapla Jozef, Jakabová Silvia, Mezey Ján, Golian Jozef, Stanček Matej

SPU Nitra, Tr. A. Hlinku 2, 949 01, Nitra, Slovenská republika

ABSTRACT

This work was focused on the wine quality of selected varieties (Rhine Riesling, Wallachian Riesling, Pinot Gris, Veltliner Grüner and Pinot Blanc) regarding their different origins and health safety. The wine samples originated from Austria, Germany, Italy, Hungary (year of vintage 2020) and for comparison the Slovak wines that originated from the Central Slovak winegrowing region were analysed as well. We focused on selected chemical parameters such as the total acid content, tartaric and malic acid content, fructose and glucose content, determined by the FTIR method. At the same time, the total polyphenol content was determined using the Folin-Ciocalteu reagent as well.

The highest total acid content was determined in samples from Slovakia, at the varieties of Rhine Riesling (8 $g.l^{-1}$) and Pinot Gris (7.8 $g.l^{-1}$). The lowest measured amount was 4.3 $g.l^{-1}$ in the sample of Pinot Blanc originating from Austria. Higher content of tartaric acid was detected in Rhine Riesling, Pinot Gris and Veltliner Grüner varieties of Slovak origin compared to foreign wines. At all five samples of wines from Slovakia, almost zero glucose content was determined, in the amount of max. 0.3 $g.l^{-1}$. Fructose content in Slovak wine samples was detemined also to be low, it ranged up to 0.7 $g.l^{-1}$. The highest content of polyphenols was found to be in the Rhine Riesling sample from Austria and Grüner Veltliner, also originating from Austria.

Key words: grape, wine, FTIR, total acids, glucose, fructose, polyphenols

ÚVOD

Víno je najrozšírenejším a jedným z najstarších alkoholických nápojov. Je celosvetovo konzumovaným, v niektorých krajinách sa uprednostňuje pred ostatnými alkoholickými nápojmi. Na Slovensku predstavuje spotreba vína na obyvateľa staršieho ako 18 rokov 17,7 litra (Meravá, 2021).

Z chemického hľadiska je víno komplexnou matricou, na ktorú vplýva viacero faktorov akými sú: klíma, geografická poloha, odroda hrozna, načasovanie zberu, proces fermentácie, podmienky skladovania a dozrievanie, vinohradnícke postupy (Canizo et al., 2019).

Pôdna mikroflóra formuje mikroflóru a fyziológiu spojenú s viničom a v konečnom dôsledku aj chuť výsledných vín. Klíma podobne ovplyvňuje kvalitu vína prostredníctvom mikroorganizmov, teploty, zrážok a slnečného žiarenia. Chladnejšie podnebie je vhodnejšie na výrobu ľahkých a jemných vín, kým teplejšie podnebie má tendenciu vytvárať ťažšie vína, bohaté na chuťové profily. Orientácia viniča a strmšie svahy môžu ovplyvniť teplo a prísun slnečného žiarenia na vinič (Van Leeuwen a Seguin, 2006). Zrážky sú pre kvalitu hrozna a následného vína taktiež dôležitým faktorom. Ovplyvňujú kvalitu a množstvo strapcov hrozna, ako aj šťavnatosť bobúľ (Morlat et al., 2001).

Tak dlho, ako existuje dopyt po víne, existuje aj falšovanie vína a podvody súvisiace s ním. Na druhej strane je čím ďalej, tým vyššia snaha mať víno kvalitné a zároveň autentické. Cieľom práce bolo porovnať kvalitu akostných vín vybraných odrôd z jedného ročníka, pochádzajúcich z rôzneho geografického pôvodu.

MATERIÁL A METODIKA

Ako materiál sme použili akostné suché biele vína (CHOP, ročník 2020) nasledovných odrôd: Rizling rýnsky, Rizling vlašský, Rulandské šedé, Veltlínske zelené a Rulandské biele, rôzneho pôvodu. Konkrétne zahraničné vzorky vín pochádzali z Rakúska, Nemecka, Talianska a Maďarska z rôznych regiónov príslušnej krajiny podľa uvedeného v tab. 1. Pre porovnanie sme odobrali aj vzorky slovenských vín s CHOP zo Stredoslovenskej vinohradníckej oblasti.

Tabuľka 1 Základná charakteristika analyzovaných vín

ODRODA	Vzorka	Krajina	Región/podoblasť
RIZLING RÝNSKY	A	Rakúsko	Weinviertel
	B	Nemecko	Mosel
	C	Taliansko	Alto-Adige
	SK-RR	Slovensko	Modrokamenský
RIZLING VLAŠSKÝ	D	Rakúsko	Carnuntum
	SK-RV	Slovensko	Modrokamenský
RULANDSKÉ ŠEDÉ	E	Nemecko	Rheinhessen
	F	Taliansko	Friuli
	G	Maďarsko	Tolna

	SK-RŠ	Slovensko	Modrokamenský
VELTLÍNSKE ZELENÉ	H	Rakúsko	Winzer Kremstal
	I	Maďarsko	Tolna
	SK-VZ	Slovensko	Modrokamenský
RULANDSKÉ BIELE	J	Rakúsko	Weinviertel
	K	Nemecko	Rheingau
	SK-RB	Slovensko	Modrokamenský

METODIKA PRÁCE

FT-IR analýza

FTIR metóda je založená na využití svetelného žiarenia v infračervenej oblasti. Toto žiarenie je absorbované chemickými väzbami vo vzorke.

Analýza FTIR sa vykonávala pomocou prístroja Alpha analyzátor. Po premeraní a zaznamenaní spektra je vzorka vína vyhodnotená na základe porovnania spektier z kalibračnej databázy,

Približne 20 ml vzorky vína sme naniesli na meraciu hlavicu ALPHA analyzátora, kde sa vzorka zohriala na teplotu 40 °C a nastalo meranie. Prístroj v priebehu 70 – 100 sekúnd vzorku vyhodnotil a výsledok sme odčítali a zaznamenali.

Stanovenie celkového obsahu polyfenolov

Celkový obsah polyfenolov (TPC) bol stanovený modifikovanou Folin-Ciocalteuovou spektrofotometrickou metódou. Metóda je založená na reakcii polyfenolov s fenolovým činidlom Folin Ciocalteua, ktorá je sprevádzaná tvorbou modrého sfarbenia v prítomnosti zásaditého prostredia ako výsledok redukcie oxidačného stavu molybdénu a volfrámu v alkalickom prostredí.

Do 50 ml odmerných baniek sa odmeralo 50 µl vína s následným pridaním 2,5 ml Folin-Ciocalteuovho činidla zriedeného demineralizovanou vodou (1:2 obj./obj.) a 5 ml Na_2CO_3 (20 % vodný roztok). Roztoky sa dôkladne pretrepali a doplnili demineralizovanou vodou na objem 50 ml. Meranie sa uskutočnilo s použitím UV/Vis spektrofotometra pri 765 nm.

Slepý pokus bol pripravený s použitím Folin-Ciocalteuovho činidla a destilovanej vody. Získaná kalibračná krivka mala korelačný koeficient R = 0,999. Koncentrácia polyfenolov bola kvantifikovaná ako $mg.l^{-1}$ ekvivalentu kyseliny galovej (GAE).

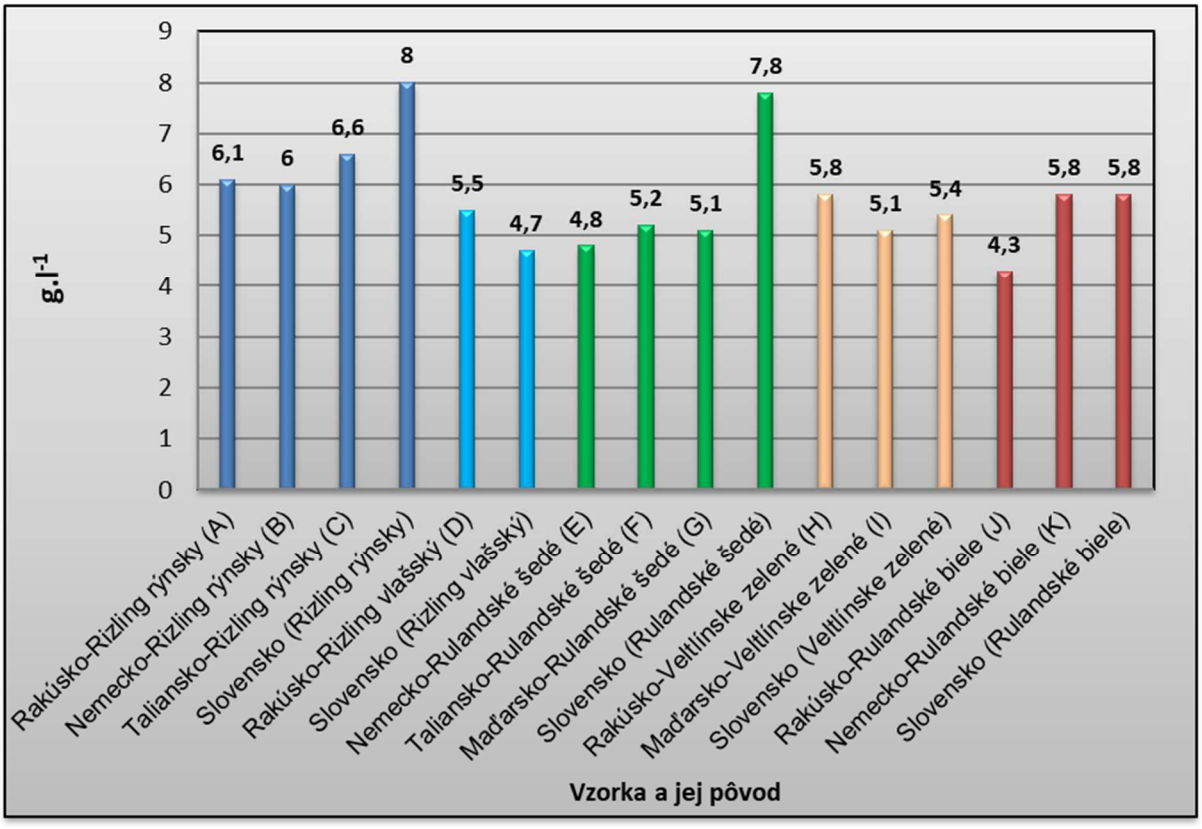
VÝSLEDKY A DISKUSIA

Na obsah celkových kyselín vo vínach môže mať vplyv nielen odroda ale aj klimatické podmienky počas roka (Ivanova-Petropulos et al., 2020). Pôsobia ako hlavné determinanty kvality odrôd viniča. Hrozno obsahuje najmä kyselinu vínnu a jablčnú, tieto ovplyvňujú kvalitu a charakter vína (Goncalves et al., 2013).

Obsah kyselín v zahraničných vzorkách bol stanovený v rozmedzí 4,3 až 6,6 $g.l^{-1}$, kým celkový obsah kyselín v slovenských vínach bol zistený v rozsahu 4,7 až 8 $g.l^{-1}$

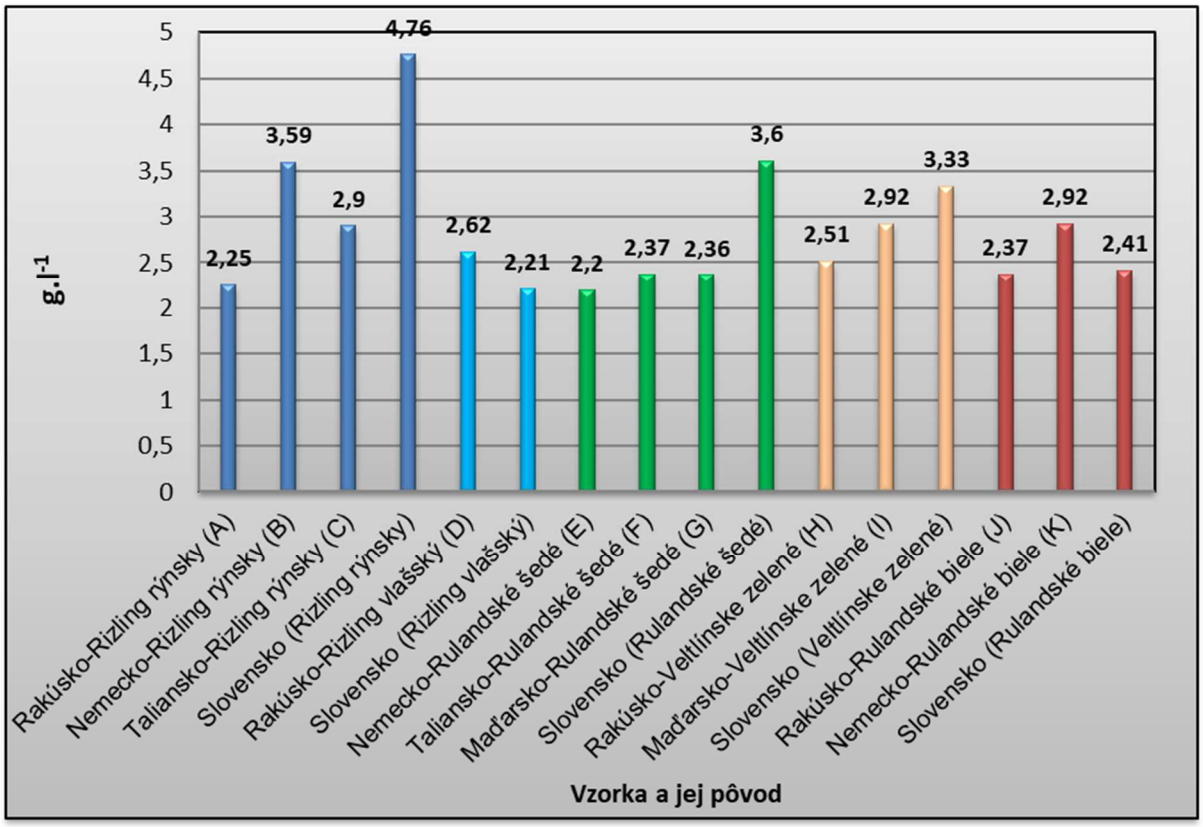
Najvyšší obsah kyselín bol zistený vo vzorkách zo Slovenska, konkrétne v odrodách Rizling rýnsky (8 $g.l^{-1}$) a Rulandské šedé (7,8 $g.l^{-1}$). Najnižšie nameraná hodnota bola vo vzorke Rulandské biele, pôvodom z Rakúska (4,3 $g.l^{-1}$). Podľa Nariadenia Rady (ES) č. 491/2009 má byť celkový obsah kyselín vo víne najmenej 3,5 $g.l^{-1}$, všetky vzorky vína sú vyhovujúce z hľadiska tejto požiadavky.

Obrázok č. 1 Celkový obsah kyselín ($g.l^{-1}$) vo vínach rôzneho pôvodu



Kyselina jablčná a kyselina vínna predstavujú viac ako 80 % celkového množstva kyselín v hrozne a šťavách a ich koncentrácie sa líšia v závislosti od odrody hrozna, klímy, štádia dozrievania a procesu výroby vína (Lima et al., 2022). V závislosti od podmienok prostredia je koncentrácia kyseliny jablčnej vo všeobecnosti nižšia v teplejších oblastiach a v zrelom hrozne ako v chladnejších oblastiach a v menej zrelom hrozne.

Obrázok č. 2 Obsah kyseliny vínnej (g.l^{-1}) vo vínach rôzneho pôvodu



Najvyšší obsah kyseliny vínnej (4,76 g.l^{-1}) bol nameraný v odrode Rizling rýnsky zo Slovenska. Medzi odrody s najnižším obsahom kyseliny vínnej, patrili Rizling vlašský zo Slovenska 2,21 g.l^{-1} a Rulandské šedé z Nemecka 2,20 g.l^{-1}.

Podľa Apichai et al. (2007) na obsah kyseliny vínnej vo víne vplýva podnebie. V chladnejšom podnebí je obsah kyseliny vínnej v mušte obvykle nad 6 g.l^{-1} a v teplejších podmienkach je obsah spravidla nižší, 2 až 3 g.l^{-1}. Pri odrodách Rizling rýnsky, Rulandské šedé a Veltlínske zelené so slovenským pôvodom bol zistený výrazne vyšší obsah kyseliny vínnej v porovnaní so zahraničnými vínami (Obr.2). Môže to byť spôsobené práve tým, že krajiny ako Rakúsko, Taliansko a Maďarsko majú teplejšie klimatické podmienky ako Slovensko.

Zo zdravotného hľadiska sa kyselina vínna stanovená v moči považuje za citlivý, selektívny biomarker mierneho príjmu vína. Stanovenie kyseliny vínnej sa javí ako nástroj na zisťovanie vplyvu mierneho pitia vína na zdravie (Domínguez-López et al., 2021).

Druhou najvýznamnejšou kyselinou nachádzajúcou sa v mušte i víne je kyselina jablčná. Najnižší obsah kyseliny jablčnej bol zistený v odrodách Veltlínske zelené zo Slovenska, 0,6 g.l^{-1} a Rulandské biele z Rakúska 0,4 g.l^{-1}. Naopak, najvyššie hodnoty boli obsiahnuté vo vínach Rizling rýnsky z Rakúska (3,3 g.l^{-1}) a Rulandské šedé zo Slovenska s obsahom (3,2 g.l^{-1}).

Počas zretia bobúľ obsah kyseliny jablčnej klesá. V prípade spustenia sekundárneho alebo jablčno-mliečneho kvasenia baktérie mliečneho kvasenia premenia zostávajúcu kyselinu jablčnú na kyselinu mliečnu, podobne mohlo nastať aj v prípade našich vzoriek vín.

Vyhodnotenie obsahu fruktózy a glukózy

Glukóza je zdrojom uhlíka pre kvasinky. Vo všetkých piatich vzorkách vín zo Slovenska nebol zistený alebo bol stanovený len stopový obsah glukózy v množstve najviac 0,3 $g.l^{-1}$. Podľa Guillaume et al. (2007) sa pri fermentácii muštu môžu použiť špeciálne kmene vínnych kvasiniek, ktoré do značnej miery spotrebujú glukózu. Práve toto môže súvisieť s nízkymi hodnotami glukózy v slovenských vzorkách vín.

Najvyšší obsah glukózy bol nameraný vo vzorke Rizling rýnsky z Talianska (4,3 $g.l^{-1}$).V tejto vzorke mohlo dôjsť k predčasnému zastaveniu kvasenia muštu.

Vo zvyšných zahraničných vínach bola zistená hladina glukózy v rozmedzí od 1,1 do 2,4 $g.l^{-1}$. Kvasinky však majú pri fermentácii vína vyššiu preferenciu glukózy ako fruktózy, čo vedie k rozdielu spotreby oboch cukrov počas fermentačného procesu. Táto rozdielna spotreba má za následok prevahu fruktózy počas posledných fáz fermentácie. V dôsledku toho môže byť vo vykvasených muštoch prítomná značná zvyšková hladina fruktózy. Okrem toho je fruktóza približne dvakrát sladšia ako glukóza, čo spôsobuje nežiaduce pocity sladkosti v suchých vínach (Tronchoni et al., 2009). Obsah fruktózy v slovenských vzorkách vín bol stanovený v rozmedzí 0 až 0,7 $g.l^{-1}$. Guillaume et al. (2007) porovnávali kmene vínnych kvasiniek *Saccharomyces cerevisiae, Saccharomyces bayanus* a *Saccharomyces pastorianus* a dospeli k záveru, že použitie iných druhov kvasiniek ako *Saccharomyces cerevisiae* by mohlo mať za následok zníženie hladín fruktózy vo výsledných vínach.

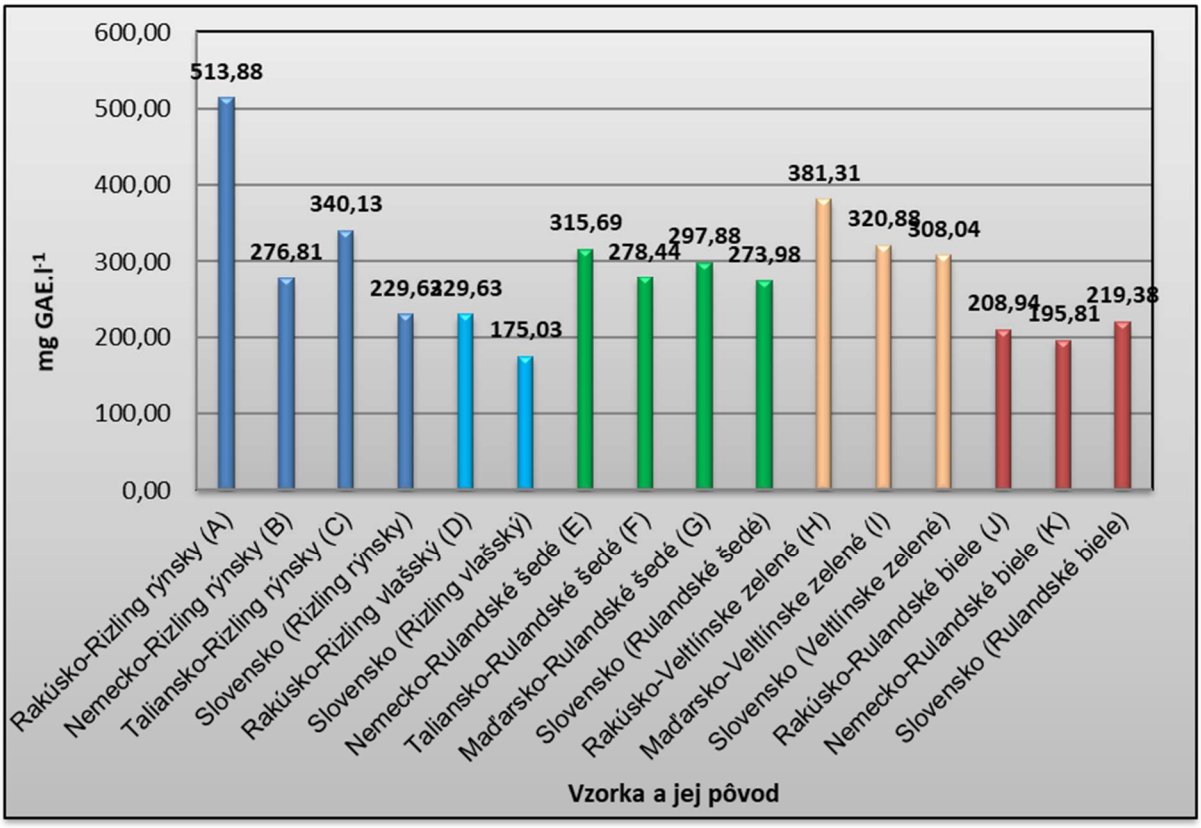
Najvyššia nameraná hodnota fruktózy 8,0 $g.l^{-1}$ sa zistila v odrode Rizling rýnsky, pôvodom z Nemecka. Najmenej obsiahnutá fruktóza bola v zahraničných vzorkách vín Rulandské šedé z Maďarska, Rulandské biele z Nemecka v množstve 1,7 $g.l^{-1}$ a Rizling vlašský z Rakúska v množstve 1,6 $g.l^{-1}$.

Vyhodnotenie celkového obsahu polyfenolov

Polyfenoly sú zložky, ktoré sa v značnom množstve nachádzajú v červenom ale aj v bielom víne. Produkuje ich každá rastlina vo svojom metabolizme. Ich obsah vo víne je ovplyvnený odrodou, typom kvasiniek použitých pri fermentácii, kontaktom s pevnými časticami a inými agronomickými a technologickými faktormi (Garrido et al., 2013; Baiano et al., 2014). Na obsah polyfenolov vo víne vplýva aj samotný postup pri výrobe vína, preto sa vyšší obsah polyfenolických látok zisťuje vo všeobecnosti v červenom víne.

Podľa Gutiérrez-Escobar et al. (2021) polyfenolové zložky vo víne vo veľkej miere súvisia s kvalitou vína a majú priaznivý vplyv na zdravie človeka. Celkový obsah polyfenolov sa v naších vzorkách pohyboval v širokom rozmedzí od 175,03 mg GAE.l^{-1} do 513,88 mg GAE.l^{-1}. Najvyšší obsah polyfenolov 513,88 mg GAE.l^{-1} bol zistený vo vzorke Rizling rýnsky z Rakúska a nasledovalo Veltlínske zelené, rovnako pôvodom z Rakúska. Tieto vzorky vín vykazovali výrazne vyššie hodnoty TPC ako sú uvedené v štúdii Jacksona (2008) kde sa obsah celkových polyfenolov bielych vín pohybuje v rozmedzí 190 do 290 mg GAE.l^{-1}. Najnižšie obsahy celkových polyfenolov boli stanovené vo vzorkách Rizling vlašský zo Slovenska a Rulandské biele z Nemecka (175,03; 195,81 mg GAE.l^{-1}), ktoré sú porovnateľné s výsledkami uvedenej štúdie.

Obrázok č.1 Obsah celkových polyfenolov (mg GAE.l^{-1}) vo vínach rôzneho pôvodu



ZÁVER

Medzi základné aspekty kvality a zdravotnej bezpečnosti vína patria jeho chemické vlastnosti, ktoré sa môžu líšiť napr. v závislosti od odrody, pôdno-klimatických podmienok, technológie spracovania, avšak stále významnejšia je aj jeho autentickosť.

Celkový obsah kyselín v zahraničných vínach sa pohyboval v rozmedzí od 4,3 g.l^{-1} až 6,6 g.l^{-1}, kým v slovenských vínach 4,7 g.l^{-1} až 8 g.l^{-1}. Celkový obsah kyselín v slovenských

odrodách vín Rizling rýnsky a Rulandské šedé bol v porovnaní so zahraničnými vínami týchto odrôd výrazne vyšší, čo bolo pravdepodobne spôsobené chladnejším podnebím na Slovensku. Kyselina vínna podobne dominovala v uvedených slovenských odrodách. Obsah glukózy vo vínach bol stanovený v množstve do 2,4 $g.l^{-1}$ s výnimkou odrody Rizling rýnsky z Talianska (4,3 $g.l^{-1}$). V tejto vzorke mohlo dôjsť k predčasnému zastaveniu kvasenia muštu. Slovenské vína sa prejavili nízkym obsahom glukózy i fruktózy.

Výrazne vysoký celkový obsah polyfenolov bol zistený vo víne Rizling rýnsky, nasledovalo Vetlínske zelené, obe pôvodom z Rakúska, čím by mohli byť najzaujímavejšie z hľadiska zdravotných benefitov pre človeka.

POĎAKOVANIE

Príspevok bol spracovaný s podporou projektov VEGA č. 1/0239/21 a KEGA č. 020SPU-4/2021. Poďakovanie patrí aj spoločnosti Movino, s.r.o, Veľký Krtíš.

POUŽITÁ LITERATÚRA

1. APICHAI, S.- PATTANA, T.- RODJANA, B.- SUPALAX S. Capillary zone electrophoresis of organic acids in beverages. In *LWT Food Science and Technology*[online]. 2007, vol. 40, no. 10, [cit. 2022-03-23]. Dostupné na:https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0023643807000412?via%3 Dihub. ISSN 0023- 6438.
2. BAIANO, A. Recovery of biomolecules from food wastes—A review. In *Molecules*. [online]. 2014, vol. 19, no. 9, [cit. 2022-02-06]. Dostupné na: https://www.mdpi.com/1420-3049/19/9/14821. ISSN 1420-3049.
3. CANIZO, B. V. et al. Quality Monitoring and Authenticity Assessment of Wines: Analytical and Chemometric Methods. In Quality Control in the Beverage Industry, vol 17, 2019. ISBN 9780128166819. p. 335-384.
4. DOMIŃGUEZ-LÓPEZ, L.- MOSER, I.P.- ARANCIBIA-RIVEROS, C.- TRESSERARIMBAU, A.- MARTÍNEZ-GONZÁLEZ, M.A. et al. Urinary Tartaric Acid, a Biomarker of Wine Intake, Correlates with Lower Total and LDL Cholesterol. In *Nutrients*.[online], 2021,vol. 13, no. 8. [cit. 2023-04-05].Dostupné na: < https://doi.org/10.3390/nu13082883>.
5. GARRIDO J.- BORGES F. Wine and grape polyphenols—A chemical perspective. In *Food Research International* [online], 2013, vol. 54, no. 2 [cit. 2022-02-08] Dostupné na:

https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0963996913004353?via%3Dihub. ISSN 0963-9969.

6. GONÇALVES, J.- SILVA, C.L.- CASTILHO, P.C.- CÂMARA J.S. An attractive, sensitive and high-throughput strategy based on microextraction by packed sorbent followed by UHPLC-PDA analysis for quantification of hydroxybenzoic and hydroxycinnamic acids in wines. In *Microchemical Journal* [online], 2013, vol. 106, [cit. 2022-03-12]. Dostupné na:https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0026265X12001555?via%3Dihub. ISSN 0026-265X.
7. GUILLAUME C.- DELOBEL P.- SABLAYROLLES J.M.- BLONDIN B. Molecular basis of fructose utilization by the wine yeast Saccharomyces cerevisiae: a mutated HXT3 allele enhances fructose fermentation. In *Applied and Environmental Microbiology* [online], 2007, vol. 73, no. 8, pp. 2432–2439 [cit. 2022-03- 18]. ISSN 1098-5336.
8. GUTIÉRREZ-ESCOBAR, R.- ALIAÑO-GONZÁLEZ, M. J.- CANTOS-VILLAR, E. 2021. Wine Polyphenol Content and Its Influence on Wine Quality and Properties: A Review. In *Wine chemistry* [online]. 2021, vol. 26, no. 3 [cit. 2022-02-06]. Dostupné na: https://www.mdpi.com/1420-3049/26/3/718. ISSN 1420-3049.
9. IVANOVA – PETROPULOS, V. et al. Rapid and Simple Method for Determination of Target Organic Acids in Wine Using HPLC-DAD Analysis. In *Food Analytical Methods* [on-line]. 2020, vol 13 [cit. 2023-03-20]. Dostupné na:< https://link.springer.com/article/10.1007/s12161-020-01724-4>.
10. JACKSON, R. S. *Wine Science: Principles and Applications.* 3th Edition. London, UK: Academic Press / Elsevier, 2008.751 s. ISBN 978-0-12-373646-8.
11. LIMA, A. A. M. et al. Organic acids characterization: wines of Pinot noir and juices of 'Bordeaux grape varieties. In *Journal of Food Composition and Analysis* [on-line]. 2022, vol. 114, [cit. 2023-03-20]. ISSN 0889-1575. Dostupné na:<https://doi.org/10.1016/j.jfca.2022.104745.>.
12. MERAVÁ, E. *Vinič hroznorodý, hroznové víno – Situačná a výhľadová správa k 31.7.2021*. Výskumný ústav ekonomiky, poľnohospodárstva a potravinárstva [on-line], ročník 23, 2021 [cit. 2023-03-27]. Dostupné na:<https://www.vuepp.sk/04_komodity 2021.htm> ISSN 1339-0937.
13. MORLAT R.- JACQUET A.- ASSELIN C. Facteurs naturels et humains des terroirs viticoles français : méthode d'étude et valorisation. In *Localized agro-food systems*[online]. 2001, vol 42, [cit. 2022-02-27] Dostupné na: https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=LV2016014689

14. *Nariadenie rady (ES) č. 491/2009 z 25. mája 2009 , ktorým sa mení a dopĺňa nariadenie (ES) č. 1234/2007 o vytvorení spoločnej organizácie poľnohospodárskych trhov a o osobitných ustanoveniach pre určité poľnohospodárske výrobky (nariadenie o jednotnej spoločnej organizácii trhov)*
15. VAN LEEUWEN, C.- AND SEGUIN, G. The concept of terroir in viticulture. In *Journal of Wine Research* [online]. 2006, vol 17, no 1[cit. 2022-03-15] Dostupné na: <https://doi.org/10.1080/09571260600633135> ISSN 09571264.

Kontaktná adresa: Fikselová Martina, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Slovak University of Agriculture, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovak Republic; E-mail: martina.fikselova@uniag.sk

POČET SOMATICKÝCH BUNIEK A ICH VPLYV NA ZLOŽENIE KOZIEHO MLIEKA

SOMATIC CELL COUNT AND THEIR EFFECT ON GOAT MILK COMPOSITION

Gancárová Barbora[1], Tančin Vladimír[1,2], Tvarožková Kristína[1], Uhrinčať, Michal[2], Mačuhová Lucia[2], Vršková Martina[2], Tomáš Kopec[3]

[1]Institute of Animal Husbandry, Slovak University of Agriculture in Nitra, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovak republic

[2]NPPC-Research Institute for Animal Production, Hlohovecka 2, 951 41 Lužianky, Slovak republic

3Department of Animal Breeding, Mendel University in Brno, Zemědělská 1, 613 00 Brno, Czech republic

ABSTRACT

The monitoring of somatic cells in goats still did not receive attention such as in cows or sheep. Our study aimed to screening SCC and describe relationship between SCC and composition of goat milk in dairy goat farm located in central Slovakia in early stage of lactation. The half udder milk samples (n=68) were divided on the basis of SCC into 3 groups (SCC1 <500, SCC2 <500≥1000, SCC3≤1000, all $\times 10^3$ cells mL^{-1}). The relationship between SCC and milk components were calculated by Pearsons correlation. The highest percentage (73.5%) of milk samples had SCC1, in SCC2 (14.7%) and the lowest (11.4%) had SCC3. The content of milk components decreased with increasing SCC and a statistically significant negative effect of SCC on protein, lactose, and not-fat dry matter (P<0.005) was found. A statistically significant negative correlation was found between SCS and lactose (-0.44564, P<0.001), SCS and protein (-0.41184, P<0.001), and not-fat dry matter (-0.48594, P<0.001). Our results, showed that SCC could be low in goat and values of SCC could be compared with SCC values in cows or sheep. Monitoring of SCC in goat´s milk is important for udder health management and thus for the optimal composition of milk for processing.

Keywords: goat milk, somatic cell counts, milk composition early stage of lactation

INTRODUCTION

Somatic cells are a natural part of the milk composition of dairy animals. and somatic cell count (SCC) is used to indicate udder health (Leitner et al., 2012). The physiology of

somatic cells and the definition of a healthy cow's udder are well known and, in many countries, the SCC in cow's milk has legislated limits. For example, in the European Union milk above 400×10^3 cells.mL^{-1} is considered as abnormal milk (Paape et al., 2007). However, the physiology of somatic cells in goat milk is still a matter of scientific discussion and the SCC hasn´t evolved into an accepted legislative parameter for the evaluation of milk quality of goat milk in the European Union (Jimenez-Granado et al., 2014). Currently, in the USA, there are legislation limits of bulk tank SCC for goats is 1500×10^3 cells.mL^{-1} and 750×10^3 cells.mL^{-1} for cows (USDA A-APHIS-VS-CEAH, 2022; US DHHS-PHS-FDA, 2019).

The main cause of elevated SCC in milk of ruminants is to detect an intramammary infection, but this isn´t the only cause of elevated SCC in goats (Paape et al., 2007). Non-infection factors such as breed (Bagnicka et al., 2011), parity (Zammuner et al. 2020; Olechnowicz a Sobek, 2008), stage of lactation (Persson et al., 2014; Aulrich and Barth, 2008), estrus (McDougall and Voermans, 2002), stress (Mehdid et al., 2019) could also affect SCC in goat milk.

The very high SCC in goat milk is not the only indicator of udder health, but it has a negative impact on goat milk quality and safety (Barrón-Bravo et al., 2013; Silanikove et al, 2010). Silanikove et al. (2014) described that with increasing SCC in goat milk, the prevalence of subclinical bacterial infection in the goat herd increases, which has a negative impact on milk and curd production. These results are related to the research of Leitner et al. (2016), who consider SCC as an important parameter of hygienic safety and the technological quality of raw milk of small ruminants.

The aim of this study was to determine SCC in goat milk at early lactation and the possible effect of SCC on goat milk composition.

MATERIALS AND METHODS

Milk samples and analyses

The study was carried out on a family dairy goat farm located in central of Slovakia during evening milking. In the farm, there are 71 goats, which the farmer divided into two groups -goats in lactation and goats in a dry period. The goats in lactation (n=34) consisted of 4 different breeds of goats on the farm, 2 Alpine goats, 4 Anglo-Nubian goats, 7 White short haired goats. Additionally, 21 crossbreeds of the following breeds were milked and involved in this study. The goats had kidded at the beginning of February to the end of March, and only two goats had kidded earlier in August. Thus, the half udder milk samples were collected in the early lactation stage (on the mean 43 days of lactation). In total, 68 samples were available for SCC analysis and due to insufficient amount of milk in sample only 65 samples were used for

milk composition analysis**.** SCC was determined using a Somacount 150 (Bentley Czech, USA). Milk composition was determined using MilkoScan FT 120 (Foss Electric, Hillerød, Denmark).

Statistical analysis

Milk samples were divided into three SCC groups on the basis of half udder SCC. Group SCC1 comprised samples of less than 500×10^3 cells.mL^{-1}. SCC2 ranged from 500 to 1000×10^3 cells.mL^{-1} and SCC3 comprised samples above 1000×10^3 cells.mL^{-1}. The data were further classified into Statistical analysis was performed using the One-way ANOVA in SAS7.1 (2014) for the relationship between SCC groups and the composition of goat milk. For statistical evaluation, SCC were recalculated to SCS: LOG_2 (SCC/100 000) + 3. The differences were considered statistically significant at $P\leq0.05$. The statistical model was:

$$y_i = \mu + M_i + e_i$$

y_i - fat, protein, lactose, dry matter, and non-fat dry matter (NFDM)
μ – overall mean
M_i - fixed factor of SCC group (five levels: $<500\times10^3$, $<500\geq1000$, ≤1000, all $\times10^3$ cells.mL^{-1})
e_{il} - random error

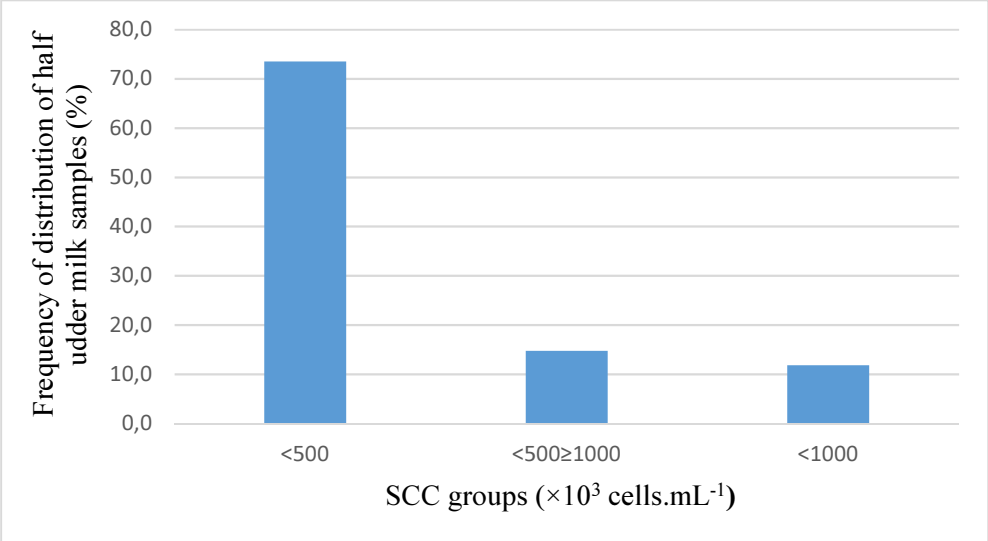
Multiple comparisons between groups were made by applying the Tukey´s Studentized Range (HSD) Test. Pearson correlation was used to analyze the relationship between milk components and somatic cell count in SAS7.1 (2014).

RESULTS AND DISCUSSION

The frequency of distribution of milk samples according to SCC in SCC groups is shown in Figure 1. The majority of the milk samples were classified as SCC1 group (73.5%), followed by SCC2 (14.7%) and SCC3 ones (11.8%). The 33.8% of half udder milk samples ranged SCC between 15 to 98×10^3 cells.mL^{-1}. Moroni et al. (2005) observed 70% of samples with SCC less than 500×10^3 cells.ml^{-1} in healthy goat udder but in infected goats only 37% of the goat was in these SCC group. Tvarožkova et al. (2023, in press) recorded a higher prevalence in SCC groups in dairy goats in mid and late lactation. In mid lactation stage (n=222) in groups SCC3 $\geq1000<2000$ there were 23 % of half udder milk samples, 36 % in the late lactation stage (n=236) and in SCC4 ≥2000 there were 21% and 12%.In this study, the authors observed significantly higher SCS in milk samples with a pathogen (7.48±0.11) compared with no pathogen (7.16±0.05, $P<0.001$). Corresponding to the frequency of samples distribution in SCC groups is the mean of SCC in milk of involved goats. The SCC at the beginning of lactation

was surprisingly low, the mean SCC in half udder milk samples were 500±1044×10^3 cells.mL^{-1} and SCS 4.02±1.86. Our values were lower than reported Tvarožkova et al. (2021), Tvarožkova et al. (2019) in sheep and Tvarožková et al. (2023, in press) in dairy goats. Additionally, Persson et al. (2014) and Stuhr et al. (2013) reported higher SCS (4.936 ± 0.156 and 5.140 ± 0.040) in half udder milk samples of goats in the early lactation stage. One of the reasons for lower SCC in our study could be caused by high hygiene standards before and during the milking. Before the farmer starts milking, he discarded the first squirts of milk from teats, than cleans the udder with a damp cloth and puts on the milking machine. After milking the farmer applies post-deep on teats. A positive effect of hygiene-sanitary management on SCC and bacteriology quality of goat milk was described by Delgado-Pertiñez et al. (2003).

Figure 1: Frequency of distribution of goat milo samples in SCC groups



The effect of SCC on the composition of goat milk are presented in Table 1. The results of the current study indicated that the SCC of goats in the early lactation stage had a significant effect only on the content of protein, lactose, and not-fat dry matter (P<0.005), where the content of milk components decreases with increasing SCC. Turkmen et al. (2018) presented a significant negative effect of high SCC results in a lower fat content. Also, various studies have reported the negative effect of SCC on milk components, safety, and technical quality of goat milk products (Rupp et al. 2019; Leitner et al. 2016; Silanikove et al, 2014, Sánchez-Macías et al., 2013). Podhorecká et al. (2021) reported that the quality of goat milk may change if SCC>600×10^3 cells. mL^{-1} (SCS 5.58), even if the milk extraction was subject to high hygiene standards and the milk is free of pathogens.

Table 1, Relationship between the composition of goat milk and SCC groups

SCC groups ($\times 10^3$ cells.mL^{-1})			
	SCC1 (<500)	SCC2 (<500≥1000)	SCC3 (≤1000)
Protein (%)	3,26±0,06^{a}	2,94±0,13^{a,b}	2,89±0,12^{b}
Fat (%)	3,37±0,01	3,25±0,28	3,22±0,26
Lactose (%)	4,87±0,03^{a}	4,76±0,07^{a,b}	4,64±0,09^{b}
Not-fat dry matter (%)	8,8±0,11^{a}	8,34±0,19^{a,b}	8,18±0,15^{b}
Dry matter (%)	12,12±0,13	11,57±0,39	11,39±0,35

Within lines, values with different superscripts (a, b, c) are significantly different

Our results (Table 2) showed a statistically significant negative correlation between SCS and lactose (-0.45, P<0.001), SCS and protein (-0.41, P<0.001), and not-fat dry matter (-0.49, P<0.001), compared with Tvarožkova et al (2023, in press), who found statistically significant negative correlations were found between SCS and lactose content (-0.37), and non-fat dry matter (-0.30) (P<0.001) in mid and late lactation stage. A statistically significant negative correlation between SCS and lactose was also found in sheep by Oravcova et al. (2018). Hanuš et al. (2010) described a negative correlation between SCS and lactose in cows, sheep and goats, and this relationship can be used to monitor and prevent mammary gland health disorders in small ruminants such as cows.

Table 2, Pearson correlation

Variables	Fat	Protein	Lactose	Not-fat dry maters	Dry matter
SCS	0.096	-0.41**	-0.45**	-0.49**	-0.21

*P≤0.05, **P≤0.001

CONCLUSION

In conclusion, contrary to the general, that somatic cell counts are very high in goat milk but our results showed opposite trend. High hygiene-sanitary management during milking could be a reason for low SCC in the herd of goats. Nevertheless, we confirmed the negative impact of increased SCC on goat milk composition. Monitoring SCC is an important way to reduce the negative impact of high SCC on goat milk quality and we assume that SCC should be used as an indicator of the poor health of udder, such as it is used in dairy cows.

ACKNOWLEDGEMENT

The research was supported by the APVV-21-0134 "Subclinical mastitis in ewes and goats farms: pathogens, somatic cells and udder morphology" and by the VEGA 1/0597/22 "Aetiology of somatic cell counts changes in the mammary gland of goats: physiological and pathological aspects"and by the GA FAPZ 06/2023.

REFERENCES

1. AULRICH, K. and BARTH K. Intramammary infections caused by coagulase-negative staphylococci and the effect on somatic cell counts in dairy goats. In *Landbauforschung - vTI Agriculture and Forestry Research*. 2008, vol. 58, no. 1-2, pp. 56-64. https://literatur.thuenen.de/digbib_extern/bitv/dk039992.pdf
2. BAGNICKA, E. et al. Relationship between somatic cell count and bacterial pathogens in goat milk. In *Small Ruminant Research*, 2011, vol. 100, no. 1, pp. 72-77, https://doi.org/10 .1016/j.smallrumres.2011.04.014
3. BARRÓN-BRAVO, O. G. et al. Losses in milk yield, fat and protein contents according to different levels of somatic cell count in dairy goats. In *Small Ruminant Research*. 2013, vol. 113, no. 2-3, pp. 421-431. https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2013.04.003
4. CATTANEO, L. et al. Drying-off cows with low somatic cell count with or without antibiotic therapy: A pilot study addressing the effects on immunometabolism and performance in the subsequent lactation. In *Livestock Science*. 2021, vol. 254, pp. 104740, https://doi.org/10.1016/j.livsci.2021.104740
5. DELGADO-PERTINEZ, M. et al. Effect of hygiene-sanitary management on goat milk quality in semi-extensive systems in Spain. In *Small Ruminant Research*. 2003, vol. 47 , no. 1, pp.51-61, https://doi.org/10.1016/S0921-4488(02)00239-0
6. HANUŠ, O. et al. Vztah mezi počtem somatických buněk a obsahem laktózy v mléce různych druhů savců. In *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis.* 2010, vol. LVIII, no. 2, pp. 87–100.
7. JIMENEZ-GRANADO et al. Factors affecting somatic cell count in dairy goats: a review. In *Spanish Journal of Agricultural Research*. 2014, vol. 12, no. 1, pp 133-150, http://dx.doi.org/10.5424/sjar/2014121-3803
8. LEITNER et al. Somatic cell counts, chemical composition and coagulation properties of goat and sheep bulk tank milk. In *International Dairy Journal*. 2016, vol. 58, pp. 9-13, https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2015.11.004
9. LEITNER et al. Effects of intra-mammary bacterial infection with coagulase negative staphylococci and stage of lactation on shedding of epithelial cells and infiltration of leukocytes into milk: Comparison among cows, goats and sheep. In *Veterinary Immunology*

and Immunopathology. 2012, vol. 147, no. 3-4, pp. 202-210, https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2012.04.019

10. MCDOUGALL, S. and VOERMANS, M. Influence of Estrus on Somatic Cell Count in Dairy Goats. In *Journal of Dairy Science.* 2002, vol. 85, no. 2, pp. 378-383. https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(02)74084-8
11. MEHDID, A. O. et al. Effect of stress on somatic cell count and milk yield and composition in goats. In *Research in Veterinary Science*. 2019, vol. 125, pp 61-70. https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2019.05.015
12. MORONI, P. et al. Risk factors for intramammary infections and relationship with somatic-cell counts in Italian dairy goats. In *Preventive Veterinary Medicine*. 2005, vol. 69, no. 3-4, pp. 163 173. https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2004.10.013
13. OLECHNOWICZ, J. and SOBEK, Z. Factors of variation influencing production level, SCC and basic milk composition in dairy goats. In *Journal of Animal and Feed Sciences*. 2008, vol. 17, pp. 41–49, https://doi.org/10.22358/jafs/66468/2008
14. ORAVCOVÁ, M., MAČUHOVÁ, L. and TANČIN, V. The relationship between somatic cells and milk traits, and their variation in dairy sheep breeds in Slovakia. In *Jouranl of Animal and Feed Sciences*. 2018, vol. 27, no. 2, pp 97-104, https://doi.org/10.22358/jafs/90015/2018
15. PAAPE, M. J. et al. Monitoring goat and sheep milk somatic cell counts. In *Small Ruminant Research*. vol. 68, no. 1-2, pp 114-125. https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2006.09.014
16. PERSSON, Y., LARSEN, T. and NYMAN, A. K. Variation in udder health indicators at different stages of lactation in goats with no udder infection. In *Small Ruminant Research*, 2014, vol. 116, no. 1, pp. 51-56. https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2013.10.004
17. PODHORECKÁ, K. et al. Somatic cell count in goat milk: An indirect quality indicator. 2011. In *Foods.*2021, vol. 10, no. 5, pp. 1046. https://doi.org/10.3390/foods10051046
18. SÁNCHEZ-MACÍAS, D. et al. Effects of addition of somatic cells to caprine milk on cheese quality. In *International Dairy Journal*. vol. 29, no 2, pp. 61-67. https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2012.10.010
19. USDA A-APHIS-VS-CEAH Milking Procedures and Milk Quality on U.S. Dairy Goat Operations NAHMS Goat 2019 Study November 2022 [Information Brief-November 2022] 2022, pp. 4, https://www.aphis.usda.gov/animal_health/nahms/goats/downloads/goat19/goat2019-milking-procedures-milk-quality.pdf
20. SILANIKOVE, N. et al. Recent advances in exploiting goat's milk: Quality, safety and production aspects. In *Small Ruminant Research*, 2010. vol. 89, no. 2-3, pp. 110-124. https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2009.12.033

21. SILANIKOVE, N., MERIN U. and LEITNER G. On effects of subclinical mastitis and stage of lactation on milk quality in goats. In *Small Ruminant Research*, 2014. vol. 122, pp. 76-82. https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2014.07.018
22. STUHR, T. et al. Influence of udder infection status on milk enzyme activities and somatic cell count throughout early lactation in goats. In *Small Ruminant Research*, 2013. vol. 111, no. 1-3, pp. 7139-146. https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2012.09.004
23. TURKMEN, N., KANCA, H. and GURSOY A. Effects of Somatic Cell Count in Goat Milk on Some Physical, Chemical and Sensory Properties of Vanilla Ice Cream. In *Atatürk Üniversitesi Vet. Bil. Derg*. 2018, vol. 13, no. 3. pp. 135-140. https://doi.org/10.17094/ataunivbd.360130
24. TVAROŽKOVA, K. et al. Pathogens in milk of goats and their relationship with somatic cell count. In *Dairy Journal research, 2023* [in press]
25. TVAROŽKOVA, K. et al. Mastitis pathogens and somatic cell count in ewes milk. In *Potravinarstvo Slovak Journal of Food Science*, 2020, vol. 14, pp. 164-169.
26. TVAROŽKOVA, K. et al. Mastitis in ewes: somatic cell counts, pathogens and antibiotic resistance. *Journal Microbiology and Biotechnology Food Science*, 2019, vol. 9, no. 3, pp. 661-670.
27. TVAROŽKOVA, K. et al. The presence of pathogens in milk of ewes in relation to the somatic cell counts and subpopulations of leukocytes. In *Czech Journal of Animal Science.* 2021, vol. 66, pp. 315-322.
28. US DHHS-PHS-FDA. Grade "A" Pasteurized Milk Ordinance, Including Provisions from the Grade "A" Condensed and Dry Milk Products and Condensed and Dry Whey—Supplement I to the Grade "A" Pasteurized Milk Ordinance. Public Health Service/Food and Drug Administration, 2019, pp. 3, https://www.fda.gov/media/140394/download
29. ZAMMUNER, F. et al. Effects of month of kidding, parity number, and litter size on milk yield of commercial dairy goats in Australia. In *Journal of Dairy Science*, 2020, vol. 103 no. 1, pp. 954-964. https://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302(19)30925-7/fulltext

Contact address: Gancárová Barbora, Institute of Animal Husbandry, Slovak University of Agriculture in Nitra, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovak republic, E-mail: xgancarova@uniag.sk

NUTRI-SCÓRE A PERSPEKTÍVY OZNAČOVANIA POTRAVÍN

NUTRI-SCORE AND FOOD LABELING PERSPECTIVES

Golian Jozef [1],Vlčko Tomáš[1], Jakabová Silvia[1], Benešová Lucia[2],

[1] Ústav potravinárstva, Fakulta biotechnológie a potravinárstva, Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovenská republika

[2]Výskumné centrum AgroBioTech, Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovenská republika

ABSTRACT

Nutri-Score provides consumers with information about the nutritional quality of foods in a limited, simple and easily visible form. It ranks first for simplicity, usefulness, and is considered influential and helpful in building better menus. Consumers also reported that this labelling is easy to read. Consumers prefer the transparency, simplicity, and comprehensibility of the logo on the front of the food packaging. The goal of Nutri-Score is to have the greatest possible influence on all groups of residents with different socioeconomic status when choosing food. Nutri-Score has support in all population groups, but especially among people with less knowledge about nutrition. Consumers do not have time to read the information on the back of the package when buying food. The presence of Nutri-Score on the packaging could thus help consumers to make more appropriate food choices. In our work, we deal with the application of Nutri-Score in cheeses.

Key words: Nutri-Score, cheese, consumer preferences, nutritional information

ÚVOD A PREHĽAD LITERATÚRY

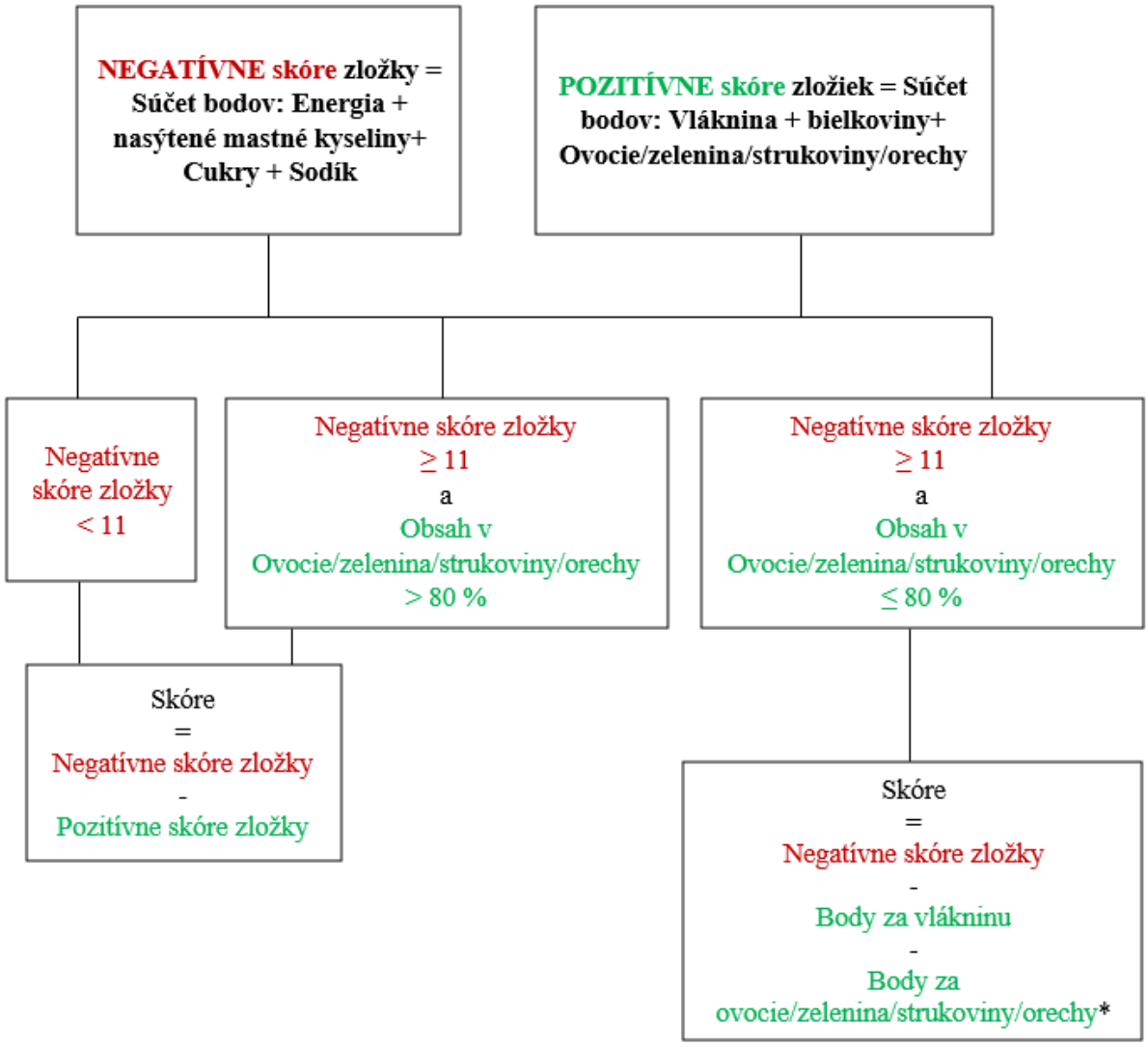
Legislatíva označovania potravín sa stanovuje na národnej a európskej úrovni. Národná legislatíva je špecifická v každom štáte a zaoberá sa konkrétnymi požiadavkami. Naopak európska legislatíva sa týka označovania potravín vo všetkých štátoch Európskej únie (EÚ). Niektoré európske predpisy sa čiastočne premietajú aj do národnej legislatívy. Nariadenie Európskeho parlamentu a Rady (EÚ) č. 1169/2011 o poskytovaní informácií o potravinách spotrebiteľom sa týka požiadaviek a povinností v oblasti informácií uvedených na potravinách, ktoré musia spĺňať definovanú veľkosť písma. Toto nariadenie ukladá výrobcom povinnosť uvádzať na všetky obaly potravín EÚ výživové údaje. Povinne musia byť uvedené informácie o energetickej hodnote, množstve tukov, nasýtených tukov, sacharidov, cukrov, bielkovín a soli na 100 g alebo 100 ml výrobku. Najčastejšie sú zobrazené v tabuľke alebo v riadku vedľa seba.

Podľa Nariadenia Európskeho parlamentu a Rady (EÚ) č. 1169/2011 môžu byť najdôležitejšie informácie zo zadnej strany obalu potravín dobrovoľne uvedené aj na prednej strane obalu, aby boli pre spotrebiteľov lepšie viditeľné (Nariadenie EP a R 1169/2011). Na tento účel sa používajú rôzne systémy označovania potravín na prednej strane obalu, ktoré môžu byť zobrazené v grafickej podobe alebo ako symbol (Storcksdieck, et al., 2020). Označovanie potravín na prednej strane obalu je teda nepovinné. Je možné ho dobrovoľne používať, ale informácie uvedené na obale potravín nesmú byť zavádzajúce alebo chybné (Dereň, et al., 2021). Kvôli jeho dobrovoľnosti možno nájsť v rôznych krajinách odlišné typy log na prednej strane obalu pri potravinách (Gabor, et al., 2020). Tiež sa objavujú obavy, že sa v prípade dobrovoľného nutričného označovania niektoré štáty EÚ nezúčastnia, preto je potrebné zaviesť povinný celoeurópsky prístup (Nutri-Score could become EU's front-of-pack nutrition labelling scheme if underlying algorithm is revised, 2022).

Nutri-Score u potravín a nápojov

V prípade zavedenia povinného označovania Nutri-Score by sa toto logo nenachádzalo na všetkých potravinách a nápojoch. Nutri-Score sa vzťahuje na potraviny, u ktorých musia byť povinne označené výživové údaje na zadnej strane obalu. U niektorých označených potravín, ale existujú výnimky. Príkladom je dojčenská výživa určená pre deti 0-3 roky, vzhľadom na odlišné odporúčania pre deti a dospelých a tiež kvôli obsahu tuku, ktorý by mohol ovplyvniť výsledok Nutri-Score.

Výpočet Nutri-Score



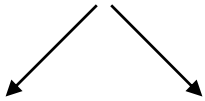
Špeciálne úpravy nápojov, syrov a pridaných tukov

* V prípade, že výrobok obsahuje negatívnu zložku, ktorá má skóre ≥ 11 a nie je zložená z viac ako 80 % ovocia/zeleniny/orechov, bielkoviny sa už pri výpočte nutričného skóre nezohľadňujú.

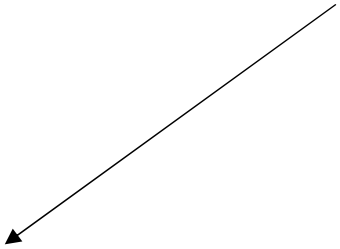
Výpočet Nutri-Score syra na príklade syru Camembert

Obsah bielkovín v syroch, ktorý by mal odrážať obsah vápnika, sa (čiastočne) zohľadňuje bez ohľadu na ich negatívne skóre.

Výživové údaje	na 100 g
Energia	1 117 kJ 269 kcal
Tuky / z toho nasýtené tuky	21 g / 15 g
Sacharidy / z toho cukry	Stopy
Bielkoviny	20 g
Soľ	1,4 g



Negatívna zložka					**Pozitívna zložka**			
BODY	Energetická hodnota (kJ/100 g)	Nasýtené tuky (g/100 g)	Cukry (g/100 g)	Sodík* (mg/100 g)	BODY	Ovocie, zelenina, strukoviny, orechy (g/100g) (%)	Vláknina (g/100 g) Metóda AOAC	Bielkoviny
0	≤ 335	≤ 1	**≤ 4,5**	≤ 90	**0**	**≤ 40**	**≤ 0,9**	≤ 1,6
1	> 335	> 1	> 4,5	> 90	1	> 40	> 0,9	> 1,6
2	> 670	> 2	> 9	> 180	2	> 60	> 1,9	> 3,2
3	**> 1005**	> 3	> 13,5	> 270	3	-	> 2,8	> 4,8
4	> 1340	> 4	> 18	> 360	4	-	> 3,7	> 6,4
5	> 1675	> 5	> 22,5	> 450	**5**	> 80	> 4,7	**> 8,0**
6	> 2010	> 6	> 27	**> 540**				
7	> 2345	> 7	> 31	> 630				
8	> 2680	> 8	> 36	> 720				
9	> 3015	> 9	> 40	> 810				
10	> 3350	**> 10**	> 45	> 900				
* obsah sodíka zodpovedá obsahu soli vedenom v povinnom údaji vydelenému číslom 2,5								
Výsledné skóre = negatívna zložka (0+3+6+10=19) – pozitívna zložka (0+0+5=5) = **14**								



Trieda	**Skóre**
A	**minimum -1**
B	**0 – 2**
C	**3 – 10**
D	**11 – 18**
E	**19 a viac**

Korelácia proteín/vápnik sa v skutočnosti neberie do úvahy

Korelácia vápnik-proteín sa berie do úvahy len pri syroch s nízkym obsahom bielkovín (<8g/100g), a teda nízkym obsahom vápnika.

Tabuľka 1 Priemerné nutričné zloženie pre 16 250 syrov

Nutričné info	Priemer	Štandardný rozdiel	10. percentil	Medián	90. percentil
Energia	1 360 kJ (328 kcal)	313 kJ (75 kcal)	682 kJ (75 kcal)	1 420 kJ (343 kcal)	1 750 kJ (418 kcal)
Tuk (nasýtené tuky)	26,3 g (17,6 g)	6,56 g (4,62 g)	12 g (7,2 g)	28 g (19 g)	35 g (23 g)
Bielkoviny	20,2 g	6,24 g	8 g	21 g	28 g
Soľ	1,3 g	0,541 g	0,48 g	1,32 g	2,1 g
Vápnik	546 mg	273 mg	130 mg	520 mg	993 mg

Zdroj: (https://fr.openfoodfacts.org/categorie/fromages)

Tabuľka 2 Bodové hodnotenie nutričných zložiek z tab. 1

Body	Energetická hustota (kJ/100 g)	Nasýtený tuk (g/100 g)	Sodík (mg/100 g)	Ovocie, zelenina, strukoviny a orechy	Vláknina (g/100 g)	Bielkoviny (g/100 g)
0	0	0	0	0	0	0
1	335	1	90	40	0,9	1,6
2	670	2	180	60	1,9	3,2
3	1005	3	270	-	2,8	4,8
4	1340	4	360	-	3,7	6,4
5	1675	5	450	80	4,7	8
6	2010	6	540			
7	2345	7	630			
8	2680	8	720			
9	3015	9	810			
10	3350	10	900			
90 % syrov má vyšší obsah bielkovín na 8 g / 100 g (medián 21 g), a preto nemôžu mať prospech z úpravy ich skutočného obsahu vápnika						

Tabuľka 3 Klasifikácia syra podľa Nutri-Score

	Údaje spoločnosti	Údaje Ciqual	Údaje Eurofir Francúzsko	Údaje OpenFoodFacts Francúzsko
Počet produktov	550	93	113	15 882**
A	0 %	0 %	2,65 %**	2,74 %**
B	0,73 %	0 %	3,54 %**	2,75 %
C	7,64 %	2,15 %	7,96 %	10,59 %
D	87,82 %	90,32 %	80,53 %	77,32 %
E	3,82 %	7,53 %	5,31 %	6,60 %

* Dréano-Trécant, L.; Egnell, M.; Hercberg, S et al. Nutrients 2020, 12, 1303.

https://doi.org/10.3390/nu12051303

** Fresh cheese (quark, cottage cheese), which are however not considered as cheeses for the calculation of the Nutri-Score: https://www.santepubliquefrance.fr/media/files/02-determinants-de-sante/nutrition-et-activite-physique/nutri-score/qr-scientifique-technique

Takmer 90 % syrov sú zaradené v triedach D a E a viac ako 80 % v triede D.

Rozmanitosť zloženia syrov klasifikovaných ako D

Skóre je rovnaké v prípade syra s vysokým obsahom tuku, nízkym obsahom bielkovín a vápnika v porovnaní so syrom s nižším obsahom tuku a bohatým na bielkoviny a vápnik.

Tabuľka 4 Zloženie a rozmanitosť syrov klasifikovaných ako D

	Ľahko strúhaný syr	Nátierkový syr	Ementál	Maroilles
Tuky (g/100 g)	**15**	**40**	29	26
Bielkoviny (g/100 g)	**30**	**8**	27	21
Soľ (g/100 g)	0,8	1,3	**0,75**	**2,3**
Vápnik (mg/100 g)	950	**80**	**1 000**	580
Skóre (Nutri-Score) D	11	15	12	18

Syry s 15 až 40 % tuku; 0,1 až 2,5 % soli; 6 až 33 % bielkovín a 90 až 1000 mg Ca / 100 g sú všetky zaradené do triedy D.

Ako zlepšiť koreláciu proteín/vápnik

Ak chceme docieliť zahrnutie obsahu bielkovín ako markera obsahu vápnika, tak stupnica kladných bodov pre bielkoviny by sa mala rozšíriť minimálne na mediánovú hodnotu (21 %) a nemala by sa zastaviť na ôsmich percentách – viď nižšie.

Body	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Bielkoviny (g/100 g)	0	1,6	3,2	4,8	6,4	8	9,6	11,2	12,8	14,4	16	17,6	19,2	20,8

Zaradenie syrov v strave Francúzov (g/d)

Množstvo skonzumovaného vápnika sa blíži k odporúčanému a vysokému príjmu vápnika

Vek	4-6 r.	7-10 r.	11-14 r.	15-17 r.	18-44 r.	45-64 r.	65-79 r.
Denná konzumácia v g/deň	17,0	19,8	18,4	17	28,4	33	36,9

U dospelých vo veku 18 až 79 rokov tvorí konzumácia syrov celkovo 19 % príjmu vápnika, čo predstavuje prvé miesto medzi mliečnymi výrobkami a výrobkami celkovo

Zdroj: (Národný prieskum individuálnej spotreby potravín 3 (INCA 3))

Správne používanie Nutri-Score

Aby mohlo byť Nutri-Score u populácie účinné, musí byť spotrebiteľovi vždy hodnotené v rámci jednej potravinovej skupiny. Spotrebiteľ nemá dôvod porovnávať hodnotu Nutri-Score u rôznych potravinových skupín. Pokiaľ má záujem o cereálie, bude sa pozerať na hodnotu Nutri-Score u cereálií a nemá zmysel sledovať hodnotu Nutri-Score u sladených nápojov. Cieľom je, aby mu Nutri-Score jednoducho a rýchlo pomohlo rozpoznať potravinu, ktorá bude mať najviac priaznivé zloženie v porovnaní s ostatnými (Nutri-Score blog, 2022).

Podľa výsledkov štúdie vykonanej v Nemecku bolo Nutri-Score schopné rozlišovať variabilitu potravín v rámci rovnakých potravinových skupín. V každej skupine potravín sa nachádzali aspoň 3 farby zo škály Nutri-Score. Z toho možno vydedukovať, že majú spotrebitelia pri výbere možnosť vybrať si z ponúkaných potravín tú s lepším skóre.

Nie je isté, či spotrebitelia, ktorí by si vyberali iba lepšie hodnotené výrobky označené hodnotou Nutri-Score A, B môžu dosiahnuť vyváženú stravu. Ich strava by sa tak mohla stať aj deficitnou (Brát, 2021).

V rámci bežnej a vyváženej stravy sa nemajú konzumovať iba výrobky s Nutri-Score A, B, ale je v poriadku konzumovať aj výrobky zaradené do kategórií C, D a E. Je ale dôležité vedieť , že by sme ich mali konzumovať v menšom množstve alebo menej často (Hercberg et al., 2021).

Bolo zistené, že účinnosť Nutri-Score je nižšia, ak sa nachádza iba na niektorých potravinách. Vo Francúzsku bolo Nutri-Score prítomné dva roky po oficiálnom prijatí iba na 25 % potravín. Zároveň môže byť problémom, že výrobky s nízkou výživovou hodnotou pravdepodobne nebudú označené nutričným označovaním. „Dôkazy teda jasne naznačujú, že je potrebné prijať povinný prístup, aby sa zabezpečilo označovanie FOP u všetkých potravín vrátane tých, ktoré majú vysoký obsah tukov, cukrov alebo soli“ (Nutri-Score could become EU’s front-of-pack nutrition labelling scheme if underlying algorithm is revised 2022).

Ďalej je dôležité si uvedomiť, že Nutri-Score hodnotí nutričnú hodnotu predávaných potravín, nie pripravených. Je teda logické, že kupované mrazené hranolky (bez iných úprav) majú Nutri-Score A, pretože to sú iba nakrájané zemiaky. To, ako si ich spotrebiteľ ďalej pripraví, aký na to použije olej už je individuálne a nemá to nič spoločné s týmto logom (Five Nutri-Score myths busted, 2019).

Ako už bolo spomenuté, Nutri-Score nechce potraviny rozdeľovať na zdravé a nezdravé, pretože vždy závisí od množstva, frekvencie konzumácie danej potraviny a tiež od celkového zloženia stravy spotrebiteľa. Jeho cieľom je skôr informovať spotrebiteľa o vhodnejšom výrobku v rámci jednej kategórie potravín (Hercberg et al., 2021).

Pokiaľ by bol systém Nutri-Score povinne zavedený, je nutné, aby boli spotrebitelia dostatočne edukovaní o tom, ako Nutri-Score rozumieť a ako ho používať.

ZÁVER

Nutri-Score neslúži ako návod na zostavenie vyváženej stravy, nezohľadňuje obsah všetkých potrebných živín a individuálne potreby zákazníka. Syry zahŕňajú široký sortiment výrokov, ktoré sa od seba odlišujú obsahom tuku, bielkovín, mastných kyselín ale aj vápnika. Výpočet Nutri-Score u syrov je pomerne zložitý. Na druhej strane poskytuje objektívnejšie informácie o ich nutričnej hodnote aj napriek kritike postupu výpočtu. Rozlíšenie syrov podľa ich zloženia umožňuje spotrebiteľom pri nákupoch sa rozhodnúť aký druh syra si kúpiť. To je vlastne hlavný cieľom Nutri-Score, aby si spotrebiteľ mohol porovnať nutričnú hodnotu v rámci daného druhu výrobku a nie porovnávať hodnotu Nutri-Score medzi rozdielnymi výrobkami.

LITERATÚRA

1. Brát, J. 2021. Hlubší pohled do systému Nutri-Score - Databáze reformulovaných potravin a nápojů. Published 11 2021. Accessed February 16, 2022. http://reformulace.cz/index.php/ informace-pro-spotrebitele/aktualne/145-hlubsi-pohled-dosystemu-nutri-score
2. Dereń, K., Dembiński, Ł., Wyszyńska, J., et al. 2021. Front-Of-Pack Nutrition Labelling: A Position Statement of the European Academy of Paediatrics and the European Childhood Obesity Group. *Ann Nutr Metab*. 77 (1):23-28. doi:10.1159/00051433
3. Dréano-Trécant L, Egnell M, Hercberg S, Galan P, Soudon J, Fialon M, Touvier M, Kesse-Guyot E, Julia C. Performance of the Front-of-Pack Nutrition Label Nutri-Score to Discriminate the Nutritional Quality of Foods Products: A Comparative Study across 8 European Countries. Nutrients. 2020 May 2;12(5):1303. doi: 10.3390/nu12051303. PMID: 32370277; PMCID: PMC7284849.
4. Five Nutri-Score myths busted. Published December 20, Accessed February 11, 2022. https://www.beuc.eu/ publications/five-nutri-score-myths-busted
5. Hercberg, S., Touvier, M., Salas-Salvado, J., 2021. On behalf of the G of E scientists supporting the implementation of NS in E. The Nutri-Score nutrition label. *Int J Vitam Nutr Res*. Published online July 27, doi:10.1024/0300-9831/a000722

6. Label Nutri-Score across the French Population: Evolution of Awareness, Support, and Purchasing Behaviors between 2018 and 2019. *Nutrients*. 12(9):E2887. doi:10.3390/nu12092887
7. Label: History: Nutrition label. Food labelling, a tool to help improve the food literacy of costumers. Accessed, March 26, 2022. http://www.foodlabel.org.uk/label/history.aspx
8. Nariadenie Európskeho parlamentu a Rady (EÚ) č. 1169/2011 z 25. októbra 2011 o poskytovaní informácií o potravinách spotrebiteľom, o zmene nariadenia Európskeho spoločenstva parlamentu a Rady (ES) č. 1924/2006 a (ES) č. 1925/2006 a o zrušení smernice Komisie 87/250/EHS, smernice Rady 90/496/EHS, smernice Komisie 1999/10/ES, smernica Európskeho parlamentu a Rady 2000/13/ES, smerníc Komisie 2002/67/ES a 2008/5/ES a nariadenia Komisie (ES) č. 608/2004
9. Nutri-Score blog. Why Nutri-Score is computed on the basis of 100g of food and not per serving (as requesteded by manufacturers) ? NUTRI-SCORE. Published December 2, 2021. Accessed February 16, 2022. https://nutris-core.blog/2021/12/02/why-nutri-score-is-computed-on-the-basis-of-100g-offood-and-not-per-serving-as-requesteded-by-manufacturers/
10. Nutri-Score frequently asked questions. Published online April 1, 2022. Accessed April 15, 2022. https://www.santepubliquefrance.fr/determinants-de-sante/nutrition-et-activite-physique /articles/nutri-score
11. Nutri-Score could become EU's front-of-pack nutrition labelling scheme if underlying algorithm is revised. Accessed February 3, 2022. https://ehnheart.org/publications-and-papers/position-papers-and-statements/1283: nutri-score-could-become-eu%E2%80%99s-front-of-pack-nutrition-labelling-if-its-underlying-algorithm-is-revised.htm
12. Nutri-Score frequently asked questions. Published online April 1, 2022. Accessed April 15, 2022. https://www.santepubliquefrance.fr/determinants-de-sante/nutrition-et-activitephysique/ articles/ nutri-scor.
13. Nutrition Label Nutri-Score to Discriminate the Nutritional Quality of Foods Products: A Comparative Study across 8 European Countries. Nutrients. 12(5):1303. doi:10.3390/nu1 2051303
14. Storcksdieck Genannt Bonsmann, S., Marandola, G., Ciriolo, E., Van Bavel, R., Wollgast, J. Front-of-pack nutrition labelling schemes: a comprehensive review. JRC Publications Repository. doi:10.2760/436998

15. Systematic review and integration of definitions and models. *BMC Public Health*. 12(1):80. doi:10.1186/1471-2458-12-80

Kontaktná adresa: prof. Ing. Jozef Golian, Dr. Ústav potravinárstva, Fakulta biotechnológie a potravinárstva SPU v Nitre, Tr. A. Hlinku 2, 949 01 Nitra. E-mail: jozef.golian@uniag.sk

VÝZNAM HYGIENY PROSTREDIA PRI VÝSKYTE MASTITÍD V CHOVE DOJNÍC

THE IMPORTANCE OF ENVIRONMENTAL HYGIENE IN THE OCCURRENCE OF MASTITIS IN DAIRY FARMING

Gregová Gabriela[1], Szabóová Tatiana[1], Dančová Nikola[1], Výrostková Jana[2]

[1]Katedra verejného veterinárskeho lekárstva a welfare zvierat,

[2]Katedra hygieny, technológie a zdravotnej bezpečnosti potravín, Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, Komenského 73, 041 81 Košice, Slovenská republika

ABSTRACT

Mastitis of dairy cows is causing economic losses due to reduced milk production and the cost of the treatment and culling of dairy cows. In the control of environmental mastitis, it is important to maintain cleanliness, a suitable microclimate in animal housings, ventilation, and hygiene during the milking process.

The aim of our work was to compare the relationship between the occurrence of mastitis on individual dairy farms, the cleanliness of the environment, and air contamination. The minimum inhibitory concentration (MIC) for antibiotics was determined for isolated *E. coli* isolates from the breeding environment and from milk samples from cows with environmental mastitis.

We found a high concentration of airborne microorganisms - more than 10^5 KTJ·m^{-3} and coliform bacteria ($0{,}3 \cdot 10^3$ KTJ·m^{-3} to $4 \cdot 10^3$ KTJ·m^{-3}). Faecal environmental contamination of animal houses was lower in housing systems with deep litter and in resting boxes with straw bedding. *E. coli* isolates from environmental samples and from milk samples from cows with mastitis showed similar MIC values for antibiotics (ampicillin and tetracycline), which correlate with consumption of ATB in Slovakia.

Key words: mastitis, antibiotic resistance, *E. coli*

ÚVOD

Mikroklíma maštaľného prostredia významne vplýva na zdravotný stav zvierat, úžitkovosť ako aj ich celkovú pohodu, welfare ustajnených zvierat. Úroveň hygieny chovu zvierat poukazuje na vyspelosť chovateľov, ale súčasne výrazne ovplyvňuje výsledky dosahované v živočíšnej výrobe (MAREKOVÁ a kol., 2006).

Nedostatky v hygiene ustajňovacieho prostredia sú nebezpečné, pretože sa prejavujú v zdravotnom stave zvierat skryte, pomalšie a znižujú kvalitu potravinárskych produktov. (PARA a kol., 1992).

V súčasnosti environmentálne mastitídy zostávajú veľkým problémom v chovoch dojníc. Environmentálne organizmy sa nachádzajú v podstielke, pôde, na pastvinách, ako aj iných povrchoch chovu. Bežnými zdrojmi týchto mikroorganizmov sú organické podstielkové materiály, ako je slama, drevené hobliny, recyklovaný hnoj alebo podlaha kontaminovaná hnojom. Environmentálne mastitídy spôsobujú hlavne mikroorganizmy ako *Streptococcus* spp. (okrem *Strep. agalactiae*), *Staphylococcus* spp. (okrem *Staph. aureus*), koliformné baktérie, *E. coli* a *Klebsiella* spp. a iné. Tieto patogény môžu byť často rezistentné na antibiotiká, čo komplikuje liečbu. Pri kontrole environmentálnych mastitíd je dôležité udržiavanie čistoty prostredia maštale, vhodnej mikroklímy chovu, vetrania a hygieny počas dojenia. Ustajnenie, podstielka a iné kontaktné povrchy s kravami musia byť čisté a suché. Welfare kráv je kľúčovým faktorom pri znižovaní rizika environmentálnych mastitíd, preto je dôležité zabezpečiť, aby sa im zabezpečili ustajňovacie priestory s primeraným množstvom čistej a suchej podstielky a taktiež pravidelnou úpravou a výmenou (BURVENICH et al., 2003).

Pravidelné čistenie a dezinfekcia povrchov spôsobuje redukciu mikroorganizmov v chove, ale znižuje aj možnosť kontaminácie maštaľného vzduchu a šírenie infekcií do okolia.

Cieľom našej práce bolo porovnanie vzťahu medzi výskytom mastitíd v jednotlivých chovoch dojníc, čistotou prostredia a kontamináciou vzduchu. U izolovaných *E. coli* izolátov z prostredia chovu a zo vzoriek mlieka od kráv s environmentálnou mastitídou bola zisťovaná minimálna inhibičná koncentrácia (MIC) na antibiotiká.

MATERIÁLY A METÓDY

Boli sledované jednotlivé mikroklimatické, hygienické parametre v spojení s výskytom mastitíd na 3 farmách dojníc s kapacitou nad 200 ks s ustajnením v ležiskových boxoch pristieľaných slamou, na hlbokej podstielke alebo v ležiskových boxoch s gumeným matracom. Počas 4 mesačného obdobia sa na každej farme uskutočnili celkovo 3 návštevy. Na farmách boli odoberané vzorky mlieka od kráv s klinickou a subklinickou mastitídou a taktiež vzorky exkrementov. Po nariedení boli vzorky naočkované na mäsopeptónový agar, endo agar a suspektné *E. coli* kolónie boli potvrdené Enterotestom 24N.

Odber vzoriek vzduchu bol vykonaný pomocou aeroskopu MAS 100 Eco na štandardnú Petriho misku s agarom (mäsopeptónový agar, endo agar, sabouraud agar).

Fyzikálne faktory prostredia boli merané pomocou prístrojov Testo a koncentrácie plynov prístrojom MultiRae.

Minimálne inhibičné koncentrácie (MIC) na antibiotiká u *E. coli* izolátov boli stanovené podľa CLSI 2018: VET01-S2 s použitím mikrodilúčneho testu (EUCAST, 2017) a výsledky boli odčítané pomocou softvéru MIDITECH.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Nameraná teplota vnútorného prostredia vo všetkých sledovaných objektoch bola v rozmedzí od 13°C do 25°C, čo predstavuje optimálne podmienky z hľadiska welfare a zdravia hovädzieho dobytka. Relatívna vlhkosť bola v rozmedzí od 75-88%, pričom zvýšená vlhkosť môže mať pozitívny vplyv na rast mikroorganizmov v podstielke aj vo vzduchu. Maštale boli obojstranne prirodzene prevetrávané so zvýšenou rýchlosťou prúdenia vzduchu (0,6 - 0,8 $m \cdot s^{-1}$ a v nárazoch až 1,5 $m \cdot s^{-1}$). V ustajnení s hlbokou podstielkou bolo prúdenie vzduchu nižšie 0,4-0,5 $m \cdot s^{-1}$.

Maštaľné plyny boli vo všetkých sledovaných ustajňovacích objektoch v norme - indikátory hygieny ovzdušia NH_3 sa pohybovali do 5 ppm (norma max. 25 ppm), CO_2 od 400 do 600 ppm (norma je max. 3000 ppm) a H_2S bolo 0 ppm .

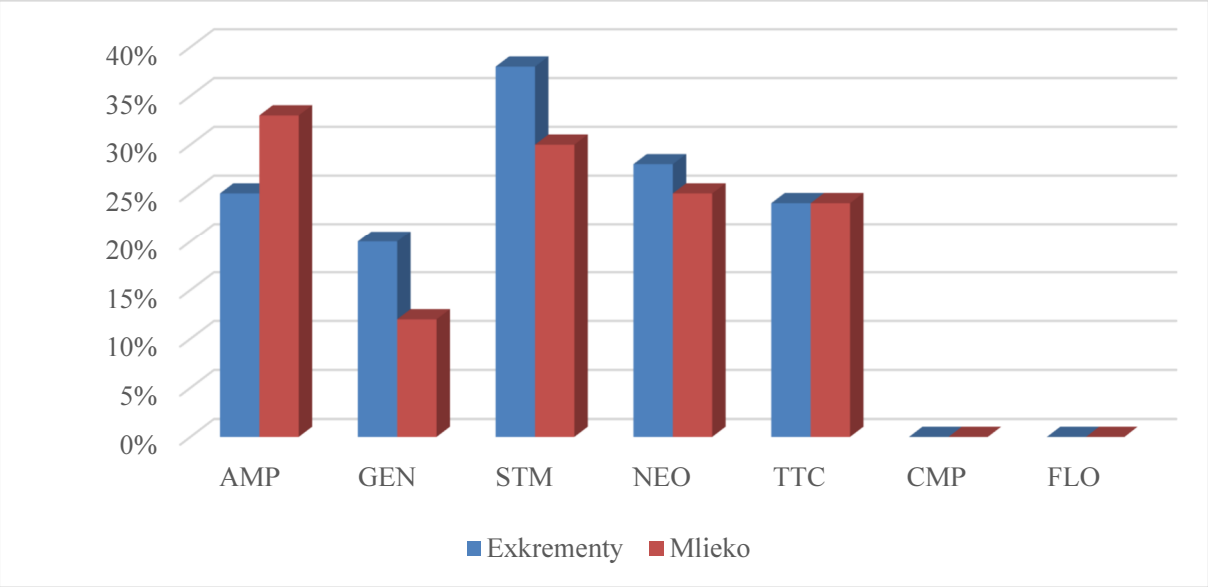
Tabuľka 1 Priemerné hodnoty mikroorganizmov vo vzduchu a na podlahe v rôznych typoch ustajnenia

ODBEROVÉ MIESTO	Mikrobiálna kontaminácia vzduchu (KTJ/m³)		Mikrobiálna kontaminácia ležoviska (KTJ/g)		
Ustajnenie	CPM	KB	CPM	KB	FKB
Ležiskové boxy – podstielka slama	$7,3 \cdot 10^4$	$0,3 \cdot 10^3$	$5 \cdot 10^5$	$4,3 \cdot 10^4$	$7,5 \cdot 10^2$
Hlboká podstielka	$>10^5$	$4 \cdot 10^3$	$6,5 \cdot 10^5$	$1,5 \cdot 10^4$	$4,3 \cdot 10^4$
Ležiskové boxy – gumený matrac	$>10^5$	$3,7 \cdot 10^3$	$3 \cdot 10^6$	$4,3 \cdot 10^4$	$2,5 \cdot 10^4$

CPM – celkové počty mikroorganizmov
KB – koliformné baktérie
FKB – fekálne koliformné baktérie
KTJ – kolónia tvoriaca jednotku

Vo všetkých chovoch boli zistené vysoké hodnoty vzdušných mikroorganizmov - celkový počte mikroorganizmov v rozmedzí od $7,3 \cdot 10^4$ $KTJ \cdot m^{-3}$ do viac ako 10^5 $KTJ \cdot m^{-3}$ a koliformné baktérie od $0,3 \cdot 10^3$ $KTJ \cdot m^{-3}$ do $4 \cdot 10^3$ $KTJ \cdot m^{-3}$ (Tab. 1).

Mikrobiálna kontaminácia prostredia – ležoviska bola najnižšia v chove s použitím podstielky alebo ležiskových boxov s pristieľaním slamou, a to celkových počtoch mikroorganizmov, koliformných baktérií aj fekálnych koliformných baktérií.



Graf 1 Percento rezistencie u *E. coli* kmeňov z izolovaných z prostredia chovu a zo vzoriek mlieka s mastitídou

Izoláty *E. coli* zo vzoriek z exkrementov aj vzoriek mlieka od kráv s mastitídou vykazovali podobné hodnoty MIC na antibiotiká (Graf 1). Vyššia bola rezistencia na ampicilín, streptomycín, neomycín, tetracyklín a gentamycín čo koreluje so spotrebou ATB na Slovensku.

Medzi najpoužívanejšie antibiotiká na Slovensku patria už dlhodobo penicilíny, makrolidy, linkozamidy, streptogramíny a cefalosporíny (EMA 2020).

I keď sa v posledných rokoch na Slovensku znížila spotreba veterinárnych antibiotík. Najpredávanejšími antibiotikami na veterinárne účely sú tetracyklíny, penicilíny, sulfónamidy, pleuromutilíny a fluórochinolóny. V období rokov 2011 až 2018 došlo k poklesu troch najpredávanejších antimikrobiálnych tried – tetracyklíny (46 %), penicilíny (14 %) a sulfónamidy (52 %) (EMA 2020). Z celkového predaja antimikrobiálnych látok bolo približne 41% použitých v chovoch hovädzieho dobytka. Odhaduje sa, že 81% cefalosporínov, 65% sulfonamidov, 45% aminoglykoidov a 42% tetracyklínov bolo určených na použitie u hovädzieho dobytka (FDA 2020).

V chove hospodárskych zvierat, ale taktiež aj v rastlinnej výrobe (ovocné sady) je používaných množstvo identických alebo úzko príbuzných s antimikrobiálnymi látkami používanými v humánnej medicíne. Antibiotiká sa u zvierat používajú na liečbu, profylaxiu infekčných chorôb, metafylaxiu a v minulosti boli používané ako rastové promótory (Guardabassi et al. 2008).

V dôsledku selekčného tlaku prostredia, nadmerného a nesprávneho používania antibiotík v humánnej a veterinárnej praxi došlo v priebehu niekoľkých desaťročí k vzniku rezistencie baktérií voči antibiotikám, pričom bakteriálna populácia môže odolávať účinku inhibičnej koncentrácie danej skupiny antimikrobiálnych liečiv (Čonková et al. 2009).

HILLE a kolektív (2017) zistili, že menej intenzívne chovy (do 500 kusov dobytka) v porovnaní s veľkými farmami (nad 500 kusov dobytka) v kombinácii s lepšou hygienou u hovädzieho dobytka bol spojený s nižšou prevalenciou antibiotiko rezistentných baktérií. Medzi faktory pozitívne ovplyvňujúce výskyt antimikrobiálnej rezistencie na farmách zvierat je nižší počet ustajňovacích objektov, dĺžka výkrmu viac ako 18 mesiacov, kŕmenie senom a manuálne čistenie (Markland et al. 2019). Podobne Schmid a kolektív (2013) detekovali na farmách nakupujúcich veľké množstvo dobytka vyššiu mieru výskytu ESBL pozitívnych *E. coli* izolátov.

ZÁVER

Mastitída je nákladné ochorenie u dojníc v dôsledku zníženia produkcie mlieka, nákladov na liečbu a vyradenie dojníc. Použitie antibiotík na liečbu mastitídy môže byť zavedené po diagnóze založenej na detekcii zvýšeného počtu somatických buniek v mlieku. Zanedbávanie hygieny chovu a zhoršená mikroklíma sa však nedá nahradiť zvýšeným podávaním antimikrobiálnych látok. Pravidelné čistenie a dezinfekcia povrchov spôsobuje redukciu mikroorganizmov a následný pokles výskytu mastitíd.

POĎAKOVANIE

Táto práca bola podporovaná projektom KEGA 001UVLF-4/2022.

POUŽITÁ LITERATÚRA

1. BURVENICH Christian, Merris Valérie van, Mehrzad Jalil, Diez-Fraile Araceli, Duchateau Luc. Severity of E. coli mastitis is mainly determined by cow factors. Veterinary Research, 2003, 34 (5), pp.521-564.
2. CLSI document VET01-S2 Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals. 1–168 (Publ. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, 2013).
3. ČONKOVÁ, E. et al. Quinolones from the point of view of pharmacology and veterinary indications (A Review). In *Folia veterinaria.* ISSN 0015-5748, 2009, vol. 53, no. 4, s. 175-185.

4. EMA, European Medicines Agency; *Sales of veterinary antimicrobial agents in 31 European countries in 2018.* 10th ESVAC Report. EMA : Amsterdam, 2020. 101 p. ISBN 978-92-9155-265-4.
5. EUCAST guidelines for detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical and/or epidemiological importance. Version 2.0, 1–43 (2017).
6. FDA. Food and Drug Administration. 2019 *Summary report on antimicrobials sold or distributed for use in food-producing animals.* 2020, 49 p. https://www.fda.gov/media/154820/download>.
7. GUARDABASSI, L., JENSEN, L.B., KRUSE, H. *Antimicrobial use in animals*. Oxford : Blackwell Publishing, 2008. p. 240. ISBN 978-1-4051-5079-8.
8. HILLE, K. et al. Cefotaxime-resistant E. coli in dairy and beef cattle farms-Joint analyses of two crosssectional investigations in Germany. In *Prev. Vet. Med.* ISSN: 01675877, 2017, 142, p. 39-45.
9. MAREKOVÁ, J. a kol. Prevencia a riešenie behaviorálnych problémov domestikovaných zvierat, In: Sborník z VIII. Konference mladých vedeckých pracovníku s medzinárodnou účastí, Brno, 2006, s. 17000-173, ISBN 80-7305-564-3).
10. MARKLAND, S. et al. High Prevalence of cefotaxime resistant bacteria in grazing beef cattle: a cross sectional study. In *Front. Microbiol*. ISSN 1664-302X, 2019, vol. 10, no. 176.
11. PARA, Ľ. a kol. Zoohygiena, Hygiena ovzdušia. Vydavateľstvo Magnus, Košice, 1992, s. 1-44, ISBN 80-85569-05-1.
12. SCHMID, A. et al. Prevalence of extendedspectrum beta-lactamase-producing Escherichia coli on Bavarian dairy and beef cattle farms. In *Appl. Environ. Microbiol*. ISSN: 0099-2240, 2013, vol. 79, p. 3027-3032

Kontaktná adresa: Gabriela Gregová, Department of Public Veterinary Medicine and Animal Welfare, University of Veterinary Medicine and Pharmacy in Košice, Komenského 73, 04181 Košice, Slovak Republic; E-mail: gabriela.gregova@uvlf.sk

ANTIBIOFILMOVÁ AKTIVITA QUERCETÍNU A POMIFERÍNU VOČI IZOLÁTOM *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* POCHÁDZAJÚCICH Z MLIEKA DOJNÍC

ANTIBIOFILM ACTIVITY OF QUERCETIN AND POMIFERIN AGAINST *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* ISOLATED FROM MILK OF DAIRY COWS

Hajdučková Vanda, Király Ján, Lauko Stanislav, Hudecová Patrícia, Pilipčinec Emil

Katedra mikrobiológie a imunológie, Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, Komenského 73, 041 81 Košice, Slovenská republika

ABSTRACT

Mastitis is a multifactorial disease, it is a significant health, production, and economic problem in cattle farms. An important causative agent of clinical and subclinical mastitis is *Staphylococcus aureus*, whose main virulence factor is the ability to form a biofilm, which in bacteria is also associated with resistance to antibiotics. Of the 55 isolates of staphylococci that came from the milk of dairy cows with subclinical mastitis, 11 were identified as *Staphylococcus aureus*, and their ability to form a biofilm was monitored. The increase in the occurrence of resistant strains is a worldwide problem, and plant polyphenols such as quercetin and pomiferin can be used as an alternative to the use of antibiotics and inhibition of biofilm formation. The biofilm-forming reference strain *Staphylococcus aureus* 4223 CCM was used as a control. Of the 11 tested isolates, 4 were strong biofilm producers. The tested concentration of 1.56 µmol/ml quercetin significantly reduced biofilm formation in 3 isolates. Pomiferin in the tested concentration did not inhibit biofilm formation in any of the isolates, compared to the control strain.

Key words: milk, *Staphylococcus aureus*, quercetin, pomiferin, biofilm

ÚVOD

Mastitídy patria v súčasnosti medzi ekonomicky najzávažnejšie ochorenia hovädzieho dobytka, ktoré okrem negatívneho vplyvu na zdravie dojnice majú za následok veľké finančné straty spojené s vyradením dojníc, nákladmi na liečbu a na dezinfekčné prostriedky, veterinárnymi zákrokmi, nízkou úžitkovosťou a vyradením mlieka. Zápal mliečnej žľazy je multifaktoriálne ochorenie, ale jeho primárnou príčinou je infekcia spôsobená patogénom. K významným pôvodcom klinických a subklinických mastitíd patrí *Staphylococcus aureus* (Cheng a Han 2020). *S. aureus* pastrí k pyogénnym baktériám, ktorého hlavným faktorom

virulencie je okrem produkcie enzýmov a toxínov aj schopnosť tvoriť biofilm (Pilipčinec a kol. 2019). Najvýznamnejšou príčinou spôsobujúcu problémy s eradikáciou mastitíd, je prítomnosť biofilmu u dojníc postihnutých týmto ochorením (Szweda a kol, 2012). Quercetín a pomiferín patria k rastlinným polyfenolom, ktoré sa prirodzene vyskytujú vo väčšine rastlín, najmä v kvetoch, listoch semenách a plodoch. Rastlinné polyfenoly sú sekundárne metabolity rastlín s výraznou vôňou, antiflogistickým a antibakteriálnym pôsobením (Süli a kol. 2014). Antibakteriálne pôsobenie rastlinných polyfenolov má viacero mechanizmov účinku, napríklad interagujú s bakteriálnymi proteínmi, poškodzujú cytoplazmatickú membránu, ovplyvňujú permeabilitu membrán, inhibujú syntézu nukleových kyselín, syntézu bunkovej steny a tiež ovplyvňujú energetický metabolizmus. Niektoré rastlinné polyfenoly vykazujú aj antibiofilmovú aktivitu (Álvarez-Martínez a kol. 2020). Cieľom našej práce bolo sledovanie antibiofilmovej aktivity quercetínu a pomiferínu voči izolátom *S. aureus*, ktoré pochádzali z mlieka dojníc so subklinickou formou mastitídy.

MATERIÁL A METODIKA

Identifikácia izolátov

Všetkých 55 izolátov stafylokokov pochádzalo z mlieka dojníc so subklinickou formou mastitídy. Izoláty boli uskladnené pri -80 °C v kryoskúmavkách Microbank (Pro-Lab, Canada). Všetky stafylokoky boli identifikované pomocou kultivačných a biochemických metód. Zo živných médií bol použitý krvný agar na hodnotenie hemolytickej aktivity stafylokokov a Baird-Parker agar na honotenie lecitinázovej aktivity stafylokokov. Fenotypická identifikácia izolátov bola vykonaná použitím biochemickej rady STAPHYTest 24 (Erba Lachema, ČR). Ďalšiemu testovaniu boli podrobené len izoláty *Staphylococcus aureus*.

Testovanie biofilmovej aktivity izolátov

U všetkých identifikovaných izolátov *S. aureus* bola testovaná schopnosť tvorby biofilmu modifikovanou metódou podľa O'Toole. V sterilnom fyziologickom roztoku bola pripravená suspenzia o hodnote 1 McFarland a následne 100 µl takto pripravenej suspenzie bolo pridanej k 100 µl modifikovaného BHI (37 g BHI, 10 g glukózy a 20 g NaCl/liter). Mikrotitračné platničky boli inkubované v termostate pri 37 °C 24 hodín. Po inkubácii bolo médium odsaté a jamky boli ofarbené 0,1 % roztokom kryštálovej violete (200 µl) a inkubované pri izbovej teplote 30 minút. Po premytí a vysušení jamiek bola kryštálová violeť naviazaná na adherované bunky extrahovaná 30 % kyselinou octovou (200 µl). Optická denzita bola stanovená spektrofotometricky meraním absorbancie pri vlnovej dĺžke 550 nm, pomocou prístroja

SYNERGY READER 4 (BioTek, Merck, SRN). Ako referenčný biofilm tvoriaci kmeň bol použitý *Staphylococcus. aureus* CCM 4223 (Česká zbierka mikroorganizmov, Brno).

Testovanie antibiofilmovej aktivity quercetínu a pomiferínu

Quercetín a pomiferín bol nariedený v 10 % DMSO (Honeywell) a modifikovanom BHI na koncentráciu 1,56 µmol/ml, ktorá bola stanovená na základe predchádzajúcich meraní ako minimálna ihibičná koncetrácia (MIC). Suspenzia izolátov o hustote 1 McFarland (100 µl) bola pridaná k 100 µl nariedeného quercetínu a pomiferínu. Mikrotitračné platničky boli inkubované v termostate pri 37 °C 24 hodín. Po inkubácii bola testovaná antibiofilmová aktivita quercetínu a pomiferínu postupom opísaným vyššie. Ako referenčný biofilm tvoriaci kmeň bol použitý *Staphylococcus aureus* CCM 4223 (Česká zbierka mikroorganizmov, Brno).

Štatistické vyhodnotenie výsledkov

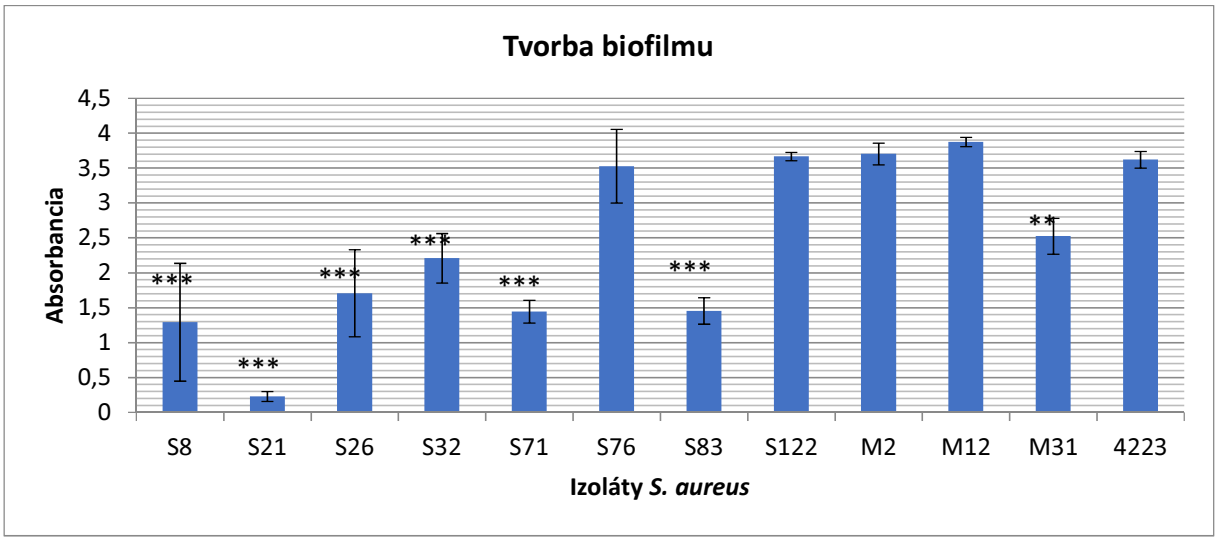
Dosiahnuté výsledky boli vyhodnotené pomocou štatistického programu Prism použitím jednocestnej ANOVA – Tukeyho test.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Všetky izoláty stafylokokov boli identifikované kultivačne a mikroskopicky. Z 55 izolátov stafylokokov bolo 11 identifikovaných ako *Staphylococcus aureus*, u ktorých bola testovaná schopnosť tvorby biofilmu. Výsledky boli porovnávané s biofilm tvoriacim kmeňom *Staphylococcus aureus* CCM 4223. Signifikantne nižšia schopnosť tvorby biofilmu bola u 7 izolátov *S. aureus* (S8, S21, S26, S32, S71, S83, M31) v porovnaní s kontrolným kmeňom (Obrázok č. 1). Na testovanie antibiofilmovej aktivity quercetínu a pomiferínu bola použitá koncentrácia 1,56 µmol/ml. ktorá bola stanovená ako MIC na základe predchádzajúcich meraní voči kontrolnému kmeňu *Staphylococcus aureus* CCM 4233. Testovaná koncentrácia pomiferínu voči izolátom *S. aureus* signifikantne neinhibovala tvorbu biofilmu v porovnaní s kontrolným kmeňom. Naopak quercetín v použitej koncentrácii signifikantne znižoval tvorbu biofilmu u 3 izolátov *S. aureus* (S8, S71, S83) v porovnaní s kontrolným kmeňom (Obrázok č.2 a č.3). Prevalencia *S. aureus* ako pôvodcu mastitídy dojníc sa celosvetovo odlišuje. Ako uvádza Casanova a kol. (2016) bol v roku 2016 *S. aureus* pôvodcom mastitídy v 21,62 % prípadov mastitíd v Brazílii. Belay, Mohammed a Wasihun (2022) zaznamenali v období od februára 2020 do septembra 2020 v južnej Etiópii celkovo 422 kráv trpiacich mastitídov, z tohto počtu bol najviac izolovaným patogénom *S. aureus* s prevalenciou až 42,6 %. V súčasnosti sa stretávame s pomerne zložitou situáciou, kedy sa antibiotika stávajú čoraz menej účinnými v boji proti *S. aureus*. Ako uvádza Slobodníková a kol. (2016) práve vyššie

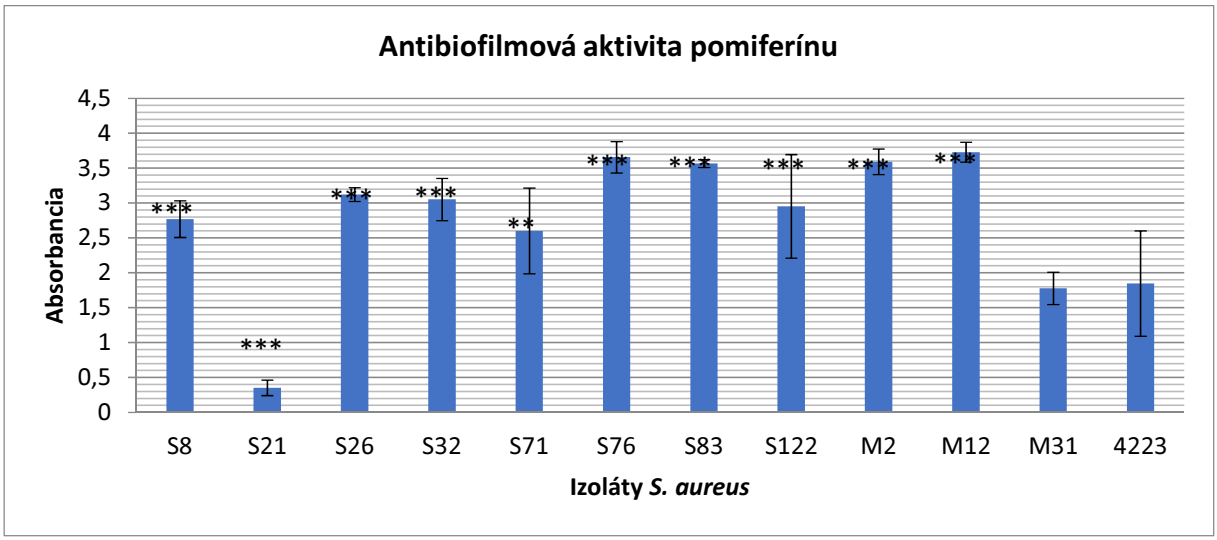
spomínané rastlinné polyfenoly by mohli byť alternatívnou cestou v liečbe infekcií spôsobených stafylokokmi. Podľa Kim a kol. (2018) quercetín vykazuje antibiofilmovú aktivitu pri MIC 16-32 mg/l proti *S. aureus*. Ako uvádza Ranjith a kol. (2013) pomiferín vykazuje silnú aktivitu proti *Cryptococcus neoformans* a strednú aktivitu proti MRSA čo by mohlo dokazovať jeho antimikrobiálnu aktivitu.

Obrázok č. 1, Tvorba biofilmu u izolátov stafylokokov



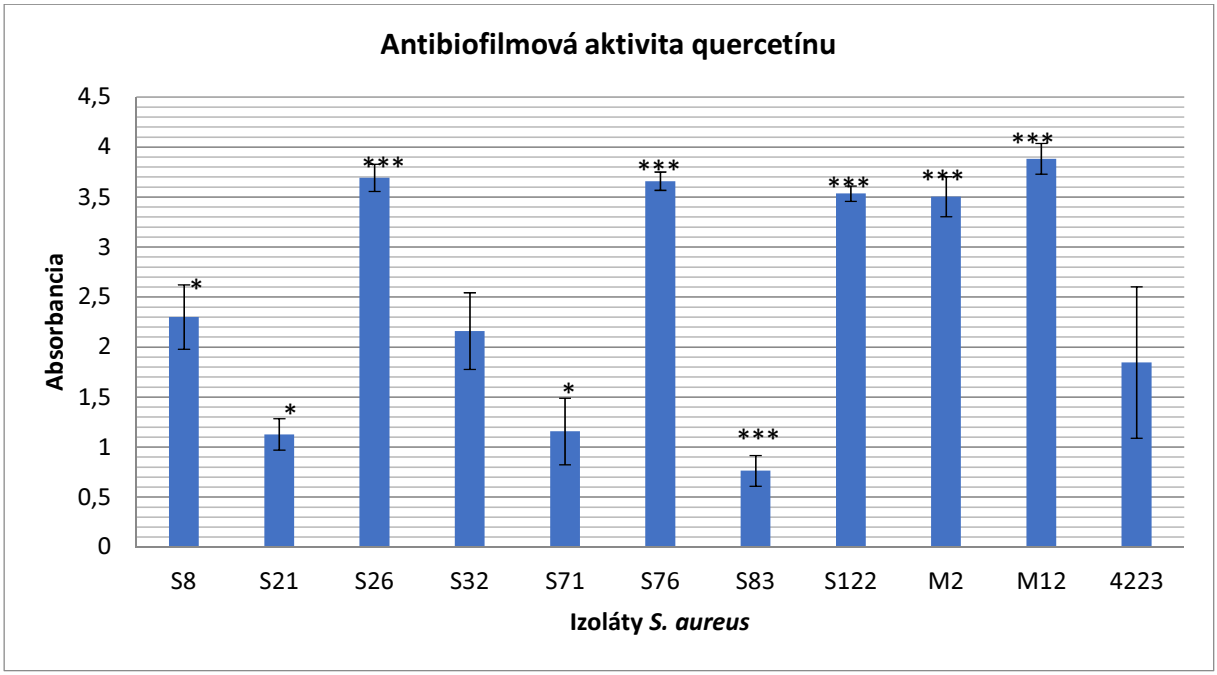
Legeda: p<0,001 *** p<0,01 **

Obrázok č. 2, Antibiofilmová aktivita pomiferínu



Legeda: p<0,001 *** p<0,01 **

Obrázok č. 3, Antibiofilmová aktivita quercetínu



Legeda: p<0,001 *** p<0,05 *

ZÁVER

V práci sme sa zamerali na alternatívne možnosti boja proti stafylokokovým infekciám. Stafylokoky sú najčastejšími pôvodcami mastitíd u dojníc a výskyt rezistentných kmeňov stafylokokov je celosvetovým problémom. Schopnosť tvorby biofilmu výrazne znižuje účinnosť antibiotík, a tak alternatívne možnosti inhibície tvorby biofilmu ako sú polyfenoly otvárajú nové možnosti.

POĎAKOVANIE

Táto práca vznikla za podpory projektu KEGA 007UVLF-4/2021.

POUŽITÁ LITERATÚRA

1. ÁLVAREZ-MARTÍNEZ, J. F. et al *Antimicrobial capacity of plant polyphenols against Gram-positive bacteria: a comprehensive review*.[online]. 2020.
2. BELAY, N – MOHAMMED, N. – SEYOUM W. *Bovine mastitis: prevalence, risk factors and bacterial pathogens isolated in lactating cows in Gamo Zone Southern Ethiopia.* [online]. 2022. [cit. 2023.3.20].
3. CASANOVA, V. et al. *Bovine mastitis: prevalence and antimicrobial susceptibility profile and detection of genes associated with biofilm formation in Staphylococcus aureu.* Semin Cierncias Agrarias. 2016. s.37.

4. CHENG, W. N. – HAN G. S. *Bovine mastitis:risk factors, therapeutic starategies and alternative treatments.* [online]. 2020.
5. KIM, K. M. et al. *In vitro synergism and anti.biofilm activity od quercetin-pivaloxymethyl conjugate against Staphylococcus aureus and Enterococcus species.* [online]. 2018. [cit. 2023.3.10] .
6. PILIPČINEC, E. a kol. *Špeciálna bakteriológia: Gram-pozitívne baktérie.* UVLF Košice. 2019, s. 21 – 25, ISBN 978-80-8077-632-9.
7. RANJITH, H. et al. *Antimicrobial and antileishmanial compounds from maclura pomifera fruits.*[online]. 2013.[cit. 2023.2.25].
8. SLOBODNÍKOVÁ, L. et al. *Antibiofilm activity of plant polyphenols.* [online]. 2016. [cit. 2022.9.15] .
9. SZWEDA, P. et al. Biofilm production and presence of ica and bap genes in Staphylococcus aureus strains isolated from cows with mastitis in the eastern Poland. Pol J Microbiol, 2012, 61 (1), 65-69.
10. SÜLI, J. et al. *Polyfenolové látky v potravinách.* [online]. 2014, roč. 17, č. 3, s. 162 – 170.

Kontaktná adresa: Hajdučková Vanda, Department of Microbiology and Immunology, University of Veterinary Medicine and Pharmacy in Košice, Komenského 73, 041 81 Košice, Slovak Republic; E-mail: vanda.hajduckova@uvlf.sk

POROVNANIE ÚČINNOSTI PROGRAMOV HYGIENICKÉHO DOJENIA PRI ZÍSKAVANÍ SUROVÉHO MLIEKA

COMPARISON OF THE EFFECTIVENESS OF HYGIENIC MILKING PROGRAMMES IN OBTAINING RAW MILK

Halás Šimon[1], Bolger Kevin Dilan[1], Zigo František[1], Farkašová Zuzana[1], Lacková Zuzana[1], Arvaiová Juliana[1]

[1]Katedra výživy a chovu zvierat, Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, Komenského 73, Košice

ABSTRACT

The procedures before and after milking, as well as the cleanliness of the equipment used for milking cows, includes or combines milking hygiene. The application of means for the sanitary treatment of the udder of dairy cows and the use of sufficiently effective preparations significantly reduces the contamination of the skin of the udder teats with bacterial pathogens. The aim of the study was to evaluate the effectiveness of disinfection of teats and teat adapters leading to a reduction of the microbial load before milking in two production farms with different hygienic milking regimes. The first farm performed soaking the teats with foam before milking, the second performed udder toileting by applying moistened wipes without foaming. The obtained results showed that both farms experienced a reduction in the microbial load of pods and nipples after disinfection. The first farm, compared to the second one, achieved a greater reduction in the microbial load thanks to soaking the teats, which proves the importance of their disinfection before milking.

Key words: cows, milking, teats, disinfection, contamination

ÚVOD

Postupy pred dojením môžu pozostávať z namáčania, napeňovania, čistenia alebo sušenia strukov (Reugg, 2004), pričom používanie účinných prípravkov a prostriedkov na sanitárne ošetrenie kravského vemena výrazne znižuje kontamináciu kože strukov vemena a znižuje celkovú bakteriálnu kontamináciu mlieka (Ózsvári a Dorottya, 2022). Na namáčanie strukov sa používa množstvo rôznych typov dezinfekčných prostriedkov, napríklad jód, chlórhexidín, okyslený chloritan sodný, peroxid, organické kyseliny (kyselina mliečna, kyselina salicylová, kyselina kaprínová, kyselina glykolová) a iné. Nedostatočné hygienické postupy, nesprávne mechanické čistenie, používanie nevhodných dezinfekčných prostriedkov

a zlá čistota zariadení, mikrobiálna záťaž vzduchu, zásobovanie vodou, podmienky ustajnenia – to všetko významne vplýva na kontamináciu surového mlieka (Velazquez a kol., 2019).

Najčastejšie kontaminanty dojacieho zariadenia predstavujú baktérie ako *Escherichia coli*, *S. aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella spp.*, *Micrococcus spp.*, *Campylobacter jejuni*, *Enterococcus faecalis*, *Citrobacter freundii* (Hillerton and Berry, 2003, EFSA, 2015; Zastempowska a kol., 2016).

Mikrobiálnu záťaž surového mlieka ovplyvňujú mikroorganizmy prítomné vo strukovom kanáliku a na povrchu kože struku. Povrch strukov bol identifikovaný ako najväčší prispievateľ k mikrobiote surového mlieka, po ktorom nasledovali výkaly (Velazquez a kol., 2019; Zekarias, 2020). Toto je v súlade so štúdiami Verdiera a kol. (2012) a Reugg (2017), ktorí konštatovali, že koža strukov bola primárnym zdrojom mikrobiálnych populácií v surovom mlieku pričom preukázali, že miera intramamárnych infekcií sa zvyšuje so zvyšujúcim sa počtom baktérií na koži strukov. Mnoho bakteriálnych kmeňov bolo spojených s mastitídou, pričom hlavné kmene boli identifikované ako *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae* a *Streptococcus uberis*, *Staphylococcus aureus* a *Escherichia coli* (Hillerton a Berry, 2003, EFSA 2015; Zastempowska 2015).

Cieľom štúdie bolo vyhodnotenie účinnosti dezinfekcie strukov a strukových násadcov vedúcej k zníženiu mikrobiálnej záťaže pred dojením v dvoch produkčných farmách s rôznymi hygienickými režimami dojenia.

MATERIÁL A METODIKA

Chovy dojníc a spôsoby dojenia

Praktická časť tejto štúdie bola zameraná na dve produkčné farmy nachádzajúce sa na východnom Slovensku s rôznymi hygienickými programami dojenia s počtom 250 - 350 ks dojníc plemena slovenského strakatého dobytka medzi 1. a 4. laktáciou s priemernou dennou dojivosťou 21,6 +/- 2,4 litra a 23,2 +/- 3,1 litra.

Slovenský strakatý dobytok sú plemená kombinovanej úžitkovosti, využívané na produkciu mlieka aj mäsa, s dojivosťou 6,5 – 7,5 kg x 10^3 za laktáciu. Toto plemeno je súčasťou celosvetovej populácie plemena simentál, ktoré je na Slovensku veľmi rozšírené. Dojnice boli kŕmené TMR na báze siláže, sena a koncentrátu v súlade s nutričnými požiadavkami pre laktačnú výkonnosť 20 až 30 litrov denne.

Hygienický program dojenia na prvej farme

Na začiatku dojenia sa používal prípravok Prefoam+ (Hypred S.A., Dinard, Francúzsko), určený na namáčanie strukov. Prefoam+ s aktívnou biocídnou zložkou 5% kyseliny L-(+)-mliečnej sa použil na hygienu vemena pred dojením, aplikoval sa ako pena.

Po napenení boli struky mechanicky vyčistené vlhčenými utierkami UdderClean Agromont, Nitra), ktoré sú určené na čistenie celého vemena. Utierky UdderClean majú 4 výhody svojho použitia: čistenie vemena, stimulácia tvorby mlieka, skrátenie doby dojenia a čistenie rúk dojičky. Vákuum dojenia a pulzácie bolo nastavené na 42 kPa. Pulzačný pomer bol 60:40 pri rýchlosti 52 c/min a ukončenie dojenia bolo automaticky signalizované, keď prietok mlieka klesol na 0,2 l/min. Konce ceckov boli po dojení dezinfikované roztokom s obsahom aktívnej zložky kyseliny mliečnej. Strukové násadce boli umývané a dezinfikované 2% peroxidom vodíka po každej výmene skupiny kráv v dojárni. Mlieko sa skladovalo v chladiacich nádržiach pri teplote + 4 °C.

Hygienický program na druhej farme

Dojenie bolo dvakrát denne, prvé dojenie začínalo o 4.30 hodine a druhé o 16.30 hodine. Najprv sa vemeno vyčistilo vlhčenými utierkami namočenými v dezinfekčnom roztoku DERMISAN+ (Agromont Nitra, SR, účinné látky: 15000 mg/kg N-(3-aminopropyl)-N-dodecylpropán-1,3-diamín) na odstránenie nečistôt z vemena a ceckov. Vákuum dojenia a pulzácie bolo nastavené na 42 kPa. Pulzačný pomer bol 60:40 pri rýchlosti 52 c/min a ukončenie bolo automaticky signalizované, keď prietok mlieka klesol na 0,2 l/min. Po dojení boli struky dezinfikované formou namáčania strukov Ioderm 5000 (Agromont Nitra, SR, účinná látka: 5000 mg/kg jódu). Strukové násadce boli umývané iba vodou počas dojenia bez použitia dezinfekčných prostriedkov. Mlieko sa skladovalo v chladiacich nádržiach pri teplote + 4 °C.

Odber a vyšetrenie vzoriek

Z pätnástich dojníc a dojacích zariadení z každej farmy boli odobraté vzorky z povrchov (n = 45), pričom z každej dojnice sa odoberali dve vzorky zo strukov. V prípade vzoriek strukov: boli stery odobraté pred dojením, po mechanickom čistení a po máčaní (druhá farma preddojné máčanie strukov nerealizovala). V prípade vzoriek strukových násadcov, boli vzorky odoberané pred dojením, po dojení, po dezinfekcii či umytí. Odobraté vzorky sa vyhodnotili v laboratóriu podľa metodík Vargová a kol. (2023).

Pre celkový počet baktérií (CPB) a pre koliformné baktérie (KB) sa vzorky z výteru zriedili v sterilnom fyziologickom roztoku. Zriedené roztoky (objem 0,1 ml) sa potom naniesli na platne pomocou metódy nalievania na selektívne média Endo agar (EA; HiMedia, India) a

Nutrient agar č. 2 (NA; HiMedia, India) podľa stanovených postupov (ISO 6887-5: 2010). Detekcia CPB bola vykonaná podľa ISO 18593:2004 a detekcia počtu KB bola vykonaná podľa ISO 4832:2006 Výsledky z Endo agaru a Nutrien agaru boli získané po 24 hodinovej inkubácií pri 37 °C.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Vyhodnotené výsledky po napenení strukov a očistení dezinfekčnými utierkami na prvej farme vykazovali významný pokles mikrobiálnej záťaže CPB o 58,4% a KB o 31,1 %. Okrem toho na druhej farme, kde sa neuskutočňovalo namáčanie strukov, sa dosiahlo nižšie zníženie mikrobiálnej záťaže CPB o 40,2 % a KB o 42,9 %. Výsledky štúdie poukazujú, že namáčanie strukov zohráva významnú úlohu pri ich dezinfekcii a znižovaní mikrobiálnej záťaže. V tabuľkách č. 1 a č. 2 uvádzame dosiahnuté zistenia z monitorovaných fariem.

Tabuľka 1. Vplyv sanitačného režimu na mikrobiálnu záťaž monitorovaných povrchov na prvej farme

struk	**pred dojením** (Log_{10} JTK/cm^2)		**po mechanickom čistení** (Log_{10} JTK/cm^2)		**po namáčaní** (Log_{10} JTK/cm^2)	
	CPB	KB	CPB	KB	CPB	KB
priemer	4.36	2.33	3.18	1.78	0.99	0.95
ceckový nadstavec	**pred dojením** (Log_{10} JTK/cm^2)		**po dojení** (Log_{10} JTK/cm^2)		**po dezinfekcii** (Log_{10} JTK/cm^2)	
	CPB	KB	CPB	KB	CPB	KB
priemer	1.85	0.90	2.09	1.22	0.77	0.62

Legenda: CPB celkový počet baktérií, KB koliformné baktérie, JTK jednotka tvoriaca kolónie

Celkový počet baktérií sa používa na prehľad mikrobiálnej kontaminácie a počet koliformných baktérií na hodnotenie hygieny (Tamime 2004). Na prvej farme sa aplikoval napeňovací roztok s kyselinou mliečnou počas toalety vemena. Kontaminácia CPB a KB získaná sterom z kože struku klesla na 0,99 log^{10} JTK/cm^2 a 0,95 log^{10} JTK/cm^2. Na dezinfekciu strukových násadcov sme použili dezinfekčný prostriedok s účinnou látkou chlórnan sodný, ktorý znížil počet CPB z 1,85 na 0,77 Log^{10} JTK/cm^2 a počty KB z 0,90 na 0,62 Log^{10} JTK/cm^2 (Tab. 1).

Na druhej farme boli struky čistené utierkami namočenými v dezinfekčnom roztoku DERMISAN+ na odstránenie nečistôt z vemena a ceckov. Následne bolo vemeno dôkladne vysušené jednorazovými papierovými utierkami. Po dojení boli struky ponorené do jodového

prípravku. Ceckové násadce sa umývali vodou iba počas procesu dojenia bez použitia dezinfekčných prostriedkov. Výsledky sanitačného režimu na mikrobiálnu záťaž monitorovaných povrchov pre druhú farmu boli CPB od 4,81 do 2,54 Log^{10} JTK/cm^2 a KB od 2,88 do 1,42 Log^{10} JTK/cm^2. Tieto výsledky naznačujú, že na druhej farme ostali struky po toalete vemena s vyššou mikrobiálnou kontamináciou ako aj ceckové násadce (Tab. 2).

Tabuľka č. 2. Vplyv sanitačného režimu na mikrobiálnu záťaž monitorovaných povrchov na druhej farme

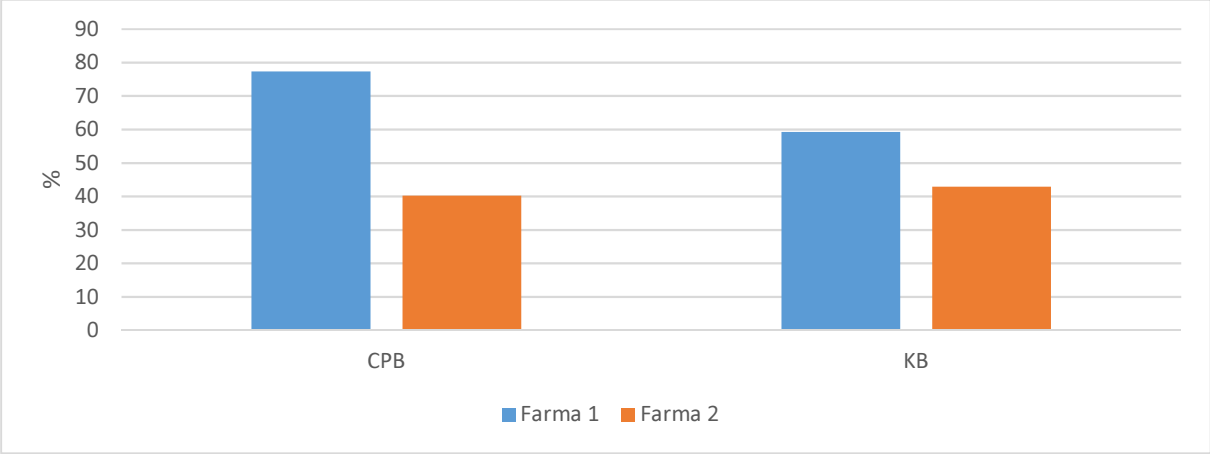
struk	**pred dojením** (Log_{10} JTK/cm^2)		**po mechanickom čistení** (Log_{10} JTK/cm^2)		**po namáčaní*** (Log_{10} JTK/cm^2)	
	CPB	KB	CPB	KB	CPB	KB
priemer	4.81	2.54	2.88	1.45	-	-
ceckový nadstavec	**pred dojením** (Log_{10} JTK/cm^2)		**po dojení** (Log_{10} JTK/cm^2)		**po umytí** (Log_{10} JTK/cm^2)	
	CPB	KB	CPB	KB	CPB	KB
priemer	1.50	1.0	2.45	1.57	1.10	0.95

Legenda: CVB celkový výpočet baktérií, KB koliformné bactérie, JTK jednotka tvoriaca kolónie; po namáčaní* - krok preddojného namáčania struku absentuje.

Porovnanie účinnosti aplikovaných hygienických programov dojenia na obidvoch farmách je znázornené na grafe 1 a 2. Z obidvoch grafov vyplýva, že kombinácia napeňovacieho roztoku a dezinfekčných utierok počas toalety vemena bola účinnejšia na zníženie bakteriálnej kontaminácie na koži struku v porovnaní s použitím iba dezinfekčných utierok (Graf 1).

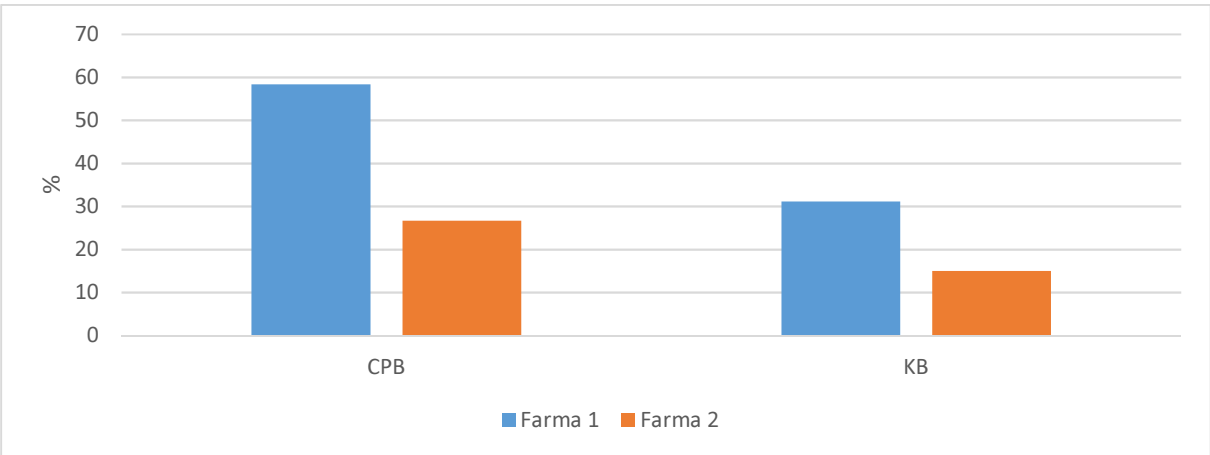
V štúdií Vargová a kol. (2023) autori detegovali 44 pozitívnych vzoriek na *S. aureus* (42 % z celkového počtu vzoriek), ktorý bol najčastejším patogénom z hodnotených povrchov. *S. aureus* bol identifikovaný z ceckov, strukových násadcov a z utierok používaných na mechanické čistenie vemena. *Staphylococcus aureus* predstavuje hlavný alimentárny a virulentný patogén, ktorý môže zvýšiť riziko mastitídy u produkčných dojníc. V mnohých krajinách predstavuje *Staphylococcus aureus* primárnu príčinu mastitídy. Každý materiál, ktorý je kontaminovaný *S. aureus* môže byť potenciálnym zdrojom intramamárnej infekcie pre laktujúce kravy (Monistero, 2018).

Graf č. 1. Porovnanie struku – zníženie mikrobiálnej záťaže



Prostriedky na dezinfekciu ceckov pôsobia odlišne pri znižovaní prenosu baktérií medzi kravami alebo z ich prostredia (t. j. povrchov, rúk, podstielky). V súčasnosti je k dispozícii široká škála produktov na dezinfekciu strukov. V našej štúdií dosiahol dezinfekčný prostriedok s aktívnou zložkou - kyselinou mliečnou 77,3% zníženie celkového počtu baktérií a 59,2% zníženie koliformných baktérií na strukoch po ponorení. Dezinfekcia strukov po dojení sa ukázala ako veľmi účinná pri znižovaní bakteriálnej kontaminácie vemena z prostredia. Tieto výsledky sú v súlade s výsledkami viacerých autorov. Podľa Vargová a kol. (2023) a Monistero (2018) jód v kombinácii s kyselinou mliečnou a iba produkt s kyselinou mliečnou dosiahli 79% a 73% zníženie prirodzene sa vyskytujúcich stafylokokových izolátov na koži strukov.

Graf č. 2. Porovnanie strukovej násady – zníženie mikrobiálnej záťaže



ZÁVER

Výsledky štúdie naznačujú, že je najlepšie vykonávať ponorenie strukov po mechanickom čistení, aby sa dosiahlo uspokojivejšie zníženie mikrobiálnej záťaže, a teda aj väčšie zníženie rizika kontaminácie mlieka. Ošetrenie vemena s napeňovacím dezinfekčným

roztokom spolu s dezinfekčnými utierkami pred dojením sú vhodnejšia kombinácia na redukciu baktérií ako použitie iba dezinfekčných utierok. Na záver táto štúdia zdôrazňuje dôležitosť dezinfekcie strukov a strukových násadcov na zníženie mikrobiálnej záťaže s cieľom získať kvalitné mlieko, ktoré bude bezpečnejšie pre spotrebu.

POĎAKOVANIE

Táto štúdia bola podporená projektami APVV-22-0457: Bezantibiotické prístupy kontroly mastitíd dojníc so zvýšením hygieny prostredia na produkčných farmách; SAIA-2022-05-15-001: Vplyv patogénov mliečnej žľazy na produkciu a stupeň oxidačného stresu u dojníc a projektom VEGA-1-0162-23: Zníženie používania antibiotík v programoch kontroly mastitíd dojníc.

POUŽITÁ LITERATÚRA

1. EFSA BIOHAZ Panel (EFSA Panel on Biological Hazards). 2015. Scientific Opinion on the public health risks related to the consumption of raw drinking milk. *EFSA J.*, 13: 3940, 95 s.
2. Food and Agriculture Organisation of the United Nations. 2020. Gateway to dairy production and products. [online]. www.fao.org [cit. 10. 4. 2023]. Dostupné na: https://www.fao.org/dairy-production-products/production/en/
3. Hillerton, J. E., Berry, E. A. 2003. The management and treatment of environmental streptococcal mastitis. *Vet. Clin. Food Anim*. 19: 157–169. http://doi:10.1016/S0749-0720(02)00069-5.
4. ISO 6888-1:1999. Microbiology of food and animal feeding stuffs: Horizontal method for the enumeration of coagulase-positive staphylococci (*Staphylococcus aureus* and other species) - Part 1: Technique using Baird-Parker agar medium.
5. ISO 18593:2004. Microbiology of food and animal feeding stuffs: Horizontal methods for sampling techniques from surfaces using contact plates. International Standard Organisation.
6. ISO 4832:2006. Microbiology of food and animal feeding stuffs: Horizontal method or the enumeration of coliforms. International Standard Organisation.
7. ISO 6887-5:2010. Microbiology of food and animal feeding stuffs. Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination. Part 5: Specific rules for the preparation of milk and milk products.

8. ISO 21528-1:2017. Microbiology of the Food Chain: Horizontal Method for the Detection and Enumeration of *Enterobacteriaceae* – Part 1: Detection of *Enterobacteriaceae*.
9. Garcia, S. N., Osburn, B. I., Cullor, J. S. 2019. A one health perspective on dairy production and dairy food safety. *One Health*. 7: 100086. http://doi:10.1016/j.onehlt.2019.100086.
10. Vijaya Kumar, A., Venkateswara Rao, L., Kishan Kumar. M., Srinu, B., Madhava Rao, T. 2012. Efficacy of Udder Disinfectants on Reduction of Bacterial Load and Certain Pathogens of Public Health Significance. *J Microbiol Biotechn Res*. 2: 147–51.
11. Mourad, G., Bettache, G., Samir, M. 2014. Composition and nutritional value of raw milk. *Issues in Biological Sciences and Pharmaceutical Research*. 2: 115-122. http://doi:10.15739/ibspr.005.
12. Ózsvári, L., Ivanyos, D. 2022. The use of teat disinfectants and milking machine cleaning products in commercial Holstein-Friesian farms. *Front Vet Sci*. 9: 956843. http://doi: 10.3389/fvets.2022.956843
13. Vargova, M., Vyrostkova, J., Lakticova, K. V., Zigo, F. 2023. Effectiveness of sanitation regime in a milking parlour to control microbial contamination of teats and surfaces teat cups'. *Ann Agric Environ Med*. 30(1):55-60. http://doi:10.26444/aaem/161037.
14. Reugg, P, 2004. Pre-milking cow preparation – secret methods of producing high quality milk. [online]. University of Wisconsin. [cit. 10. 4. 2023]. Dostupné na: https://edisciplinas.usp.br/pluginfile.php/5765494/mod_resource/content/0/2004R_005.pdf.
15. Tamime, A. Y. 2009. Milk Processing and Quality Management: Quality Control. Belleque J., Chicon R. and Recio I., Eds. West Sussex, UK: John Wiley and sons publishers; s. 56-60.
16. van Stuijvenberg, M. E., Nel, J., Schoeman, S. E., Lombard, C. J., du Plessis, L.M., Dhansay, M. A. 2015. Low intake of calcium and vitamin D, but not zinc, iron or vitamin A, is associated with stunting in 2- to 5-year-old children. *Nutrition*. 31(6): 841-6. http://doi:10.1016/j.nut.2014.12.011.
17. Velazquez, V., Carranza, B., Tenorio-Borroto, E. et al. 2019. Microbial Contamination in Milk Quality and Health Risk of the Consumers of Raw Milk and Dairy Products. [online] http://doi:10.5772/intechopen.86182.

18. Zastempowska, E., Grajewski, J., Twarużek, M. 2016. Food-Borne Pathogens and Contaminants in Raw Milk – A Review. *Annals of Animal Science*. 6: http://doi:10.1515/aoas-2015-0089.
19. Zekarias, T. 2020. Milk Quality and Sources of Microbiological Contamination: A Review. *World Journal of Dairy & Food Sciences.* 15(1): 21-31.
20. Zigo, F. et al. 2022. Slovenské národné a tradičné plemená zvierat. Košice: UVLF, 558 s., ISBN 978-80-8077-763-0.
21. Zigo, F., Vasiľ, M., Ondrašovičová, S., Výrostková, J., Bujok, J., Pecka-Kielb, E. 2021. Maintaining Optimal Mammary Gland Health and Prevention of Mastitis. *Front Vet Sci*. 8: 60731.

Kontaktná adresa: MVDr. Šimon Halás, Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, Komenského 73, Košice, E-mail: simon.halas@student.uvlf.sk

DETEKCIA PRÍTOMNOSTI ZÁSTUPCOV ČEĽADE ENTEROBACTERIACEAE V PROSTREDÍ REMESELNEJ VÝROBY SYROV

DETECTION OF THE PRESENCE OF FAMILY ENTEROBACTERIACEAE IN THE ENVIROMENT OF ARTISANAL CHEESEMAKING

Hanzelová Zuzana, Dudriková Eva, Výrostková Jana

Katedra hygieny, technológie a zdravotnej bezpečnosti potravín, Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, Komenského 73, 041 81 Košice, Slovenská republika

ABSTRACT

Part of the working environment of the dairy industry is the presence of microorganisms that occur naturally as a microbiocenosis of raw milk. Representatives of the Enterobacteriaceae family, in addition to their negative impact on the technology of production of dairy products, can also pose a risk to human health, both as the causative agents of alimentary diseases and, according to the results of many works in recent decades, also as a potential source of transfer of antimicrobial resistance genes. Out of a total of 49 occupational swab samples collected, the presence of Enterobacteriaceae bacteria in 15 swab samples was detected in a wide range of total swabs (2.69 – 9.130 log CFU per swab).

Key words: cheese working, Enterobacteriaceae family, swabs.

ÚVOD

Konzumácia syrov a ich celková obľúbenosť stúpa, čo je výborná správa vzhľadom k benefitom tejto potraviny, ktoré môžeme pozorovať v krajinách, kde je ich konzumácia dlhodobá. Dobrou správou je, že aj na Slovensku pribúdajú nové syrárne a tie vzniknuté si budujú svoju pozíciu cez kvalitné produkty, ktoré ponúkajú na trh. Dlhoročná tradícia chovu oviec je u nás spojená s produkciou nielen bryndze, ale v ostatných rokoch aj zrejúcich ovčích a taktiež kozích syrov. Slovenská legislatíva a aj legislatíva na úrovni EÚ dohliada nad bezpečnosťou týchto komodít, ale z perspektívneho hľadiska a kritickej situácie s antimikrobiálnou rezistenciou by bolo žiaduce sledovať prítomnosť niektorých baktérií, ktoré na jednej strane predstavujú riziko negatívneho ovplyvnenia technológie výroby syrov a na druhej strane môžu byť potenciálnym zdrojom antibiotickej rezistencie pre konzumentov. Práve prítomnosť niektorých technologicky nežiaducich baktérií v syroch, ktoré môžu byť súčasne zdrojom antibiotickej rezistencie pre konzumentov, ako sú zástupcovia čeľade Enterobacteriaceae týkajúcich sa najmä u syrov vyrobených z pasterizovaného mlieka, je

pravdepodobne výsledkom vplyvu prostredia, v ktorom sa vyrábajú, hygienou zamestnancov a ich priamym kontaktom so syrmi počas celého procesu výroby. Práve zástupcovia čeľade Enterobacteriaceae okrem svojho negatívneho vplyvu na technológiu výroby mliečnych výrobkov môžu predstavovať aj riziko pre zdravie ľudí a to ako pôvodcovia alimentárnych ochorení a podľa výsledkov mnohých prác za ostatné dekády aj ako potenciálny zdroj prenosu génov antimikrobiálnej rezistencie prostredníctvom konzumácie mliečnych výrobkov (syrov) na konzumenta (Ntuli et al. 2016, Jian-li et al. 2017, Özdikmenli Tepeli et al. 2018, Gołaś-Pradzyńska a Rola 2021).

MATERIÁL A METODIKA

V období jún až november 2022 bolo odobratých 49 vzoriek sterov podľa STN EN ISO 18593 z prostredia výroby zrejúcich syrov remeselným spôsobom v syrárňach v rôznych oblastiach Slovenska. Ako uvádza Tabuľka č. 1, stery boli odobraté jednak zo zariadení na výrobu, ale taktiež aj z rúk pracovníkov a záster, ak boli používané počas manipulácie so surovinou. Vo všetkých syrárňach bola syrenina počas celého procesu výroby spracovaná manuálne pracovníkmi. Zo všetkých vzoriek sterov boli pripravené desaťnásobné riedenia podľa STN EN ISO 6887-5 (2010). Následne bola vykonaná izolácia baktérií čeľade Enterobacteriaceae podľa STN EN ISO 21528.

Tabuľka č. 1, Prehľad miest odberov vzoriek v prevádzkach počas výroby syrov

Počet odobratých sterov z výrobného zariadenia (pastér, syrárska vaňa, pracovné nástroje, formičky)	19
Počet odobratých sterov od pracovníkov	11
Počet sterov odobratých z pracovného prostredia priameho kontaktu so syreninou (syrárské stoly, police na odkvapkávanie)	6
Počet odobratých sterov z okolia pracovného prostredia (steny, vypínače)	9
Počet sterov z prostredia zrenia syrov	4
Spolu	49

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Z celkového počtu 49 odobratých vzoriek sterov bola v rámci detekcie v počte 15 vzoriek zachytená prítomnosť baktérií čeľade Enterobacteriaceae v pomerne širokej škále ich celkového počtu (2,69 – 9,130 log KTJ na tampón). Z týchto 15 vzoriek boli uvedené baktérie prítomné v 6 vzorkách, ktoré boli odobraté z prostredia rúk a pracovnej zástery pracovníkov

syrární. Ostatných 9 vzoriek s pozitívnym nálezom baktérií čeľade Enterobacteriaceae sa týkalo okolia pracovného prostredia (steny, podlahy), políc na odkvapkávanie syrov a políc v zrecích skladoch. Pracovné pomôcky, ktoré prichádzali do priameho kontaktu so surovinou počas procesu výroby boli pozitívne na prítomnosť uvedených baktérií iba v dvoch prípadoch v jednej výrobni (formičky na syr). Počty KTJ na jeden tampón čeľade Enterobacteriaceae sú uvedené v Tabuľke č. 2 v logaritmickom tvare z dôvodu lepšej prehľadnosti a možnosti porovnania daných výsledkov.

Tabuľka č. 2, Priemerné počty baktérií čeľade Enterobacteriaceae vo vzorkách sterov s pozitívnym záchytom vo vzorke

Vzorka steru	Miesto odberu steru	Počet baktérií v log KTJ na jeden tampón
1	Ruky pracovníkov	8,67
2	Ruky pracovníkov	5,98
3	Ruky pracovníkov	3,30
4	Ruky pracovníkov	2,69
5	Ruky pracovníkov	3,00
6	Formička na výrobu syrov	8,88
7	Formička na výrobu syrov	3,39
8	Pracovná zástera	7,90
9	Polica na odkvapkávanie syrov	7,00
10	Polica na odkvapkávanie syrov	4,53
11	Stena (umývateľná) pri pasterizačnom zariadení	6,35
12	Stena (umývateľná) pri pasterizačnom zariadení	3,00
13	Zrecí sklad- polica na syry	5,99
14	Podlaha vo výrobni pri pasterizačnom zariadení	9,13
15	Podlaha vo výrobni pri pasterizačnom zariadení	9,00

Ako vyplýva z výsledkov uvedených v Tabuľke č. 2 najvyššie počty zástupcov čeľade Enterobacteriaceae boli vo vzorkách sterov detekované ako na rukách pracovníkov syrárne, tak aj na formičkách na výrobu syrov a taktiež aj na podlahe pri pasterizačnom zariadení. Všetky odobraté stery z rúk pracovníkov vykazovali prítomnosť baktérií z čeľade Enterobacteriaceae minimálne na jednej ruke, pritom vo všetkých syrárňach prichádzajú pracovníci do priameho kontaktu so surovinou počas celého výrobného procesu. Iba v jednom prípade bolo možné odobrať ster z pracovnej zástery, ktorá bola dezinfikovateľná. Vo všetkých ostatných prevádzkach používajú pracovníci bavlnené oblečenie, ktoré sa každodenne mení a stery neboli odoberané. Prítomnosť sledovaných baktérií na zástere však môže indikovať ako zdroj baktérií

aj pracovné oblečenie. Miesta pozitívneho záchytu zástupcov čeľade Enterobacteriaceae sa rôznili v jednotlivých prevádzkach. Z toho dôvodu nie je možné zovšeobecňovať miesta výskytu uvedených baktérií v našom experimente. Mikrobiologické požiadavky na mlieko a mliečne výrobky upravuje Nariadenie Komisie č. 2073/2005 o mikrobiologických kritériách pre potraviny živočíšneho pôvodu. V uvedenom nariadení sú stanovené mikrobiologické kritériá pre niektoré mikroorganizmy a vykonávacie predpisy, ktoré musia dodržiavať prevádzkovatelia potravinárskych podnikov pri vykonávaní všeobecných a špecifických hygienických opatrení.

Pri mlieku a mliečnych výrobkoch sa sleduje prítomnosť mikroorganizmov pri mliečnych výrobkoch zástupcov čeľade Enterobacteriaceae (pasterizované mlieko, zmrzlina, mrazené dezerty), *E. coli* (syry, maslo, smotana) a koaguláza-pozitívne stafylokoky (syry). Prítomnosť určitých mikroorganizmov, ktoré môžu byť označené ako technologicky nežiaduce nie je ošetrená súčasne platnou legislatívou, napriek tomu je ich prítomnosť najmä v mliečnych produktoch predmetom záujmu mnohých výskumníkov, a to z dôvodu, že tieto mikroorganizmy môžu byť zdrojom prenosu génov antibiotickej rezistencie pre konzumenta, resp. spôsobujú chyby finálnych výrobkov. Pri syroch s nízko dohrievanou syreninou sa môže vyskytnúť skoré durenie syrov z dôvodu prítomnosti koliformných baktérií a to: *Enterobacter aerogenes, Escherichia coli*, ktoré sa môžu dostať do pasterizovaného mlieka sekundárnou kontamináciou pri jeho ďalšom spracovaní (Dudriková et al. 2014, Mladenović et al. 2018b, Tančinová et al. 2017). Po procese výroby by malo byť všetko dobre vyčistené, pretože aj malé množstvo mlieka môže byť zdrojom živín pre baktérie čeľade Enterobacteriaceae. Voda použitá na čistenie by mala mať dobrú hygienickú kvalitu, pretože môže byť tiež zdrojom koliformných baktérií, ktoré môžu následne kontaminovať mlieko. Personál podieľajúci sa na spracovaní mlieka by mal venovať pozornosť čistote svojho oblečenia, rukám a hygiene dojacích zariadení. Opatrnosť je tiež odporúčaná počas dojenia, spracovania a skladovania, pretože kontaminácia mlieka sa môže vyskytnúť pri každom kroku jeho spracovania. (Freitas et al. 2013).

Otázka biofilmu v potravinárstve, a teda aj mliekarstve je na mieste ako ukazujú aj naše pozorovania, pretože prítomnosť baktérií Enterobacteriaceae bola zaznamenaná v približne v jednej tretine odobratých sterov z pracovného prostredia a v každej zo sledovaných syrární bol pozitívny záchyt. Pokiaľ sa biofilm vyskytuje v potravinárskych prevádzkach, môže pri výrobe alebo balení potravín dochádzať k jeho uvoľňovaniu, a tým ku kontaminácii produktov. Mikrobiálnou kontamináciou potravín dochádza k zníženiu ich trvanlivosti a zvyšuje sa riziko prenosu bakteriálnych infekcií (Chmielewski a Frank 2003, Lindsay a Von Holy 2006, Schlegelová a Karpíšková 2007, Šilhová-Hrušková et al. 2015). Biofilm prítomný na povrchu príslušenstva používaného v potravinárskom priemysle býva identifikovaný ako

príčina ochorení z potravín (Capita et al. 2020). Baktérie v biofilme vykazujúce rezistenciu ku rôznej enviromentálnej záťaži, tak potencujú ich životnosť a narastajúce riziko kontaminácie potravín (Mladenović et al. 2018 a, b). Formovanie biofilmu na zariadeniach, ktoré sa používa pri spracovaní mlieka nastáva veľmi rýchlo. Mlieko je bohaté na živiny, špeciálne vápnik, čo podporuje tvorbu biofilmu (Flint et al. 2015). Štúdia vedená Cherif-Antar et al. (2016) zaznamenala prítomnosť biofilmu produkovaného zástupcami z čeľade Enterobacteriaceae (*Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens* a *Enterobacter* spp.) na povrchu nerezového potrubia v mliekarni. Podľa Malek et al. (2012), enterobaktérie môžu byť rezistentné k čistiacim prostriedkom, čo musí byť brané do úvahy. Malek et al. (2012) dokázali prítomnosť *Enterobacter sp*. vo vzorkách, ktoré boli odobraté po dezinfekcii zariadenia. Mladenović et al. (2018 a, b) zistili schopnosť zástupcov rodov *Serratia* a *Klebsiella* izolovaných zo surového mlieka vytvárať biofilm. Nedostatočná hygiena personálu počas manipulácie s potravinami v obchodnej sieti je najviac zaznamenávaná praktická skúsenosť, ktorá vedie k ochoreniam z potravín. Napriek narastajúcemu povedomiu o bezpečnej manipulácií s potravinami a pravidelnému preškoľovaniu pracovníkov, ktorí s potravinami prichádzajú do kontaktu, vo výsledkoch štúdie Lues a Van Tonder (2007), boli zástupcovia čeľade Enterobacteriaceae prítomné v 44 % vzoriek rúk takýchto pracovníkov a v 16 % vzoriek záster.

ZÁVER

Prítomnosť zástupcov čeľade Enterobacteriaceae je známkou úrovne hygieny výrobného procesu a je potrebné brať do úvahy nielen ich záchyt, ale aj množstvo, v ktorom sú detekované v jednotlivých častiach výrobného procesu. Ich prítomnosť je nežiaduca jednak z hľadiska možného negatívneho ovplyvnenia procesu výroby syrov, ale je asociovaná aj s rizikom ich prenosu na konzumenta v potravinovom reťazci, ako pôvodcov alimentárnych ochorení a v mnohých štúdiách aj potvrdeného potenciálneho zdroja prenosu génov antibiotickej rezistencie, pokiaľ sú prítomné aj v konečných produktoch – syroch rôznych typov, čo je predmetom ďalšieho vedeckého skúmania. Skúmanie prítomnosti uvedených baktérií v prostredí výroby syrov na území SR, najmä remeselným spôsobom, počas celého výrobného procesu by mohlo mapovať aktuálnu situáciu so zameraním sa na možné riziká voči konečnému spotrebiteľovi.

POĎAKOVANIE

Práca bola finančne podporená projektom KEGA č. 007UVLF-4/2020.

POUŽITÁ LITERATÚRA

1. CAPITA, R. – CASTAÑO-ARRIBA, A. – RODRÍGUEZ-MELCÓN, C. et al. Diversity, antibiotic resistance, and biofilm-forming ability of Enterobacteriaceae isolated from red meat and poultry preparations. In *Microorganisms*. ISSN 2076-2607, 2020, vol. 8, p. 1226.
2. DUDRIKOVÁ, E. et al. : *Technológia výroby, bezpečnosť a kvalita mlieka a mliečnych výrobkov pre magistrov*. Košice: Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie, 2014, 307 s. ISBN 978-80-8077-447-9.
3. FLINT, S. – JAMALUDIN, N.M. – SOMERTON, B. – PALMER, J. – BROOKS, J. The efect of milk composition on the development of bioflms, in Biofilms in the Dairy Industry, eds Teh KH, Flint S, Brooks J, Knight G. Chichester, Wiley, 2015, p. 36-48.
4. FREITAS, R. – BRITO, M.A. – NERO, L.A. – DE CARVALHO, A.F. (2013) Microbiological safety of Minas Frescal Cheese (MFC) and tracking the contamination of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* in MFC processing. In *Foodborne Pathogens Dis*. ISSN 1535-3141, 2013, vol. 10, p. 951-955.
5. GOŁAŚ-PRADZYŃSKA, M. – ROLA, J.G. 2021. Occurrence and antimicrobial resistance of enterococci isolated from goat´s milk. In J. Vet. Res. 65, 449-455. Dostupné na: doi: 10.2478/jvetres-2021.0071.
6. CHERIF-ANTAR, A. – MOUSSA-BOUDJEMÂA, B. – DIDOUH, S. – MEDJAHDI, K. – MAYO, B. – FLÓREZ, A.B. Diversity and biofilm-forming capability of bacteria recovered from stainless steel pipes of a milk-processing dairy plant. In *Dairy Sci Technol*. ISSN 1958-5586, 2016, vol.96, p.27–38.
7. CHMIELEWSKI RAN, FRANK JF. Biofilm formation and control in food processing facilities. In *Compr Rev Food Sci F*. ISSN 1541-4337, 2003, vol. 2, p.22-32.
8. JIAN-LI, W. – YUAN-YUAN, S. – SHOU-YU, G. et al. Serotype and virulence genes of Klebsiella pneumoniae isolated from mink and its pathogenesis in mice and mink. In Sci Rep. ISSN 2045-2322, 2017, vol.7, p.1–7.
9. LINDSAY, D. – VON HOLY A. What food safety professional should know about bacterial biofilm. In *Brit Food J*. ISSN 1758-4108, 2006, vol.108, p. 27-37.
10. LUES, J.F.R. – VAN TONDER, I. The occurrence of indicator bacteria on hands and aprons of food handlers in the delicatessen sections of a retail group. In *Food Control*. ISSN 9567-135, 2007, vol.18, p.326-332.

11. MALEK, F. – MOUSSA-BOUDJEMÂA, B. – KHAOUANI-YOUSF, F. – KALAI, A. – KIHEL, M. Microfora of biofilm on Algerian dairy processing lines: an approach to improve microbial quality of pasteurized milk. In *Afr J Microbiol Res.* ISSN 1996-0808, 2012, vol. 6, p. 3836-3844.
12. MLADENOVIĆ, K. – MURUZOVIĆ, M. – LJ, Č. The efects of environmental factors on planktonic growth and biofilm formation of *Serratia odorifera* and *Serratia marcescens* isolated from traditionally made cheese. In *Acta Aliment*. ISSN 0139-3006, 2018a, vol.47, p. 370-378.
13. MLADENOVIĆ, K. – MURUZOVIĆ, M. – LJ, Č. The efects of environmental factors on planktonic growth and biofilm formation of *Serratia odorifera* and *Serratia marcescens* isolated from traditionally made cheese. In *Acta Aliment*. ISSN 0139-3006, 2018a, vol.47, p. 370-378.
14. NARIADENIE KOMISIE (ES) č. 2073/2005 z 15. novembra 2005, o mikrobiologických kritériách pre potraviny. In *Úradný vestník Európskej únie*, L 338, 22.12.2005, p. 1-26.
15. NTULI, V. – NJAGE, P.M.K. – BUYS, E.M. Characterization of Escherichia coli and other Enterobacteriaceae in producer-distributor bulk milk. In *J Dairy Science*. ISSN 0022-0302, 2016, vol.99, p.9534–9549.
16. ÖZDIKMENLI TEPELI, S. – DEMIREL ZORBA, N.N. Frequency of extended-spectrum β-lactamase (ESBL) and AmpC β-lactamase producing Enterobacteriaceae in a cheese production process. In *Journal of Dairy Science*. ISSN 0022-0302, 2018, vol.101, p. 2906-2914.
17. SCHLEGELOVÁ, J. – KARPÍŠKOVÁ, S. Mikrobiální biofilmy v potravinářském průmyslu. In *Epidemiol Mikrobiol Imunol*. ISSN 1210-7913, 2007, vol. 56, p. 14-19.
18. STN EN ISO 18593 (560114) Mikrobiológia potravín a krmív. Horizontálne metódy na odber vzoriek z povrchov použitím odtlačkov a sterov (ISO 18593: 2018).
19. STN EN ISO 6887-5 Mikrobiológia potravín a krmív. Úprava analytických vzoriek, príprava základnej suspenzie a desaťnásobných riedení na mikrobiologické skúšanie. Časť 5: Špecifické pokyny na úpravu mlieka a mliečnych výrobkov (ISO 6887-5: 2010).
20. STN ISO 21528 Mikrobiológia potravinárskeho reťazca. Horizontálna metóda na dôkaz a stanovenie počtu Enterobacteriaceae. Časť 2: Metóda počítania kolónií (ISO 21258-2: 2017).
21. ŠILHOVÁ-HRUŠKOVÁ, L. – MOŤKOVÁ, P. – ŠILHA, D. – VYTŘASOVÁ J.: Detection of biofilm formation by selected pathogens relevant to the food industry *Epidemiol. Mikrobiol. Imunol*. ISSN 210-7913, 2015, vol. 64, č. 3, s. 169–174.

22. TANČINOVÁ, D. – KAČANIOVÁ, M. – FELŠÖCIOVÁ, S. – MAŠKOVÁ, Z. Mikrobiológia potravín. Nitra: Slovenská poľnohospodárska univerzita, 2017, 239 s. ISBN 978-80-552-1642-3.

Kontaktná adresa: Hanzelová Zuzana, Department of Food Hygiene, Technology and Safety, University of Veterinary Medicine and Pharmacy in Košice, Komenského 73, 041 81 Košice, Slovak Republic; E-mail: zuzana.hanzelova@student.uvlf.sk

STANOVENÍ ANTIOXIDAČNÍ KAPACITY KÁVY V ZÁVISLOSTI NA ZPŮSOBU SKLADOVÁNÍ

DETERMINATION OF THE ANTIOXIDANT CAPACITY OF COFFEE DEPENDING ON THE STORAGE METHOD

Havlová Lenka, Hufová Veronika, Pospiech Matej, Tremlová Bohuslava

Ústav hygieny a technologie potravin rostlinného původu, Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární univerzita Brno, Palackého tř. 1946/1, 612 42 Brno, Česká republika

ABSTRACT

Polyphenols in coffee beans have a beneficial effect on health due to their antioxidant effect. Their content may be affected by storage conditions. The aim of this study was to determine the effect of storage temperature on the antioxidant capacity of coffee using the DPPH method. Samples of selected coffee were stored in a resealable bag at room temperature (22 °C), in a refrigerator (4 °C) and in a freezer (-18 °C). The analyses were performed after 20, 54 and 140 days of storage. Our results showed that suitable methods of coffee storage are refrigeration and freezing, and the least suitable method was storing at room temperature.

Key words: coffee beans, storage conditions, DPPH

ÚVOD

Káva patří celosvětově mezi nejoblíbenější nápoje, což souvisí s její jedinečnou chutí (Thurston, 2018; de Melo Pereira *et al.*, 2019a; Yahayu *et al.*, 2020; Tran *et al.*, 2022). Kávová zrna prochází technologickým procesem, který má vliv na chuťový profil kávy. Mezi zásadní kroky výroby patří nejen sklizeň kávových třešní, ale také jejich další zpracování, které může probíhat suchou, mokrou nebo polosuchou cestou. Po fermentaci následuje sušení a zelená zrna se poté praží. Tyto kroky významně ovlivňují kvalitu a finální chuť kávy. Neméně podstatným krokem, který umožní zachovat kávovým zrnům jejich kvalitu je jejich skladování. Během skladování dochází k významným chemickým, fyzikálním a biologickým změnám, které značně ovlivňují kvalitu a přijatelnost nápoje. Tyto změny závisí zejména na teplotě, vlhkosti, přístupu kyslíku a typu obalu (Thurston, 2018; Toledo *et al.*, 2016; de Melo Pereira *et al.*, 2019b; Tripetch and Borompichaichartkul, 2019). Stříbrná slupka, která obklopuje endosperm kávového zrna je bohatá na obsah polyfenolů, které vykazují značnou antioxidační aktivitu (de Melo Pereira *et al.*, 2019b).

Antioxidační vlastnosti polyfenolů spočívají ve schopnosti zachytit volné radikály, které mají negativní dopad na živé organismy (Munteanu and Apetrei, 2021). Pražená zrna mohou být následně skladována za různých podmínek. Cílem této práce bylo zjistit, jaké podmínky jsou z hlediska doby skladování a zachování si co nejvyšší antioxidační kapacity nejvhodnější. Pražená zrnková káva byla zabalena do běžně dostupného uzavíratelného sáčku a skladována při pokojové teplotě, v chladničce a mrazničce.

MATERIÁL A METODIKA

Vzorky: Byla použita výběrová pražená zrnková káva 100% arabika, původem z Brazílie a odrůdou Catucaí 2SL. Vzorky kávy byly skladovány při pokojové teplotě (22 °C), v chladničce (4 °C) a mrazničce (-18 °C) v uzavíratelných sáčcích po dobu 140 dnů. Analýzy vzorků kávy probíhaly v den příjmu a dále po 20, 54 a 140 dnech.

Příprava extraktu:

Do tmavých lahviček bylo naváženo 0,1 g namletého vzorku kávy, přidáno 20 ml 96% etanolu s destilovanou vodou (v poměru 1:1, v/v). Poté byly lahvičky s extraktem vloženy na 30 minut do ultrazvukové lázně a zfiltrovány.

Stanovení antioxidační aktivity metodou DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl):

K 3 ml připraveného extraktu byl přidán 1 ml 0,1 mM etanolového roztoku DPPH (0,0039 g DPPH bylo doplněno do 100 ml etanolem). Dále byl připraven srovnávací roztok smícháním 3 ml roztoku (96% etanol s vodou v poměru 1:1) a 1 ml 0,1 mM DPPH. Po 30 minutové inkubaci ve tmě a protřepání byla změřena absorbance při vlnové délce 517 nm. Tato metoda vychází z metodiky dle Adilah et al. (2018).

Výsledky byly vypočítané podle vzorce:

$$DPPH\ (\%) = [(Abs_{DPPH} - Abs_{sample})/Abs_{DPPH}] \cdot 100$$

Statistické zpracování:

Výsledky byly statisticky zpracovány testem Kruskal-Wallis (one-way ANOVA) na hladině významnosti p=0,001 (Xlstat verze 2022, USA).

VÝSLEDKY A DISKUZE

Tato práce byla zaměřena na zjištění změn antioxidační kapacity kávy v závislosti na délce a způsobu skladování. Tabulka 1 uvádí naměřené hodnoty antioxidační kapacity metodou DPPH v různých časových intervalech.

Případné odchylky měření mohly být způsobeny reakcí proteinů v kávě, dále je reakce ovlivněna teplotou a dobou před měřením (Yahayu *et al.*, 2020).

Tabulka č. 1, Antioxidační kapacita kávy v závislosti na způsobu skladování a typu balení v %

Odběr	Doba skladování	Způsob skladování	Uzavíratelný sáček
1.	**20 dní**	Pokojová teplota	$44,63 \pm 0,28^{aA*}$
		Chladnička	$52,83 \pm 0,40^{bA}$
		Mraznička	$56,03 \pm 0,12^{cA}$
2.	**54 dní**	Pokojová teplota	$11,71 \pm 0,52^{aB}$
		Chladnička	$24,39 \pm 0,20^{bB}$
		Mraznička	$23,33 \pm 0,77^{bB}$
3.	**140 dní**	Pokojová teplota	$2,59 \pm 0,11^{aC}$
		Chladnička	$12,05 \pm 0,44^{bC}$
		Mraznička	$11,21 \pm 0,64^{bC}$

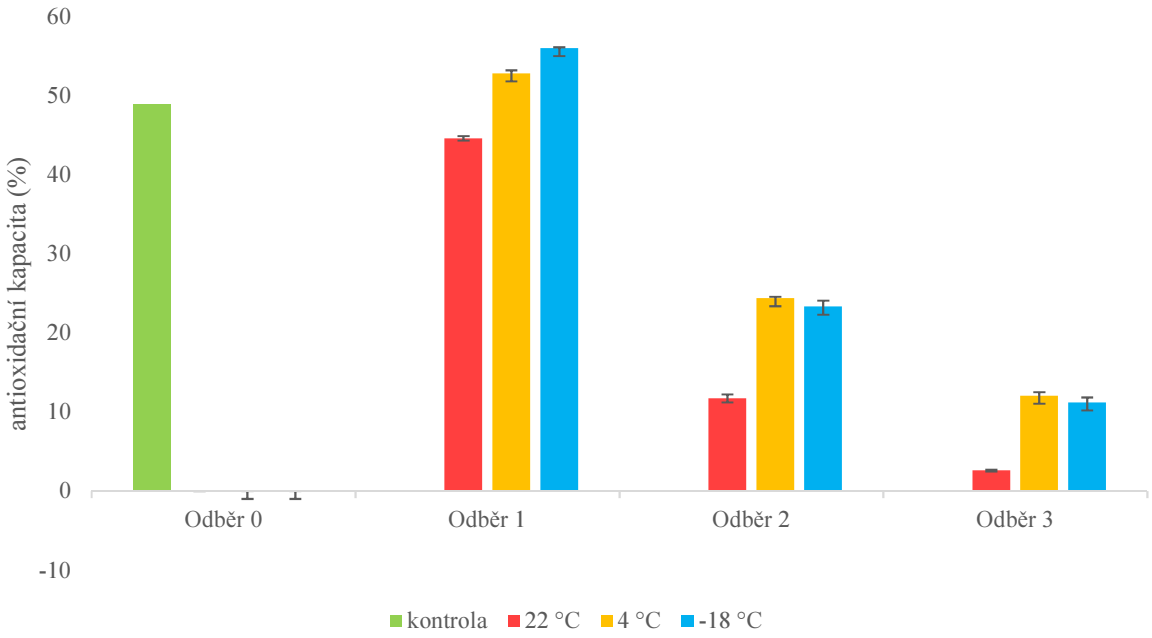
* malá písmena v horním indexu označují statisticky významný rozdíl ($p<0,001$) v rámci jednoho odběru (mezi pokojovou teplotou, chladničkou a mrazničkou); velká písmena v horním indexu označují statisticky významný rozdíl ($p<0,001$) ve způsobu skladování (porovnání mezi odběry).

Antioxidační kapacita vzorku kávy před skladováním byla 48,91 ± 1,43 %. Z výsledků vyplývá, že již po 20 dnech skladování při různých teplotách došlo ke změně antioxidační kapacity kávy. V rámci prvního odběru vykazovaly výsledky statisticky významný rozdíl $p<0,001$ u kávy skladované při pokojové teplotě 44,63 ± 0,28 %, v chladničce 52,83 ± 0,40 % i mrazničce 56,03 ± 0,12 %.

V rámci 2. odběru byly statisticky významné rozdíly $p<0,001$ mezi vzorky skladovanými při pokojové teplotě 11,71 ± 0,52 % v porovnání s chladírenskou 24,39 ± 0,20 % i mrazírenskou teplotou 23,33 ± 0,77 %. Mezi chladírenskou a mrazírenskou teplotou nebyl zjištěn statisticky nevýznamný rozdíl.

Po 140 dnech skladování byly z hlediska statistické významnosti výsledky stejné jako u 2. odběru. Nicméně hodnoty antioxidační kapacity s délkou skladování klesaly až na 2,59 ± 0,11 % v případě uchovávání vzorků při pokojové teplotě, 12,05 ± 0,44 % při chladírenské teplotě a 11,21 ± 0,64 % při mrazírenské teplotě.

Obrázek č. 1, Vliv skladování kávy na antioxidační kapacitu



Z naměřených dat (obrázek 1) je zřejmé, že s prodlužující se dobou skladování docházelo k poklesu antioxidační kapacity kávy u všech způsobů skladování statisticky významně $p<0,001$. Antioxidační kapacita stanovená u pokojové teploty klesla po 34 dnech skladování z hodnoty 44,63 ± 0,28 % na 11,71 ± 0,52 % a po dalších 86 dnech na 2,59 ± 0,11 %.

V případě chladírenské (4 °C) a mrazírenské (- 18 °C) teploty hodnoty antioxidační aktivity s délkou skladování také klesaly. Po 34 dnech skladování při 4 °C klesla hodnota antioxidační kapacity z 52,83 ± 0,40 % na 24,39 ± 0,20 %, zatímco u skladování při - 18 °C došlo k poklesu z 56,03 ± 0,12 % na 23,33 ± 0,77 %. Po dalších 86 dnech skladování došlo k dalšímu poklesu antioxidační kapacity, a to na hodnoty 12,05 ± 0,44 % u skladování při 4 °C a 11,21 ± 0,64 % v případě skladování při -18 °C.

Výsledky této práce potvrzují závěry autorů Toledo et al. (2016), který ve své studii uvádí, že rychlost oxidace během skladování je snížena mimo jiné také vlivem nízké teploty.

Chemickými změnami způsobenými vlivem skladování kávového nápoje při teplotě 4 a 25 °C se zabývali autoři Pérez-Martínez et al. (2008). V této studii bylo využito metody HS-GC-MS (headspace plynová chromatografie s hmotnostní spektrometrií) pro zjištění obsahu těkavých látek po 30 dnech skladování kávy. Výsledky ukázaly, že během 30 dní skladování nedošlo ke vzniku nových látek (Pérez-Martínez et al., 2008). Autoři Pérez-Martínez et al.

(2008) také uvádí, že pozorované změny jsou pomalejší a méně výrazné u skladování při 4 °C, což potvrzuje také závěr naší práce.

Studie autorů Tripetch and Borompichaichartkul (2019) ukazuje, že z hlediska stabilizace obsahu vlhkosti a barvy jsou HDPE (high density polyethylene) sáčky vhodné pro skladování zelených zrn kávy po dobu delší než 10 měsíců. Pokud jde o bioaktivní sloučeniny, nestabilní podmínky mohou podporovat tvorbu nových bioaktivních látek během skladování. Nicméně autoři uvádí, že tato problematika vyžaduje provedení dalších studií (Tripetch and Borompichaichartkul, 2019).

ZÁVĚR

Tato práce se zabývá stanovením antioxidační kapacity v kávových zrnech v závislosti na teplotě skladování. Vzorky kávy byly skladovány v uzavíratelných sáčcích při teplotě 22 °C, 4 °C a -18 °C. U těchto vzorků kávy byla stanovena antioxidační kapacita po 20, 54 a 140 dnech skladování. Z naměřených dat vyplývá, že teplota i doba skladování významně ovlivňuje antioxidační kapacitu kávy. Jako nejvhodnější způsob uchovávání kávy bylo vyhodnoceno skladování v chladničce 12,05 ± 0,44 %, kdy si káva zachovala v porovnání s ostatními vzorky skladovanými při pokojové 2,59 ± 0,11 % a mrazírenské 11,21 ± 0,64 % teplotě, nejvyšší antioxidační kapacitu i po 140 dnech.

POUŽITÁ LITERATURA

1. ADILAH, A.N. et al.. Utilization of mango peel extracts on the biodegradable films for active packaging. In *Food Packaging and Shelf Life* [online]. 2018, vol. 16, pp. 1–7. Available at: https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2018.01.006.
2. DE MELO PEREIRA, G. V. et al.. Exploring the impacts of postharvest processing on the aroma formation of coffee beans – A review. In *Food Chemistry* [online]. 2019, vol. 272, pp. 441–452. Available at: https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.08.061.
3. MUNTEANU, I.G. AND APETREI, C.. Analytical methods used in determining antioxidant activity: A review. In *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2021, vol. 22, no. 7. Available at: https://doi.org/10.3390/ijms22073380.
4. PÉREZ-MARTÍNEZ, M. et al.. Changes in volatile compounds and overall aroma profile during storage of coffee brews at 4 and 25 C. In *Journal of agricultural and food chemistry* [online]. 2008, vol. 56, no. 9, pp. 3145-3154.
5. THURSTON, Robert W. *Coffee: from bean to barista*. Rowman & Littlefield, Publishing Group, Inc., Lanham, 2018 ISBN: 978-1538108086. 200 s.
6. TOLEDO, P.R.A.B. et al.. Relationship Between the Different Aspects Related to

Coffee Quality and Their Volatile Compounds. In *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* [online]. 2016, vol. 15, no. 4, pp. 705–719. Available at: https://doi.org/10.1111/1541-4337.12205.

7. TRAN, T.K.N. et al.. Chemistry potential and application of activated carbon manufactured from coffee grounds in the treatment of wastewater: A review. In *Materials Today: Proceedings* [online]. 2022, vol. 60, pp. 1914–1919. Available at: https://doi.org/10.1016/j.matpr.2022.01.020.
8. TRIPETCH, P. AND BOROMPICHAICHARTKUL, C.. Effect of packaging materials and storage time on changes of colour, phenolic content, chlorogenic acid and antioxidant activity in arabica green coffee beans (*Coffea arabica* L. cv. Catimor). In *Journal of Stored Products Research* [online]. 2019, vol. 84, p. 101510. Available at: https://doi.org/10.1016/j.jspr.2019.101510.
9. YAHAYU, M. et al.. Antioxidant Activity In Green And Roasted Coffee: A Critical Review. In *Bioscience Research* [online]. 2020, vol. 17, pp. 2249–2263.

Kontaktní adresa: Havlová Lenka, Ústav hygieny a technologie potravin rostlinného původu, Veterinární univerzita Brno, Palackého tř. 1946/1, 612 42 Brno, Česká republika; E-mail: havloval@vfu.cz

KVALITATÍVNE STANOVENIE OBSAHU ß-LAKTÁMOVÝCH A TETRACYKLÍNOVÝCH ANTIBIOTÍK V SUROVOM KRAVSKOM MLIEKU

QUALITATIVE DETERMINATION OF THE CONTENT OF ß-LACTAM AND TETRACYCLINE ANTIBIOTICS IN RAW COW'S MILK

Hriciková Simona, Kožárová Ivona

Katedra hygieny, technológie a zdravotnej bezpečnosti potravín, Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, Komenského 73, 041 81 Košice, Slovenská republika

ABSTRACT

Since the milk should not contain any harmful contaminants before leaving the farm, this study provides the results of the analysis of the presence of residues from the group of β-lactam and tetracycline antibiotics in samples of raw cow's milk obtained during the year from farms in Slovakia. The Duplex BT Scan test (Zeulab S.L., Zaragoza, Spain) paired with the IRIS device and mobile application was used to evaluate the presence of β-lactam and tetracycline antibiotics. Out of the total number of 27 analysed samples of raw cow's milk, 6 (22 %) samples were positive for the presence of β-lactam residues and 4 (15 %) samples were evaluated positive for the presence of tetracycline residues. Milk samples positive for the presence of antibiotic residues exceeding the maximum residue limits (MRL) are not suitable for human consumption and further processing.

Key words: milk, residues, antibiotic, β-lactams, tetracyclines, contaminants

ÚVOD

Mlieko je považované za jednu z najcennejších potravín na svete, pretože zohráva dôležitú úlohu vo výžive zvierat a ľudí. Odvetvie mliečneho priemyslu v posledných rokoch neustále rastie. V minulom roku sa na celom svete vyprodukovalo viac ako 540 ton kravského mlieka. Európska únia vyprodukovala za posledný rok 145 ton mlieka, čím sa stala najväčším producentom mliečnych výrobkov na svete (*Number of milk cows worldwide by country* 2022).

Každoročne sa na celom svete použije viac ako 63 tisíc ton antibiotík u hospodárskych zvierat (EMA 2018). Rezíduá antimikrobiálnych látok sú jedným z najčastejších kontaminantov mlieka. Mnohé antimikrobiálne látky používané v terapii dojníc sa vylučujú do mlieka. Po uvoľnení je väčšina antibiotík perzistentná a biologicky aktívna (Polianciuc et al. 2020).

Vzhľadom na vysokú toxicitu a karcinogénne vlastnosti rezíduí antibiotík je ich prítomnosť v mlieku hrozbou. Niektoré antibiotiká sú odolné voči tepelnej inaktivácii,

pasterizácii, autoklávovaniu a iným druhom postupov spracovania potravín. Na produkciu vysoko kvalitného mlieka je teda nevyhnutné eliminovať riziko kontaminácie mlieka (Polianciuc et al. 2020; Benkerroum 2020).

Rezíduá antimikrobiálnych látok je potrebné monitorovať a kontrolovať v súlade s platnou legislatívou Európskej Únie (EÚ). Vykonávacie nariadenie Komisie (EÚ) 2019/627 uvádza praktické opatrenia na vykonávanie úradných kontrol produktov živočíšneho pôvodu určených na ľudskú spotrebu v súlade s nariadením Európskeho parlamentu a Rady (EÚ) 2017/625 o monitorovaní určitých látok a ich rezíduí v živých zvieratách a živočíšnych produktoch (*Commission Implementing Regulation (EU) 2019/627*; *Regulation (EU) 2017/625 of the European Parliament and of the Council)*.

Keďže prítomnosť rezíduí antibiotík predstavuje rizikový faktor pre verejné zdravie, cieľom tejto štúdie bolo analyzovať mlieko z fariem na prítomnosť najbežnejšie používaných skupín antibiotík (β-laktámy a tetracyklíny).

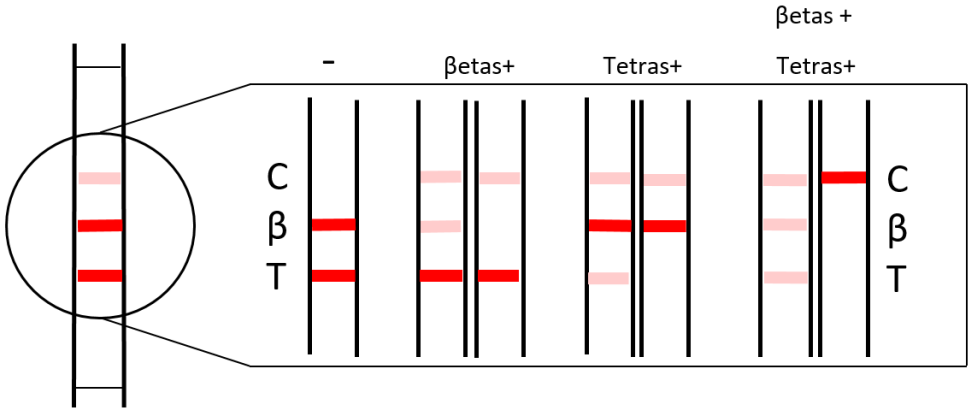
MATERIÁL A METODIKA

Vzorky mlieka: V priebehu jedného roka bolo z fariem na Slovensku zozbieraných celkovo 27 vzoriek surového kravského mlieka. Vzorky mlieka boli uskladnené v mrazničke pri teplote -18 °C. Bezprostredne pred testovaním boli vzorky zahriate na teplotu 40 °C počas 20 minút a homogenizované.

Duplex BT Scan*:* Duplex BT Scan (Zeulab S.L., Zaragoza, Španielsko) je kvalitatívny automatický test v kazetovom formáte určený na detekciu antibiotík zo skupiny β-laktámov a tetracyklínov v surovom kravskom, ovčom a kozom mlieku. Ide o kompetitívny imunochromatografický test, ktorý obsahuje špecifické receptory a protilátky pre detekciu β-laktámov a tetracyklínov. Ak vzorka neobsahuje tieto antibiotiká, receptory sa naviažu na pre nich špecifické miesto na testovacom prúžku, čo sa prejaví zobrazením červenej čiarky v odčítacom poly (negatívna vzorka). Ak vzorka obsahuje niektoré z týchto antibiotík, antibiotikum sa naviaže na špecifické receptory, ktoré sa ďalej nebudú schopné naviazať na špecifické miesto na testovacom prúžku, a teda červená čiarka sa v testovacom poly nezobrazí alebo bude slabej intenzity (pozitívna vzorka), obrázok 1. Limity detekcie jednotlivých antibiotík sú uvedené v tabuľke 1. Test bol použitý podľa pokynov výrobcu. Stručne povedané, kazeta bola vybratá zo sterilného obalu a vložená do zariadenia IRIS. 100 µl mlieka sa pridalo do jamky na kazete a spustil sa automatický test s použitím aplikácie IRIS. Proces trval 6 minút. Táto skúška bola navrhnutá a validovaná v súlade s nariadením Komisie (EÚ) č. 37/2010 z 22. decembra 2009 o farmakologicky účinných látkach a ich klasifikácii s ohľadom na maximálne

limity rezíduí (MRL) v potravinách živočíšneho pôvodu a podľa internej validácie ISO 13969: 2003.

Obrázok č. 1, Interpretácia výsledkov testu Duplex BT Scan vizuálnym čítaním



C = kontrola, β = betalaktámy, T = tetracyklíny

Zdroj: Vlastný obrázok

Tabuľka č. 1, Detekčné limity jednotlivých antibiotík testu Duplex BT Scan

Antibiotikum	MRL (µg.l^{-1}, ppb)	LOD (µg.l^{-1}, ppb)
Amoxicillin	4	3
Ampicillin	4	3
Cefalonium	20	4
Cefoperazon	50	5
Cefquinome	20	10
Ceftiofur	100	100
Cephalexin	100	> 600
Cephapirin	60	8
Chlortetracycline	100	40
Cloxacillin	30	5
Nafciline	30	15
Oxacillin	30	5
Oxytetracycline	100	60
Penicillin G	4	2
Tetracycline	100	40

MRL = maximálny reziduálny limit; LOD = limit detekcie

Zdroj: https://www.zeulab.com/en/landing-duplex-bt-scan-iris-eng/

IRIS: IRIS (Zeulab S.L., Zaragoza, Španielsko) je automatické zariadenie na analýzu (automatický test) a/alebo vyhodnotenie výsledku (čítanie prúžku) rýchlych testov od spoločnosti Zeulab. Prístroj vyhodnocuje prítomnosť kontaminantov v matrici meraním absorbancie, ktorá je vyjadrená v číselných hodnotách. Výsledky sa zobrazia v mobilnej aplikácii spárovanej s týmto zariadením.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

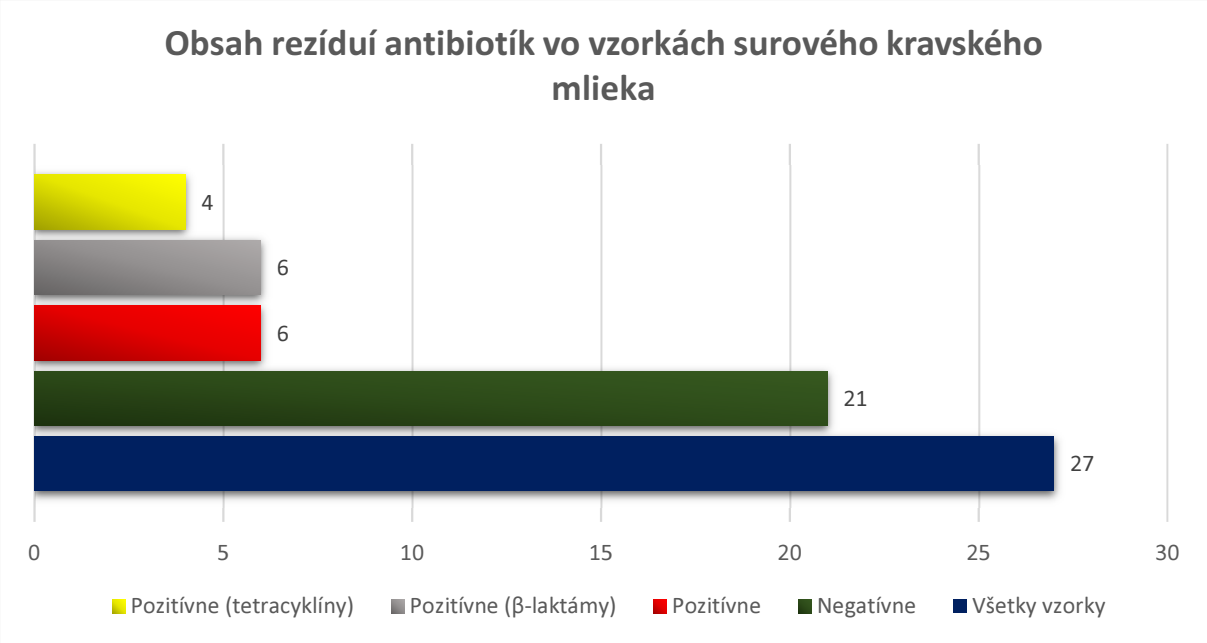
Prítomnosť rezíduí antibiotík v mlieku je v súčasnosti čoraz väčším problémom. Uvádza sa, že rezíduá antibiotík v mlieku môžu mať negatívny vplyv na ľudské zdravie, spracovanie a kvalitu mlieka a môžu brániť procesu fermentácie pri výrobe jogurtov a syrov (Alves et al. 2020). Je zrejmé, že šírenie mikrobiálnej rezistencie voči antibiotikám sa v posledných rokoch stalo celosvetovou hrozbou. Centrum pre kontrolu a prevenciu chorôb (CDC) opísalo rezistenciu ako jeden z najvýznamnejších problémov zdravotníctva v dôsledku množstva baktérií rezistentných na antibiotiká objavených v nedávnych štúdiách (*Antibiotic resistance* no date).

V našej štúdii boli analyzované rezíduá β-laktámových a tetracyklínových antibiotík, pretože sú široko používané v terapii bakteriálnych infekcií, najmä na liečbu mastitíd u dojníc.

Z celkového počtu 27 analyzovaných vzoriek surového kravského mlieka bolo 6 (23 %) vzoriek pozitívnych na prítomnosť rezíduí antibiotík (tabuľka 2). Zo 6 pozitívnych vzoriek boli 4 (67 %) vzorky pozitívne na prítomnosť tetracyklínov a 6 (100 %) vzoriek bolo pozitívnych na prítomnosť β-laktámov (obrázok 2).

Výsledky ukázali, že kontaminácia mlieka antibiotikami môže súvisieť s absenciou izolácie mlieka produkovaného dojnicami liečenými antibiotikami. Preto sa kontaminované mlieko pri zbere mieša s nekontaminovaným mliekom a mliekom z iných fariem. Výsledky taktiež naznačujú nedostatočný skríning rezíduí antibiotík v mlieku na úrovni fariem. Výsledky ukázali vyššiu prevalenciu β-laktámových rezíduí v porovnaní s tetracyklínovými rezíduami v testovanom kravskom mlieku.

Obrázok č. 2, Miera pozitivity testovaných vzoriek surového kravského mlieka na prítomnosť rezíduí antibiotík



Tabuľka č. 2, Obsah rezíduí jednotlivých antibiotík v analyzovaných vzorkách kravského mlieka

Vzorka	Obsah ß-laktámov	Hodnota*	Obsah tetracyklínov	Hodnota*
1	-	3.6	-	2.3
2	-	1.3	-	4.5
3	-	2.7	-	3.9
4	-	4.9	-	1.1
5	+	0.4	+	0.8
6	-	3.1	-	5.4
7	-	5.4	-	2.9
8	+	0.3	+	0.7
9	+	0.7	-	4.8
10	-	2.0	-	2.0
11	-	3.6	-	5.7
12	-	1.8	-	5.9
13	+	0.3	-	3.8
14	-	5.8	-	4.9
15	-	1.4	-	3.7

Pokračovanie tabuľky: Obsah rezíduí jednotlivých antibiotík v analyzovaných vzorkách kravského mlieka

16	-	4.4	-	3.2
17	+	0.5	+	0.7
18	-	3.7	-	2.9
18	-	4.4	-	2.9
19	-	2.3	-	2.4
20	-	4.9	-	5.7
21	-	4.8	-	4.2
22	-	2.8	-	4.1
23	-	1.4	-	6.6
24	+	0.6	+	0.5
25	-	3.1	-	4.7
26	-	4.8	-	3.8
27	-	4.7	-	5.1

*Hodnota absorbancie vyhodnotená zariadením IRIS, nepriamo úmerná obsahu rezídua antibiotík vo vzorke

V štúdii, ktorá sa uskutočnila v Palestíne boli preukázané podobné výsledky. Uviedli prítomnosť β-laktámových a tetracyklínových rezíduí v 22,2 % analyzovaných vzoriek mlieka. Prekvapivo v Rumunsku uviedli, že viac vzoriek bolo pozitívnych na rezíduá tetracyklínov (25,7 %) v porovnaní s rezíduami β-laktámov (5,7 %) (Pogurschi et al. 2015). V Iráne boli vzorky mlieka testované pomocou β-star testu, ktorý ukázal, že 5,33 % vzoriek bolo pozitívnych na rezíduá antibiotík (Kurjogi et al. 2019). V Indii bol použitý Charm β-laktám Tetracyklín Combo test a zistilo sa, že 4,2 % vzoriek bolo pozitívnych na β-laktámové a tetracyklínové antibiotiká (Zeghilet, Bouchoucha, Bouaziz 2022). V Benine bolo mlieko testované pomocou testu Twin Sensor kit 020 a výsledok ukázal 83,9 % pozitivitu na β-laktámové a tetracyklínové rezíduá. Najčastejšou príčinou prítomnosti rezíduí antibiotík v mlieku je podľa nich nedodržanie ochrannej lehoty, po ktorom nasleduje nadmerné podávanie antibiotík a podávanie zakázaných antibiotík (Zeghilet, Bouchoucha, Bouaziz 2022). Ďalšími príčinami môžu byť terapeutické alebo profylaktické zneužívanie antibiotík alebo používanie antibiotík ako rastových stimulátorov (Treiber, Beranek-Knauer 2021).

Celkovo sú rezíduá antibiotík často prítomné v mlieku a preto spôsobujú veľké obavy pre farmárov, spracovateľov mlieka a spotrebiteľov (Treiber, Beranek-Knauer 2021). Rezíduá

antibiotík v mlieku majú veľký dopad na verejné zdravie, pretože môžu spôsobiť nepriaznivé zdravotné účinky u ľudí ako sú alergické reakcie, karcinogenita, mutagenita, teratogenita a rezistencia mikroorganizmov voči antibiotikám, čo môže viesť k zlyhanie antibiotickej liečby globálnych rozmerov. Rezíduá antibiotík môžu pôsobiť hepatotoxicky a spôsobovať reprodukčné poruchy (Chowdhury et al. 2015).

Pre optimálnu ochranu spotrebiteľa a zabezpečenie kvality mlieka a mliečnych výrobkov je dôležité, aby sa rezíduá antimikrobiálnych látok v mlieku nevyskytovali. Obsah rezíduí antibiotík v mlieku musí byť kontrolovaný a hladina nesmie prekročiť prípustný maximálny limit rezíduí (MRL) (Temamoğulları, Kaya 2010). Pre detekciu rezíduí antibiotík v mlieku by mali byť použité jednoduché, rýchle a citlivé testy. Hodnoty MRL by sa mali pravidelne monitorovať na celoštátnej úrovni. Je dôležité, aby boli dodržiavané ochranné lehoty pre jednotlivé liečivá, aby boli liečivá správne skladované a podávané. Po intramamárnej aplikácii antibiotík sa musí mlieko odobrať a zlikvidovať. Všetky dojnice by mali byť ľahko identifikovateľné a dojnice liečené antibiotikami by mali byť oddelené od ostatných, aby sa minimalizovalo riziko kontaminácie mlieka (Beyene 2016).

ZÁVER

S rastúcou svetovou spotrebou kravského mlieka sa zvyšuje aj jeho produkcia a tlak na dodávateľov. Produkcia mlieka sa snaží pokryť dopyt po mlieku, čo častokrát znamená nedodržanie ochranných časových intervalov po podaní liečiva pred dojením, čím sa zvyšuje riziko kontaminácie mlieka rezíduami antimikrobiálnych látok. Prítomnosť rezíduí týchto látok môže ohroziť zdravie spotrebiteľa a preto je dôležité eliminovať a monitorovať používanie antimikrobiálnych látok v chove hospodárskych zvierat a následne monitorovať obsah rezíduí farmakologicky účinných látok v produktoch živočíšneho pôvodu pre zabezpečenie zdravých a bezpečných potravín.

POĎAKOVANIE

Táto štúdia bola podporená Grantom KEGA Č. 015UVLF-4/2021.

POUŽITÁ LITERATÚRA

1. ALVES, Janine F., PAULA, Guilherme H., SILVA, Rânio C.F., LEÃO, Paulo V.T., LEÃO, Karen M., NICOLAU, Edmar S. a SILVA, Marco A.P., 2020. Residues of antibiotics in milk: persistence and quality interference. *Canadian Journal of Animal Science*. marec 2020. Vol. 100, no. 1, pp. 93–101. DOI 10.1139/cjas-2018-0224.

2. Antibiotic resistance, no date. online. [Cit 22 február 2023]. Cit z: https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antibiotic-resistance
3. BENKERROUM, Noreddine, 2020. Aflatoxins: Producing-Molds, Structure, Health Issues and Incidence in Southeast Asian and Sub-Saharan African Countries. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. február 2020. Vol. 17, no. 4, pp. 1215. DOI 10.3390/ijerph17041215.
4. BEYENE, Takele, 2016. Veterinary drug residues in food-animal products: its risk factors and potential effects on public health. *J Vet Sci Technol*. 2016. Vol. 7, no. 1, pp. 1–7.
5. *Commission Implementing Regulation (EU) 2019/627 of 15 March 2019 laying down uniform practical arrangements for the performance of official controls on products of animal origin intended for human consumption in accordance with Regulation (EU) 2017/625 of the European Parliament and of the Council and amending Commission Regulation (EC) No 2074/2005 as regards official controls (Text with EEA relevance.)*, 2019. online. [Cit 8 február 2023]. Cit z: http://data.europa.eu/eli/reg_impl/2019/627/oj/eng
6. EMA, 2018. Maximum residue limits (MRL). *European Medicines Agency*. online. 17 september 2018. [Cit 8 február 2023]. Cit z: https://www.ema.europa.eu/en/veterinary-regulatory/research-development/maximum-residue-limits-mrl
7. CHOWDHURY, Suchayan, HASSAN, Mohammad Mahmudul, ALAM, Mahabub, SATTAR, Sarmina, BARI, Md Saiful, SAIFUDDIN, A. K. M. a HOQUE, Md Ahasanul, 2015. Antibiotic residues in milk and eggs of commercial and local farms at Chittagong, Bangladesh. *Veterinary world*. 2015. Vol. 8, no. 4, pp. 467.
8. KURJOGI, Mahantesh, MOHAMMAD, Yasser Hussein Issa, ALGHAMDI, Saad, ABDELRAHMAN, Mostafa, SATAPUTE, Praveen a JOGAIAH, Sudisha, 2019. Detection and determination of stability of the antibiotic residues in cow's milk. *PLOS ONE*. 10 2019. Vol. 14, no. 10, pp. e0223475. DOI 10.1371/journal.pone.0223475.
9. Number of milk cows worldwide by country 2022, no date. *Statista*. online. [Cit 8 február 2023]. Cit z: https://www.statista.com/statistics/869885/global-number-milk-cows-by-country/
10. POGURSCHI, Elena, CIRIC, Alexandru, ZUGRAVU, Corina a PATRASCU, Daniela, 2015. Identification of Antibiotic Residues in Raw Milk Samples Coming from the Metropolitan Area of Bucharest. *Agriculture and Agricultural Science Procedia*. 31 december 2015. Vol. 6, pp. 242–245. DOI 10.1016/j.aaspro.2015.08.066.

11. POLIANCIUC, Svetlana Iuliana, GURZĂU, Anca Elena, KISS, Bela, ŞTEFAN, Maria Georgia a LOGHIN, Felicia, 2020. Antibiotics in the environment: causes and consequences. *Medicine and Pharmacy Reports*. júl 2020. Vol. 93, no. 3, pp. 231–240. DOI 10.15386/mpr-1742.
12. *Regulation (EU) 2017/625 of the European Parliament and of the Council of 15 March 2017 on official controls and other official activities performed to ensure the application of food and feed law, rules on animal health and welfare, plant health and plant protection products, amending Regulations (EC) No 999/2001, (EC) No 396/2005, (EC) No 1069/2009, (EC) No 1107/2009, (EU) No 1151/2012, (EU) No 652/2014, (EU) 2016/429 and (EU) 2016/2031 of the European Parliament and of the Council, Council Regulations (EC) No 1/2005 and (EC) No 1099/2009 and Council Directives 98/58/EC, 1999/74/EC, 2007/43/EC, 2008/119/EC and 2008/120/EC, and repealing Regulations (EC) No 854/2004 and (EC) No 882/2004 of the European Parliament and of the Council, Council Directives 89/608/EEC, 89/662/EEC, 90/425/EEC, 91/496/EEC, 96/23/EC, 96/93/EC and 97/78/EC and Council Decision 92/438/EEC (Official Controls Regulation)Text with EEA relevance.*, 2017. online. [Cit 8 február 2023]. Cit z: http://data.europa.eu/eli/reg/2017/625/oj/eng
13. TEMAMOĞULLARI, F. a KAYA, Sezai, 2010. Ankara piyasasında satılan sütlerde bazı antibiyotik kalıntılarının ince tabaka kromatografisi ve biyootografik yöntemle saptanması. *Journal of the Faculty of Veterinary Medicine, University of Kafkas, Kars*. 2010. Vol. 16, no. 2, pp. 187–191.
14. TREIBER, Fritz Michael a BERANEK-KNAUER, Heide, 2021. Antimicrobial residues in food from animal origin—A review of the literature focusing on products collected in stores and markets worldwide. *Antibiotics*. 2021. Vol. 10, no. 5, pp. 534.
15. ZEGHILET, Noureddine, BOUCHOUCHA, Brahim a BOUAZIZ, Omar, 2022. βeta-lactam and tetracycline antibiotic residues in cow milk in the Constantine Region, Algeria. *Veterinarska stanica*. 2022. Vol. 53, no. 3, pp. 305–311.

Kontaktná adresa: Hricikóvá Simona, Department of Food Hygiene, Technology and Safety, University of Veterinary Medicine and Pharmacy in Košice, Komenského 73, 041 81 Košice, Slovak Republic; E-mail: simona.hricikova@student.uvlf.sk

KVANTITATÍVNE STANOVENIE OBSAHU AFLATOXÍNU M1 V SUROVOM KRAVSKOM MLIEKU

QUANTITATIVE DETERMINATION OF AFLATOXIN M1 CONTENT IN RAW COW'S MILK

Hriciková Simona, Kožárová Ivona

Katedra hygieny, technológie a zdravotnej bezpečnosti potravín, Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, Komenského 73, 041 81 Košice, Slovenská republika

ABSTRACT

Aflatoxins produced by the fungi *Aspergillus flavus* and *Aspergillus Parasiticus* seriously threaten food safety and thus human and animal health. European Union legislation sets maximum limits for aflatoxin residues for milk and milk products at a limit of 0.05 µg/kg (ppb). From the point of view of consumer health protection verification, AflaM1 Scan (Zeulab S.L., Zaragoza, Spain), a rapid competitive immunochromatographic test designed for quantification (30-200 ppt (ng.kg-1)) of aflatoxin M1 (AFM1) in raw cow's, sheep and goat milk was used to analyse the presence of AFM1 in raw cow's milk samples. The test was used together with the IRIS device and mobile application (Zeulab S.L., Zaragoza, Spain). Out of a total of 22 samples tested, only 4 (18.2%) samples were evaluated as negative and i.e. compliant and 18 (81.8%) positive (non-compliant) samples. Out of 18 positive (non-compliant) samples 15 tested samples contained AFM1 in a concentration higher than the maximum detection limit of the AflaM1 Scan test used (> 200 ppt (ng.kg-1)). Due to the high level of contamination, it is important to pay attention to the prevention of mold in feed and regular screening of milk.

Key words: milk, residues, mycotoxins, aflatoxins, contaminants

ÚVOD

Mykotoxíny sú látky, ktoré prirodzene vznikajú pri raste plesní na obilných zrnách. Najčastejšie pozorované sú aflatoxíny, ochratoxín A, patulín, fumonizíny, zearalenón a nivalenol/deoxynivalenol (WHO 2018).

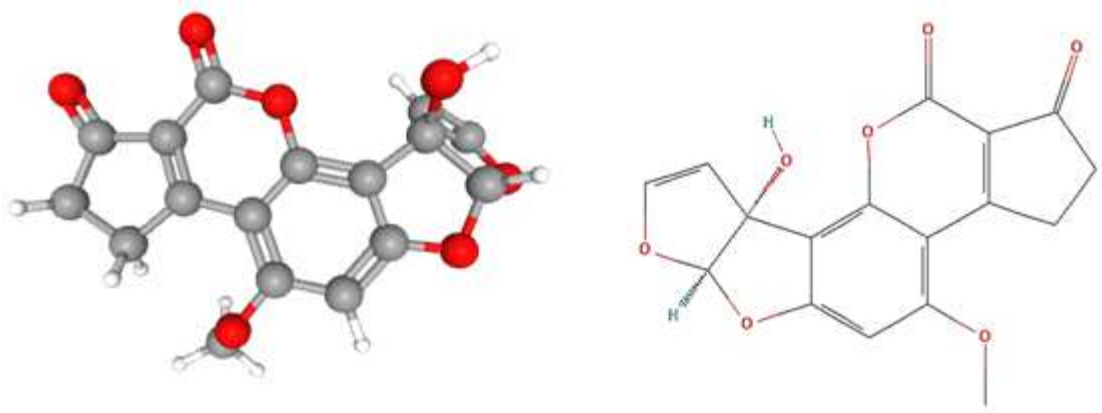
Aflatoxíny boli prvým identifikovaným zdrojom kontaminácie mykotoxínmi v strave prežúvavcov (WHO 2018). Ide o mykotoxíny produkované plesňami *Aspergillus flavus* a *Aspergillus Parasiticus.* Môžu rásť na pôde, rozkladajúcej sa vegetácii, krmive a obilninách (DAFM 2019).

Tieto toxíny sú vysoko škodlivé pre zdravie zvierat aj ľudí a už vo veľmi nízkych koncentráciách spôsobujú akútne klinické príznaky, hoci väčšina poškodzuje zdravie skôr chronicky (DAFM 2019).

K priamej expozícií mykotoxínov dochádza pri požití kontaminovaných obilnín, avšak môže dochádzať aj k nepriamej expozícii mykotoxínov a to požitím kontaminovaných produktov živočíšneho pôvodu, najmä mlieka (WHO 2018).

Aflatoxín M1 (AFM1) (obrázok 1) sa ako hydroxylovaný metabolit aflatoxínu B1 nachádza v mlieku alebo mliečnych výrobkoch získaných od hospodárskych zvierat, ktoré požili kontaminované krmivo (Galvano et al. 1996). Kvôli tejto skutočnosti je AFM1 začlenený do zoznamu látok, ktoré sú pravidelne monitorované na základe Národného plánu monitorovania rezíduí (EFSA 2022).

Obrázok č. 1, 3D a 2D chemická štruktúra aflatoxínu M1



Zdroj: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Aflatoxin-M1#section=Structures

Európska únia stanovuje najprísnejšie kritéria týkajúce sa maximálnych limitov rezíduí (MRL) pre aflatoxíny vo vzorkách surového mlieka. Pre výrobu mliečnych výrobkov je zavedený limit 0,05 µg/kg (ppb). Tento limit je podstatne nižší pre produkty ako je dojčenská výživa a následná dojčenská výživa (0,025 µg/kg) (Nariadenie Komisie (ES) č. 1881/2006). Pre porovnanie, limit pre Spojené štáty americké je 0,5 µg/kg pre AFM1 v mlieku (Kumar et al. 2017).

Pre ochranu zdravia spotrebiteľov je nevyhnutné udržiavať kontaminanty na úrovniach, ktoré sú toxikologicky prijateľné, čo je možné dosiahnuť správnymi poľnohospodárskymi a výrobnými postupmi. Kvôli karcinogénnym vlastnostiam mykotoxínov a najmä aflatoxínov musia byť ich MRL tak nízke, ako je to rozumne dosiahnuteľné (ALARA) (de Koe 1999).

Keďže prítomnosť mykotoxínov v mlieku predstavuje rizikový faktor pre verejné zdravie, cieľom tejto štúdie bolo analyzovať obsah aflatoxínu M1 v mlieku zozbieranom na úrovni fariem a vyhodnotiť mieru kontaminácie mlieka.

MATERIÁL A METODIKA

Vzorky mlieka: V priebehu jedného roka bolo z fariem na Slovensku zozbieraných celkovo 27 vzoriek surového kravského mlieka. Vzorky mlieka boli uskladnené v mrazničke pri teplote -18 °C. Bezprostredne pred testovaním boli vzorky zahriate na teplotu 40 °C počas 20 minút a homogenizované.

AflaM1 Scan: AflaM1 Scan (Zeulab S.L., Zaragoza, Španielsko) je rýchly test určený na kvantifikáciu (30 – 200 ppt (ng.kg-1)) AFM1 v surovom kravskom, ovčom a kozom mlieku. Ide o kompetitívny imunochromatografický test pozostávajúci zo skúmavky s lyofilizovanými detekčnými zlúčeninami AFM1 a prúžkom so špecifickými činidlami. Prítomnosť AFM1 je nepriamo úmerná intenzite vzniknutého testovacieho prúžku a kvantifikácia vyžaduje čítačku IRIS. Test bol použitý podľa pokynov výrobcu. Stručne povedané, 200 µl vzorky mlieka sa pridalo do skúmavky s lyofilizovaným obsahom, dobre sa premiešalo pipetou a inkubovalo 3 minúty pri 40 °C. Následne sa testovací prúžok vložil do skúmavky a inkuboval sa ďalších 7 minút pri 40 °C. Po inkubácii sa prúžok umiestnil do kazety a výsledky boli odčítané pomocou zariadenia IRIS spárovaného s mobilnou aplikáciou.

Interpretácia výsledkov na základe kvantifikácie obsahu aflatoxínu M1 vo vzorke:

- <30 ppt – 35 ppt = negatívne, vyhovujúce
- 36 – 49 ppt = podozrivé, potvrdiť výsledok zopakovaním analýzy
- 50 – 64 ppt = pozitívne, nevyhovujúce, potvrdiť výsledok zopakovaním analýzy
- 65 – >200 ppt = pozitívne, nevyhovujúce

IRIS: IRIS (Zeulab S.L., Zaragoza, Španielsko) je automatické zariadenie na analýzu (automatický test) a/alebo vyhodnotenie výsledku (čítanie prúžku) rýchlych testov od spoločnosti Zeulab. Prístroj vyhodnocuje prítomnosť kontaminantov v matrici meraním absorbancie, ktorá je vyjadrená v číselných hodnotách. Výsledky sa zobrazia v mobilnej aplikácii spárovanej s týmto zariadením.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Na prítomnosť aflatoxínu M1 bolo vyšetrených celkovo 22 vzoriek surového kravského mlieka (tabuľka 1). Z 22 analyzovaných vzoriek bolo 18 (81,8 %) vzoriek pozitívnych (nevyhovujúce) a 4 (18,2 %) vzorky boli stanovené ako negatívne (vyhovujúce). Obsah AFM1 v nevyhovujúcich vzorkách kolísal od 71 ppt do >200 ppt. Z celkového počtu 18 pozitívne

testovaných vzoriek až 15 (83,3 %) vzoriek obsahovalo AFM1 v koncentrácii vyššej, ako je maximálny detekčný limit použitého testu AflaM1 Scan (> 200 ppt (ng.kg-1)). V prípade vzoriek mlieka testovaných na prítomnosť AFM1 v tejto štúdii je možné konštatovať vysokú mieru kontaminácie mlieka.

Tabuľka č. 2, Výsledky analýzy vzoriek surového kravského mlieka na prítomnosť AFM1

Vzorka	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Hodnota	<30	>200	>200	>200	32	147	>200	71	>200	>200	>200
Výsledok	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
Vzorka	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
Hodnota	>200	98	>200	>200	>200	>200	>200	<30	36	>200	>200
Výsledok	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+

Správa Európskeho úradu pre bezpečnosť potravín (European Food Safety Authority - EFSA) sumarizuje údaje z monitorovania vytvorené v roku 2020 v rámci úradných kontrolných činností o prítomnosti rezíduí veterinárnych liekov a určitých látok v živých zvieratách a živočíšnych produktoch v Európskej únii, na Islande a v Nórsku. V prípade mykotoxínov (podskupina B3d) bolo analyzovaných 1 568 vzoriek mlieka, z ktorých 4 (0,26 %) vzorky boli hlásené ako nevyhovujúce v súvislosti s AFM1, nahlásené 3 krajinami (EFSA 2022).

Ak porovnáme tieto výsledky s predchádzajúcimi štúdiami uskutočnenými na celom svete, prevalencia je mimoriadne vysoká. Štúdia (Kamkar 2005) o surovom mlieku v meste Sarab v Iráne v roku 2005 preukázala 40 % zhodu. Ďalšia štúdia (Hussain, Anwar 2008) v Pakistane vykonala mesačnú analýzu hladín AFM1 v mlieku. Hodnoty AFM1 v mlieku odobratom v októbri sa pohybovali od 0,27 $\mu g.l^{-1}$ do 0,45 $\mu g.l^{-1}$ s priemernou hodnotou 0,345 $\mu g.l^{-1}$. Ďalším mesiacom na porovnanie bol február, priemerná hodnota obsahu AFM1 bola 0,466 $\mu g.l^{-1}$. Zo všetkých testovaných vzoriek 99,4 % vzoriek prekročilo odporúčaný limit Európskeho spoločenstva/Potravinového kódexu a to 0,05 $\mu g.l^{-1}$ alebo 0,05 $\mu g.kg^{-1}$. Tento limit bol stanovený na základe princípu ALARA (as low as reasonably achievable - tak nízke, ako je rozumne dosiahnuteľné). Zásada ALARA bola dôvodom, prečo sú limity pre aflatoxíny v EÚ stanovené na tak nízkych úrovniach. To je dôvod, prečo väčšina vzoriek prekračuje tieto úrovne pri testovaní. Na zníženie týchto úrovní je potrebné ďalšie vzdelávanie a výskum v danej oblasti (De Koe 1999).

Na prítomnosť aflatoxínov v potravinách živočíšneho pôvodu môže mať vplyv aj typ podnebného pásma. Riziko expozície aflatoxínu sa považuje za vyššie v regiónoch s tropickým alebo subtropickým podnebím. Extrémne teploty a sucho môžu byť faktormi ovplyvňujúce rast *Aspergillus* spp. v plodinách (Benkerroum 2020). Na výskyt aflatoxínov môže mať vplyv aj

ročné obdobie. Pozorované hladiny aflatpxínov sú vyššie v zimných mesiacoch. Je to spôsobené typom výživy ustajnených zvierat. Dobytok sa v zimných mesiacoch bežne kŕmi krmivom a koncentrátmi. V letných mesiacoch má naopak dobytok možnosť spásať čerstvé pastviny a riziko expozície aflatoxínom sa zníži (WHO 2018).

Ideálnymi podmienkami pre rast plesní je vlhké a teplé prostredie. Pre obmedzenie rastu plesní v krmivách je preto dôležité krmivá skladovať v primerane suchých a chladných podmienkach. Pravidelnou kontrolou skladovacích podmienok krmív a obilnín a kontrolou akýchkoľvek známok kontaminácie alebo vystavenia aflatoxínom môžeme znížiť riziko ich prenosu do produktov živočíšneho pôvodu. Počas sušenia a skladovania by sa malo zabrániť poškodeniu zŕn. Poškodené zrná sú náchylnejšie na inváziu plesní, najmä aflatoxínov. Poľnohospodári a prevádzkovatelia potravinárskych podnikov by mali nakupovať čerstvé obilniny, ak je to možné. Priestory na skladovanie obilia a krmovín by sa mali udržiavať bez prístupu hmyzu. Možnú kontamináciu taktiež zvyšuje predĺžená doba skladovania. Pre zníženie rizika expozície mykotoxínov na farme sa tiež odporúča zabezpečiť pestrú stravu. Skrmovaním rôznych druhov obilnín a krmovín sa zníži riziko nadmerného vystavenia mykotoxínov jednej plesni (Kamkar 2005, Benkerroum 2020, WHO 2018).

ZÁVER

Vysoké riziko kontaminácie aflatoxínmi predstavujú najmä krmoviny a obilniny. Keďže sú aflatoxíny produkované bežne sa vyskytujúcimi plesňami *Aspergillus* spp. je ich výskyt podmienený ideálnou teplotou a vlhkosťou pre rast plesní. Pre obmedzenie rastu plesní a redukciu obsahu mykotoxínov je preto potrebné dodržiavať správne podmienky skladovania krmovín a obilnín. S cieľom zabezpečiť bezpečné a zdravé potraviny je nevyhnutné pravidelné monitorovanie obsahu týchto kontaminantov v potravinách rastlinného aj živočíšneho pôvodu.

POĎAKOVANIE

Táto štúdia bola podporená Grantom KEGA Č. 015UVLF-4/2021.

POUŽITÁ LITERATÚRA

1. BENKERROUM, N., 2020: Aflatoxins: Producing-molds, structure, health issues and incidence in Southeast Asian and Sub-Saharan African countries. *IJERPH,* 17, 1215.
2. DE KOE, W. J. (1999). Regulations of the European Union for mycotoxins in foods. *Arhiv Za Higijenu Rada i Toksikologiju*, *50*(1), 37–46.
3. DE KOE, W. J., 1999: Regulations of the European Union for mycotoxins in foods. *Arh. za Hig. Rada Toksikol.*, *50*, 37—46.

4. EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY, 2022: *Report for 2020 on the Results From the Monitoring of Veterinary Medicinal Product Residues and Other Substances in Live Animals and Animal Products.* Available at https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.2903/sp.efsa.2022.EN-7143. Accessed on 10th October 2022.
5. GALVANO, F., GALOFARO, V., & GALVANO, G. (1996). Occurrence and stability of aflatoxin M1 in milk and milk products: A worldwide review. *Journal of Food Protection*, *59*(10), 1079–1090. https://doi.org/10.4315/0362-028X-59.10.1079
6. HUSSAIN, I., ANWAR, J., 2008: A study on contamination of aflatoxin M1 in raw milk in the Punjab province of Pakistan. *Food Control*, *19*, 393–395. DOI: 10.1016/j.foodcont.2007.04.019.
7. KAMKAR, A., 2005: A study on the occurrence of aflatoxin M1 in raw milk produced in Sarab city of Iran. *Food Control*, *16*, 593–599. DOI: 10.1016/j.foodcont.2004.06.021.
8. KUMAR, P., MAHATO, D. K., KAMLE, M., MOHANTA, T. K., & KANG, S. G. (2016). Aflatoxins: A global concern for food safety, human health and their management. *Frontiers in Microbiology*, *7*, 2170. https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.02170
9. NARIADENIE KOMISIE (ES) č. 1881/2006 z 19. decembra 2006 , ktorým sa ustanovujú maximálne hodnoty obsahu niektorých kontaminantov v potravinách (Text s významom pre EHP), 2006. , OJ L
10. THE STATE LABORATORY – DAFM (2019). Agriculture & Food. Available: https://www.statelab.ie/agriculture.html. Accessed on 28th March 2023).
11. WORLD HEALTH ORGANISATION – WHO, 2018: *Mycotoxins.* Available at https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/mycotoxins. Accessed on *5th October 2022.*
12. WORLD HEALTH ORGANISATION – WHO, 2022: *Antibiotic resistance.* Available at https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antibiotic-resistance. Accessed on 3rd October 2022.

Kontaktná adresa: Hricikova Simona, Department of Food Hygiene, Technology and Safety, University of Veterinary Medicine and Pharmacy in Košice, Komenského 73, 041 81 Košice, Slovak Republic; E-mail: simona.hricikova@student.uvlf.sk

ANTIBAKTERIÁLNA AKTIVITA VYBRANÝCH ESENCIÁLNYCH OLEJOV VOČI *YERSINIA RUCKERI*, VÝZNAMNÉMU PATOGÉNU RÝB

ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF SELECTED ESSENTIAL OILS AGAINST *YERSINIA RUCKERI* AS AN IMPORTANT FISH PATHOGEN

Hudecová Patrícia[1], Koščová Jana[1], Fečkaninová Adriána[2], Hajdučková Vanda[1]

[1]Katedra mikrobiológie a imunológie, Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, Komenského 73, 041 81 Košice, Slovenská republika

[2]Katedra farmaceutickej technológie, farmakognózie a botaniky, Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, Komenského 73, 041 81 Košice, Slovenská republika

ABSTRACT

Essential oils (EO) are secondary metabolites of plants, which are characterized by anti-inflammatory, antioxidant, immunostimulating and significant antibacterial activity, thus they create a promising alternative to fight against growing antibiotic resistance. The aim of this work was to detect the antibacterial activity of 10 EOs against *Yersinia ruckeri*, with the reference strain of *Yersinia ruckeri* 8467 CCM, while *Yersinia ruckeri* 85365/1 was used as the clinical strain. To confirm the inhibition of pathogens growth, a disk diffusion method was performed, based on which EOs were selected to determine the minimum inhibitory concentration (MIC). The plant EOs of *Thymus vulgaris*, *Origanum vulgare*, *Cinnamomum verum* and *Eucalyptus globolus* whose minimum inhibitory concentrations ranged from 0.6 % to 0.01 % demonstrated a significant growth inhibitory effect.

Key words: essential oil, antibacterial activity, *Yersinia ruckeri*, MIC

ÚVOD

Esenciálne oleje (EO) predstavujú hydrofóbne sekundárne metabolity rastlín, ktoré sú známe svojou protizápalovou, antimikrobiálnou, antioxidačnou a imunostimulačnou aktivitou, čo umožňuje ich využitie v rôznych oblastiach priemyslu. Takéto širokospektrálne využitie je umožnené prostredníctvom ich veľkej rozmanitosti zloženia, čo dokazuje prítomnosť aj 200 rôznych komponentov v zmesi čistého EO. Medzi hlavné komponenty patria alkoholy, aldehydy, estery, ketóny, fenoly a terpény, ktorých kombinácia určuje biologické vlastnosti oleja (Bakkali 2019, Hanif 2019, Nazzaro 2013, Turek 2013). EO taktiež predstavujú sľubnú náhradu antibiotík, vďaka ich antibakteriálnej aktivite a kvôli zvyšujúcej sa antibiotickej rezistencii sú predmetom skúmania rôznych štúdií (Owen 2018). Taktiež k rastúcej

antibiotickej rezistencii dochádza aj v oblasti akvakultúry a práve preto bolo cieľom tejto práce sledovanie antibakteriálnej aktivity EO z rastlín *Eucalyptus globolus*, *Cymbopogon citratus*, *Juniperus communis*, *Pinus sylvestris*, *Rosmarinus officinalis*, *Origanum vulgare*, *Melaleuca alternifolia*, *Salvia officinalis*, *Thymus vulgaris* a *Cinnamomum verum* voči *Yersinia ruckeri*, významnému patogénu rýb, ktorý je pôvodcom enterickej červene (enteric redmouth disease) a ktorý spôsobuje vysoké ekonomické straty v chovoch rýb (Kumar 2015).

MATERIÁL A METODIKA

ESENCIÁLNE OLEJE A BAKTERIÁLNE KMENE

Esenciálne oleje rastlín eukalyptus (*Eucalyptus globolus*), citrónová tráva (*Cymbopogon citratus*), borievka (*Juniperus communis*), borovica (*Pinus sylvestris*), rozmarín (*Rosmarinus officinalis*), oregano (*Origanum vulgare*) a čajovník (*Melaleuca alternifolia*) boli získané z Katedry farmaceutickej technológie, farmakognózie a botaniky na Univerzite veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach a EO zo šalvie (*Salvia officinalis*), tymiánu (*Thymus vulgaris*) a škorice (*Cinnamomum verum*) boli zaobstarané z firmy Hanus, Slovenská republika.

Antibakteriálna aktivita EO bola testovaná na referenčnom kmeni *Yersinia ruckeri* CCM 8467 z Českej zbierky mikroorganizmov a na klinickom izoláte *Yersinia ruckeri* 85365/1 z Veterinárnej univerzity, Brno.

DISKOVO DIFÚZNA METÓDA

Bakteriálne inokulá boli pripravené z nočnej kultúry (18 h) v tryptón sójovom bujóne (TSB) pri 37°C. Inokulá boli upravené na zákal, ktorý korešponduje s 0,5 štandardou McFarlandovej stupnice v sterilnom fyziologickom roztoku, čo zodpovedá koncentrácii 1,5 x 10^8 KTJ/ml. Takto pripravené inokulá boli v objeme 100µl naočkované na Mueller-Hinton agar (MHA), na ktoré boli následne uložené papierové disky s priemerom 6 mm, pre aplikáciu 10 µl čistého EO. Na umožnenie difúzie EO boli platne ponechané pri izbovej teplote po dobu 30 minút a inkubácia prebehla pri 37°C po dobu 24 hodín. Antibakteriálna aktivita bola vyhodnotená meraním priemeru zóny inhibície rastu v milimetroch.

MINIMÁLNA INHIBIČNÁ KONCENTRÁCIA (MIC)

Minimálna inhibičná koncentrácia (MIC) bola prevedená s EO, ktoré preukázali vhodnú zónu inhibície rastu z diskovo difúznej metódy. EO boli dvojkovo riedené v TSB v 96-jamkových platničkách v koncentračnom rozpätí 0,6 % až 0,01%, pričom Tween 20 bol použitý, ako emulgátor. Bakteriálne inokulá boli pripravené z nočnej kultúry, tak ako je spomenuté vyššie a upravené na zákal zodpovedný 1,0 štandarde McFarlandovej stupnice v sterilnom fyziologickom roztoku, čo zodpovedá koncentrácii 3,0 x 10^8 KTJ/ml. Pripravené

inokulá boli pridané k nariedenému EO v pomere 1:1 a finálna koncentrácia baktérií predstavovala 0,5 štandardy McFarlandovej stupnice (1,5 x 10^8 KTJ/ml). Ako negatívna kontrola bolo použité čisté bakteriálne inokulum v TSB. Inkubácia prebehla pri 37°C po dobu 24 hodín a vyhodnotenie bolo vykonané prostredníctvom spektrofotometra pre meranie v mikrotitračných platničkách Biotek Synergy 2 pri vlnovej dĺžke 600 nm a Dunnett testom v štatistickom programe Prism 8.3.0.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

EO predstavujú sľubnú náhradu antibiotík vďaka ich antibakteriálnej aktivite, načo poukazujú viaceré štúdie. Yildirim a Turker (2018) skúmali antibakteriálny efekt 24 EO voči patogénom rýb, kde potvrdili silnú antibakteriálnu aktivitu EO z pepermintu (*Mentha piperitae*), rozmarínu (*Rosmarinus officinalis*) a levandule (*Lavandula angustifolia*). Mith (2014) sa zaoberal antibakteriálnou aktivitou 15 EO voči *Listeria monocytogenes, Salmonella* Typhimurium a *Escherichia coli* O157:H7, pri ktorých potvrdili významný antibakteriálny vplyv škoricového (*Cinnamomum verum*), tymiánového (*Thymus vulgaris*) a oregánového EO (*Origanum compactum*).

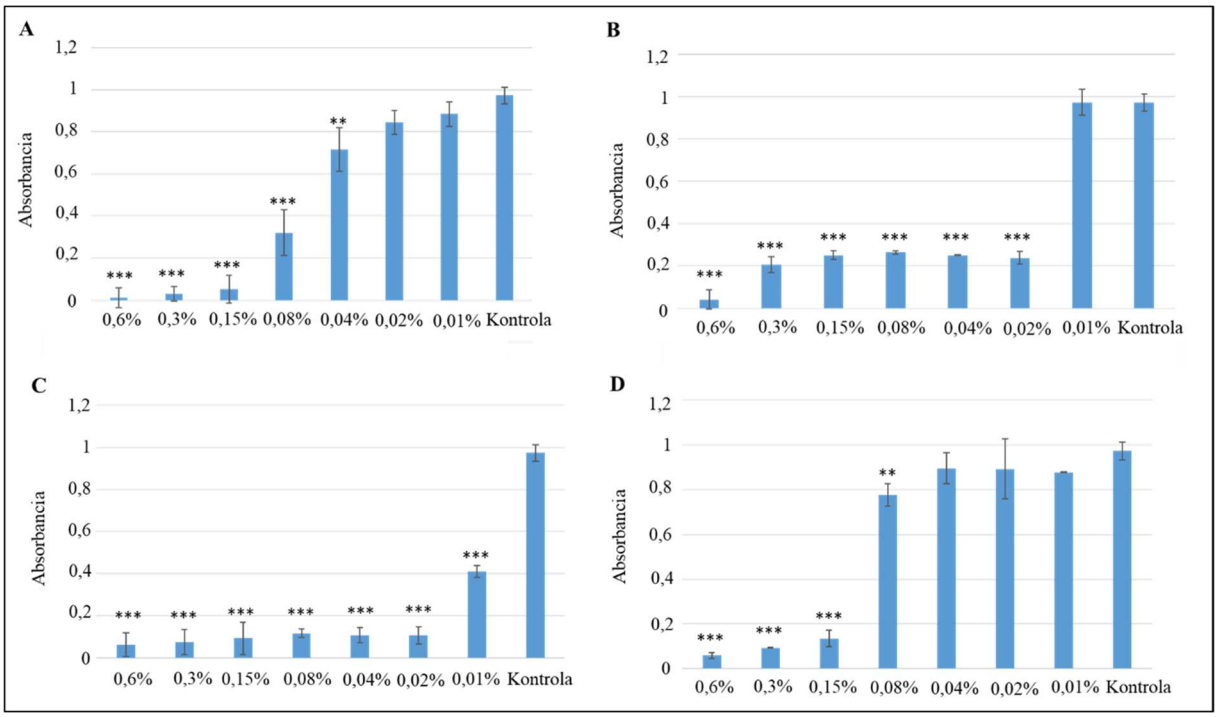
V aktuálnej práci bola pozorovaná antibakteriálna aktivita 10 EO voči *Y. ruckeri* CCM 8467 a *Y. ruckeri* 85365/1 použitím diskovo difúznej metódy. Jej výsledky sú zosumarizované v Tabuľke č. 1. Ako je spomenuté v práci Mith (2014), zóna inhibície menšia ako 7 mm je považovaná za výsledok bez antibakteriálnej aktivity. Jediným EO, ktorý preukázal rezistenciu voči obidvom patogénom, je *Cymbopogon citratus*, zatiaľ čo EO z *Origanum vulgare*, *Thymus vulgaris* a *Cinnamomum verum* preukázali silnú antibakteriálnu aktivitu voči *Y. ruckeri* CCM 8467 a *Y. ruckeri* 85365/1.

Tabuľka č. 1, Antibakteriálna aktivita EO voči *Y. ruckeri* CCM 8467 a *Y. ruckeri* 85365/1 použitím diskovo difúznou metódou

EO z rastliny	*Y. ruckeri* CCM 8467	*Y. ruckeri* 85365/1
Origanum vulgare	45 mm	35 mm
Thymus vulgaris	55 mm	37 mm
Cinnamomum verum	50 mm	45 mm
Melaleuca alternifolia	33 mm	22 mm
Eucalyptus globolus	23 mm	17 mm
Pinus sylvestris	17 mm	15 mm
Rosmarinus officinalis	19 mm	14 mm
Juniperus communis	14 mm	11 mm
Salvia officinalis	12 mm	11 mm
Cymbopogon citratus	0 mm	0 mm

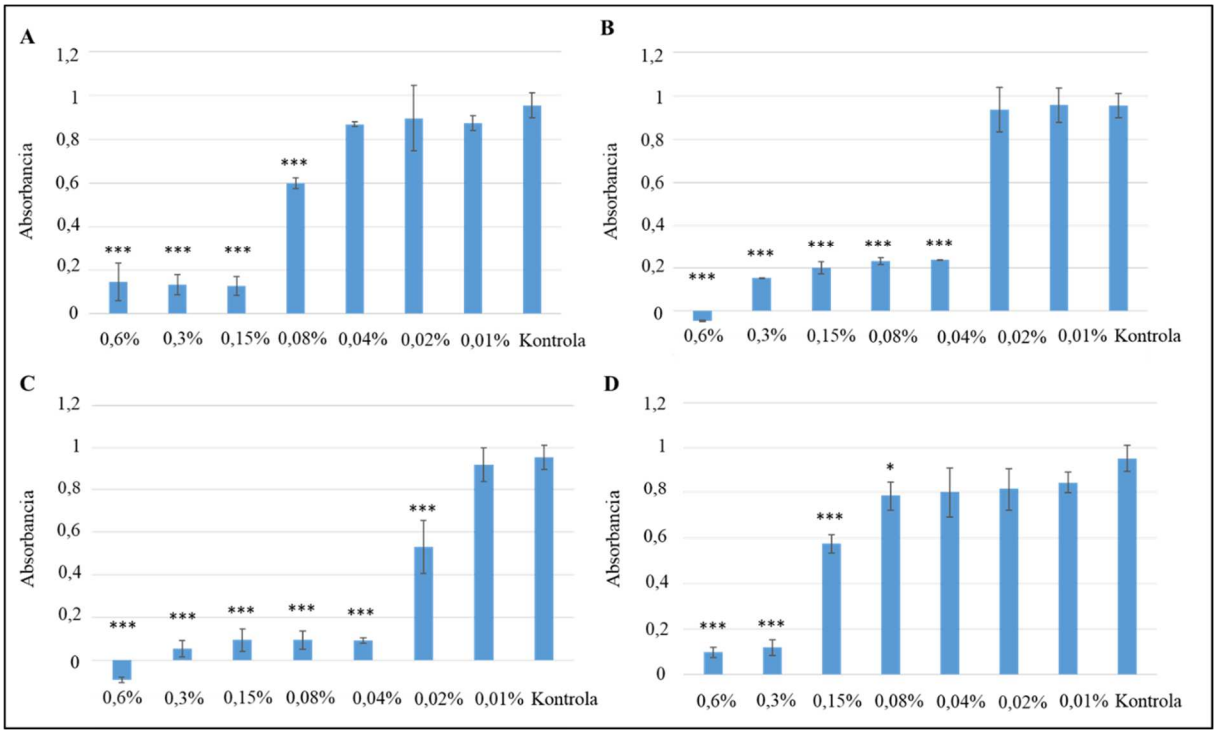
Pre stanovenie MIC boli vybraté 4 EO s vyhovujúcim inhibičným účinkom, potvrdeným diskovo difúznou metódou, medzi ktoré patrí *Origanum vulgare*, *Thymus vulgaris*, *Cinnamomum verum* a *Eucalyptus globolus*. EO preukázali signifikantné inhibičné účinky voči *Y. ruckeri* CCM 8467, u ktorej je MIC pre *Origanum vulgare* 0,04 % ($p<0,01$), pre *Thymus vulgaris* 0,02 % ($p<0,001$), pre *Cinnamomum verum* 0,01 % ($p<0,001$) a pre *Eucalyptus globolus* 0,08 % ($p<0,01$) (Obrázok č. 1). Signifikantné inhibičné účinky preukázali EO aj voči *Y. ruckeri* 85365/1, u ktorej je MIC pre *Origanum vulgare* 0,08 % ($p<0,001$), pre *Thymus vulgaris* 0,04 % ($p<0,001$), pre *Cinnamomum verum* 0,02 % ($p<0,001$) a pre *Eucalyptus globolus* 0,08% ($p<0,05$) (Obrázok č. 2). Výsledok tejto práce je zhodný s prácou Hulankova (2022), ktorá poukázala na signifikantný účinok škoricového (*Cinnamomum zeylanicum*), oregánového (*Origanum vulgare*) a tymiánového EO (*Thymus vulgare*) voči *Y. enterocolitica* a *Y. pseudotuberculosis*. Podľa Park (2016), eukalyptový EO (*Eucalyptus globolus*) vykazuje antibakteriálnu aktivitu voči patogénom rýb ako *Edwardsiella tarda*, *Streptococcus iniae*, *Vibrio harveyi* a *V. ichthyoenteri*.

Obrázok č. 1, Minimálna inhibičná koncentrácia EO voči *Y. ruckeri* CCM 8467



*Legenda: MIC EO Origanum vulgare (A), Thymus vulgaris (B), Cinnamomum verum (C) a Eucalyptus globolus (D) boli merané voči kontrole Y. ruckeri CCM 8467 (*p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001).*

Obrázok č. 2, Minimálna inhibičná koncentrácia voči *Y. ruckeri* 85365/1



*Legenda: MIC EO Origanum vulgare (A), Thymus vulgaris (B), Cinnamomum verum (C) a Eucalyptus globolus (D) boli merané voči kontrole Y. ruckeri 85365/1 (*p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001).*

ZÁVER

Daná práca bola zameraná na antibakteriálnu aktivitu vybraných esenciálnych olejov voči rybiemu patogénu, *Y. ruckeri*. Všetky EO preukázali inhibičný účinok okrem *Cymbopogon citratus*, pričom signifikantný účinok preukázali EO rastlín *Origanum vulgare*, *Thymus vulgaris*, *Cinnamomum verum* a *Eucalyptus globolus*. Ich aplikácia predstavuje sľubnú alternatívu k zníženiu rastúcej antibiotickej rezistencie, avšak dovtedy je potrebné vykonať viaceré štúdie, vrátane *in vivo* testov.

POĎAKOVANIE

Táto práca bola podporovaná projektom VEGA 1/0731/21.

POUŽITÁ LITERATÚRA

1. BAKKALI, Fadil, et al. Biological effects of essential oils–a review. In *Food and chemical toxicology*. ISSN 0278-691, 2008, vol. 46, no. 2, p. 446-475.
2. HANIF, Muhammad Asif, et al. Essential oils. In *Essential Oil Research: Trends in Biosynthesis, Analytics, Industrial Applications and Biotechnological Production*, 2019. ISBN 978-3-030-16545-1. s. 3-17.
3. HULANKOVA, Radka. Higher Resistance of Yersinia enterocolitica in Comparison to Yersinia pseudotuberculosis to Antibiotics and Cinnamon, Oregano and Thyme Essential Oils. In *Pathogens*. ISSN 2076-0817, 2022, vol. 11, no. 12, p. 1456.
4. KUMAR, Gokhlesh, et al. Yersinia ruckeri, the causative agent of enteric redmouth disease in fish.In *Veterinary research*. ISSN 1297-9716, 2015, vol. 46, no. 1, p. 1-10.
5. MITH, Hasika, et al. Antimicrobial activities of commercial essential oils and their components against food-borne pathogens and food spoilage bacteria. In *Food science & nutrition*. ISSN 2048-7177, 2014, vol. 2, no. 4, p. 403-416.
6. NAZZARO, Filomena, et al. Effect of essential oils on pathogenic bacteria. In *Pharmaceuticals*. ISSN 1424-8247 , 2013, vol. 6, no. 12, p. 1451-1474.
7. OWEN, Lucy; LAIRD, Katie. Synchronous application of antibiotics and essential oils: dual mechanisms of action as a potential solution to antibiotic resistance. In *Critical reviews in microbiology*. ISSN 1549-7828, 2018, vol. 44, no. 4, p. 414-435.
8. PARK, Joon-Woo; WENDT, Mitchell; HEO, Gang-Joon. Antimicrobial activity of essential oil of Eucalyptus globulus against fish pathogenic bacteria. In *Laboratory Animal Research*. ISSN 1738-6055, 2016, vol. 32, no. 2, p. 87-90.

9. TUREK, Claudia; STINTZING, Florian C. Stability of essential oils: a review. In *Comprehensive reviews in food science and food safety*. ISSN 1541-4337 , 2013, vol. 12, no.1, p. 40-53.
10. YILDIRIM, Arzu Birinci; TÜRKER, Hakan. Antibacterial activity of some aromatic plant essential oils against fish pathogenic bacteria. In *Journal of Limnology and Freshwater Fisheries Research.* ISSN 2149-4428, 2018, vol. 4, no. 2, p. 67-74.

Kontaktná adresa: Hudecová Patrícia, Department of Microbiology and Immunology, University of Veterinary Medicine and Pharmacy in Košice, Komenského 73, 041 81 Košice, Slovak Republic; E-mail: Patricia.Hudecova@student.uvlf.sk

EKONOMICKÉ UKAZOVATELE PRODUKCIE ZVERINY NA SLOVENSKU V POĽOVNÍCKEJ SEZÓNE 2021/2022

ECONOMIC INDICATORS OF GAME PRODUCTION IN SLOVAKIA IN THE HUNTING SEASON 2021/2022

Humeník Filip [1], Bartkovský Martin [2], Lazár Jozef [3], Čurlík Ján [3], Karolová Renáta [3], Lazár Peter [3]

[1]Katedra morfologických disciplín, Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, Komenského 73, 041 81 Košice, Slovenská republika

[2]Katedra hygieny, technológie a zdravotnej bezpečnosti potravín, Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, Komenského 73, 041 81 Košice, Slovenská republika

[3]Katedra chovu a chorôb zveri, rýb a včiel, ekológie a kynológie Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, Komenského 73, 041 81 Košice, Slovenská republika

ABSTRACT

Economic indicators of game production play, in addition to indicators of trophy quality, a non-negligible role in the management of hunting grounds and, ultimately, in the national economy. In the presented work, we monitored game production from the point of view of the number of pieces of game caught, subsequently converted to weight using the method according to Hell (2007). In the 2021/2022 hunting season, the total production of hunting grounds in Slovakia was 3779 tons of deer, 847 tons of fallow deer, 142 tons of mouflon, 392 tons of roe deer, 2526 tons of wild boar, 64 tons of hare and 54 tons of pheasant. When converted to euros with the prices offered by buyers of game (price calculated on average, taking into account the time of hunting and abatement) represents game production in Slovakia for all hunting grounds approx. €12 384 694.

Key words: game, economic indicators, hunting, hunting season 2021/2022

ÚVOD

Zverinu je možno charakterizovať ako mäso voľne-žijúcich teplokrvných zvierat (vtákov a cicavcov), ktoré sa chovajú pre lov. Vo všeobecnosti pre tento druh mäsa platí, že má hnedo-červenú farbu vďaka vyššiemu obsahu myoglobínu. Z hľadiska dietetického sa zverina považuje za ľahko stráviteľnú potravinu, vďaka nižšiemu obsahu tuku a medzisvalového väziva [1]. V prospech diviny hovorí aj fakt, že sa jedná o produkt vysoko kvalitný, keďže pochádza od voľne žijúcich zvierat, ktorých potravinové spektrum je značne bohatšie ako u zvierat

domácich. Naviac majú tieto zvieratá aj voľnosť pohybu, čo napomáha optimálnej tvorbe svaloviny [2]. Ba čo viac, ak hovoríme o zverine, ktorá bola získaná za dodržania všetkých zásad poľovníckej etiky, môžeme tvrdiť že sa jedná o produkt, ktorý spĺňa aj tie najprísnejšie kritéria uplatňujúce sa pri ochrane zvierat [3]. Trendom posledného decénia je nárast jarných kmeňových stavov raticovej zveri, s čím súvisí aj nárast škôd na lesných a poľnohospodárskych kultúrach[4]. Práve z tohto hľadiska zohrávajú ekonomické ukazovatele uplatňujúce sa v poľovníctve nezanedbateľnú úlohu. V tejto štúdii sme vyčíslili produkciu diviny v poľovných revíroch Slovenska vychádzajúc z počtu ulovených kusov jednotlivých druhov zveri z hľadiska hmotnostného a rovnako tak ja finančného.

MATERIÁL A METODIKA

Pri vyčíslení produkcie zveriny na Slovensku vychádzame z údajov týkajúcich sa výšky odstrelu jednotlivých druhov raticovej a drobnej zveri v poľovníckej sezóne 2021/2022 a následne metódy doc. Hella (2004) pre výpočet priemernej plánovanej hmotnosti pre hlavné druhy zveri: jelenia 70 kg, danielia 35 kg, muflónia 20 kg, srnčia 13 kg, diviačia 35 kg, zajačia 3,9 kg a bažantia 1,3 kg [5].

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Celková produkcia zveri v poľovníckej sezóne 2021/2022 teda predstavovala 3779 ton jelenej, 847 ton danielej, 142 ton muflónej, 392 ton srnčej, 2526 ton diviačej, 64 ton zajačej a 54 ton bažantej zveri. Pri prepočte na eurá s cenami ponúkanými výkupcami zveriny (cena počítaná v priemere s ohľadom na dobu lovu a zrážky) predstavuje produkcia zveriny na Slovensku za všetky poľovné revíry cca 12 384 694€. Napriek tomu, že si poľovníci a užívatelia poľovných revírov plnia svoje povinnosti v oblasti plánov lovu a chovu zveri svedomite, o čom hovoria aj každoročne stúpajúce čísla ulovenej zveri, v poslednom období sa čoraz častejšie hovorí o škodách na poľnohospodárskych plodinách spôsobených zverou. V roku 2021 boli škody lesnou zverou vyčíslené na takmer 26 miliónov eur [4]. Preto je namieste diskutovať aj o regulácii početnosti zveri, pohlavnej štruktúre a plnení plánov lovu s cieľom dosiahnutia únosných normovaných kmeňových stavov na jednej strane a poľnohospodárskej politike, osevných plánoch či diverzifikácii poľnohospodárstva na strane druhej, tak aby slúžili k spokojnosti a prospechu všetkých zúčastnených strán [6] [7].

ZÁVER

Pri súčasných cenách za prenájom poľovných revírov, predstavujú zisky z predaja diviny nezanedbateľnú položku vo výsledkoch poľovného hospodárenia. Je však potrebné

zohľadniť aj škody spôsobené zverou na lesných porastoch a poľnohospodárskych kultúrach. Pravdou však je, že škody napáchané zverou sa poškodeným subjektom nevyplácajú v plnej miere. Preto, je na mieste uvažovať o ďalšom manažmente, ktorý by viedol k udržateľnosti poľovníctva a rovnako tak aj hospodárskej činnosti v krajine. Motiváciou pre poľovné združenia a spoločnosti môže byť aj predaj ulovenej zveri prostredníctvom webovej aplikácie, kde by príjmy podstatne prevyšovali ceny poskytované výkupcami.

POĎAKOVANIE

Práca vznikla s podporou Vedeckej grantovej agentúry MŠVVaŠ SR VEGA1/0237/23.

POUŽITÁ LITERATÚRA

1. Niewiadomska, K. *et al.* Game Meat Consumption—Conscious Choice or Just a Game? *Foods* **9**, 1357 (2020).
2. Neethling, J., Hoffman, L. C. & Muller, M. Factors influencing the flavour of game meat: A review. *Meat Sci.* **113**, 139–153 (2016).
3. Hölker, S., von Meyer-Höfer, M. & Spiller, A. Inclusion of Animal Ethics into the Consumer Value-Attitude System Using the Example of Game Meat Consumption. *Food Ethics* **3**, 53–75 (2019).
4. Huba, J. Škody spôsobené poľovnou zverou treba riešiť, nie ich prehliadať. *Poľnoinfo.sk* https://polnoinfo.sk/skody-sposobene-polovnou-zverou-treba-riesit-nie-ich-prehliadat/ (2022).
5. HELL, Pavel – GARAJ, Peter. 2004. Nová príručka poľovníctva, Bratislava: Príroda 2004, 288 s. ISBN 80-07-01302-4.
6. Vomáčka, V. & Bártů, J. Damage Caused by Game and its Compensation in Central European Countries: A Comparative Perspective. *Cent. Eur. J. Comp. Law* **3**, 183–200 (2022).
7. Vacek, S. *et al.* Growth response of mixed beech forests to climate change, various management and game pressure in Central Europe. *J. For. Sci.* **65 (2019)**, 331–345 (2019).

Kontaktná adresa: Humeník Filip, Department of Morphological Disciplines, Technology, University of Veterinary Medicine and Pharmacy in Košice, Komenského 73, 041 81 Košice, Slovak Republic; E-mail: filip.humenik@uvlf.sk

IN VIVO TESTOVANIE VPLYVU RÔZNYCH DRUHOV HUMÍNOVÝCH LÁTOK NA ČREVNÚ MIKROBIOTU PRASIAT

IN VIVO TESTING OF THE EFFECT OF DIFFERENT HUMIC SUBSTANCES ON PIG´S INTESTINAL MICROBIOTA

Chomová Natália[1], Moskáľová Lenka[1], Alena Hreško Šamudovská[2], Michaela Harčárová[2], Lukáš Bujňák[2], Koščová Jana[1], Mudroňová Dagmar[1]

[1]Katedra mikrobiológie a imunológie, Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, Komenského 73, 041 81 Košice, Slovenská republika

[2]Katedra výživy, dietetiky a chovu zvierat, Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, Komenského 73, 041 81 Košice, Slovenská republika

ABSTRACT

The research was focused on the influence of humic substances (HS) on the composition of pig´s gut microbiota, specifically lactic acid bacteria (LAB) and enteric bacteria. In the experiment, overall 18 crossbred pigs (Slovakian White x Landrace; 34 days old; average body weight 11,89 kg) were allotted to 3 dietary groups: control group without supplementation of HS (CON) (n=6), AFM group supplemented with 0,6 % HUMAC® Natur AFM (n=6) and MYCO group supplemented with 0,6 % HUMAC® Natur AFM MycotoxiSorb (n=6). Piglets were supplemented with HS in feed during whole experiment (27 days). No remarkable differences were noted between experimental groups during samplings (3th, 7th and 27th day). However, significant increase of LAB and at the same time decrease of coliform bacteria were noted after 3-days and 7-days supplementation of HS in AFM group against samples taken before supplementation. Same trend was observed in the MYCO group after 27-days of supplementation. It can be conclude that short time supplementation of HS to pigs can lead to beneficial modulation of gut microbiota of animals.

Key words: piglets, humic substances, lactic acid bacteria, enteric bacteria

ÚVOD

Zvyšovanie produktivity a úžitkovosti poľnohospodárstva, obzvlášť chovov hospodárskych zvierat je jednou z hlavných úloh v dnešnej dobe vzhľadom na rastúci dopyt ľudskej populácie. Tento cieľ je možné dosiahnuť racionálnym kŕmením s prídavkom biologicky aktívnych látok, ktoré aktivujú tráviace a metabolické procesy u zvierat, podporujú premenu živín a zvyšujú prírastok hmotnosti alebo zlepšujú zdravie zvierat či kvalitu

živočíšneho produktu (Bezuglova, Klimenko 2022). Medzi substancie s takýmto účinkom patria aj humínové látky (HL), ktoré definujeme ako organické zlúčeniny vytvorené počas procesu humifikácie rozkladajúcich sa rastlín a živočíchov (Angeles, Gómez-Rosales, Téllez-Isaias 2022). HL sú pripisované protihnačkové, analgetické, imunostimulačné a v neposlednom rade antimikrobiálne účinky. V posledných rokoch našli HL využitie ako prídavok do krmiva najmä u hydiny, ale aj u ďalších hospodárskych zvierat ako stimulátory rastu a ďalších parametrov (Wang et al. 2008; Bezuglova, Klimenko 2022). Predpokladá sa tiež, že HL sú schopné stimulovať rast prospešných kmeňov a zároveň potláčať patogénne kmene, stabilizovať črevnú mikrobiotu a zlepšovať využitie živín (Angeles, Gómez-Rosales, Téllez-Isaias 2022). Keďže pre intenzifikáciu chovov a zvýšenie ich produktivity je nevyhnutná zdravá mikrobiota, bol tento *in vivo* experiment zameraný na skúmanie vplyvu HL na rôzne skupiny baktérií vyskytujúce sa v tráviacom systéme prasiat, vychádzajúc z predchádzajúcich *in vitro* pokusov, v ktorých bola stanovená najvhodnejšia koncentrácia HL a overená ich účinnosť.

MATERIÁL A METODIKA

Výskum bol schválený Etickou komisiou UVLF v Košiciach (povolenie č. EKVP/2023-01). Zvieratá boli umiestnené v priestoroch spĺňajúcich požadované zootechnické podmienky. Počas experimentu sa priemerná teplota v odchovňových miestnostiach pohybovala v rozmedzí 20 ± 1,5 °C pri relatívnej vlhkosti 68 ± 4,5 %. Realizácia *in vivo* pokusu sa uskutočnila na 34-dňových krížencoch Slovenskej bielej ošípanej x Landrace s priemernou počiatočnou hmotnosťou 11,89 kg/ks (n=18). Pred začiatkom experimentu boli prasatá rozdelené do troch skupín: kontrolná skupina bez prídavku HL (n=6) (CON), skupina AFM s prídavkom 0,6 % HUMAC® Natur AFM (Humac s.r.o., Košice, Slovakia) (n=6) a skupina MYCO s prídavkom 0,6 % HUMAC® Natur AFM MycotoxiSorb (Humac s.r.o., Košice, Slovakia) (n=6). HL boli podávané v kŕmnych zmesiach na báze kukurice, pšenice, jačmeňa a sójového extrahovaného šrotu v priebehu celého pokusu. Cieľom experimentu bolo zaznamenať vplyv HL a prípadné zmeny v počtoch baktérií mliečneho kvasenia (LAB) a gramnegatívnych koliformných baktérií v čreve prasiat po suplementácii týmito látkami.

Tabuľka č. 1, Charakteristika použitých HL

DRUH HL	CHARAKTERISTIKA HL
HUMAC® Natur AFM (AFM) (Humac s.r.o., Košice, Slovakia)	veľkosť častíc do 100 µm, pH 5,8, vlhkosť max. 15 %, humínové kyseliny min. 65 % a fulvové kyseliny 5 % v sušine
HUMAC® Natur AFM MycotoxiSorb (MYCO) (Humac s.r.o., Košice, Slovakia)	veľkosť častíc do 200 µm, pH 5.8, vlhkosť max. 21 %, humínové kyseliny min. 65 % a fulvové kyseliny min. 5 % v sušine, Hrubá vláknina 24,3 g/kg, popol nerozpustný v HCl 3,69 %

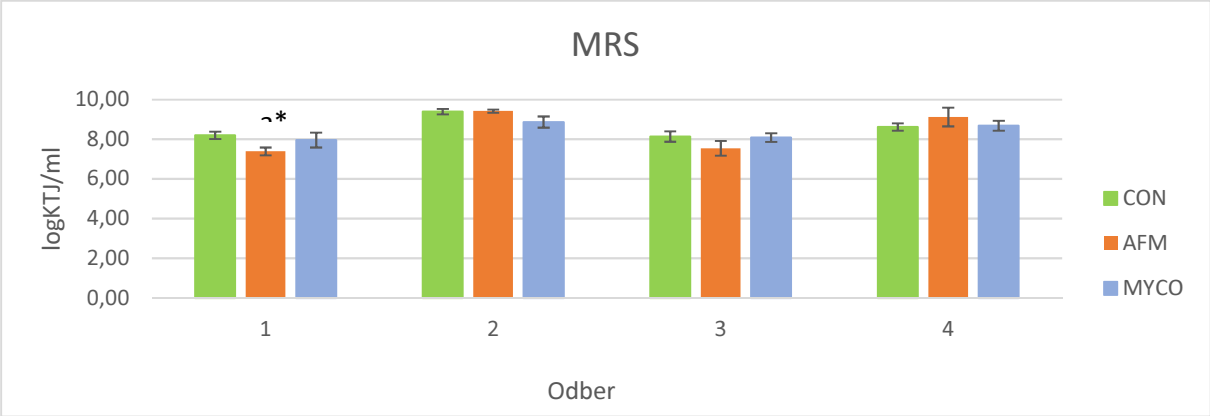
Analýza črevnej mikrobioty bola realizovaná zo vzoriek trusu, ktoré boli odoberané pred začiatkom experimentu, po 3 dňoch podávania HL, po týždni podávania HL a po 4 týždňoch suplementácie HL. Počty baktérií boli stanovené platňovou metódou na MRS agare (Biolife, Taliansko) pre LAB a na McConkey agare (HiMedia, India) v prípade koliformných baktérií. Od každého prasaťa bol odobratý 1 g trusu a nariedený 9 ml fyziologického roztoku (Mikrochem, Slovensko). Za účelom dôkladného premiešania a rozbitia čiastočiek trusu boli takto spracované vzorky umiestnené do stomachera (IUL, Instruments, Spain). Následne boli vzorky riedené decimálnym riedením fyziologickým roztokom a vysievané v množstve 100 µl na príslušné agary. Pripravené platne boli kultivované pri 37 °C za nasledujúcich podmienok: MRS agar – 48 h v anaeróbnom prostredí (Becton, Dickinson and Company, USA) a McConkey – 24 h v aeróbnom prostredí. Výsledky sú vyjadrené ako logaritmus kolónie tvoriacich jednotiek (logKTJ) na ml. Výstupy boli štatisticky vyhodnotené v programe GraphPad Prism prostredníctvom ANOVA dvojcestnej analýzy rozptylu s doplnkovým Tukeyho testom. Výsledky boli hodnotené na hladinách významnosti: $p < 0,05$, 0,01 a 0,001.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

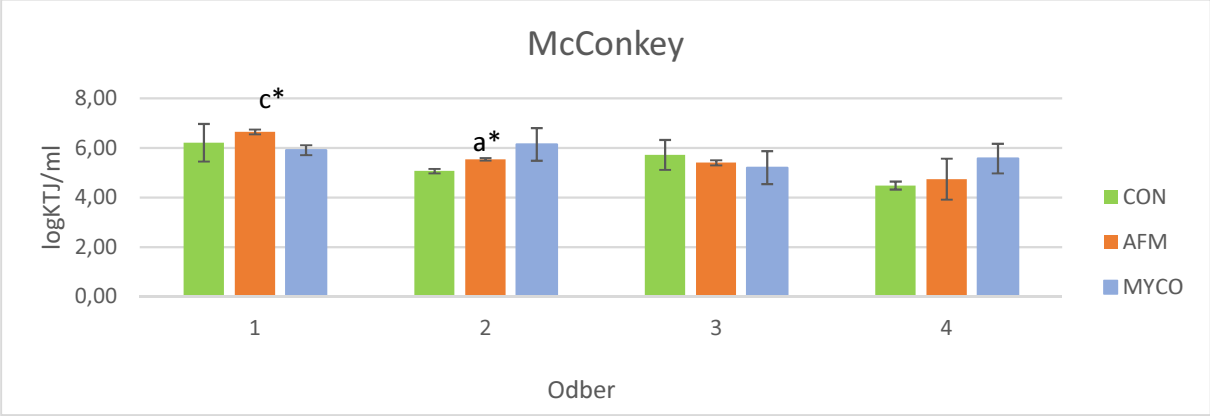
Vo všeobecnosti je HL pripisovaná na základe predošlých štúdií schopnosť potláčať rast patogénnych baktérií a naopak zvyšovať počty prospešných kmeňov. Rovnako je očakávaný ich pozitívny vplyv na rast, produkčné parametre zvierat a ich schopnosť využívať živiny z potravy (Arif a kol. 2019). Gomez-Rosales a Angeles (2015) vo svojej štúdii preukázali vyššie spomínané pozitívne účinky po podávaní výluhu červov, ktorý slúžil ako zdroj HL v pitnej vode u brojlerov. Podávaním 20 g humátu sódneho a 1700 mg oxidu zinku na kilogram krmiva zistili Kaevska a kol. (2016) ovplyvnenie mikrobiálneho zloženia feaces a zlepšenie prejavov hnačky u odstavených prasiat po infekcii enterotoxickými *Escherichia coli*. Na základe týchto, ale aj mnohých ďalších štúdií bol za účelom overenia pozitívneho vplyvu HL na zdravie a produkčné parametre vykonaný tento experiment na *in vivo* modeli prasiat. Podávaná koncentrácia HL bola zvolená na základe predošlých *in vitro* pokusov. V prvom odbere pred podávaním HL môžeme pozorovať nižší počet LAB v porovnaní s nasledujúcim odberom po začiatku podávania HL. V skupine prasiat, ktorej mal byť podávaný AFM bol dokonca tento počet signifikantne nižší oproti ostatným skupinám. Rovnako sa v tejto skupine objavil výrazne vyšší počet enterobaktérií pred začatím experimentu. Avšak, už po 3 dňoch podávania HL bol v skupine AFM zaznamenaný ich výrazný pokles. Tento trend pozorovali aj Mudroňová a kol. (2022) po dlhodobom podávaní 0,8 % leonarditu brojlerom. Po týždni podávania HL bol zaznamenaný pokles LAB v oboch experimentálnych skupinách, avšak tento pokles nebol signifikantný oproti kontrole. V prípade koliformných baktérií došlo taktiež k poklesu v skupine, ktorej bol podávaný Humac® Natur AFM MycotoxiSorb. V prípade posledného odberu po 4 týždňoch suplementácie HL nedošlo k štatisticky významným zmenám v zastúpení koliformných baktérií medzi jednotlivými skupinami. Naopak, pri LAB došlo v tejto skupine k ich signifikantnému nárastu oproti odberu pred podávaním HL. Najvýraznejší pokles koliformných baktérií za súčasného zvýšenia počtu LAB bol zaznamenaný v skupine AFM v druhom a treťom odbere po krátkodobom podávaní HL. Dell´Anno a kol. (2021) zaznamenali po 40 dňovom podávaní 0,25 % humínových kyselín zvýšenie mikrobiálnej diverzity a rovnako zlepšenie zootechnických parametrov. Bolo taktiež preukázané, že podávanie HL u prežúvavcov zvýšilo zastúpene kmeňa Firmicutes, ktorého počet pozitívne koreloval so stráviteľnosťou bielkovín. Predpokladaná bola aj eliminácia CH_4 produkcie, tá však nebola v tejto štúdií potvrdená (Terry a kol. 2018). Taklimi, Ghahri a Isakan (2012) skúmali vplyv rôznych koncentrácií HL na brojleroch. Po 6 týždňoch dosiahli pozitívne výsledky aj v oblasti morfológie čreva, konkrétnejšie vo veľkosti klkov. Ich zväčšenie viedlo k zlepšenej schopnosti vytvárať ochrannú vrstvu v tráviacom systéme, ktorá slúžila ako bariéra voči patogénnym baktériám, rovnako ako aj k zlepšeniu celkového metabolizmu živín prijatých

z potravy. Podobne Mudroňová a kol. (2020) vo svojej štúdii na brojleroch zaznamenali zvýšenú expresiu génu pre črevný mucín 2, ktorý slúži ako primárna črevná bariéra. Naviac, bol prietokovou cytometriou zistený zvýšený pomer CD4+:CD8+ buniek, ktorý slúži ako indikátor aktivácie imunitného systému. Aktivácia imunitného systému (zvýšená fagocytárna aktivita, vyšší počet rôznych subpopulácií lymfocytov) bola potvrdená aj v obdobnom experimente na prasatách, ktorým boli podávané HL (Bujňák a kol. 2023). Na základe tejto a ďalších vykonaných štúdií existuje predpoklad, že HL nielen modulujú črevnú mikrobiotu v prospech zdravia zvierat a zlepšujú produkčné parametre, ale naviac môžu meniť aj morfológiu čreva a aktivovať obranné imunitné mechanizmy. Avšak, pre potvrdenie týchto výsledkov a objasnenie mechanizmu účinku HL sú nevyhnutné ďalšie štúdie.

Graf č. 1, Vplyv 0,6 % prídavku Humac® Natur AFM (AFM) a Humac® Natur AFM Mycotoxisorb (MYCO) na počty LAB a koliformných baktérií v čreve prasiat



a-signifikantný rozdiel oproti CON; b-signifikantný rozdiel oproti AFM; c-signifikantný rozdiel oproti MYCO



a-signifikantný rozdiel oproti CON; b-signifikantný rozdiel oproti AFM; c-signifikantný rozdiel oproti MYCO

Hviezdička označuje štatisticky významný rozdiel oproti kontrole; * - $p<0,05$

ZÁVER

Na základe vykonaných *in vitro* experimentov sa predpokladá, že vybrané koncentrácie HL sú schopné znížiť počet patogénnych baktérií za súčasnej podpory rastu prospešných mikroorganizmov, obzvlášť baktérií mliečneho kvasenia. Tento *in vivo* experiment potvrdil, že krátkodobé podávanie HUMAC® Natur AFM v 0,6 % koncentrácii dokáže potlačiť rast koliformných baktérií a zvýšiť počet LAB v čreve. V prípade HUMAC® Natur AFM MycotoxiSorb neboli zaznamenané signifikantné rozdiely v počtoch koliformných baktérií, avšak po dlhodobom podávaní stúpol počet LAB. Na základe tejto a predošlých vykonaných štúdií môžeme konštatovať, že HL dokážu nielen aktivovať imunitný systém, zlepšovať ochranné mechanizmy čreva, ale aj modulovať črevnú mikrobiotu v prospech hostiteľa.

POĎAKOVANIE

Táto práca vznikla v rámci riešenia projektu VEGA 1/0402/20 „Vplyv aditív vo výžive monogastrických zvierat na produkčné zdravie, produkčné parametre, kvalitu produktov a životné prostredie“ podporovaného Ministerstvom školstva, vedy, výskumu a športu SR.

POUŽITÁ LITERATÚRA

1. ANGELES, M.L. – GÓMEZ-ROSALES, S. – TÉLLEZ-ISAIAS, G. Mechanisms of action of humic substances as growth promoters in animals. In *Humus and humic substances* [online]. 2022, [cit. 2023-16-03]. Dostupné na internete: <doi: 10.5772/intechopen.105956>. ISBN 978-1-80356-214-8
2. ARIF, A. a kol. Humic acid as a feed additive in poultry diets: a review, In *Iranian journal of veterinary research* [online]. 2019, vol. 20(3), no. 167-172 [cit. 2023-13-04]. Dostupné na internete: <https://doi.org/10.3390/agronomy12030584>
3. BEZUGLOVA, O., KLIMENKO, A. Application of humic substances in agricultural industry. In *Agronomy* [online]. 2022, vol. 12(3), no. 584 [cit. 2023-16-03]. Dostupné na internete: <https://doi.org/10.3390/agronomy12030584>
4. BUJŇÁK, L. a kol. The effect off dietary humic substances on cellular immunity and blood characteristcs in piglets, In *Agriculture* [online]. 2023, vol. 13(3), no. 655 [cit. 2023-18-04]. Dostupné na internete: <https://doi.org/10.3390/agriculture13030636>
5. DELL´ANNO, M. a kol. Evaluation of humic acids as functional feed additive on performance, metabolic parameters and gut microbiota of weaned piglets. In *2nd International conference on microbial food & feed ingredients.* Copenaghen. [online]. 2021. Dostupné na internete: <https://air.unimi.it/handle/2434/910264>

6. GOMEZ-ROSALES, S., ANGELES M. DE L. Addition of a worm leachate as source of humic substances in the drinking water of broiler chickens, In *Asian-australasian journal of animal sciences* [online]. 2015, vol. 28(2), no. 215-222 [cit. 2023-13-04]. Dostupné na internete: <doi: 10.5713/ajas.14.0321>
7. KAEVSKA, M. a kol. Effect of sodium humate and zinc oxide used in prophylaxis of post-weaning diarrhoea on faecal microbiota composiotion of weaned piglets, In *Veterinární medicína* [online]. 2016, vol. 61(6), no. 328-336 [cit. 2023-13-04]. Dostupné na internete: <doi: 10.17221/54/2016-VETMED>
8. MUDROŇOVÁ, D. a kol. The effect of humic substances on gut microbiota and immune response of broilers, In *Food and agricultural immunology* [online]. 2020, vol. 31, no. 1 [cit. 2023-13-04]. Dostupné na internete: <https://doi.org/10.1080/09540105.2019.1707780>
9. TAKLIMI, S.M. – GHAHRI, H. – ISKAN, M.A. Influence of different levels of humic acid and esterified glucomannan on growth performance and intestinal morphology on broiler chickens, In *Agricultural sciences* [online]. 2012, vol. 3, no. 5 [cit. 2023-17-04]. Dostupné na internete: <http://dx.doi.org/10.4236/as.2012.35080> p.663-668
10. TERRY, S.A. a kol. Effect of humic substances on rumen fermentation, nutrient digestibility, methane emissions, and rumen microbiota in beef heifers, In *Journal of animal science* [online]. 2021, vol. 69, no. 9 [cit. 2023-17-04]. Dostupné na internete: <https://doi.org/10.1093/jas/sky265>
11. WANG, Q. et al. Effects of supplemental humic substances on growth performance, blood characteristics and meat quality in finishing pigs, In *Livestock science* [online]. 2008, vol. 117, no. 2-3 [cit. 2023-16-03]. Dostupné na internete: <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2007.12.024> p. 270-274

Kontaktná adresa: Chomová Natália, Department of Microbiology and Immunology, University of Veterinary Medicine and Pharmacy in Košice, Komenského 73, 041 81 Košice, Slovak Republic; E-mail: natalia.chomova@student.uvlf.sk

VARIABILITA METYLXANTÍNOV V OOLONG ČAJOCH

VARIABILITY OF METHYLXANTINES IN OOLONG TEA

Jakabová Silvia [1], Árvay Július [1], Štefániková Jana [2], Ivanišová Eva [1], Benešová Lucia[2], Golian Jozef *[1]

[1] Ústav potravinárstva, Fakulta biotechnológie a potravinárstva, Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovensko

[2] Výskumné centrum AgroBioTech, SPU v Nitre, Tr. A. Hlinku 2, 94976 Nitra, Slovensko

ABSTRACT

Oolong tea is a semi-fermented tea that originates mainly from China and Taiwan. Oolong tea has a delicate taste with hints of fruit and flowers but is not as strong as black tea. In our article, we focused on monitoring the variability of three selected methylxanthine alkaloids (caffeine, theobromine, and theophylline) in oolong teas from Taiwan. Selected methylxanthines (caffeine, theobromine, and theophylline) in oolong tea samples were determined by HPLC-DAD method. The content of caffeine varied from 10,47 to 25,43 mg/g DW. Theobromine was found in the concentrations between 0,83 and 2,48 mg/g DW and theophylline in concentrations between 0,63 and 1,62 mg/g DW. Statistical analysis showed significant differences between individual tea varieties.

Key words: oolong tea, methylxanthines, variability

ÚVOD

Čaj je najobľúbenejším nápojom na svete. Na prípravu nápojov z čaju sa používajú listy z rastliny Camellia sinensis (Di Chen et al., 2008), pričom existujú rôzne variety typov a príchutí čajov, ktoré sa dosahujú rôznymi metódami spracovania čaju (Zayadi et al., 2016). Zelený čaj, čierny čaj, biely čaj a čaj oolong sa líšia stupňom oxidácie, v čajovom priemysle známym ako fermentácia. Zelený čaj je najmenej oxidovaný alebo fermentovaný; čierny čaj je 100 % oxidovaný alebo úplne fermentovaný; a oolong je polofermentovaný s rozsahom 8 – 85 % oxidácie (Manil & Zbinden, 2001). Enzým polyphenol oxidáza sa aktivuje v čerstvých čajových listoch keď sa sekajú, drvia prípadne rolujú a inaktivuje sa teplom (Zayadi et al., 2016; Sang, 2016). Oolong čaj má stupeň oxidácie v rozsahu 8-85%, Tento stupeň oxidácie a mnohé spôsoby jeho spracovania dodávajú čaju Oolong široké spektrum chutí a charakter. Príchute siahajú od kvetinových a zelených cez sladké a ovocné až po drevité a dymové. Významnými bioaktívnymi zložkami čaju sú polyfenoly s hojným výskytom katechínov a metylxantíny

zastúpené najmä kofeínom, teobromínom a teofylínom (Bonetti et al., 2017). Metylxantíny patria do skupiny psycoaktívnych látok ktoré obsahuje každodenná strava (Monteiro et al., 2019; Aqel et al., 2019). Kofeín (1,3,7-trimetylxantín), teobromín (3,7-dimetylxantín) a teofylín (1,3-dimetylxantín) sú najdôležitejšie prirodzene sa vyskytujúce metylxantíny, nachádzajúce sa v bežných nápojoch a potravinách, ako je čaj, káva, kakao, čokoláda, nealkoholických nápojoch, energetických nápojoch a tiež v obľúbenom výživovom doplnku, ako je guarrana (Ashihara et al., 2008; Ashihara et al., 2011; Carlson & Thompson, 1998; Ramli et al., 2001). Z biochemického hľadiska sú mechanizmy účinku metylxantínov popisované z hľadiska ich inhibície enzýmovej rodiny fosfodiesterázy, ďalší možný mechanizmus je ich antagonistický efekt na receptory pre adenozín alebo sa spájajú so zvýšením deacetylácie histónov, ktorá je dôležitá pre aktiváciu génovej transkripcie pri zápale (Gažová, Kyselovič, 2018).

Cieľom príspevku je zhodnotiť výskyt a variabilitu vybraných metylxantínov (kofeín, teobromín a teofylín) v oolong čajoch, pochádzajúcich z Taiwanu.

MATERIÁL A METODIKA

Predúprava vzoriek čajov

Vzorky zelených a čiernych čajov sme získali z Čajovne dobrých ľudí (Nitra, Slovensko). Popis vzoriek je v tabuľke 1. Sušené čajové lístky sa homogenizovali na prášok, následne sa navážilo po 1g vzoriek v troch opakovaniach do kadičiek a rastlinný materál sa zalial a lúhoval horúcou destilovanou vodou 10 min. Následne sa pripravený výluh filtroval cez KA-1 filtračný papier (Papírna Perštejn, Česká Repulika) a extrakty sa ďalej prefiltrovali cez striekačkové filtre Q-Max RR (0.45µm PVDF, Frisenette ApS, Nemecko) a použili na HPLC analýzu metylxantínov. Obsah sušiny sa stanovil analyzátorom vlhkosti KERN DAB 100-3 (KERN & SOHN GmbH, Balingen, Nemecko).

Tabuľka č. 1, Charakteristika vzoriek analyzovaných čajov

	Názov	Druh	Krajina pôvodu	Nadmorská výška
1	LI-SHAN PREMIUM	oolong	Taiwan	nad 2000 m
2	ALI-SHAN SUPERIOR	oolong	Taiwan	700-1300 m
3	TONG TING PREMIUM	oolong	Taiwan	500 -1500 m
4	LI-SHAN FORMOSA	oolong	Taiwan	nad 2000 m
5	HE-HUAN	oolong	Taiwan	500 -1500 m
6	DONG DING	oolong	Taiwan	500 -1500 m
7	SHAN LING SHI	oolong	Taiwan	1900-2000 m
8	DONG PIAN SI-JI-CHUN	oolong	Taiwan	1900-2000 m

HPLC stanovenie kofeínu, teobromínu a teofylínu

K analýze sa použili štandardy kofeínu, teobromínu a teofylínu (čistota 98 %, Sigma - Aldrich GmbH, Nemecko), HPLC metanol (Chromasolv Gradient, čistota ≥ 99.8 %, Sigma-Aldrich GmbH, Nemecko), kyselina mravčia (ACS, čistota ≥ 96 %, Sigma-Aldrich GmbH, Nemecko), and dejonizovaná voda (18.2 MΩ cm-1, 25 °C). HPLC stanovenie sa vykonalo na prístroji Agilent Infinity 1260 Agilent Technologies GmbH (Agilent Technologies GmbH, Nemecko), separácia prebehla na kolóne LiChroCART 250-4 Purospher STAR, RP-18 (250 mm x 4 mm x 5 µm; Merck KGaA, Nemecko) pri teplote 40°C. Mobilnú fázu tvoril metanol (A) a 0,1 % roztok kyseliny mravčej v deionizovanej vode (v/v) (B). Rýchlosť prietoku mobilnej fázy bola 1 $mL.min^{-1}$ a objem dávkovanej vzorky 3 µL. Zber údajov sa realizoval na vlnových dĺžkach 240 a 280 nm, vyhodnotenie sme vykonali s použitím programu Agilent OpenLab ChemStation.

Štatistické spracovanie výsledkov

Výsledky analýz – koncentrácie troch vybraných metylxantínov sme štatisticky vyhodnotili pomocou programov Excel a Past4.03. Popisná štatistika sa realizovala v programe Excel. V programe Past4.03 sme analyzovali vzájomnú rozdielnosť analyzovaných čajov pre sledované metylxantíny pomocou neparametrického párového testu Mann-Whitney s nekorigovanými p hodnotami pre analýzu významnosti rozdielov.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Obsah metylxantínov

Obsah kofeínu vo vzorkách sa pohyboval v rozpätí od 10,45 do 25,47 mg/g. Najnižšie koncentrácie boli zistené v oolong čaji DONG PIAN SI-JI-CHUN, kde kofeín dosahoval priemerné koncentrácie 10,47 ± 0,016 mg/g sušiny. Najvyššie koncentrácie sme zistili v oolong čaji LI-SHAN FORMOSA s priemernou koncentráciou 25,43 ± 0,026 mg/g sušiny. Koncentrácie v literatúre sú zväčša uvádzané pre vodné výluhy, pričom koncentrácie v oolong čajoch sa pohybujú na úrovni 3.46 g/L (Zayadi et al., 2016) . Pre oolong čaje uvádzajú autori Theppakorn et al. (2014) hodnoty kofeínu 22,5± 4,8 mg/g, čo je v súlade s našim zistením. Obsah kofeínu v komerčne dostupnom zelenom čaji uvádzajú autori Salihović et al. (2014) v koncentračnom rozpätí od 33.90 do 110.73 mg/g, a v čiernych čajoch je jeho obsah nižší – autori namerali hodnoty v rozpätí 10.32 až 63.00 mg/g. V nami sledovaných čajoch sme zistili nižšie hodnoty kofeínu v porovnaní so zeleným čajom zo štúdie Salihovića et al. (2014), avšak naše výsledky sú v súlade s koncentračnými úrovňami kofeínu v čiernom čaji. Vo vzťahu analyzovaných vzoriek ku nadmorskej výške pestovania čaju možno usudzovať, že významný

vplyv nadmorská výška pestovania na obsah kofeínu nemá, ale výraznejšie môže na jeho obsah vplývať skôr spôsob spracovania čaju.

Tabuľka 2, Obsahy metylxantínov vo vzorkách (výsledky vyjadrené v mg/g sušiny)

Vzorka čaju	Kofeín		Teobromín		Teofylín	
	priemer	SD	priemer	SD	priemer	SD
LI-SHAN PREMIUM	17,20	0,028	1,43	0,005	1,24	0,001
ALI-SHAN SUPERIOR	17,15	0,060	1,72	0,010	1,62	0,007
TONG TING PREMIUM	19,94	0,045	1,50	0,007	1,00	0,002
LI-SHAN FORMOSA	25,43	0,026	2,06	0,006	1,55	0,004
HE-HUAN	16,57	0,011	0,83	0,002	0,63	0,001
DONG DING	21,39	0,045	2,48	0,009	0,88	0,003
SHAN LING SHI	13,85	0,032	1,27	0,010	0,94	0,004
DONG PIAN SI-JI-CHUN	10,47	0,016	1,40	0,004	0,73	0,002

Pozn.: SD – smerodajná odchýlka

Obsah teobromínu sa pohyboval vo vzorkách oolong čaju v rozmedzí od 0,82 po 2.49 mg/g sušiny, pričom paradoxne najvyššie koncentrácie sme zaznamenali v čaji DONG DING (2,48± 0,009 mg/g sušiny) a najnižšie v čaji HE-HUAN (0,83± 0,002 mg/g sušiny), ako je uvedené v tabuľke 2. Teofylín bol v porovnaní s predchádzajúcimi dvomi metylxantínmi prítomný v nižších koncentráciách, pohybujúcich sa v rozpätí od 0,63 do 1,63 mg/g sušiny. Hiks et al. (1996) zistili v oolong čajoch Formosa významne menej teobromínu pri prvom lúhovaní v porovnaní s čiernym a zeleným čajom. Sereshti et al. (2014) stanovili koncentrácie v oolong čajoch na úrovni 3,36 mg/l pre teobromín a 0,47 mg/l pre teofylín. Baek et al. (2022) sledovali obsahy metylxantínov v 11 druchoch čajov. V oolong čaji stanovili obsah kofeínu 5,87–12,34 g/kg sušiny, teobromínu 162.3–333.4 mg/kg a teofylín bol v nedetekovateľných množstvách. Podobne aj v našom prieskume sme stanovili veľmi nižšie koncentrácie teofylínu v oolong čajoch v porovnaní s teobromínom, avšak v porovnaní s uvádzaným prieskumom boli koncentrácie vyššie.

Štatisticky sme porovnali jednotlivé čaje navzájom pomocou Mann-Witney párového testu. Na hladine významnosti p=0,05 sme zistili štatisticky významné rozdiely prakticky vo všetkých vzorkách s výnimkou obsahu kofeínu v čajoch LI-SHAN PREMIUM a ALI-SHAN SUPERIOR.

Tabuľka 3, Štatistické hodnotenie rozdielov medzi analyzovanými oolong čajmi

	ALI-SHAN SUPERIOR	TONG TING PREMIUM	LI-SHAN FORMOSA	HE-HUAN	DONG DING	SHAN LING SHI	DONG PIAN SI-JI-CHUN
LI-SHAN PREMIUM	-/+/•	*/+/•	*/+/•	*/+/•	*/+/•	*/+/•	*/+/•
ALI-SHAN SUPERIOR		*/+/•	*/+/•	*/+/•	*/+/•	*/+/•	*/+/•
TONG TING PREMIUM			*/+/•	*/+/•	*/+/•	*/+/•	*/+/•
LI-SHAN FORMOSA				*/+/•	*/+/•	*/+/•	*/+/•
HE-HUAN					*/+/•	*/+/•	*/+/•
DONG DING						*/+/•	*/+/•
SHAN LING SHI							*/+/•

Pozn.:

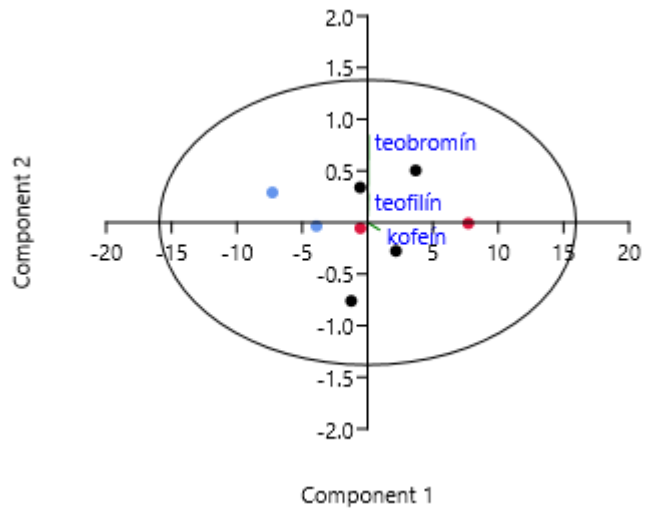
* štatisticky významný rozdiel pre parameter kofeín

\+ štatisticky významný rozdiel pre parameter teobromín

• štatisticky významný rozdiel pre parameter teofylín

\- nie je štatisticky významný rozdiel medzi porovnávanými vzorkami oolong čajov

Multivariačná analýza komponentov umožňuje využitie chemických atribútov pre možné odlíšenie vzoriek čajov na základe nadmorskej výšky pestovania. PCA mapa (Obr. 1) pomáha vizualizovať zhluk korelovaných premenných v skupinách. PCA analýzu sme realizovali na troch zoskupeniach čajov podľa nadmorskej výšky. Skupinu jedna tvorili čaje s nadmorskou výškou pestovania do 1500 m., skupinu 2 čaje s nadmorskou výškou dopestovania do 2000 m.n.m. a v tretej skupine čaje s nadmorskou výškou dopestovania nad 2000 m.n.m. Vstupnými parametrami pre PCA boli obsahy kofeínu, teobromínu a teofylínu. Výsledky prezentuje obr. 1.



skupina 1 500-1500 m
skupina 2 1500-2000 m
skupina 3 nad 2000 m

Obrázok 1, PCA mapa prvých dvoch dimenzií pre dataset obsahu metylxantínov v oolong čajoch kategorizovaných podľa nadmorskej výšky dopestovania

Dimenzia Component 1 vyjadruje 98,83 % variáciu a Component 2 zodpovedá 0,74 % variácii pozorovaní, čo dokopy vyjadruje priestor pre premenné 99,57 %. Tento typ grafu umožňuje lepšie interpretovať podiel individuálnych charakteristík na hlavných komponentoch. PCA biplot znázorňuje PC skóre vzoriek (body) a načítaných premenných (vektory). Na základe hodnotených premenných sa oddelili na ľavej strane grafu čaje zo skupiny 2.

ZÁVER

V príspevku sme hodnotili variabilitu obsahu kofeínu, teobromínu a teofylínu v oolong čajoch pochádzajúcich z Taiwanu. Štatistická analýza potvrdila rozdielnosti v obsahoch jednotlivých metylxantínoch s výnimkou obsahu kofeínu v čajoch LI-SHAN PREMIUM a ALI-SHAN SUPERIOR. PCA mapa hlavných komponentov poukázala na odlišnosť čajov dopestovaných v nadmorskej výške 1500 – 2000 m.n.m. od ostatných čajov, avšak na potvrdenie vplyvu geografických faktorov by bolo potrebné realizovať analýzy na väčšom súbore vzoriek, resp. z hľadiska identifikácie markerov pre cielené rozlišovanie čajov by bolo potrebné zohľadniť aj ďalšie chemické parametre biologicky aktívnych látok v čajoch.

POĎAKOVANIE

Táto práca bola podporená z projektov APVV-19-0180, VEGA č. 1/0239/21 a Drive-4SIFood 313011V336.

POUŽITÁ LITERATÚRA

1. Aqel, A., Almulla, A., Al-Rifai, A.A., Wabaidur, S.M., ALOthman, Z.A. and Badjah-Hadj-Ahmed, A.Y., Rapid and sensitive determination of methylxanthines in commercial brands of tea using ultra-high-performance liquid chromatography-mass

spectrometry. In *International Journal of Analytical Chemistry.* ISSN: 1687-8779, 2019, p.1-9.

2. Ashihara, H., Kato, M. and Crozier, A., *Distribution, biosynthesis and catabolism of methylxanthines in plants. Methylxanthines.* 2011, Springer, pp.11-31.
3. Ashihara, H., Sano, H. and Crozier, A., Caffeine and related purine alkaloids: biosynthesis, catabolism, function and genetic engineering. In *Phytochemistry.* ISSN 0031-9422, 2008, vol. 69, no. 4, p.841-856.
4. Baek, G.H., Yang, S.W., Yun, C.I., Lee, J.G. and Kim, Y.J., Determination of methylxanthine contents and risk characterisation for various types of tea in Korea. In *Food Control*. ISSN 0956-7135, 2021, vol. 132, p.108543.
5. Bispo, M.S., Veloso, M.C.C., Pinheiro, H.L.C., De Oliveira, R.F., Reis, J.O.N. and De Andrade, J.B., Simultaneous determination of caffeine, theobromine, and theophylline by high-performance liquid chromatography. In *Journal of chromatographic science*. ISSN 1945-239X, 2002, vol. 40, no.1, p.45-48.
6. Bonetti, F., Brombo, G., Zuliani, G., *Nootropics, functional foods, and dietary patterns for prevention of cognitive decline. Nutrition and functional foods for healthy aging*. 2017, Academic Press. pp. 211-232.
7. Carlson, M., Thompson, R.D., Liquid chromatographic determination of methylxanthines and catechins in herbal preparations containing guaraná. In *Journal of AOAC International*. ISSN 1060-3271, 1998, vol. 81, no. 4, p.691-701.
8. Di Chen, V.M., Chen, M.S., Wan, S.B., Lam, W.H., Huo, C., Landis-Piwowar, K.R., Cui, Q.C., Wali, A., Chan, T.H., Dou, Q.P., Tea polyphenols, their biological effects and potential molecular targets. In *Histology and histopathology*. ISSN 1699-584, 2008, vol. 23, no. 4, p.487.
9. Gažová, A., Kyselovič, J., Mechanizmus účinku metylxantínov a ich rôznorodé indikácie. In *Medikom*. ISSN 1338-340X, 2018, no. 1, p. 34-35.
10. Hicks, M. B., Hsieh, Y.-H. P., Bell, L. N., Tea preparation and its influence on methylxanthine concentration. In *Food Research International*. ISSN: 1873-7145, 1996, vol. 29, no. 3-4, p. 325–330.
11. Manil, C., Zbinden, M., *Tea Time*. 2001, Cassell and Co., London, UK. p.32-65.
12. Monteiro, J., Alves, M.G., Oliveira, P.F., Silva, B.M., Pharmacological potential of methylxanthines: Retrospective analysis and future expectations. In *Critical reviews in food science and nutrition*. ISSN 1549-7852, 2019, vol. 59, no. 16, p.2597-2625.

13. Ramli, N., Yatim, A.M., Said, M. and Hok, H.C., HPLC determination of methylxanthines and polyphenols levels in cocoa and chocolate products. In *Malaysian Journal of Analytical Sciences*. ISSN 13942506, 2001, vol. 7, no. 2., p.377-386.
14. Salihović, M., Huseinović, S., Špirtović-Halilović, S., Osmanović, A., Dedić, A., Ašimović, Z., Završnik, D., DFT study and biological activity of some methylxanthines. In *Bulletin of the Chemists and Technologists of Bosnia and Herzegovina*. ISSN 0367-4444, 2014, vol. 42, p.31-36.
15. Sang, S., Agricultural, N.C., *Tea: Chemistry and Processing. 1st ed.Encyclopedia of Food and Health.* 2016, Elsevier Ltd.; 268-272 p.
16. Sereshti, H., Khosraviani, M., Samadi, S., Amini-Fazl, M. S., Simultaneous determination of theophylline, theobromine and caffeine in different tea beverages by graphene-oxide based ultrasonic-assisted dispersive micro solid-phase extraction combined with HPLC-UV. In *RSC Advances*. ISSN 2046-2069, 2014, vol. 4, no. 87, p. 47114–47120.
17. Theppakorn, T., Luthfivyyah, A., Ploysri, K., Simultaneous determination of caffeine and 8 catechins in oolong teas produced in Thailand. In *International Food Research Journal*. ISSN 22317546, 2014, vol. 21, no. 5.
18. Zayadi, R. A., Rahim, N. A., Bakar, F. A., Determination of flavonoid and caffeine content in black and oolong teas. In *Journal of Science and Technology*. ISSN 2600-7924, 2016, vol. 8, no. 2.

Kontaktná adresa: Golian Jozef, Institute of Food Sciences, Slovak university of agriculture in Nitra, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovak Republic; E-mail: jozef.golian@uniag.sk

VLIV PŘÍDAVKU CIBULOVÝCH SLUPEK A SLUPEK Z KONOPNÉHO OPLODÍ NA OXIDAČNÍ STABILUTU KONOPNÉHO OLEJE

THE EFFECT OF FORTIFICATION WITH ONION SKINS AND HEMP PERICARP SKINS ON THE OXIDATIVE STABILITY OF HEMP OIL

Jarošová Eva[1], Jarošová Markéta[1], Lorenc František[2], Bedrníček Jan[2], Smetana Pavel[2], Říha Václav[3], Bárta Jan[1]

[1] Katedra rostlinné výroby, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Fakulta zemědělská a technologická, Studentská 1668, 370 05 České Budějovice, Česká republika

[2] Katedra potravinářských biotechnologií a kvality zemědělských produktů, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Fakulta zemědělská a technologická, Studentská 1668, 370 05 České Budějovice, Česká republika

[3] HEMP PRODUCTION CZ, s.r.o., Chraštice 7, 262 72 Březnice, Česká republika

ABSTRACT

Oxidative changes in oils represent the unwanted process. Oil stability depends on the fatty acid composition, antioxidant content, oxygen presence, and storage conditions. Hemp oil is a source of polyunsaturated fatty acids, essential for the human body. On the other hand, these compounds decrease oil stability. This study was focused on the effects of the supplementation of hemp oil by onion peels and hemp seed hulls and their impact on the oxidative stability of hemp oil during the fourth month of storage, expressed by changes in peroxide and acid values. According to the obtained results, it was not affected the native decrease of oxidative stability of oil after the fortification by onion peels. However, the positive influence of hemp seed hulls has been proven by a decrease in the half value of unfortified oil after four months of storage at room temperature. In a nutshell, the hemp seed hulls may have beneficial effects on the oxidative stability of hemp oil or other unstable oils.

Key words: hemp oil, oxidative stability, onion peels, hemp seed hulls, Ascorbyl palmitate

ÚVOD

Stabilita olejů zavisí na různých faktorech, zejména pak na složení mastných kyselin. Dalšími faktory ovlivňující stabilitu olejů je obsah přirozených anitioxidantů, přitomnost a působení kyslíku, forma obalového materiálu a podmínky skladování. Oleje jsou složeny převážně z triacylglycerolů (95 %), zbylou část tvoří nezmýdelnitelné látky. Mezi

nezmýdelnitelné látky patří sloučeniny s antioxidačními vlastnostmi, fosfolipidy, tokoferoly, fenolové sloučeniny, pigmenty, steroly (Abuzaytoun a Shahidi; 2006).

Oxidované esenciální mastné kyseliny mají antimetabolický účinek, působí tak proti účinku původních esenciálních mastných kyselin. U oxidovaných esenciálních mastných kyselin se vytrácí jejich nutriční a, pro člověka, fyziologicky prospěšný účinek. V zachování stability a kvality, čli pozitivních výživových vlastností olejů, je oxidace klíčovým faktorem. Při oxidačním žluknutí dochází k oxidaci dvojných vazeb nenasycených mastných kyselin, zejména α-linolové a α-linolenové kyseliny. Oxidace může probíhat dvojím způsobem, a to buď jako autooxidace adicí vzdušného kyslíku, nebo jako oxidace katalyzovaná enzymy lipoxygenasami. Tyto produkty žluknutí mají negativní vliv na senzorické vlastnosti olejů a jsou rovněž zdravotné nežádoucí (Kalač, 1999; Schmidt, 2011). Autooxidace uhlovodíkového řetězce mastných kyselin a jiných uhlovodíků je radikálová řetězová reakce, která probíhá ve třech stupních: iniciace, propagace a terminace. Za běžných teplot oxidují nenasycené mastné kyseliny a jejich náchylnost k oxidaci roste s počtem dvojných vazeb (Velíšek, Hajšlová, 2009).

Konopný olej obsahuje přibližně 80 % nenasycených mastných kyselin (PUFA), zejména α-linolovou kyselinu (55 %), α-linolenovou kyselinu (20 %), γ-linolenovou kyselin (1 – 4 %) a stearidonovu kyselinou (0,5 – 2 %) (Tura et al., 2022). Indukční perioda je u čerstvého konopného oleje 1,9 hodin a po 8 měsících skladování klesá až na hodnotu 0,5 hodin. Olej tedy snadno oxiduje a žlukne, čímž dochází k poklesu jeho kvality (Shi et al., 2021; Jarošová et al., 2021).

Oxidaci mastných kyselin je možné potlačit nebo oddálit obohacením olejů o antioxidanty, a tím tak prodloužit trvanlivost zejména za studena lisovaných olejů. Z důvodu převažujícího využívání synteticky získávaných antioxidantů pro zajištění oxidační stability nestabilních olejů, poptávka po přírodních antioxidantech roste, a to především kvůli potenciálně nepříznivým účinkům syntetických antioxidantů na lidské zdraví. Proto se stále více stává populárním studium účinků přírodních antioxidantů rostlinného původu (např. obilovin, ovoce a zeleniny), využitelných jako přídatné látky v potravinách (Munekata et al., 2020; Bedrníček at al., 2020).

Cibulové slupky obsahují vysoké množství vlákniny a také polyfenolické antioxidanty, především kvercetin a jeho deriváty, jež patří do skupiny flavonoidů (Benítez at al., 2011). Flavonoidy z cibule jsou známé svými zdravotně benefitními účinky, jež jsou dány jejich antioxidačními, protizánětlivými, antimikrobiálními a protinádorovými aktivitami (Bedrníček at al., 2020). Slupky konopného semene (otruby) jsou vedlejším produktem potravinářského zpracování konopných semen, a mohou představovat potenciální materiál pro přípravu

biologicky aktivních látek s antioxidačními vlastnostmi. Kromě těchto látek tvoří konopné slupky především vláknina (75 %) a bílkoviny (12-18 %) (Bárta et al, 2022).

Cílem tohto příspěvku bylo vyhodnocení vlivu přídavku cibulových slupek, konopných slupek a askorbyl palmitátu (jako pozitivní kontroly s prokázanými aktioxidačními účinky) na oxidační stabilitu konopného oleje skladovaného při pokojové teplotě po dobu 4 měsíců.

MATERIÁL A METODIKA

Základním materiálem byl čerstvě vylisovaný konopný olej z odrůdy USO 31 (jednodomá odrůda). Ze stejné odrůdy semen konopí byly pomocí loupačky semen získány konopné slupky (otruby). Konopný olej a slupky byly připraveny společností „HEMP PRODUCTION CZ, s.r.o.“, která se zabývá nejen zpracováním konopného semene, ale i jejím pěstováním. Suché cibulové slupky byly získány ze střední vrstvy slupkového obalu žluté orůdy Hybelle, jež byla dodána českým pěstitelem cibule (VITAL Czech s.r.o., Všestary, Česká republika). Cibulové a konopné slupky byly rozemlety na jemný prášek na planetovém mlýnu Pulverisette 6 (Fritsch, Německo) za podmínek mletí 570 ot./min. po dobu 2 minut. Jako referenční antioxidant byl zvolen čistý **askorbyl palmitát** (CAS 137-66-6) od společnosti „Dr. Ladislav Hoffmann“ (jedná se o formu vitaminu C, konkrétně o ester kyselin askorbové a palmitové).

Po lisování byl olej ponechán v lednici po dobu 2 dnů z důvodu dekantace nečistot. Do 60 ml tmavých skleněných lahviček byly naváženy, vždy ve třech opakováních, varianty jemně mletých cibulových a konopných slupek a askorbyl palmitát (tabulka č. 1). Ke každému časovému odběru byly připraveny, rovněž ve třech opakování, kontroly (pouze olej). K takto připraveným lahvičkám byl rozlit olej o objemu 50 ml a poté byl obsah promíchán lehkým protřepáním lahviček. Vzorky konopného oleje byly uskladněny při pokojové teplotě bez přístupu světla. Odběry probíhaly po 1 měsíci, 2 měsících a 4 měsících.

Tabulka č. 1, přehled přídavků cibulových a konopných slupek a askorbyl palmitátu

odběr	objem oleje [ml]	cibulové slupky [g]	konopné slupky [g]	Askorbyl palmitát [g]
1. měsíc	50	0,5		
	50	1		
	50		1	
	50			0,025
2. měsíc	50	0,5		
	50	1		
	50		1	
	50			0,025
4. měsíc	50	0,5		
	50	1		
	50		1	
	50			0,025

Stanovení **peroxidového čísla** bylo prováděno podle předepsané metodiky v normě ISO 3960. Do 250 ml Erlenmeyerovy baňky bylo naváženo na analytických vahách 3 g vzorku oleje, který byl následně rozpuštěn v 50 ml směsi octová kyselina:isooktan (3:2, v/v). Poté bylo přidáno 0,5 ml nasyceného roztoku KI (175 g/100 ml). Následovalo třepání po dobu 1 minuty a přidání 100 ml deonizované vody a 6 kapek škrobového mazu (1 g/ 100 ml). Vzorek byl titrován 0,01 M thiosíranem sodným z fialového zbarvení do mléčného zákalu. Peroxidové číslo bylo stanoveno podle následující rovnice:

$$P\check{C}(mEqO_2/kg) = \frac{(V - V_0) * c_{thio} * F * 1000}{m}$$

V = objem odměrného roztoku spotřebovaný na titraci vzorku (ml)

V_0 = objem odměrného roztoku spotřebovaný na slepý pokus (ml)

C_{thio} = molární koncentrace odměrného roztoku Na_2SO_4 (mol/l)

F = faktor odměrného roztoku

m = navážka vzorku (g)

Kyselost oleje byla stanovena titrací vzorku oleje, který byl po navážení 2 g do 250 ml Erlenmeyerovy baňky rozpuštěn ve 40 ml směsi ethanol/diethylether (1:1, v/v). K rozpuštěnému vzorku bylo přidáno 10 kapek indikátoru fenolftaleinu (1% alkoholový roztok)

a tato směs byla titrována roztokem hydroxidu sodného o koncentraci 0,1 mol/l do slabě růžového zbarvení, jež zůstává stabilní alespoň 10 sekund (Bockisch, 1998). Číslo kyselosti bylo vypočítáno dle následující rovnice:

$$\check{C}K\ \left(mg\frac{KOH}{g}\right) = \frac{(a-b)*c*56{,}1}{m}$$

a = objem odměrného roztoku spotřebovaný na titraci (ml)

b = objem odměrného roztoku spotřebovaný na slepý pokus (ml)

c = molární koncentrace odměrného roztoku NaOH (mol/l)

m = navážka vzorku (g)

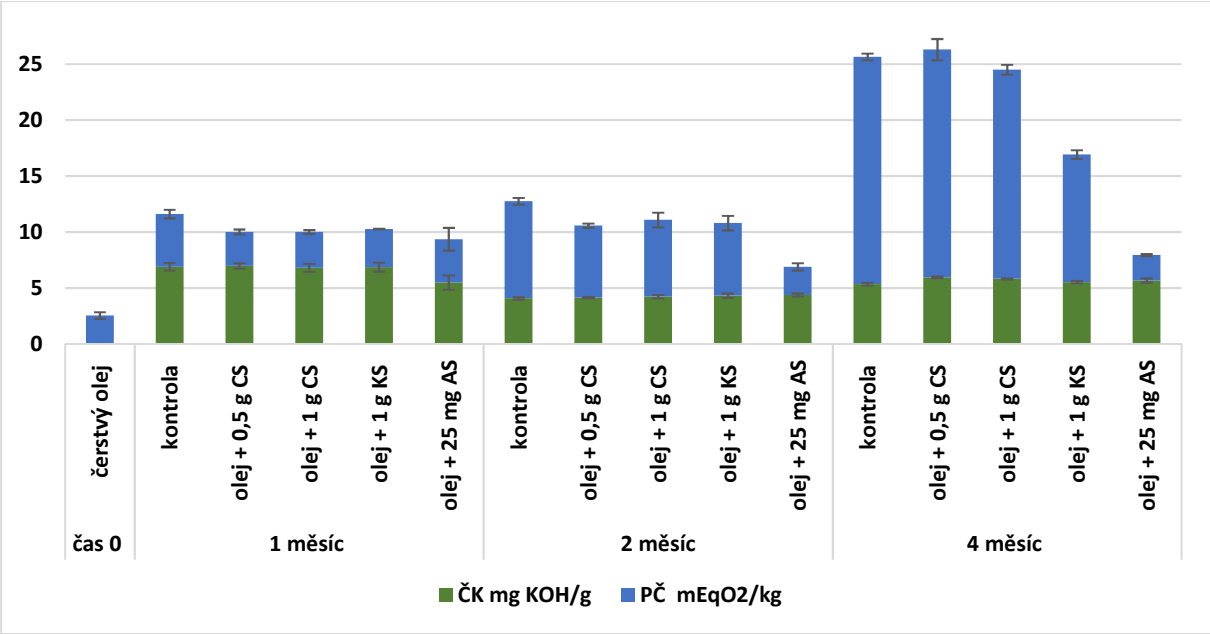
Vybraná data byla statisticky zpracována v programu Statistica 12. Pro vyhodnocení rozdílů mezi obohacenými oleji a neobohacenou (kontrolní) variantou oleje byl použit Dunnettův test. Porovnání rozdílů mezi vybranými obohacenými variantami bylo provedeno pomocí Tukeyho testu. Statistické hodnocení bylo prováděno při 5% hladině významnosti, rozdíly byly tedy považovány za statisticky významné pokud $p < 0{,}05$.

VÝSLEDKY A DISKUZE

Výsledné průměrné hodnoty čísla kyselosti a peroxidového čísla konopného oleje jsou zobrazeny v grafu č.1. Bezprostředně po vylisování oleje byly hodnoty u čísla kyselosti pod mezí detekce a u peroxidové čísla dle očekávání velmi nízké. Po prvním měsíci skladování bylo číslo kyselosti u všech vzorků oleje 6,88 mg KOH/g až na vzorek s 25 mg askorbylpalmitátu u něhož byla hodnota 5,5 mg KOH/g. Po 2 měsích skladování kleslo číslo kyselosti u všech vzorků k 4,2 mg KOH/g a po 4 měsích v průměru na 5,6 mg KOH/g. Fortifikace se výrazněji projevila u stanovení peroxidového čísla, kde po prvním měsíci skladování měl kontrolní olej 4,71 $mEqO_2$/kg, hodnota u fortifikovaných olejů se pohybovala v rozmezí od 3,04 do 3,87 $mEqO_2$/kg, byla tedy statisticky významně nižší (Dunnettův t., $p < 0{,}05$) oproti kontrole, kromě oleje fortifikovaného askorbyl palmitátem. Po 2 měsících skladování byl pokles peroxidového čísla o proti kontrole u všech fortifikovaných olejů cibulovými a konopnými slupkami o 2 $mEqO_2$/kg a u askorbyl palmitátu bylo peroxidové číslo na hodnotě 2,51 $mEqO_2$/kg (odpovídá hodnotě peroxidového čísla u čerstvě vylisovaného oleje) a byl statisticky významně nižší než u všech fortifikovaných variant oproti kontrolnímu oleji (Dunnettův t., $p < 0{,}05$). Po 4 měsících vzrostla hodnota peroxidového čísla na totožnou hodnotu 20,3 $mEqO_2$/kg u kontroly a 0,5 g přídavku cibulových slupek. Konopné slupky snížily hodnotu peroxidového čísla o proti kontrole téměř na polovinu (11,4 $mEqO_2$/kg). Nejlepšího výsledku bylo dosaženo s fortifikací 25 mg askorbyl palmitátu, kdy hodnota peroxidového čísla klesla na hodnotu 2,3 $mEqO_2$/kg.

Postupné snižování peroxidového čísla askorbyl palmitátem lze potenciálně zdůvodnit tím, že na začátku nebyl askorbyl dokonale rozpuštěn a v průběhu skladování se jeho rozpustnost zlepšila. Všechny obohacené oleje, kromě varianty oleje obohaceného 0,5 g cibulových slupek, vykazovaly nižší číslo kyselosti v porovnání s neobohaceným olejem (Dunnettův t., $p < 0,05$). Nicméně, v případě oleje obohaceného o 1 g cibulových slupek došlo pouze k mírnému poklesu, u oleje obohaceného konopnými slupkami klesla hodnota peroxidového čísla na přibližně poloviční hodnotu kontrolního oleje a hodnota peroxidového čísla oleje obohaceného askorbyl palmitátem byla oproti kontrole přibližně 9x nižší. Přestože peroxidové číslo oleje obohaceného konopnými slupkami, oproti oleji obohaceného askorbyl palmitátem, bylo statisticky významně vyšší (Tukeyho t., $p < 0,05$), pokles na poloviční hodnotu neošetřeného oleje naznačuje potenciál tohoto přírodního materiálu, a vedlejšího produktu potravinářského průmyslu, ve využitelnosti pro významné omezení oxidace nestabilních olejů. Nespornou výhodou přídavku konopných slupek je rovněž fakt, že jde o původní materiál z konopného semene a nedochází tak k senzorickým změnám u konopného oleje (u barvy ani u chuťových vlastností). Přídavkem konopných slupek tak dochází k žádoucímu obohacení konopného oleje o polyfenolické látky.

Graf č. 1, Vliv přídavku cibulových slupek, konopných slupek a askorbyl palmitátu na číslo kyselosti a peroxidové číslo v konopném oleji



Pozn. CS = cibulové slupky; KS = konopné slupky; AS = askorbylpalmitát; úsečky uvnitř sloupců grafu vyjadřují směrodatné odchylky.

ZÁVĚR

Na základě dosavadních výzkumů bylo prokázáno, že nejvhodnější způsob skladování olejů pro udržení oxidační stability představuje jeho uložení v podmínkách chladu, ideálně při teplotě 4°C. Nicméně, koncovým spotřebitelem je pro skladování stolních olejů nejčastěji volena pokojová teplota. Z důvodu korelace s předpokládanými podmínkami skladování spotřebitelem byla pokojová teplota použita rovněž v rámci výzkumného experimentu. Cílem této studie bylo zhodnocení potenciálního pozitivního vlivu fortifikace konopného oleje pomocí cibulových slupek a konopných semenných slupek. V rámci analýzy byla pozorována lepší indikace oxidační stability olejů pomocí metody stanovení peroxidového čísla v porovnání se stanovením čísla kyselosti. Fortifikace cibulovými slupkami neposkytla výrazný účinek na oxidační stabilitu konopného oleje v porovnání s konopnými slupkami na konci experimentu, tzn. ve 4. měsíci skladování. Nicméně, pokles peroxidového čísla u oleje obohaceného slupkami konopného semene téměř na polovinu hodnoty tohoto parametru u kontrolního oleje může představovat potenciál použití této suroviny, nebo jejího extraktu, jako přírodní alternativu použitelnou ke zvýšení oxidační stability nestabilních olejů. Pro ověření zmíněného potenciálu konopných slupek, a optimalizaci jejich použití, by však bylo nutné provedení dalších experimentů.

PODĚKOVÁNÍ

Příspěvek byl vypracován díky podpoře výzkumného grantu MZe, NAZV: QK 1910302 (Zpracování vedlejších produktů z lisování semen olejnin na nové výrobky s nutričními a zdravotními přínosy) a projektu GAJU 080/2022/Z (Hodnocení zemědělských a potravinářských surovin z pohledu genetické diverzity a obsahu biologicky aktivních látek a stopových prvků).

POUŽITÁ LITERATÚRA

1. ABUZAYTOUN, R., a Shahidi, F. Oxidative stability of flax and hemp oils. Journal of the American Oil Chemists' Society. 2006, 83(10), 855–861.
2. BÁRTA, J. at al. Optimalizované postupy a metody zpracování semen vybraných minoritních olejnin na olej a zušlechtěné výrobky z výlisků. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Fakulta zemědělská a technologická, 2022, ISBN 978-80-7394-955-6.
3. BEDRNÍČEK, J. at al. Onion Peel Powder as an Antioxidant-Rich Material for Sausages Prepared from Mechanically Separated Fish Meat. *Antioxidants* 2020, *9*, 974.

4. BENÍTEZ, V. et al. Characterization of industrial onion wastes (Allium cepa L.): dietary fibre and bioactive compounds. Plant foods for human nutrition, 2011, 66: 48-57.
5. BOCKISCH, M. Fats and oils handbook. Champaign, Ill: AOCS Press.Chapter 9 - Analytical Methods, 1998, 803-808.
6. JAROŠOVÁ, E. et al. Hodnocení stability a možnosti ovlivnění přídavkem dl-alfa-tokoferolu u lněného a konopného oleje. Úroda, 2021, roč. 69, č. 12, s. 653-658. ISSN 0139-6013.
7. KALAČ, P. Chemie potravin pro obchodně podnikatelský obor. České Budějovice: Jihočeská univerzita, Zemědělská fakulta. 1999, ISBN 80-7040-343-8.
8. MUNEKATA, P.E.S. et al. Natural Antioxidants from Seeds and Their Application in Meat Products. *Antioxidants* 2020, *9*, 815.
9. SHI, Y. et al. Preparation and physicochemical stability of hemp seed oil liposomes. Industrial Crops and Products,2021,162, 113283.
10. SCHMIDT, Š. Antioxidanty a oxidačné zmeny tukov v potravinách. Bratislava: Nakladateľstvo STU. Edícia monografií. 2011, ISBN 978-80-227-3491-2.
11. TURA, M. et al. Evaluation of Hemp Seed Oils Stability under Accelerated Storage Test. *Antioxidants* 2022, *11*, 490.
12. VELÍŠEK, J. a J. HAJŠLOVÁ. Chemie potravin. Rozš. a přeprac. 3. vyd. Tábor: OSSIS, 2009, 580 s. ISBN 978-80-86659-15-2.

Kontaktní adresa: Jarošová Markéta, Department of Plant Production, University of South Bohemia in České Budějovice, Faculty of Agriculture and Technology, Studentská 1668, 370 05 České Budějovice, Czech Republic Republic; E-mail: jarosovam@fzt.jcu.cz

NEBEZPEČÍ V POTRAVINÁCH ROSTLINNÉHO PŮVODU

HAZARDS IN FOODS OF PLANT ORIGIN

Javůrková Zdeňka, Pospiech Matej, Pečová Martina, Bartlová Marie, Havlová Lenka, Tremlová Bohuslava

Ústav hygieny a technologie potravin rostlinného původu, Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární univerzita Brno, Palackého tř. 1946/1, 612 42 Brno, Česká republika

ABSTRACT

Food is an essential component of human life. At the end of the last century, several important causes emerged which led to significant legislative changes. Food of plant origin becomes more significant especially due to changes in the eating habits of consumers. Very often, we encounter the presence of pesticide residues in the food group of plant origin presence of moulds and mycotoxins. In the years 2009 – 2021, the most frequently mentioned problematic foods are those coming from the category of fruits and vegetables.

Key words: pesticide, mycotoxins, aflatoxins, moulds

ÚVOD

Konzumace potravin je jednou ze základních potřeb člověka. Naši předkové konzumovali potraviny pocházející z rostlin a zvířat a možná také tušili, že s konzumací některých potravin jsou spojeny i nepříznivé účinky. Potrava je sice pro naše tělo nezbytná, ale pokud obsahuje některé z nebezpečí, může hrát roli při přenosu či vzniku onemocnění. Potravinová nebezpečí lze rozdělit na fyzikální, chemická a biologická. Nebezpečí se mohou do potravin dostat v jakékoliv fázi potravinového řetězce a jsou významným problémem, neboť mohou vyvolat širokou škálu zdravotních problémů (Singh et al., 2019). Na počátku tohoto tisíciletí byla v důsledku řady potravinových a krmivových krizí provedena významná reforma politiky EU v oblasti bezpečnosti potravin. To vedlo k vytvoření přístupu „od zemědělce ke spotřebiteli“, který má zajistit vysokou úroveň bezpečnosti ve všech fázích výrobního a distribučního procesu všech potravinářských výrobků (Kurrer, 2022).

Trh s potravinami rostlinného původu rychle roste a spotřebitelé stále častěji hledají rostlinné alternativy k živočišným produktům. Existuje několik faktorů, včetně udržitelnosti, etiky, ochrany zvířat, zdravotních aspektů (intolerance laktózy, alergie na kravské mléko, srdeční onemocnění způsobené vysokou hladinou cholesterolu), nárůst vegetariánské

a veganské stravy, které přispívají ke zvýšené poptávce po těchto potravinách (Rebellato et al., 2023).

Ani této skupině potravin se nevyhýbá nebezpečí, které se u potravin rostlinného původu může objevit v jakémkoliv stádiu produkce. Během růstu může být rostlina napadena celou řadou patogenů, převážně plísněmi, objevují se ale i bakterie a viry. Přenášená onemocnění způsobené potravinami neživočišného původu jsou celosvětově velkým zdravotním problémem (Hackl et al., 2013).

Tento příspěvek se zaměřuje na potraviny rostlinného původu a nebezpečí, která se v posledních letech u této skupiny objevila.

MATERIÁL A METODIKA

Výsledky počtů oznámení nebezpečí v potravinách, krmivech a FCM (materiál nebo předmět určený pro styk s potravinami) byly získány z „RASFF window“ a to v letech 2020 až 2022 (dřívější data nejsou volně dostupná). Dále byly porovnány s výsledky uváděným ve Zprávách o činnosti systému Rychlého varování pro potraviny a krmiva (RASFF) v České republice za roky 2009 až 2021.

Výsledky byly přepočítány na procenta pro jednotlivé skupiny a roky pro všechny členy systému RASFF a Českou republiku. Bylo sledováno, jaká nebezpečí se v posledních letech objevila na našem území v potravinách rostlinného původu.

VÝSLEDKY A DISKUSE

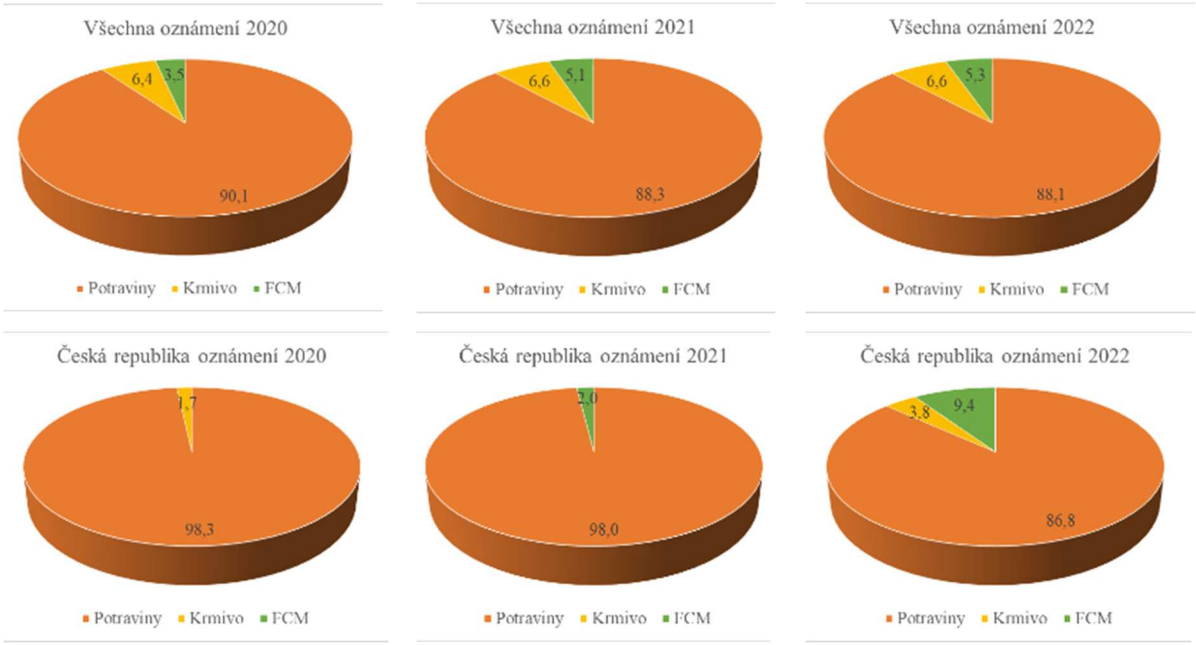
V letech 2020 až 2022 se jak v rámci všech členů, tak i v rámci České republiky, nejvyšší počet hlášení v „RASFF window“ týkal potravin (Obrázek č. 1). V roce 2020 to bylo v případě ČR až 98,3 %, v roce 2021 98,0 % a v roce 2022 86,8 %. Dle Zprávy o činnosti systému RASFF v ČR v roce 2020 (Fišnar, 2021) se z celkového počtu hlášení týkalo nakonec potravin pouze 91,0 %, 5,0 % krmiv a 4,0 % FCM. Také Zpráva o činnosti systému RASFF v České republice za rok 2021 (Fišnar, 2022) uvádí, že se z celkového počtu hlášení týkalo potravin 90 %, 3,5 % krmiv a 6,5 % FCM. Statistika oznámení v roce 2022 (Zpráva o činnosti systému RASFF v ČR za rok 2022) dosud nebyla zveřejněna. Opět se dají předpokládat nižší počty, než jsou uvedeny v „RASFF window“, neboť některá hlášení nejspíše budou ze seznamu stažena a některá se také nemusí týkat České republiky, tak jak vyplívá ze Zpráv o činnosti RASFF v České republice v letech 2020 a 2021.

Dle výsledků (Tabulka č. 1) uváděných ve Zprávách o činnosti RASFF v České republice (dále Zpráva RASFF v uvedeném roce) v letech 2009 až 2021 byl nejvyšší počet oznámení týkajících se České republiky v roce 2021, nejnižší v roce 2012.

Tabulka č. 1, Podíl oznámení týkajících se potravin a krmiv na celkovém počtu oznámení týkajících se České republiky

Rok	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019	2020	2021
Potraviny [%]	79	82	83	76	87	83	81	77	82	81	91	91	90
Krmiva [%]	6	5	5	8	7	7	4	8	5	7	5	5	3,5
FCM [%]	15	13	12	16	6	10	15	15	13	12	4	4	6,5
Celkový počet oznámení	8089	3816	3812	3424	3025	3157	3049	2993	3832	3699	3996	3862	4706
Z toho pro Českou republiku	187	177	200	144	176	199	155	196	194	191	276	279	372

FCM - Materiál nebo předmět určený pro styk s potravinami



Obrázek č. 1, Přehled hlášení v RASFF v letech 2020 až 2022,
FCM - Materiál nebo předmět určený pro styk s potravinami

Rok 2009

Na základě informací zveřejněných ve Zprávě o činnosti systému Rychlého varování pro potraviny a krmiva v roce 2009 se z celkového počtu oznámení týkalo České republiky pouze 2,3 %. Největší podíl nevyhovujících výrobků se vyskytoval v kategorii cukrovinky

(28 %, čokoláda s obsahem nedeklarované alergenní mléčné složky – kaseinu). U obilnin a obilných výrobků (12 %) se nejvíce objevovaly produkty s výskytem nepovoleného geneticky modifikovaného lněného semínka. Nejčastější pochybení u výrobků z kategorie ovoce a zelenina (8 %) souviselo s výskytem pesticidů a siřičitanů. 6 % oznámení se týkalo suchých skořápkových plodů, které obsahovali mykotoxiny. V tomto roce byla z České republiky odeslána oznámení týkající se například aflatoxinů v arašídech a mandlích či přítomnosti plísní v rozinkách. V roce 2009 se řešilo 18 případů týkajících se ovoce a zeleniny. U aditiv se především jednalo o vysoký obsah siřičitanů, kyseliny benzoové a kyseliny sorbové. Z reziduí pesticidů to byly karbendazim, fenpropatrin, ethion, azinphos-methyl, metamidophos a acetamiprid, 12 případů se týkalo přítomnosti mykotoxinů (aflatoxiny). V tomto roce byla z České republiky odeslána oznámení týkající se například aflatoxinů v arašídech a mandlích či přítomnosti plísní v rozinkách (Anonym 1, 2010).

Rok 2010

V tomto roce dle Zprávy RASFF nejčastější pochybení u výrobků z kategorie ovoce a zelenina (10 %) souviselo s výskytem aflatoxinů a siřičitanů. Dle výsledků kontroly trhu patřilo nejvíce nevyhovujících výrobků do kategorie ovoce a zelenina (33 %, rezidua pesticidů - oxamyl, chlormequat, captan a procymidon, sušené ovoce vysoký/nedeklarovaný obsah siřičitanů). V roce 2010 byla z České republiky odeslána oznámení týkající se opět aflatoxinů v arašídových bonbonech, pražených arašídech v kokosové šťávě a paraořeších. Také byl nalezen hliník v instantních nudlích z Číny, a to ve dvou případech (Anonym 2, 2011).

Rok 2011

Zpráva RASFF v roce 2011 uvádí, že největší podíl nevyhovujících výrobků se vyskytoval v kategorii ovoce a zelenina (20 %, residua pesticidů u čerstvé zeleniny a ovoce - tetradifon, formetanát, oxamyl a methomyl, siřičitany u zpracované zeleniny). Stejné prohřešky byly zjištěny při kontrole trhu, kde byly dále zjištěny suché skořápkové plody, které byly často napadeny plísněmi a aflatoxiny. V tomto roce byly odeslány z ČR oznámení o přítomnosti E425 – Konjacu, minerálních olejích v rozinkách, teradifonu v čerstvé paprice a vysoký obsah E – žluť SY FCF (Anonym 3, 2012).

Rok 2012

I v tomto roce bylo z potravin rostlinného původu nejproblematičtější ovoce a zelenina (5,5 %, rezidua pesticidů a nepovolená kyselina mravenčí). Při kontrole trhu patřilo nejvíce nevyhovujících výrobků do kategorie obiloviny a obilné produkty (19 %, napadení plísněmi a přítomnost aflatoxinů). V roce 2010 byla z České republiky odeslána oznámení týkající se přítomnosti reziduí pesticidů v čajích a také aflatoxinu v mandlích (Anonym 4, 2013).

Rok 2013

Druhou nejvýznamnější skupinu nevyhovujících produktů tvořilo ovoce a zelenina (11,7 %). Nejčastější pochybení u výrobků z této kategorie souviselo s výskytem reziduí pesticidních látek. Při kontrole trhu bylo odesláno 7 % hlášení o nevyhovujících výrobcích z kategorie ovoce a zelenina také cukrovinky, 4 % rýže a 3 % hlášení se týkalo suchých skořápkových plodů. V tomto roce došlo ve třech případech k zadržení zásilky doplňků stravy, které obsahovaly bylinu *Azadirachta indica* (Anonym 5, 2014), jejíž použití není na základě platné potravinářské legislativy v ČR povoleno (Česko, 2008).

Rok 2014

Informací zveřejněné ve Zprávě RASFF v roce 2014 se z celkového počtu oznámení týkalo České republiky 6,3 %. V kategorii ovoce a zelenina se na oznámeních podílela 6,3 %, 3 % cukrovinky, 3,1 % oznámení se týkalo kategorie suché skořápkové plody, 5,5 % kategorie obiloviny. Při kontrole trhu bylo zjištěno 11 % nevyhovujících produktů v kategorii ovoce a zelenina (rezidua pesticidů) (Anonym 6, 2015).

Rok 2015

Třetí v pořadí, co do počtu přijatých oznámení, byly kategorie materiálů přicházejících do styku s potravinami (FCM) a ovoce a zelenina. Při kontrole trhu patřilo k nejvíce nevyhovujícím výrobkům ovoce a zelenina, ořechy a výrobky z ořechů. Celkem bylo v roce 2015 ze vstupního bodu ČR na trh EU odmítnuto 12 nevyhovujících zásilek, jednalo se například o nedodržení maximálního limitu reziduí (Poustková, 2016).

Rok 2016

V roce 2016 byly nejproblematičtější z potravin rostlinného původu obiloviny a pekařské výrobky, dále ovoce a zelenina a ořechy, výrobky z nich a semena. Oznámení odeslané na základě kontroly trhu se také týkala těchto kategorií. V roce 2016 byla z České republiky odeslána oznámení týkající se přítomnosti aflatoxinů (neloupané arašídy) reziduí pesticidů (carbendazim) a nepovolených pesticidů (chlorfenapyr, diafenthiuron a hexaconazol) v chilli papričkách (Poustková, 2017).

Rok 2017

Vzhledem k počtu přijatých oznámení, byla kategorie ovoce a zelenina, kdy byla zjišťována přítomnost reziduí pesticidů, mykotoxinů a vysokého obsahu siřičitanů třetí v pořadí. Při kontrole trhu patřilo nejvíce nevyhovujících výrobků do kategorií ovoce a zelenina. V kategorii ovoce a zelenina se jednalo zejména o přítomnost reziduí pesticidů a norovirů. V tomto roce byla zadržena zásilka zeleného čaje, u kterého byla zjištěna přítomnost pesticidů, zásilka lískových jader, u kterých byl zjištěn vysoký obsah aflatoxinů. Ze stejného důvodu byly pozastaveny také 2 zásilky sušených fíků (Poustková, 2018).

Rok 2018

Největší podíl nevyhovujících potravin se vyskytoval v kategorii ovoce a zelenina. V tomto případě byly zjištěny zejména nálezy reziduí pesticidů v čerstvém nebo sušeném ovoci a v čerstvé zelenině a dále nálezy patogenních mikroorganismů v mraženém ovoci a zelenině. Při kontrole trhu patřilo nejvíce nevyhovujících výrobků do kategorie ovoce a zelenina (rezidua pesticidů a mykotoxinů). V rámci kontroly dovozu byla opět pozastavena zásilka lískových jader a podzemnice olejné (aflatoxiny), z důvodu přítomnosti plísní zásilka surových kakaových bobů a sušených chilli papriček (Poustková, 2019).

Rok 2019

V roce 2019 třetí v pořadí, co do počtu přijatých oznámení, byla kategorie ovoce a zelenina (rezidua pesticidů, cizí tělesa nebo olovo). Při kontrole trhu patřilo nejvíce nevyhovujících výrobků u potravin rostlinného původu ovoce a zelenina (mykotoxiny, rezidua pesticidů). Při kontrole dovozu byla pozastavena zásilka lískových jader, podzemnice olejné a sušené fíky. Důvodem pozastavení těchto zásilek bylo překročení maximálního limitu pro aflatoxiny (Fišnar, 2020).

Rok 2020

Významnou skupinu nevyhovujících výrobků představovala kategorie ořechy, výrobky z ořechů a semena (rezidua pesticidů - sezamová semena). Třetí v pořadí v počtu přijatých oznámení, byla kategorie obiloviny a pekařské výrobky (zejména nálezy reziduí pesticidů a mykotoxinů). Při kontrole trhu patřilo nejvíce nevyhovujících výrobků ořechy, výrobky z ořechů a semena (rezidua pesticidů - ethylenoxid), ovoce a zelenina (nedeklarování siřičitanů). Při kontrole dovozu byla pozastavena zásilka pistácií a podzemnice olejné z důvodu překročení maximálního limitu pro aflatoxiny (Fišnar, 2021).

Rok 2021

Významnou skupinu nevyhovujících výrobků představovala kategorie ovoce a zelenina (rezidua pesticidů - ethylenoxid). Třetí v pořadí, co do počtu přijatých oznámení, byla kategorie byliny a koření (rezidua pesticidů - ethylenoxid). Při kontrole trhu patřila velká část nevyhovujících výrobků do kategorie ovoce a zelenina (pochybení ve složení nebo vysoký obsah průmyslových kontaminantů - minerálního oleje). V rámci ověřování dovozu nebylo u žádné zásilky nalezeno nebezpečí, které by bylo nutné hlásit do systému RASFF. V roce 2021 proto nebylo z ČR odesláno do systému RASFF žádné oznámení týkající se kontroly dovozu potravin a surovin ze třetích zemí (Fišnar, 2022).

ZÁVĚR

Výsledky analýz ukázaly, že v současnosti je potravinová bezpečnost v ČR na velmi dobré úrovni. Činnost kontrolních a dozorčích orgánů je v průběhu analyzovaných let důsledná. Dle získaných výsledků se nejvíce hlášení v případě České republiky týkalo kategorie ovoce a zelenina. Nejčastěji uváděným prohřeškem byla přítomnost nepovoleného množství reziduí pesticidů a aflatoxinů, v některých případech nepovolených pesticidů, eventuálně se u zpracovaného ovoce a zeleniny objevovalo zvýšené množství siřičitanů. Jako další významné kategorie jsou uváděny obiloviny a výrobky z nich a suché skořápkové plody. U těchto skupin se velice často jednalo o přítomnost plísní, mykotoxinů a pesticidů.

PODĚKOVÁNÍ

Práce byla podpořena projektem: Erasmus+ Programme of the European Union FOODINOVO | 2020-1-SK01-KA203-078333.

POUŽITÁ LITERATÚRA

1. ANONYM 1. Zpráva o činnosti systému Rychlého varování pro potraviny a krmiva (RASFF) v České republice za rok 2009. Praha: Ministerstvo zemědělství. 2010. Dostupné z: https://bezpecnostpotravin.cz/publikace/
2. ANONYM 2. Zpráva o činnosti systému Rychlého varování pro potraviny a krmiva (RASFF) v České republice za rok 2010. Praha: Ministerstvo zemědělství. 2011. Dostupné z: https://bezpecnostpotravin.cz/publikace/
3. ANONYM 3. Zpráva o činnosti systému Rychlého varování pro potraviny a krmiva (RASFF) v České republice za rok 2011. Praha: Ministerstvo zemědělství. 2012. Dostupné z: https://bezpecnostpotravin.cz/publikace/
4. ANONYM 4. Zpráva o činnosti systému Rychlého varování pro potraviny a krmiva (RASFF) v České republice za rok 2012. Praha: Ministerstvo zemědělství. 2013. Dostupné z: https://bezpecnostpotravin.cz/publikace/
5. ANONYM 5. Zpráva o činnosti systému Rychlého varování pro potraviny a krmiva (RASFF) v České republice za rok 2013. Praha: Ministerstvo zemědělství. 2014. Dostupné z: https://bezpecnostpotravin.cz/publikace/
6. ANONYM 6. Zpráva o činnosti systému Rychlého varování pro potraviny a krmiva (RASFF) v České republice za rok 2014. Praha: Ministerstvo zemědělství. 2015. Dostupné z: https://bezpecnostpotravin.cz/publikace/

7. ČESKO. Vyhláška č. 225/2008 Sb., vyhláška, kterou se stanoví požadavky na doplňky stravy a na obohacování potravin. In: Zákony pro lidi.cz [online]. © AION CS 2010-2023 [cit. 20. 4. 2023]. Dostupné z: https://www.zakonyprolidi.cz/cs/2008-225
8. FIŠNAR, J. Zpráva o činnosti systému Rychlého varování pro potraviny a krmiva (RASFF) v České republice za rok 2019. Praha: Ministerstvo zemědělství. 2020. Dostupné z: https://bezpecnostpotravin.cz/publikace/ ISBN 978-80-7434-563-0
9. FIŠNAR, J. Zpráva o činnosti systému Rychlého varování pro potraviny a krmiva (RASFF) v České republice za rok 2020. Praha: Ministerstvo zemědělství. 2021. Dostupné z: https://bezpecnostpotravin.cz/publikace/ ISBN 978-80-7434-623-1
10. FIŠNAR, J. Zpráva o činnosti systému Rychlého varování pro potraviny a krmiva (RASFF) v České republice za rok 2021. Praha: Ministerstvo zemědělství. 2022. Dostupné z: https://bezpecnostpotravin.cz/publikace/ ISBN 978-80-7434-663-7
11. HACKL, E. et al. Food of plant origin: production methods and microbiological hazards linked to food-borne disease. Reference: CFT/EFSA/BIOHAZ/2012/01 Lot 1 (Food of plant origin with high water content such as fruits, vegetables, juices and herbs). EFSA Supporting Publications, [online]. 2013, vol. 10, no. 4 [cit. 2023-03-30]. Dostupné na internete: https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.2903/sp.efsa.2013.EN-402
12. KURRER, Ch. Bezpečnost potravin. [online]. 2022, 5 s. [cit. 2023-03-30]. Dostupné na internete: https://www.europarl.europa.eu/factsheets/cs/sheet/51/food-safety
13. POUSTKOVÁ, I. Zpráva o činnosti systému Rychlého varování pro potraviny a krmiva (RASFF) v České republice za rok 2015. Praha: Ministerstvo zemědělství. 2016. Dostupné z: https://bezpecnostpotravin.cz/publikace/ ISBN 978-80-7434-318-6
14. POUSTKOVÁ, I. Zpráva o činnosti systému Rychlého varování pro potraviny a krmiva (RASFF) v České republice za rok 2016. Praha: Ministerstvo zemědělství. 2017. Dostupné z: https://bezpecnostpotravin.cz/publikace/ ISBN 978-80-7434-375-9
15. POUSTKOVÁ, I. Zpráva o činnosti systému Rychlého varování pro potraviny a krmiva (RASFF) v České republice za rok 2017. Praha: Ministerstvo zemědělství. 2018. Dostupné z: https://bezpecnostpotravin.cz/publikace/ ISBN 978-80-7434-458-9
16. POUSTKOVÁ, I. Zpráva o činnosti systému Rychlého varování pro potraviny a krmiva (RASFF) v České republice za rok 2018. Praha: Ministerstvo zemědělství. 2019. Dostupné z: https://bezpecnostpotravin.cz/publikace/ ISBN 978-80-7434-514-2
17. REBELLATO, A.P. et al. Inorganic Contaminants in Plant-Based Yogurts Commercialized in Brazil. In *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 2023, vol. 20, no. 4, p. 3707.

18. SINGH, P.K. et al. Food hazards: Physical, chemical, and biological. In: *Food safety and human health*. Academic Press, 2019. p. 15-65.

Kontaktní adresa: Zdeňka Javůrková, Ústav hygieny a technologie potravin rostlinného původu, Veterinární univerzita Brno, Palackého tř. 1946/1, 612 42 Brno, Česká republika; E-mail: javurkovaz@vfu.cz

ANTIFUGÁLNA A ANIBAKTERIÁLNA ÚČINNOSŤ VODNÝCH EXTRAKTOV CHILLI PAPRÍK

ANTIFUNGAL AND ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF AQUEOUS EXTRACTS OF CHILI PEPPERS

Jevinová Pavlína, Popelka Peter, Hudáková Terézia [1], Pipová Monika

Katedra hygieny, technológie a zdravotnej bezpečnosti potravín, Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, Komenského 73, 041 81 Košice, Slovenská republika

[1]Ústav lekárskej biológie, Univerzita Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach Lekárska fakulta, Trieda SNP 1, 040 11 Košice, Slovenská republika

ABSTRACT

The work summarizes the results of the antibacterial and antifungal effect of aqueous extracts from chilli peppers Bhut Jolokia (BJ), Habanero Maya Red (HMR), Habanero Red (HR), Habanero Red Savina HRS), Serrano (S), Trinidad Moruga Scorpion (TMS) against *Escherichia coli* (*E.coli*) CCM 3954, *Staphylococcus aureus* (*Staph. aureus*) CCM 5756, *Salmonella* Enteritidis (*S.* Enteritidis) CCM 4420 and *Aspergillus ochraceus* (*A. ochraceus*) CCM F-269, *Penicillium viridicatum* (*P. viridicatum*) CCM F-583 and *Cladosporium cladosporioides* (*C. cladosporioides*) CCM F-348. We confirmed the most significant antibacterial effect with aqueous extracts from chili peppers TMS, HR and BJ. Growth inhibition was confirmed for these extracts in all tested strains. The average of the inhibition zones was in the range of 7.52±0.53 – 11.25±1.50 mm for TMS extract, 7.88±1.69 – 10.00±0.00 mm for the extract from HR and the extract from BJ 7.13±0.05 – 9.67±0.58 mm. We confirmed the highest sensitivity to the tested water extracts in *E. coli* CCM 3954, *S.* Enteritidis CCM 4420, *Staph. aureus* CCM 5756 and *Enterob. cloacae* CCM 1903.

Key words: chilli peppers, bacteria, microscopic filamentous fungi

ÚVOD

So silnejúcim dopyt spotrebiteľov po bezpečných a kvalitných potravinách narastajú nepokoje týkajúce sa používania chemických konzervačných látok a umelých antimikrobiálnych látok na inaktiváciu alebo inhibíciu rastu kontaminujúcej mikroflóry a patogénnych mikroorganizmov v potravinách. Zároveň v súvislosti s narastajúcim fenoménom antibakteriálne rezistencie sa hľadajú novšie formy liečby, ktoré sú bezpečné, nákladovo efektívne a jednoducho sa podávajú. Vzhľadom na to je použitie nutričných látok vrátane čili

paprík atraktívnou alternatívou (Dorantes a kol., 2000). Chilli papričky z rodu *Capsicum* sa celosvetovo používajú v potravinách pre ich štipľavú chuť a vôňu. Sú bohaté na bioaktívne zlúčeniny ako sú kapsaicinoidy, kyselina galová, kyselina kávová, kyselina chlorogénová a rutín (Shaimaa et al., 2016). Výsledky najnovších štúdií uvádzajú, že rod *Capsicum*, je dobrým zdrojom antimikrobiálnych a antifungálnych zlúčenín (Cichewicz a Thorpe, 1996; Dorantes a kol., 2000; Tajkarimi a kol., 2010). Cieľom tejto štúdie bolo preskúmať potenciálne antimikrobiálne a antifugálne účinky vodných extraktov z chilli paprík Bhut Jolokia (BJ), Habanero Maya Red (HMR), Habanero Red (HR), Habanero Red Savina HRS), Serrano (S), Trinidad Moruga Scorpion (TMS) voči *Escherichia coli* (*E.coli*) CCM 3954, *Staphylococcus aureus* (*Staph. aureus*) CCM 5756, *Salmonella* Enteritidis (*S.* Enteritidis) CCM 4420 a *Aspergillus ochraceus* (*A. ochraceus*) CCM F-269, *Penicillium viridicatum* (*P. viridicatum*) CCM F-583 a *Cladosporium cladosporioides* (*C. cladosporioides*) CCM F-348.

MATERIÁL A METODIKA

Vysušené plody paprík sme pomocou elektrického mlynčeka (*Sencor SCG1050WH*, Čína) pomleli na prášok, ktorý sme následne preosiali cez sito s veľkosťou otvorov 1 000 µm. Takto získané prášky (10 g) sme v Erlenmayerovej banke extrahovali 30 minút s 20 ml destilovanej vody v ultraznukovom kúpeli. Následne sme extrakty prefiltrovali a zvyšky aj s filtrami sme opätovne extrahovali s 200 ml destilovanej vody rovnakým spôsobom. Uvedený spôsob extrakcie sme zopakovali ešte raz so 100 ml destilovanej vody. Zo spojených extraktov sme vo vákuovej odparke (*Heidolph Hei-VAP Precision,* Nemecko) pri 50 °C odparili použité rozpúšťadlo. Takto získané suché extrakty sme rozpustili v 10 ml destilovanej vody a použili na testovanie.

Antibakteriálnu a antifugálnu účinnosť vodných extraktov chilli paprík sme stanovili diskovou difúznou metódou podľa Bauer-Kirb (CLSI, 2020). Testované kmene baktérií a vláknitých húb boli získané z Českej zbierky mikroorganizmov (Masaryková univerzita Brno, Česká republika). Na testovanie sme si pripravili 24 hodinovú suspenziu bakteriálnych kmeňov kultiváciou v termostate pri 37 °C v bujóne mozgovo-srdcovej infúzie (BHI). Následne sme 24 hodinovú kultúru upravili pomocou denzitometra (BIOSAN, Lotyšsko) na 0,5 stupňa McFarlandovho zákalového štandardu. V prípade vláknitých húb sme si pred testovaním pripravili suspenzie spór z kolónií testovaných kmeňov na Sabouraudovom dextrózovom agare kultivovaných 5 dní pri 25 °C (Hudáček a kol., 2007) a pomocou denzitometra (BIOSAN, Lotyšsko) upravili suspenziu spór testovaných kmeňov vláknitých húb na 1. stupeň McFarlandovho zákalového štandardu.

Na stanovenie antibakteriálnej aktivity sme použili testovacie médium Müller-Hinton agar (OXOID, Veľká Británia) a antifugálnej aktivity testovacie médium Sabouraudov dextrózovy agar (Hi-Media, India). Na povrch médií v Petriho miskách (90 mm) sme rozotreli 0,1 ml pripravených suspenzií testovaných kmeňov. Po vsiaknutí inokula sme sterilnými ihlami umiestnili na povrch agaru papierové disky (6 mm, Becton, Dickinson and Company, USA). Následne sme na tieto disky paralelne naniesli mikropipetou 10 µl z každého extraktu. Takto pripravené Petriho misky s bakteriálnymi kmeňmi sme inkubovali v termostate pri 37 °C 24 – 48 hod. a s mikromycétami pri 25 °C 5 dni Po uvedenej dobe inkubácie sme posuvným meradlo zmerali priemery inhibičných zón. Tento *in vitro* test sme opakovali trikrát, aby sme získali výsledkom so štandardnou odchýlkou.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Inhibičný účinok vodných extraktov testovaných chilli paprík sa prejavil tvorbou inhibičných zón iba u testovaných kmeňov baktérií (Tabuľka č. 1 a Graf č.1). Najvýraznejší antibakteriálny účinok sme potvrdili u vodných extraktov z chilli paprík TMS, HR a BJ. U týchto extraktov bola potvrdená inhibícia rastu u všetkých testovaných kmeňoch.

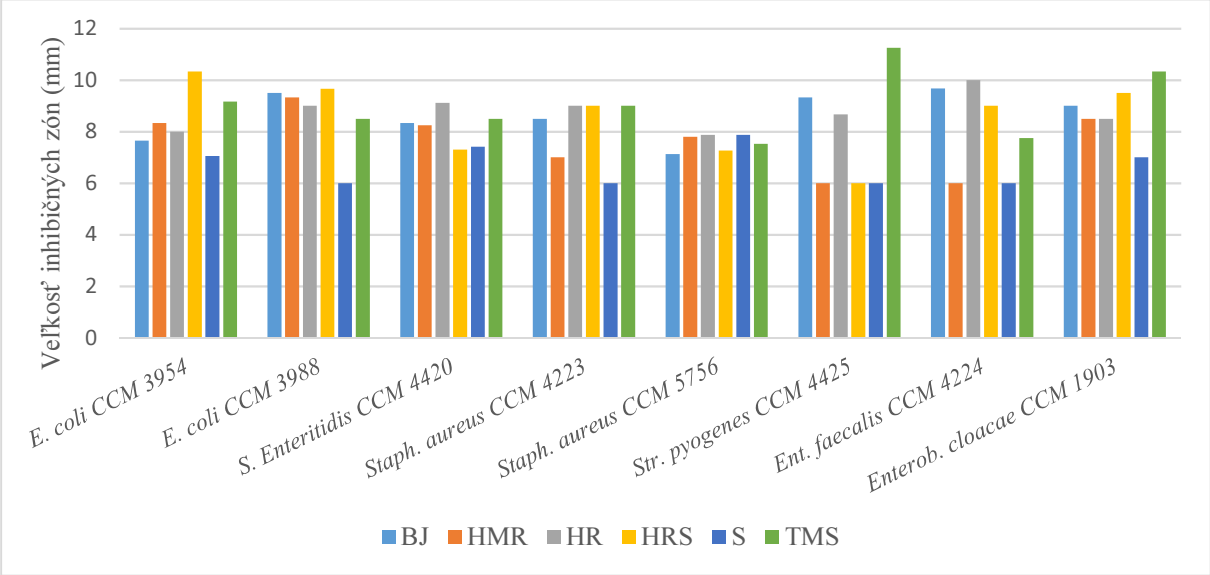
Tabuľka č. 2, Veľkosti zón inhibície vodných extraktov testovaných chilli paprík

	BJ	HMR	HR	HRS	S	TMS
E. coli CCM 3954	7,65±0,66	8,33±0,75	8,0±1,10	10,33±1,66	7,05±0,08	9,17±1,51
E. coli CCM 3988	9,50±0,85	9,33±0,58	9,00±0,00	9,66±0,82	6,00±0,00	8,50±1,73
S. Enteritidis CCM 4420	8,33±0,52	8,25±0,82	9,12±0,20	7,3±0,22	7,42±0,73	8,5±0,55
Staph. aureus CCM 4223	8,05±0,00	7,00±0,00	9,00±0,00	9,00±0,00	6,00±0,00	9,00±0,00
Staph. aureus CCM 5756	7,13±0,05	7,80±1,11	7,88±1,69	7,26±0,18	7,87±0,55	7,52±0,53
Strep. pyogenes CCM 4425	9,33±0,58	6,00±0,00	8,67±2,31	6,00±0,00	6,00±0,00	11,25±1,50
Enter. faecalis CCM 4224	9,67±0,58	6,00±0,00	10,00±0,00	9,00±0,00	6,00±0,00	7,75±2,06
Enterob. cloacae CCM 1903	9,00±0,82	8,50±0,58	8,50±0,50	9,50±0,58	7,00±0,00	10,33±0,29

E. – Escherichia; *S. – Salmonella*; *Staph. – Stapylococcus*; *Str. – Streptococcus*; *Ent. – Enterococcus*; *Enterob. – Enterobacter;*

Priemer inhibičných zón sa pohyboval u extraktu z TMS v rozsahu 7,52±0,53 – 11,25±1,50 mm, u extraktu z HR 7,88±1,69 – 10,00±0,00 mm a extraktu z BJ 7,13±0,05 – 9,67±0,58 mm. Najvyššiu citlivosť voči testovaným vodným extraktom sme potvrdili u *E. coli* CCM 3954, *S.* Enteritidis CCM 4420, *Staph. aureus* CCM 5756 a *Enterob. cloacae* CCM 1903.

Graf č. 2, Výsledky antibakteriálnej účinnosti vodných extraktov chilli paprík



E. – Escherichia; *S. – Salmonella*; *Staph. – Stapylococcus*; *Str. – Streptococcus*; *Ent. – Enterococcus*; *Enterob. – Enterobacter;*

DISKUSIA

Stanovenie antibakteriálnej a antifungálnej účinnosti extraktov pripravených z rôznych druhov chilli paprík je predmetom veľkého záujmu (Koffi-Nevry et al., 2012; Omolo et al., 2014; Hleba et al., 2015; Salman, et al., 2018). Stanovenie fytochemických zložiek a hodnotenie *in vitro* antibakteriálnej aktivity vodných a metanolových extraktov paprík *Capsicum frutescens*, *Capsicum annuum* a *Capsicum chinense* dopestovaných v Západnom Bengálsku, (India) proti trom grampozitívnym (*Bacillus subtilis, Staphylococcus aureus, Micrococcus luteus*) a piatim gramnegatívnym (*Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa, Shigella dysenteriae, Shigella flexneri, Vibrio cholerae*) baktériám bolo predmetom štúdie Sen a kol. (2016). Antibakteriálny test sa uskutočnil pomocou agarovej jamkovej difúznej metódy. Z výsledkov tejto štúdie vyplýva, že vodné extrakty z *Capsicum annum* vykazovali najvyššiu aktivitu proti *Shigella flexneri* (11,6±1,0 mm) a najnižšiu proti *Staphylococcus aureus* (10,0±0,057 mm). Vodné extrakty z *Capsicum frutescens* vykazovali najvyššie inhibičné zóny u *Micrococcus luteus* (13,40±1,15 mm) a najnižšie inhibičné zóny u *Staphylococcus aureus* (11,62±0,57 mm). U vodného extraktu z *Capsicum chinense* boli pozorované najvyššie

inhibičné zóny u *Shigella dysenteriae* (14,0±1,15 mm) a najnižšie u *Escherichia coli* (10,0±0,57 mm). Pri metanolovom extrakte z *Capsicum annum* bola najvyššia aktivita zaznamenaná proti *Escherichia coli* (19,67±1,52 mm), podobné to bolo pri ostatných baktériách, okrem *Vibrio cholerae*, o ktorej sa zistilo, že je necitlivá na tento extrakt. Metanolový extrakt z *Capsicum frutescens* vykazoval maximálnu inhibičnú zónu proti *Micrococcus luteus* (20,33±0,57 mm). Metanolový extrakt z *Capsicum chinense* vykazoval antibakteriálne vlastnosti proti štyrom bakteriálnym kmeňom z ôsmich s výraznou inhibíciou rastu *Micrococcus luteus* (18,67±1,53 mm). V štúdii Izah et al. (2019) sa skúmala antibakteriálna aktivita vodných a etanolových extraktov z vysušených plodov papriky *Capsicum frutescens* var. *minima* (Delta, Nigéria) proti potenciálnym bakteriálnym patogénom (*Escherichia coli, Staphylococcus aureus, Bacillus subtilis* a *Pseudomonas aerugionsa*). Zóny inhibície etanolových extraktov stanovených agarovou jamkovou difúznou metódou dosiahli veľkosti od 12 mm do 14,33 mm a vodný extrakt od 10,33 do 12,00 mm v závislosti od testovaného kmeňa. Z výsledkov vyplýva, že medzi vodnými a etanolovými extraktmi nie je významný rozdiel v antibakteriálnej aktivite voči testovaným baktériám. Zóny inhibície vo vodných aj etanolových extraktov z *Capsicum frutescens* var. *minima* naznačujú, že ide o potenciálne širokospektrálne antibiotiká.

Uvedené výsledky sú v súlade s výsledkami našej štúdie. Najvýraznejší antibakteriálny účinok sme potvrdili u vodných extraktov z chilli paprík TMS, HR a BJ. U týchto extraktov bola potvrdená inhibícia rastu u všetkých testovaných kmeňoch. Priemer inhibičných zón sa pohyboval u extraktu z TMS v rozsahu 7,52±0,53 – 11,25±1,50 mm, u extraktu z HR 7,88±1,69 – 10,00±0,00 mm a extraktu z BJ 7,13±0,05 – 9,67±0,58 mm. Najvyššiu citlivosť voči testovaným vodným extraktom sme potvrdili u *E. coli* CCM 3954, *S.* Enteritidis CCM 4420, *Staph. aureus* CCM 5756 a *Enterob. cloacae* CCM 1903. Kmene *A. ochraceus* CCM F-269, *P. viridicatum* CCM F-583 a *C. cladosporioides* CCM F-348 boli voči všetkým testovaným extraktom rezistentné.

Výsledky štúdií viacerých autorov potvrdzujú antibakteriálny a antifugálny účinok fenolových kyselín chilli paprík. Dorantes a kol. (2000) testovali inhibičný účinok extraktov z troch chilli paprík druhov Habanero, Serrano a Pimiento Morron proti *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* Typhimurium a *Bacillus cereus*. V extraktoch boli identifikované viaceré mikrobiálne inhibítory ako kapsaicín, dihydrokapsaicín, kyselina škoricová, kyselina m-kumarová a kyselina o-kumarová. Autori dospeli sa k záveru, že k inhibícii štyroch baktérií prispeli najväčšou mierou kyselina škoricová a m-kumarová. Kapsaicín a dihydrokapsaicín (zodpovedné za štipľavosť paprík) v koncentráciách použitých v tejto práci neprejavili žiaden inhibičný účinok na rast testovaných mikroorganizmov. Papriky

druhu Habanero, ktoré obsahovali najviac kapsaicínu, boli najmenej účinným bakteriálnym inhibítorom. Extrakty z papriky Pimineto Morron ktoré obsahujú kyselinu m-kumarovú a kyselinu škoricovú, ale neobsahujú kapsaicín preukázali veľmi dobrú inhibičnú aktivitu voči všetkým štyrom testovaným baktériám. Spomedzi testovaných mikroorganizmov bola najviac citlivou voči extraktom z troch chilli paprík *L. monocytogenes* a najviac rezistentnou *S.* Typhimurium.

ZÁVER

V tejto štúdií sme nezaznamenali antifugálny účinok vodných extraktov testovaných chilli paprík. Výsledky štúdie potvrdili iba inhibičný účinok voči testovaným kmeňom baktérií. Z výsledkov vyplýva, že antibakteriálny účinok chilli paprík do značnej mieri závisí od ich druhu. Z testovaných druhov najväčší antibakteriálny účinok sme potvrdili u vodných extraktov z paprík Trinidad Moruga Scorpion (TMS), Habanero Red (HR) a Bhut Jolokia (BJ). Na základe týchto výsledkov môžeme konštatovať, že extrakty z chilli paprík majú veľký potenciál ako antibakteriálne látky v farmaceutickom, ako aj potravinárskom priemysle. Predstavujú potenciálny prostriedok náhrady chemických konzervačných látok na inaktiváciu alebo inhibíciu rastu kontaminujúcej mikroflóry a patogénnych mikroorganizmov v potravinách.

POĎAKOVANIE

Práca bola podporená projektom KEGA č. 013UVLF-4/2021.

POUŽITÁ LITERATÚRA

1. CICHEWICZ, R. H. – THORPE, P. A. The antimicrobial properties of chile peppers (*Capsicum species*) and their uses in Mayan medicine. *J. Ethnopharmacol,1996,* ISSN 1872-7573, 52(2), p. 61–70.
2. CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). Approved Standard: M2. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. CLSI, Wayne, PA, USA, [online]. 2020, [cit. 2023.04.20.] Dostupné na internete: www.clsi.org
3. DORANTES, L. et al. Inhibition of growth of some foodborne pathogenic bacteria by *Capsicum annum* extracts. Int. *J. Food Microbiol*., 2000, ISSN 1879-3460, 57(1-2), 125-128.
4. HLEBA, L. et al. Antibacterial activity of habanero chili sauces against selected pathogenic bacteria. *Anim. Sci. Pap. Rep*., 2015, ISSN 2344-4576, 48 (1), p. 132-136.
5. HUDÁČEK, J. a kol. Antifungálny účinok laktobacilov na plesne rodu *Fusarium* a *Aspergillus*, *Chem. Listy*, 2007, ISSN 1213-7103, 101, p.730-737.

6. IZAH, S. C. et al. Evaluation of crude and ethanolic extracts of Capsicum frutescens var. minima fruit against some common bacterial pathogens. *J. Altern. Complement. Med.*, 2019, ISSN 1557-7708, 12(3), p.105-108.
7. KOFFI-NEVRY, R. et al. Antibacterial Activity of Two Bell Pepper Extracts: *Capsicum annuum* L. and *Capsicum frutescens.* In *Int. J. Food. Prop.*, 2012, ISSN 1094-2912, 15, p. 961-971.
8. OMOLO, M.A. et al. Antimicrobial Properties of Chili Peppers. In *J. Infect. Dis. Ther.*, 2014, ISSN 2332-0877, 2, 145.
9. SALMAN, H.A. et al. Lack of Antibacterial Activity of *Capsicum annuum* and *Simarouba glauca* against *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus.* In *Biosci. Biotechnol. Res. Asia,* 2018, ISSN 0973-1245, 15 (2), p. 311-315.
10. SEN, N. et al. In vitro antibacterial potential and phytochemical analysis of three species of Chilli plant. In *J. Chem. Pharm. Sci*., 2016, ISSN 0975-7384, 8(2) p. 443-447.
11. SHAIMAA, G., et al. 2016. Effect of heat treatment on phenolic and flavonoid compounds and antioxidant activities of some egyptian sweet and chilli pepper. *Nat. Prod. Res.*, 2016, ISSN 2329-6836, 4, p. 1-6.
12. TAJKARIMI, M.M. et al. Antimicrobial herb and spice compounds in food. In *J. Food Control*., 2010, ISSN 2157-7110, 21, p. 1199-1218.

Kontaktná adresa: Jevinová Pavlína, Department of Food Hygiene and Technology, University of Veterinary Medicine and Pharmacy in Košice, Komenského 73, 041 81 Košice, Slovak Republic; E-mail: pavlina.jevinova@uvlf.sk

HODNOCENÍ SENZORICKÝCH, TEXTURNÍCH A BAREVNÝCH VLASTNOSTÍ ANALOGŮ MASA

EVALUATION OF SENSORY, TEXTURE AND COLOR PROPERTIES OF MEAT ANALOGUES

Ježek František, Bednář Jiří, Fouad Ali Abdullah Abdullah, Kameník Josef, Bursová Šárka

Ústav hygieny a technologie potravin živočišného původu a gastronomie, Veterinární univerzita Brno, Palackého tř. 1946/1, 612 42 Brno, Česká republika

ABSTRACT

Meat analogues are an alternative source of protein and their sensory properties are intended to imitate meat or meat products. The study is focused on comparing the color, textural and sensory parameters of meat analogues compared to meat. A total of 42 samples of meat analogs and 6 samples of meat were purchased in the market network. The color (L^*, a^*, b^*) of the samples was measured instrumentally before heat treatment. After heat treatment, toughness (shear force according to Warner-Bratzler) was measured and sensory parameters were evaluated (overall appearance, toughness, elasticity, color on the cut surface, odor, juiciness, fibrousness, cohesiveness, meat taste, soy taste, oil flavor, overall impresion). The results show large differences between individual meat analogues in all evaluated parameters. Classic meat products had a more intense meat taste. On the basis of other parameters, it cannot be clearly stated whether meat analogues are better or worse than meat products.

Key words: meat alternatives, vegetable protein, high-moisture extrusion, shear force

ÚVOD

Současná globální situace klade nové výzvy na vědce a technology v otázce hledání inovativních řešení a alternativ k tradiční systémům produkce potravin. Cílem je především snížit vliv na životní prostředí a současně produkce zdravějších, nutričně bohatých a bezpečných potravin ve velkém množství, aby byla naplněna rostoucí poptávka v celosvětovém měřítku (Delgado-Pando et al., 2023). Analogy masa nebo náhražky masa simulují chutnost a vzhled tradičních masných výrobků. Hlavním požadavkem v Evropě je, aby byly k přípravě analogů využívány primárně rostlinné zdroje, nikoliv jiné zdroje bílkovin (Joseph et al., 2020). Mezi nejčastěji používané alternativní zdroje proteinů patří sója a její

deriváty společně s pšeničným lepkem. V menším množství jsou využívány luštěniny, jako jsou hrách, lupina, cizrna a čočka (Kyriakopoulou et al., 2019). Analogy masa jsou vyrobeny z látek, které nejsou živočišného původu, ale mají podobný vzhled, texturu a chutnost jako maso (Sha and Xiong, 2020) a v současné době dosahují v některých zemích poměrně dobré komercializace. Rozhodování zákazníků závisí především na ceně, aroma a chuti, a přestože si uvědomují benefity konzumace analogů masa, maso zůstává stále první volbou (Zhang et al., 2023). Prohloubení senzorické a strukturální podobnosti analogů masa a masa by mohlo pomoci tyto produkty zatraktivnit. Velkou výzvou však zůstává napodobení aroma masa vzhledem ke složitosti látek vznikajících při tepelné úpravě masa (Kumar et al., 2017). Ačkoliv aroma a chuť rostlinných analogů může být upraveno kořením a solí v průběhu tepelné úpravy, nepatrné rozdíly ve složení analogů masa a maných výrobků mohou vést k velkým rozdílům v celkové chutnosti (Kyriakopoulou et al., 2019). Na rozdíl od masa jsou analogy masa tepelně opracovány více než jednou. Při procesu extruze jsou rostlinné suroviny zpracovávány při vysoké teplotě a tlaku. Toto ošetření slouží k vytvoření tkáňové struktury podobné svalovému vláknu, dochází ke změně molekulární struktury a zvyšuje se stravitelnost rostlinných analogů masa. Spotřebitelé však musí výrobek před konzumací ještě ohřát, což může značně změnit jeho vlastnosti (Zhang et al., 2023). Jak uvádí práce Vu et al. (2022), samotná metoda tepelné úpravy (smažení na pánvi, smažení horkým vzduchem, pečení v troubě) neměla hlavní vliv na fyzikálně chemické vlastnosti hovězích ani rostlinných karbanátků. Hlavní vliv měl čas přípravy, který vede ke zvýšení teploty uvnitř výrobku a zvyšuje změny ve struktuře a interakcích proteinů a jiných ingrediencí. Dochází k Maillardovým reakcím, které se projevují ve změně světlosti a barvy finálních produktů.

Cílem práce bylo posoudit senzorické vlastnosti (celkový vzhled, tuhost, pružnost/elasticita, barva na řezu, vůně, šťavnatost, vláknitost, soudržnost, masová chuť, sojová chuť, olejová příchuť, celkový dojem) rostlinných analogů masa a masných produktů po tepelné úpravě panelem školených hodnotitelů. Součástí práce bylo také instrujmentální hodnocení barevných parametrů před tepelnou úpravou vzorků a měření tuhosti vzorků po tepelné úpravě na analyzátoru textury.

MATERIÁL A METODIKA

Vzorky rostlinných analogů masa a masných produktů byly zakoupeny v tržní síti České republiky. Celkem bylo v práci hodnoceno 42 vzorků masných analogů a 6 vzorků masných produktů z mletého masa. Vzorky byly tepelně upravovány v gastronomické dílně dle návodu výrobce na pánvi s malým množstvím řepkového oleje. Před tepelnou úpravou byl od každého výrobku odebrán vzorek pro měření barevných parametrů v systému CIELab (L^*- světlost, a^*-

červená, b* - žlutá) na přístroji. Instrumentální hodnocení barvy bylo provedeno pomocí spektrofotometru KonicaMinolta CM-5 (KonicaMinolta, Japonsko). Přístroj byl nastaven na zdroj světla D65 a standardní úhel pozorovatele 10°, měřící štěrbina 8 mm. Kalibrace byla provedena na černou a bílou barvu. Každý vzorek byl měřen 10x na různých místech v nákroji. Po tepelné úpravě byly vzorky vytemperovány na teplotu místnosti a bylo provedeno měření tuhosti vzorků dle Warner-Bratzlera. Instrumentální měření textury bylo provedeno na přístroji INSTRON 5544 (InstronCorporation, USA). Bylo provedeno měření střižní síly (N), veliost vzorků byla 10x10x20 mm. Rychlost příčníku byla 80 mm/min. Výsledek byl získán z pěti měření. Pro senzorické hodnocení byl připraven hodnotitelský protokol, přičemž pro hodnocení vybraných senzorických parametrů (celkový vzhled, tuhost, pružnost/elasticita, barva na řezu, vůně, šťavnatost, vláknitost, soudržnost, masová chuť, sojová chuť, olejová příchuť, celkový dojem) byly použity 100 mm grafické nestrukturované stupnice s bodovou hodnotou 0 až 100. Senzorického hodnocení se účastnilo celkem 17 proškolených hodnotitelů, z nichž někteří vlastní osvědčení o absolvování základní senzorické zkoušky u Státní zemědělské a potravinářské inspekce. Na jednom setkání bylo hodnoceno maximálně 6 vzorků. Jako degustační sousto byla předkládána voda a bílé pečivo. Výsledky byly zpracovány pomocí programu Microsoft Office Excel 2016.

VÝSLEDKY A DISKUZE

Výsledky všech analýz ukazují na velké rozdíly mezi testovanými vzorky. Při hodnocení světlosti (L*) byly zjištěny nejvyšší hodnoty u pokrmu na bázi sójových bílkovin (73,89) a nejnižší hodnoty (39,45) u výrobku na bázi sójových, pšeničných a hrachových bílkovin. Při hodnocení červené barvy (a*) byla nejvyšší hodnota (19,33) zjištěna u sójových kuliček s cibulkou a černým pepřem, nejnižší hodnota (2,31) byla u pokrmu na bázi pšeničných a sójových bílkovin. Nejvyšší hodnota (38,69) parametru b* - žlutá byla zjištěna u pokrmu s quinoou, fazolemi a kukuřicí, nejnižší hodnota (11,77) u hrachového burgeru. Produkty z masa se umístili při hodnocení parametrů L*, a*, b* vždy mezi rostlinnými analogy masa, tedy nelze konstatovat, že by se v barvě výrazně odlišovaly. Jak uvádí Vu et al. (2022), dochází v průběhu tepelné úpravy k poklesu hodnot všech barevných parametrů (L*, a*, b*), přičemž s rostoucím časem tepelné úpravy se hodnoty dále snižují. Tyto změny jsou připisovány alteracím v mikrostruktuře a složení v průběhu tepelné úpravy (Hughes et al., 2020). Rovněž při instrumentálním měření textury byly zjištěny velké rozdíly mezi posuzovanými vzorky. Velikost střižní síly - tuhost (N) dosahovala hodnot od 1,93 ± 1,08 po 29,64 ± 6,79. Nejnižší tuhost byla zjištěna u burgeru s brokolicí, nejvyšší tuhost u veganského trhaného kuřecího. U produktů z masa byla zjištěná tuhost srovnatelná s rostlinnými analogy. Senzoricky

posuzované parametry vykazovaly rovněž velké rozdíly. Celkový vzhled byl nejlépe hodnocen (92,64) u pokrmu na bázi sójových bílkovin, nejhorší byl steak ze sóje a pšenice (31,00). U karbanátků z masa i u rostlinných karbanátků nemá způsob tepelné úpravy velký vliv na jejich celkový vzhled. Rozdíly byly zjištěny spíše mezi produkty z masa a masnými analogy. U masa dochází s délkou tepelné úpravy k rostoucímu smrštění produktu, které u rostlinných analogů není tak velké. To souvisí s denaturací svalových proteinů masa v průběhu tepelného opracování, zatímco u rostlinných analogů jsou proteiny denaturované již před tepelnou úpravou (Vu et al., 2022). Jako nejtužší (87,91) byl hodnocen steak s quinoou, fazolemi a kukuřicí, nejméně tuhý (14,00) byl burger s brokolicí. V parametru pružnost/elasticita byly nejvyšší hodnoty zjištěny u výrobků z masa, konkrétně u vepřových karbanátků (78,09), u analogů masa potom u výrobku na bázi sójových, pšeničných a hrachových bílkovin, nejnižší hodnota (28,80) byla zjištěna u falafelu na základě cizrny. Barva byla nejlépe hodnocena u rostlinného čevapčiči (78,33), nejhůře byla hodnocena u steaku ze sóje a pšenice (32,60). V parametru vůně byly nejlépe hodnoceny opět vepřové karbanátky (82,91), z rostlinných analogů pak burger s brokolicí (78,22), nejhůře byla vůně hodnocena hrachového burgeru (38,64). Šťavnatost byla nejlépe hodnocena u burgeru s hrachovou bílkovinou (79,82), nejnižší šťavnatost byla zaznamenána u falafelu na základě cizrny (33,40). V parametru vláknitost byly nejlépe hodnoceny kuličky na bázi sójových, pšeničných a hrachových bílkovin (77,89), nejhorší byla vláknitost u výrobku falafel na základě cizrny (15,55). Soudržnost byla nejvyšší u steaku s quinoou, fazolemi a kukuřicí (92,82), nejnižší opět u výrobku falafel na základě cizrny (20,67). Masová chuť byla nejlépe hodnocena u produktů z masa, opět u vepřových karbanátků (87,64), u produktů rostlinných byla nejlépe imitována u pokrmu na bázi sójových bílkovin (68,91). Nejhorší hodnocení za masovou chuť získal burger s brokolicí (8,10). Sójová chuť byla nejvýraznější u sójového mletého (69,20), nejméně intenzivní byla produktů z masa, u rostlinných analogů byla nejméně intenzivní v případě burgeru s hrachovou bílkovinou (24,18). Olejová příchuť byla ovlivněna způsobem tepelné úpravy vzorků. Nejintenzivnější olejovou příchuť vykazovalo veganské trhané kuřecí (72,09), nejméně se olejová příchuť projevila u pokrmu na bázi pšeničných a sójových bílkovin (23,22). V tabulce č. 1 je uvedeno senzorické hodnocení celkového dojmu prvních dvaceti nejlépe hodnocených vzorků rostlinných analogů masa a produktů z masa. Nejméně bodů získal za celkový dojem výrobek ze sóje a pšenice (29,40). Pro spotřebitele je důležitá široká dostupnost a možnost výběru analogů masa, musí však splňovat nároky spotřebitelů na vzhled, aroma, chuť a texturu. Chuť a textura masa jsou spotřebiteli hodnoceny nejvíce a jsou zásadní pro jejich rozhodování (Starowicz et al., 2022). Primárními texturními parametry jsou šťavnatost a křehkost (Schreuders et al., 2021).

Tabulka č. 1, Výsledky hodnocení celkového dojmu u dvaceti nejlépe hodnocených vzorků rostlinný analogů masa a produktů z masa (vyznačeny červeně)

Označení vzorku při senzorické analýze	Název vzorku	Bodové hodnocení celkového dojmu
746	Pokrm na bázi sójových bílkovin	86,27
444	Vepřové karbanátky	77,64
936	Vepřový burger s rostlinnou bílkovinou	74,50
374	Veganský burger s brokolicí	73,56
412	Veganský burger s brokolicí	72,80
549	Pokrm na bázi sójových a pšeničných bílkovin	71,00
263	Pokrm na bázi sójových bílkovin	70,73
528	Vegi steak s quinoou, fazolemi a kukuřicí	70,55
321	Pokrm na bázi sójových a pšeničných bílkovin	69,91
471	Pokrm na bázi pšeničných a sójových bílkovin	69,18
111	Plátky z ochuceného mletého hovězího masa	68,73
548	Nudlkičky ze sóje	63,90
333	Mleté maso mix	62,73
635	Sójové kuličky s cibulkou a černým pepřem	62,00
458	Burger s hrachovou bílkovinou	61,45
777	Burger s hrachovou bílkovinou	61,27
943	Nudličky ze sóje	61,00
555	Mleté maso míchané	60,64
871	Pokrm na bázi sójových a pšeničných bílkovin	60,56
365	Vegetariánské kuřecí nugetky	60,44

ZÁVĚR

Prezentovaná práce je součástí širší studie, která se mimo senzorické parametry zabývá rovněž hodnocením chemického složení a mikrobiologických parametrů. Z výsledků je zřejmé, že na trhu je v současné době velké množství rostlinných analogů masa a výběr pro spotřebitele je široký. Díky tomuto spektru byly mezi výrobky zjištěny velké rozdíly v senzorických parametrech hodnocených jak smyslově, tak instrumentálními metodami. Hlavními faktory, které rozhodují o přijetí produktu jsou vzhled, aroma, chuť a textura, které mají za úkol imitovat produkty z masa. Výsledky rovněž ukazují, že kvalita některých analogů masa je srovnatelná s produkty z masa.

PODĚKOVÁNÍ

Práce byla finančně podpořena projektem Interní tvůrčí agentury VETUNI č. 2022ITA24.

POUŽITÁ LITERATURA

1. DELGADO-PANDO, G. et al. Introduction: general overview of meat analogues and meat replacers. In MEISELMAN, H. L. and LORENZO, J. M. *Meat and meat Replacements.* Cambridge: Woodhead Publishing, 2022. 407 p. ISBN 978-0-323-85838-0.
2. HUGHES, J. M. et al. Meat color i determined not only by chromatic heme pigments but also by the physical structure and achromatic light scattering properties of the muscle. In *Comprehensive reviews in Food Science and Food Safety,* ISSN: 1541-4337, 2020, vol. 19, no. 1, p. 44-63.
3. JOSEPH, P. et al. Alternative proteins: Market research on consumer trends and emerging landscape. In *Meat and Muscle Biology,* ISSN: 2575-985X, 2020, vol. 4, no. 2, p. 16: 1-11.
4. KUMAR, P. Meat analogues: Health promising sustainable meat substitutes. In *Critical Reviews in Food Science and Nutrition,* ISSN: 1040-8398, vol. 57, no. 5, 923-932.
5. KYRIAKOPOULOU, K. et al. Plant-based meat analogues. In GALANAKIS, C. M. *Sustainable meat production and processing.* Academic Press, 2019. 274 p. ISBN 978-0-128-14874-7.
6. SHA, L. and XIONG, Y. L. Plant protein-based alternatives of reconstructed meat: Science, technology, and challenges. In *Trends in Food Science & Technology,* ISSN: 0924-2244, 2020, vol. 102, p. 51-61.
7. SCHREUDERS, F. K. G. et al. Texture methods for evaluating meat and meat analogue structures: a review. *Food Control,* ISSN: 0956-7135, vol. 127, 108103.
8. STAROWICZ, M. et al. What are the main sensory attributes that determine the acceptance of meat alternatives. *Current Opinion in Food Science,* ISSN: 2214-7993, vol 48, 100924
9. VU, G. et al. Impact of cooking method on properties of beef and plant-based burgers: Appearance, texture, thermal properties, and shrinkage. In *Journal of Agriculture and Food Research,* ISSN: 2666-1543, 2022, vol. 9, 100355.

10. ZHANG, Z. et al. Effect of two types of thermal processing methods on the aroma and taste profiles of three commercial plant-based beef analogues and beef by GC-MS, E-nose, E-tongue, and sensory evaluation. In *Food Control,* ISSN: 0956-7135, 2023, vol. 146, 109551.

Kontaktní adresa: Ing. František Ježek, Ph.D., Ústav hygieny a technologie potravin živočišného původu a gastronomie, Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární univerzita Brno, Palackého tř. 1946/1, 612 42 Brno, Česká republika; E-mail: fjezek@vfu.cz

TVORBA BIOFILMU KMEŇOV *S. AUREUS* IZOLOVANÝCH Z DOJNÍC SO SUBKLINICKOU FORMOU MASTITÍDY

BIOFILM FORMATION IN *S. AUREUS* ISOLATED FROM DAIRY COWS WITH SUBCLINICAL FORM OF MASTITIS

Király Ján, Hajdučková Vanda, Pilipčinec Emil

Katedra mikrobiológie a imunológie, Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, Komenského 73, 041 81 Košice, Slovenská republika

ABSTRACT

Mastitis is one of the global problems of the dairy industry. Among the most important etiological agents are bacteria of the genera *Staphylococcus*, *Streptococcus* and *Escherichia*. Staphylococcal infections are the most common cause of mastitis with a significantly low cure rate. The pathogenesis of staphylococcal mastitis can be caused by the influence of extracellular factors and the properties of bacteria such as adherence and biofilm formation. *S. aureus* is an important cause of subclinical mastitis worldwide and is among the most common foodborne pathogens, with milk and milk products being potential sources of infection. The aim of the research was to monitor the ability to form a biofilm in *S. aureus* isolates and to detect the genes involved in this process. From the milk of cows (n=215) with subclinical mastitis, 6 isolates of *S. aureus* were isolated and identified, of which 4 strains formed a biofilm. Using multiplex PCR (mPCR), the presence of the *icaABCD*, *agrA*, *srtA*, *fnbA*, *clfA*, *clfB* genes was detected in all *S. aureus* isolates, the presence of the *fnbB* gene was detected in one and the *bap* gene in none of the isolates. The results show a difference in genotypic and quantitative testing of biofilm formation, which may be due to different *in vitro* and *in vivo* conditions.

Key words: subclinical mastitis, *Staphylococcus aureus*, biofilm, multiplex PCR

ÚVOD

Subklinická mastitída hovädzieho dobytka je multifaktoriálne ochorenie definované ako asymptomatický zápal mliečnej žľazy, v ktorého dôsledku dochádza k zníženiu produkcie mlieka, zvýšeniu kontaminácie rezíduami antibiotík a vzniku chronických infekcií, ktoré môžu viesť až k úhynu postihnutého jedinca (QOLBAINI a kol., 2021). Napriek tomu, že jej vznik spôsobuje viacero faktorov, predstavuje bakteriálna infekcia jednu z hlavných príčin manifestácie ochorenia. Medzi najdôležitejších pôvodcov mastitíd patria zástupcovia rodu

Staphylococcus, *Streptococcus* a *Escherichia*. Na základe mnohých štúdií možno predovšetkým stafylokokové infekcie považovať za prevládajúce nákazlivé patogény spôsobujúce subklinickú mastitídu s príznačne nízkou mierou vyliečenia (MBINDYO a kol., 2020). Patogenéza stafylokokovej mastitídy môže byť spôsobená vplyvom extracelulárnych faktorov a vlastností baktérií ako je adherencia a tvorba biofilmu. Celosvetovo významným pôvodcom subklinickej mastitídy je *S. aureus*, ktorý je aj najrozšírenejším patogénom izolovaným zo vzoriek mlieka od dojníc s mastitídou. Z toho dôvodu patrí medzi najbežnejšie patogény z potravín, pričom mlieko a mliečne výrobky sú potenciálnym prameňom infekcie (SCHNITt a TENHAGEN, 2020). *S. aureus* počas infekcie exprimuje mnohé faktory virulencie, čo vedie k jeho úniku pred imunitnou odpoveďou hostiteľa (ZECCONI a kol., 2006) alebo k jeho odolnosti voči účinku rôznych skupín antimikrobiálnych látok. Najvyššiu odolnosť voči antibiotikám vykazujú biofilm tvoriace kmene *S. aureus* oproti kmeňom, ktoré ho nevytvárajú a preto je aj účinnosť terapeutických prípravkou znížená (MOUFTI a kol., 2015, AGARWAL a JAIN, 2012) a často je antibiotická liečba neúspešná čím sa biofilmové infekcie ťažko eradikujú (HOIBY a kol., 2015, HOIBY a kol., 2011).

Biofilm tvorí viacero vrstiev baktérií, ktoré sú chránené exopolysacharidovým glykokalyxom. Ako jeden z faktorov virulencie uľahčuje adherenciu a kolonizáciu baktérií na epitel mliečnych žliaz, čo prispieva k ochrane pred imunitnou odpoveďou a zhoršenej eradikácii patogénov čoho dôsledkom sú opakujúce alebo pretrvávajúce infekcie (DARWISH a ASFOUR, 2013). Mechanizmus tvorby biofilmu stafylokokov predstavuje komplikovaný proces, do ktorého sú zapojené mnohé gény a regulačné faktory. Jeho tvorba pozostáva v princípe z počiatočnej adhézie baktérií k povrchu, tvorby mikrokolónií, dozrievania biofilmu a disperzie. U biofilm tvoriacich *S. aureus* bolo identifikovaných niekoľko typov adhéznych molekúl, ktorými sa baktérie pripájajú na hostiteľské tkanivo. Adhézia na biotické povrchy je sprostredkovaná prostredníctvom skupiny povrchovo exponovaných proteínov exprimovaných v bunkovej stene *S. aureus* označených ako MSCRAMM (*Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecule*) (ARCIOLA a kol., 2005). Schopnosť viazať sa na rôzne cicavčie extracelulárne proteíny ma *S. aureus* pomocou proteínov viažucich fibronektín (FnbA, FnbB) a proteínov viažucich fibrinogén (ClfA, ClfB). U kmeňov izolovaných z bovinnej mastitídy bola dokázaná dôležitá úloha v primárnom prichytávaní a akumulácii bakteriálnych buniek proteínu spojeného s biofilmom (Bap), ktorý patrí taktiež do skupiny MSCRAMM (CUCARELLA a kol., 2001). Významným pre väčšinu MSCRAMM je aminokyselinový Leu-Pro-X-Thr-Gly (LPXTG) motív rozpoznávaný a štiepený enzýmom sortáza A, ktorý katalyzuje kovalentné pripojenie MSCRAMMs k peptidoglykánovej vrstve baktérií počas zostavovania bunkovej steny

pri vegetatívnom raste. Nadmerná expresia génu *srtA* (kóduje sortázu A) zvyšuje rýchlosť ukotvenia povrchových proteínov v biosyntéze bunkovej steny a prispieva k zvýšenej virulencii (TSOMPANIDOU a kol., 2012). V ďalšej fáze dochádza k množeniu baktérií za vzniku viacvrstvového biofilmu, ktorý súvisí s produkciou polysacharidovej intracelulárnej adhézie (PIA). Lokus intracelulárnej adhézie (*ica*) je operón zodpovedný za syntézu PIA tvoreného polysacharidom poly-N-acetylglukozamínom, ktorý je primárnym determinantom podporujúcim adhézne interakcie medzi bakteriálnymi bunkami (KHORAMROOZ a kol., 2016). Produkty génov lokusu *icaABCD* sú nevyhnutné pre tvorbu biofilmu pričom zásadnú rolu zohrávajú produkty génov *icaA* a *icaD* (VASUDEVAN a kol., 2003). V konečnom štádiu biofilmu dochádza k disperzii niektorých buniek hydrolýzou exopolysacharidu (EPS). Uvoľnené bunky prechádzajú do planktonickú formy a sú schopné vytvoriť základ nového biofilmu v iných miestach. Proces poslednej fázy je pod kontrolou systému Agr označovaný ako *quorum-sensing* systém (QS), ktorý reguluje expresiu génov, kódujúcich RNA regulačné molekuly (RNAIII) spôsobom závislým na hustote buniek a akumulácii autoinduktorov pôsobiacich ako signálne molekúly (AIP - autoindukujúci peptid). Zvýšením hustoty bakteriálnych buniek dochádza k zvýšeniu koncentrácie AIP a po dosiahnutí prahovej koncentrácie sa aktivujú zložky Agr, ktoré iniciujú transkripciu δ-hemolyzínu a efektora RNAIII z promótora P3. Syntéza RNAIII vedie k zníženej produkcii povrchových proteínov a k zvýšeniu produkcie exotoxínov. QS systém je centrálnou zložkou komunikácie medzi bunkami interakciou susediacich baktérií, ktoré po kolonizácii spoločne reagujú na genetickej úrovni voči imunitným reakciám hostiteľa (KHORAMROOZ a kol., 2016).

Cieľom nášho výskumu bolo sledovať schopnosť tvoriť biofilm u izolátov *S. aureus* získaných z bovinných mastitíd a detegovať u nich gény zapojené do tohto procesu.

MATERIÁL A METODIKA

Odber vzoriek, izolácia a identifikácia Staphylococcus aureus

Vzorky mlieka boli odobraté od dojníc (n=215) z rôznych slovenských fariem so subklinickou formou mastitídy s pozitívnym NK-testom. Izolácia a identifikácia *S. aureus* (n=6) bola vykonaná klasickými mikrobiologickými metódami a následne boli izoláty potvrdené pomocou PCR metódy na molekulárnej úrovni.

Testovanie biofilmovej aktivity – testovanie biofilmu kryštálovou violeťou

Biofilmová aktivita bola testovaná pomocou 96-jamkovej polystyrénovej mikrotitračnej platničky farbením kryštálovou violeťou modifikovanou kolorimetrickou metódou podľa O´Toole. Testované kmene *S. aureus* boli ako čisté bakteriálne kultúry inkubované pri 37 °C

cez noc (počas 18 hodín) na krvnom agare. Zo skupiny jednotlivých kolónií bol pripravený 1 McFarland bakteriálnej suspenzie vo fyziologickom roztoku, ktorý bol pridaný do jamiek polystyrénovej platne v objeme 100 µl ku 100 µl modifikovaného bujónu *Brain heart infusion* (mBHI**,** HiMedia Laboratories, Mumbai, India) s 1 % glukózou a 2 % NaCl. Ako negatívna kontrola bol použitý čistý bujón a referenčným kmeňom tvoriacim biofilm bol *S. aureus* CCM 4223 (Česka zbierka mikroorganizmov, Brno). Po 24 hodinovej inkubácii pri 37 °C bolo médium s planktonickými bunkami odstránené a jamky boli štyrikrát premyté destilovanou vodou. Následne boli biofilmy farbené pridaním 200 µl 0,1 % roztoku kryštálovej violete (Merck, Germany) a inkubované počas 30 minút pri laboratórnej teplote. Po štvornásobnom premytí a sušení počas 10 minút pri laboratórnej teplote bolo farbivo z adherovaných buniek extrahované pridaním 30 % roztoku ľadovej kyseliny octovej v objeme 200 µl na jamku. Optická denzita bola stanovená spektrofotometricky meraním absorbancie pri vlnovej dĺžke 550 nm pomocou čítačky platničiek SYNERGY READER 4 (BioTek, Merck, Germany).

Štatistické vyhodnotenie tvorby biofilmu

Tvorba biofilmu bola vyhodnotená na základe získaných dát štatistickou analýzou pomocou programu GraphPad Prism 6.01 (GraphPad Inc., San Diego, CA, USA) použitím jednosmernej analýzy rozptylu (ANOVA) a Tukeyho testu pre určenie významnosti $p < 0,001$.

Detekcia génov zapojených do procesu tvorby biofilmu

Prítomnosť génov zapojených do procesu tvorby biofilmu bola sledovaná pomocou PCR a multiplex PCR (mPCR). Genomická DNA bola extrahovaná z izolátov kultivovaných cez noc v modifikovanom bujóne *Brain heart infusion* (mBHI**,** HiMedia Laboratories, Mumbai, India) s 1 % glukózou a 2 % NaCl pomocou izolačného kitu *High Pure PCR Template Preparation Kit* (Roche Molecular Systems, Inc.). PCR amplifikácia s jedným párom primérov prebehla pri detekcii génu *bap*, ktorý kóduje proteín asociovaný s biofilmom (Tabuľka č. 1). PCR reakčná zmes obsahovala vo výslednom objeme 0,5 ng izolovanej genomickej DNA, 1x *DreamTaq Green PCR Master Mix* (ThermoFisher SCIENTIFIC, USA), 0,5 pmol primérov („forward, reverse“) a vodu. Reakcia PCR prebehla pri optimalizovaných podmienkach (Tabuľka č. 2) na termocykléri Mastercycler® nexus X2 (Eppendorf, Germany). Amplifikáciou s troma pármi primérov pomocou mPCR boli identifikované génové úseky génov operónu *icaABCD*, *srtA* a *agrA*, pričom na základe veľkosti produktov boli vybrané kombinácie primérov detegujúcich *icaA*, *icaB*, *icaC* a kombinácie primérov detegujúcich gény *icaD*, *srtA*, *agrA* (Tabuľka č. 1). Dva páry primérov boli v mPCR použité pri detekcii génov v kombinácii *fnbA*, *fnbB* a v kombinácii *clfA*, *clfB* (Tabuľka č. 1). Reakčná zmes mPCR

obsahovala vo výslednom objeme 0,5 ng izolovanej DNA, 1x *DreamTaq Green PCR Master Mix* (ThermoFisher SCIENTIFIC, USA), 0,25 pmol (*icaB*, *icaC*, *icaD*, *agrA*, *srtA*), 0,375 pmol (*icaA*) a 0,5 pmol (*fnbA*, *fnbB*, *clfA*, *clfB*) každého priméru („forward, reverse“) a vodu. Reakcia mPCR prebehla na termocykléri Mastercycler® nexus X2 (Eppendorf, Germany) pri optimalizovaných podmienkach (Tabuľka č. 3). Elektroforetická separácia amplifikovaných úsekov DNA prebehla v 2,5 % agarózovom géli s pridanou GoodView™ (Amplia, SR) netoxickou reagenciou na detekciu nukleových kyselín pomocou elektroforetickej aparatúry Wide Mini-Sub® Cell GT System (BIO RAD, USA) a zdroja napätia PowerPac™ Basic (BIO RAD, USA). Produkty PCR boli v géli po elektroforéze vizualizované pomocou UV svetla zariadenia Ultraviolet Transilluminator (Bio-Imaging Systems, Israel) a zaznamenané prostredníctvom Kodak Gel Logic 100 Digital Imaging System (Kodak, USA).

Tabuľka č. 1, Použité priméry na PCR analýzu

Gén	Primér	Sekvencia (5´→3´)	Produkt (bp)	Referencia
icaA	icaA_Fw	CTTGCTGGCGCAGTCAATAC	75	Iqbal a kol. 2016
	icaA_Rev	GTAGCCAACGTCGACAACTG		
icaB	icaB_Fw	ATACCGGCGACTGGGTTTAT	141	Nourbakhsh a kol. 2016
	icaB_Rev	ATGCAAATCGTGGGTATGTGT		
icaC	icaC_Fw	CTTGGGTATTTGCACGCATT	209	Pereyra a kol. 2016
	icaC_Rev	GCAATATCATGCCGACACCT		
icaD	icaD_Fw	ACCCAACGCTAAAATCATCG	211	Nourbakhsh a kol. 2016
	icaD_Rev	GCGAAAATGCCCATAGTTTC		
srtA	srtA_Fw	GTGGTACTTATCCTAGTGGCAGC	183	Englerová a kol. 2021
	srtA_Rev	GCCTGCCACTTTCGATTTATC		
agr	agr_Fw	TCGTAAGCATGACCCAGTTG	96	
	agr_Rev	AAATCCATCGCTGCAACTTT		
bap	bap_Fw	TTGACGAGGTTGGTAATGGC	87	Táto štúdia
	bap_Rev	CGCCTACAGTTTCTGGTAATGC		
fnbA	fnbA_Fw	GAAGTGGCACAGCCAAGAAC	192	Englerová a kol. 2021
	fnbA_Rev	ACGTTGACCAGCATGTGG		
fnbB	fnbB_Fw	CAATGATCCTATCATTGAGAAGAGTG	156	
	fnbB_Rev	CCTTCTACACCTTCAACAGCTGTA		
clfA	clfA_Fw	GAGAGCATTTAGTTTAGCGGCA	180	Táto štúdia
	clfA_Rev	TCACCTTTAACAGCAGAATTAGGC		
clfB	clfB_Fw	GTCTACACAAACGAGCAATACCAC	120	
	clfB_Rev	TGAGGAACAGTTTGATCTTGCA		

Tabuľka č. 2, Podmienky PCR detegujúcej *bap*

Proces	Teplota (°C)	Čas (Sekundy/minúty)	Počet cyklov
Počiatočná denaturácia	95	3 min.	1
Denaturácia	95	30 sek.	35
Annealing	61	30 sek.	
Extenzia	72	15 sek.	
Konečná extenzia	72	10 min.	1

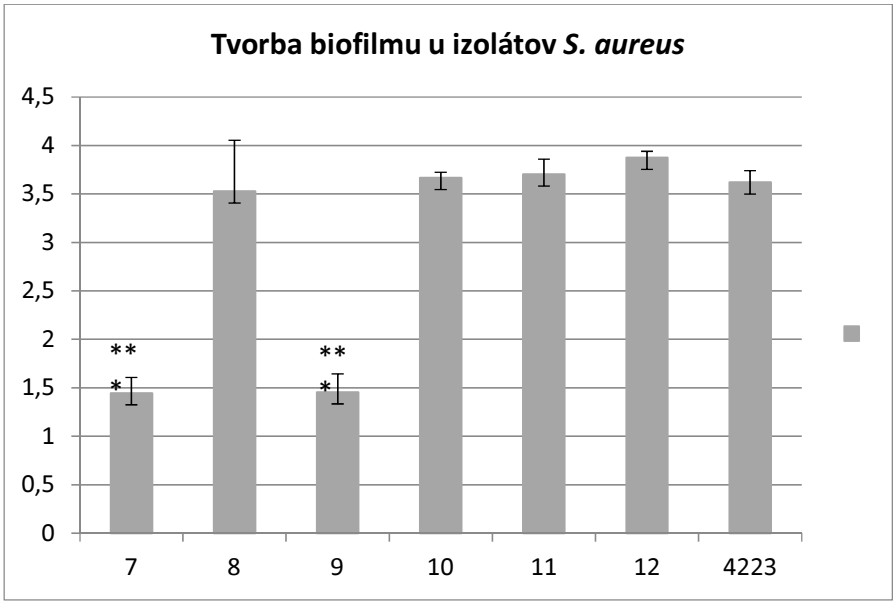
Tabuľka č. 3, Podmienky mPCR detegujúcej *icaABCD*, *srtA*, *agrA*, *fnbA/B*, *clfA/B*

Proces	Teplota (°C)	Čas (Sekundy/minúty)	Počet cyklov
Počiatočná denaturácia	95	3 min.	1
Denaturácia	95	30 sek.	35
Annealing	61	30 sek.	
Extenzia	72	20 sek.	
Konečná extenzia	72	10 min.	1

VÝSLEDKY A DISKUSIA

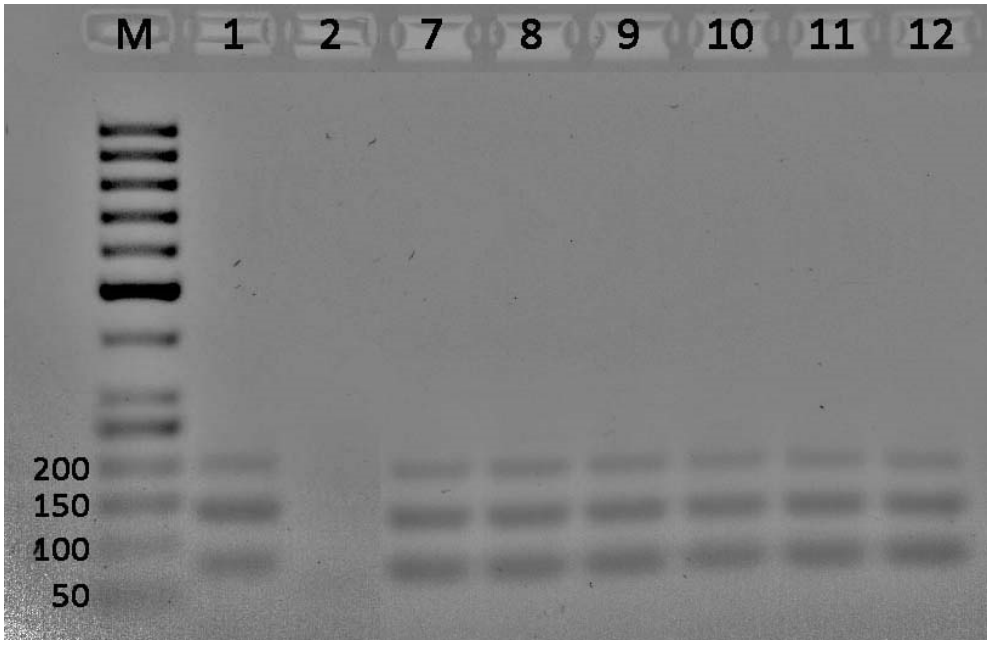
Schopnosť tvorby biofilmu u jednotlivých izolátov *S. aureus* bola testovaná pomocou modifikovanej kolorimetrickej metódy podľa O´Toole. Štatistickým vyhodnotením dát (Obrázok č. 1) možno určiť, že 4 izoláty *S. aureus* (8, 10, 11, 12) zo 6 analyzovaných produkovali biofilm rovnako ako biofilm tvoriaci referenčný kmeň *S. aureus* CCM 4223 zatiaľ čo 2 izoláty (7 a 9) signifikantne neprodukovali biofilm. Spomedzi izolovaných klinických kmeňov *S. aureus* malo 66,7 % schopnosť vytvárať biofilmy. Prevalencia kmeňov *S. aureus* izolovaných z mlieka dojníc so subklinickou mastitídou schopných tvoriť biofilm je podľa našich dosiahnutých výsledkov podobná alebo rovnaká ako v mnohých publikovaných štúdiách vo svete (RYCHSHANOVA a kol., 2022). Z dosiahnutých výsledkov je preto nutné poukázať na potrebu zvýšenej pozornosti vo vzťahu k prevalencii biofilm tvoriacich kmeňov izolovaný z chovov hovädzieho dobytka v dôsledku existencie potenciálneho rizika šírenia týchto kmeňov a kontaminácie mlieka a mliečnych výrobkov s dopadom na verejné zdravie. Štúdia Wanga a kolektívu (2018) poukazuje na to, že biofilmy zvyšujú príležitosť na prenos génov rezistencie voči antibiotikám. Neefektívna liečba mastitíd zapríčinených biofilm tvoriacimi *S. aureus* antibiotikami môže zvýšiť riziko antibiotickej rezistencie, ktorá predstavuje hrozbu pre zdravie ľudí a zvierat (PEDERSEN a kol., 2021).

Obrázok č. 1, Tvorba biofilmu u izolátov *S. aureus* z mlieka subklinickej mastitídy



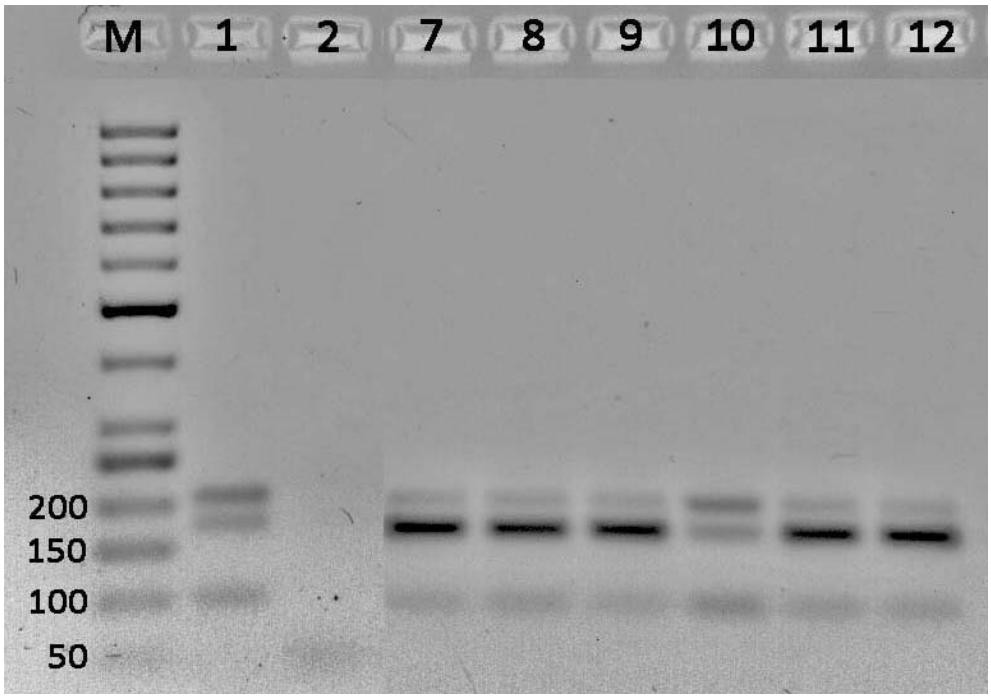
V dôsledku silnej závislosti medzi podmienkami rastu a tvorbou biofilmu v *in vivo* a *in vitro* podmienkach sa ukazuje ako nevyhnutné pre identifikáciu kmeňov tvoriacich biofilm využiť okrem fenotypových metód aj metódy genotypovej analýzy génov asociovaných s biofilmom. Z toho dôvodu sme u všetkých klinických izolátov *S. aureus* sledovali detekciu génov súvisiacich s biofilmom pomocou simplexnej a multiplexnej PCR metódy (Obrázok č. 2 až 5). Ako významný faktorom virulencie v patogenéze mastitídy sa uvádza PIA kódujúci intercelulárny adhézny lokus (*ica*) tvorený z génov *icaABCD*, z ktorých najdôležitejšiu úlohu v procese tvorby biofilmu majú gény *icaA* a *icaD* (GAJEWSKA a CHAJECKA-WIERZCHOWSKA, 2020). Ukotvenie mnohých povrchových proteínov pri syntéze bakteriálnej bunkovej steny, ktoré sú spojené s virulenciou ako je adhézia a invazibilita katalyzuje transpeptidázový enzým sortáza A. Kmene *S. aureus*, ktorým chýbal gén *srtA* kódujúci sortázu A, boli defektné v ukotvení proteínov LPXTG v bunkovej stene a preto baktérie neboli schopné ukotviť proteíny bunkového povrchu nevyhnutné pre adhéziu k eukaryotickým bunkovým štruktúram (HUSSAIN a kol., 2020). Lokus *agr* hra dôležitú úlohu pri kontrole expresie väčšiny faktorov virulencie *S. aureus*. Gén *agrA* kóduje regulátor odozvy, ktorý je súčasťou *agr* quorum-sensing systému a väzbou na DNA aktivuje promótor P3 čím reguluje expresiu rôznych faktorov virulencie, fázu disperzie a prežívanie *S. aureus* v hostiteľskom tkanive (KHORAMROOZ a kol., 2016). Analýzou amplifikovaných úsekov génov *icaABCD*, *srtA*, *agrA* po mPCR bola v našej štúdií ich prítomnosť potvrdená u všetkých (100 %) izolátov *S. aureus* (izoláty č. 7 až 12).

Obrázok č. 2, Detekcia génov *icaA*, *icaB*, *icaC* u izolátov *S. aureus* pomocou mPCR



M – štandard GeneRuler 50 bp DNA ladder; 1 – kontrolný kmeň *S. aureus* CCM 4223; 2 – negatívna kontrola bez DNA; 7 až 12 – izoláty pozitívne na *icaA* (75 bp), *icaB* (141 bp) a *icaC* (209 bp)

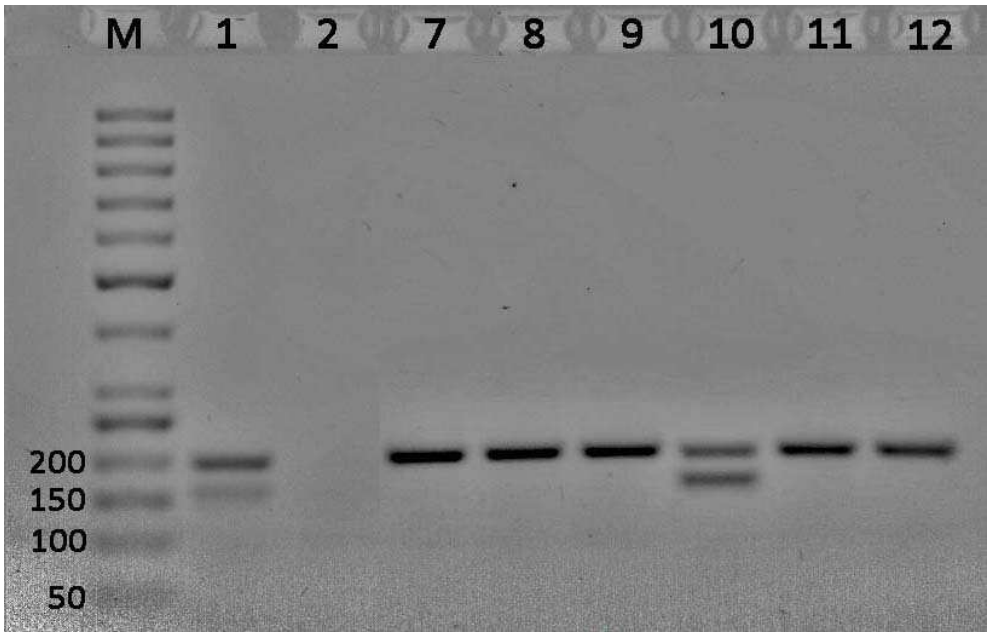
Obrázok č. 3, Detekcia génov *agrA*, *srtA*, *icaD* u izolátov *S. aureus* pomocou mPCR



M – štandard GeneRuler 50 bp DNA ladder; 1 – kontrolný kmeň *S. aureus* CCM 4223; 2 – negatívna kontrola bez DNA; 7 až 12 – izoláty pozitívne na *agrA* (96 bp), *srtA* (183 bp) a *icaD* (211 bp)

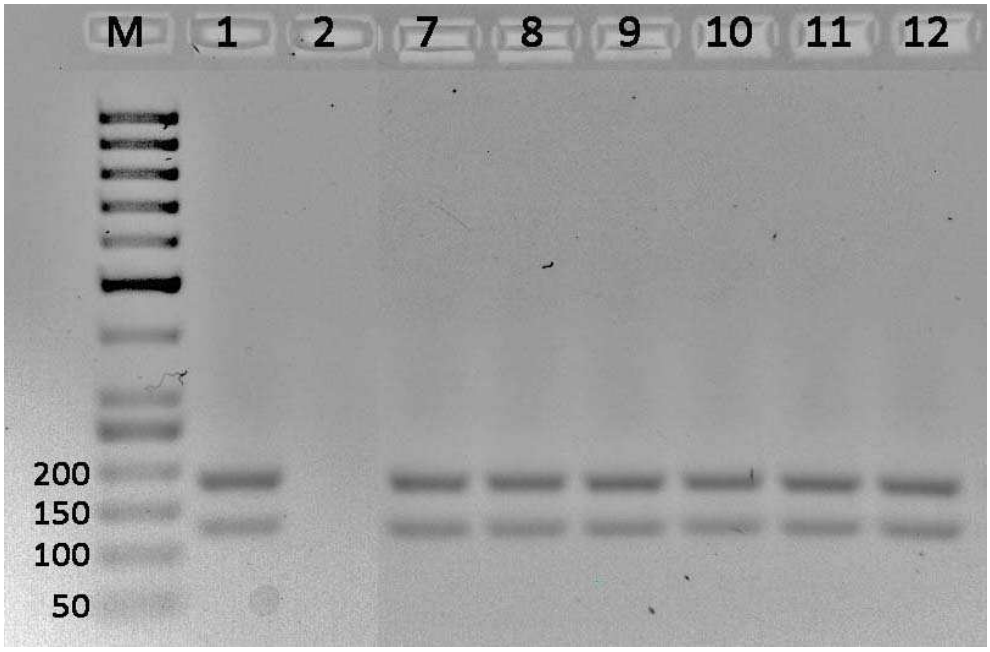
Ďalšou skupinou génov, ktorých produkty sú zapojené do procesu tvorby biofilmu sú gény kódujúce proteíny skupiny MSCRAMM adhezínov (LPXTG proteíny), cez ktoré sa *S. aureus* viaže na cicavčie extracelulárne proteíny. Medzi tieto gény, u ktorých bola sledovaná silná asociácia s tvorbou biofilmu patria gény *fnbA* a *fnbB* kódujúce fibronektín viažuce proteíny FnbA a FnbB a gény *clfA* a *clfB* kódujúce proteíny viažuce fibrinogén označované ako zhlukovacie faktory A (ClfA) a B (ClfB). Do skupiny adhezínov MSCRAMM patrí aj proteín spojený s biofilmom (Bap), ktorý podporuje počiatočnú a aj medzibunkovú adhéziu kmeňov *S. aureus*. Gén *bap* bol detegovaný hlavne u silných producentov biofilmu *S. aureus* izolovaných z hovädzieho dobytka (TORRES a kol., 2019). Použitím metódy mPCR sme sledovali v klinických izolátoch prítomnosť dvojice génov *fnbA*, *fnbB* a *clfA*, *clfB* (Obrázok č. 4 a 5) a simplexnou PCR gén *bap*. Gény *fnbA*, *clfA* a *clfB* boli detegované u 100 % izolátov (izoláty č. 7 až 12), prítomnosť génu *fnbB* bola zaznamenaná iba u jedného izolátu č. 10 (16,7 %) a *bap* gén nebol detegovaný u žiadneho klinického kmeňa *S. aureus*.

Obrázok č. 4, Detekcia génov *fnbA*, *fnbB* u izolátov *S. aureus* pomocou mPCR



M – štandard GeneRuler 50 bp DNA ladder; 1 – kontrolný kmeň *S. aureus* CCM 4223;
2 – negatívna kontrola bez DNA; 7 až 12 – izoláty pozitívne na *fnbA* (192 bp), 10 – izolát pozitívny na *fnbB* (156 bp)

Obrázok č. 5, Detekcia génov *clfA*, *clfB* u izolátov *S. aureus* pomocou mPCR



M – štandard GeneRuler 50 bp DNA ladder; 1 – kontrolný kmeň *S. aureus* CCM 4223;
2 – negatívna kontrola bez DNA; 7 až 12 – izoláty pozitívne na *clfA* (180 bp) a *clfB* (120 bp)

Prevalencia nami detegovaných génov (*icaABCD*, *srtA*, *agrA*) je v publikovaných štúdiách rôzna (DARWISH a ASFOUR, 2013, GAJEWSKA a CHAJECKA-WIERZCHOWSKA, 2020, TORRES a kol., 2019). Štúdie zamerané na detekciu génov kódujúcich proteíny FnbA, FnbB, ClfA, ClfB a Bap sa taktiež vo svojich výsledkoch stanovenia percenta prevalencie jednotlivých génov nezhodujú (DARWISH a ASFOUR, 2013, KHORAMROOZ a kol., 2016, TORRES a kol., 2019, MOHAMMADI a kol., 2020). Rozdiely v detekcii génov u biofilm tvoriacich kmeňov môžu byť spôsobené bodovými mutáciami v príslušných génoch. Preto sú odlišnosti v sekvenciách DNA príčinou neúspešnej amplifikácia génových úsekov v niektorých klinických izolátoch a dosiahnuté výsledky pravdepodobne vykazujú falošnú negativitu. Dva najviac študované mechanizmy zodpovedné za tvorbu biofilmu sú mechanizmus tvorby biofilmu závislý od PIA pod kontrolou operónu *ica* a mechanizmus tvorby biofilmu nezávislý od PIA sprostredkovaný proteínom Bap (TORRES a kol., 2019). Preto výsledky v publikovaných štúdiách poukazujúce na neprítomnosť génov zapojených do procesu tvorby biofilmu v kmeňoch *S. aureus* pozitívnych na biofilm môžu súvisieť s tvorbou biolmu pod kontrolou iných génov zodpovedných za vznik biofilmu (KHORAMROOZ a kol., 2016). V našej práci sme naopak zaznamenali 100 % prevalenciu väčšiny sledovaných génov (*icaABCD*, *srtA*, *agrA*, *fnbA*, *clfA*, *clfB*) s výnimkou *fnbB* (16,7 %) a *bap* (0 %) aj u izolátov negatívnych na biofilm čo môže súvisieť s rôznou schopnosťou izolátov *S. aureus* tvoriť biofilm v *in vivo* a *in vitro* podmienkach.

ZÁVER

Výsledky našej štúdie poukazujú na vysokú mieru prevalencie biofilm tvoriacich kmeňov *S. aureus* izolovaných z mlieka od dojníc so subklinickou formou mastitídy čo naznačuje patogénny potenciál týchto kmeňov. Znížená úroveň hygieny dojenia vedie ku šíreniu patogénnych stafylokokov a pri nedodržaní postupov vyšetrenia surového mlieka sa môže takéto mlieko stať prameňom patogénnych kmeňov *S. aureus*. Výskyt kmeňov schopných vytvárať biofilm v stáde dojníc poukazuje na potrebu venovať pozornosť dodržiavaniu správnych postupov pri dojení a zavádzať postupy účinnej profylaxie, kontroly a liečby infekcii mliečnej žľazy.

POĎAKOVANIE

Táto práca bola podporovaná projektmi KEGA 007UVLF-4/2021, APVV-16-0171.

POUŽITÁ LITERATÚRA

1. AGARWAL, A. & JAIN, A. Association between drug resistance & production of biofilm in staphylococci. *Indian J Med Res,* 2012, 135**,** 562-4.
2. ARCIOLA, C. R., et al. Prevalence of cna, fnbA and fnbB adhesin genes among Staphylococcus aureus isolates from orthopedic infections associated to different types of implant. *FEMS Microbiol Lett,* 2005, 246, 81-6.
3. CUCARELLA, C., et al. Bap, a Staphylococcus aureus surface protein involved in biofilm formation. *J Bacteriol,* 2001, 183, 2888-96.
4. DARWISH, S. F. & ASFOUR, H. A. Investigation of biofilm forming ability in Staphylococci causing bovine mastitis using phenotypic and genotypic assays. *ScientificWorldJournal,* 2013, 378492.
5. GAJEWSKA, J. & CHAJECKA-WIERZCHOWSKA, W. 2020. Biofilm Formation Ability and Presence of Adhesion Genes among Coagulase-Negative and Coagulase-Positive Staphylococci Isolates from Raw Cow's Milk. *Pathogens,* 9.
6. HOIBY, N., et al. ESCMID guideline for the diagnosis and treatment of biofilm infections 2014. *Clin Microbiol Infect,* 2015, 21 Suppl 1, S1-25.
7. HOIBY, N., et al. The clinical impact of bacterial biofilms. *Int J Oral Sci,* 2011, 3**,** 55-65.
8. HUSSAIN, M., et al. Role of SrtA in Pathogenicity of Staphylococcus lugdunensis. *Microorganisms,* 2020, 8.

9. KHORAMROOZ, S. S., et al. Detection of biofilm related genes, classical enterotoxin genes and agr typing among Staphylococcus aureus isolated from bovine with subclinical mastitis in southwest of Iran. *Microb Pathog,* 2016, 97, 45-51.
10. MBINDYO, C. M., et al. Prevalence, Etiology, and Risk Factors of Mastitis in Dairy Cattle in Embu and Kajiado Counties, Kenya. *Vet Med Int,* 2020, 8831172.
11. MOHAMMADI, A., et al. Molecular Detection of Genes Involved in Biofilm Formation in Staphylococcus aureus Strains Isolates: Evidence From Shahid Motahari Hospital in Tehran. *Jundishapur J Microbiol,* 2020, 13, e102058.
12. MOUFTI, M. F. E., et al. Characterization of Some Genotypic and Phenotypic Traits of Biofilm Producing Clinical Isolates of Methicillin Resistant Staphylococcus Epidermidis. *American Journal of Infectious Diseases and Microbiology,* 3, 2015, 95-103.
13. PEDERSEN, R. R., et al. Biofilm Research in Bovine Mastitis. *Front Vet Sci,* 2021, 8, 656810.
14. QOLBAINI, E. N., et al. Identification and antimicrobial susceptibility of methicillin-resistant Staphylococcus aureus-associated subclinical mastitis isolated from dairy cows in Bogor, Indonesia. *Vet World,* 2021, 14, 1180-1184.
15. RYCHSHANOVA, R., et al. Antibiotic resistance and biofilm formation in Staphylococcus aureus isolated from dairy cows at the stage of subclinical mastitis in northern Kazakhstan. *Arch Anim Breed,* 65, 2022, 439-448.
16. SCHNITT, A. & TENHAGEN, B. A. Risk Factors for the Occurrence of Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus in Dairy Herds: An Update. *Foodborne Pathog Dis,* 2020, 17, 585-596.
17. TORRES, G.,et al. Genotypic and phenotypic characterization of biofilm production by Staphylococcus aureus strains isolated from bovine intramammary infections in Colombian dairy farms. *Heliyon,* 2019 5, e02535.
18. TSOMPANIDOU, E., et al. The sortase A substrates FnbpA, FnbpB, ClfA and ClfB antagonize colony spreading of Staphylococcus aureus. *PLoS One,* 2012, 7, e44646.
19. VASUDEVAN, P., et al. Phenotypic and genotypic characterization of bovine mastitis isolates of Staphylococcus aureus for biofilm formation. *Vet Microbiol,* 2003, 92, 179-85.
20. WANG, W., et al. Prevalence and Characterization of Staphylococcus aureus Cultured From Raw Milk Taken From Dairy Cows With Mastitis in Beijing, China. *Front Microbiol,* 2018, 9, 1123.

21. ZECCONI, A., et al. Role of several Staphylococcus aureus virulence factors on the inflammatory response in bovine mammary gland. *Microb Pathog,* 2006, 40, 177-83.

Kontaktná adresa: Király Ján, Department of microbiology and immunology, UVLF Košice, Komenského 73, 041 81 Košice, Slovak Republic; E-mail: jan.kiraly@.uvlf.sk

IMUNOMODULAČNÝ POTENCIÁL PURIFIKOVANÝCH EXOPOLYSACHARIDOV ZÍSKANÝCH Z BAKTÉRII MLIEČNEHO KVASENIA SLEDOVANÝ POMOCOU *IN VITRO* KO-KULTÚRNEHO MODELU IMITUJÚCEHO ČREVO

IMMUNOMODULATORY POTENTIAL OF PURIFIED EXOPOLYSACCHARIDES DERIVED FROM LACTIC ACID BACTERIA MONITORED BY *IN VITRO* CO-CULTURE MODEL MIMICKING THE GUT

Kiššová Zuzana[1], Tkáčiková Ľudmila[1], Mudroňová Dagmar[1], Link Róbert[2]

[1]Katedra mikrobiológie a imunológie, Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, Komenského 73, 041 81 Košice, Slovenská republika

[2]Klinika ošípaných, UVN, Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, Komenského 73, 041 81 Košice, Slovenská republika

ABSTRACT

As the aim of the present study we set a closer examination of immunomodulatory effects of exopolysaccharides (EPS) obtained from probiotic strain *Limosilactobacillus reuteri* L26 Biocenol™ (CCM 8616) in a model of infection with enterotoxigenic bacterial strain *E. coli* (ETEC) by creating a 3D model of cell co-cultures set up from IPEC-J2 cell line and monocytes derived dendritic cells (moDCs). Our experimental work examines interactions between communication of enterocytes and immune cells found in *lamina propria* during the action of EPS-L26 and pathogens *in vitro*, at the level of gene expression of pro-inflammatory cytokines IL-6, IL-8, gene encoding TLR4 receptor and the intracellular signaling molecule Myd88 using qPCR. Our results revealed intercellular communication in *in vitro* co-culture model, where we recorded an increased level of genes encoding cytokines IL-6, IL-8, TLR4 and Myd88, not only in directly infected IPEC-J2 cells with ETEC, but also in moDC cells indirectly induced through paracrine signaling. We confirmed the immunomodulating potential of the used EPS-L26 by reduced levels of pro-inflammatory cytokines in IPEC-J2 cells directly treated with EPS-L26 and also in moDC cells compared to the infected experimental group of the corresponding cell line. Our findings also revealed that IPEC-J2 cell pre-treatment with EPS-L26 before infection had a suppressive effect on *E. coli* induced inflammatory response in form of reduction of IL-6 mRNA level in indirectly induced moDC cells. In addition to determining the mRNA levels of monitored cytokines, we found a similar trend by quantification of extracellular protein IL-8 from the obtained cell supernatants by ELISA test. Our results indicate that the use of EPS

producing lactic acid bacteria in the diet of pigs appears to be a suitable alternative for the prevention of infections caused by ETEC strains which frequently occures in intensive animal farming.

Key words: Exopolysaccharides, co-cultures, ETEC, qPCR, ELISA

ÚVOD

Baktérie mliečneho kvasenia (LAB) sú schopné počas fermentácie syntetizovať metabolity známe ako exopolysacharidy (EPS), ktoré hrajú dôležitú úlohu v produkcii fermentovaných mliečnych výrobkov vďaka svojim želírovacím a zahusťovacím vlastnostiam (Abedfar a Hossininezhad, 2016), zároveň sú prospešné aj pre zdravie ľudí a zvierat (Sørensen et al., 2022). EPS produkované probiotickými baktériami sú schopné vytvárať biofilmovú vrstvu na sliznici črevného epitelu, zabezpečujúc tým ochranu hostiteľa pred poškodením infekčných mikroorganizmov a ich toxínov, zároveň uplatňujú svoje prospešné účinky na hostiteľa prostredníctvom modulácii trávenia, metabolizmu ako aj mechanizmov vrodenej slizničnej imunity, vďaka čomu môžu byť nasadené v prevencii alebo v zmiernení ochorení tráviaceho traktu. Použitie probitických prípravkov ako náhrada za antibiotickú liečbu predstavuje novú stratégiu pre udržanie zdravia črevných infekcií nielen u ľudí ale aj zvierat (Castro-Bravo et al., 2018). Hnačky spôsobené enterotoxigénnou *Escherichia coli* (ETEC) predstavujú jednu z primárnych príčin chorobnosti a úmrtnosti novo odstavených ciciakov a zároveň v produkcii ošípaných patria medzi hlavné dôvody použitia antimikrobiálnych prípravkov. Z tohto dôvodu sú alternatívne postupy, ako je pridávanie probiotických prípravkov do krmív jednou z ciest ktoré môžu pomôcť znížiť používanie antibiotík aj v chovoch ošípaných (Kim et al., 2022). Pri skúmaní terapeutických možností sú *in vitro* modely reprodukujúce zdravé alebo infikované črevné tkanivo užitočným nástrojom pre štúdium mechanizmov prebiehajúceho zápalu v črevách. Avšak bunkové monokultúry nie sú schopné napodobniť komplexnú štruktúru definujúcu črevné tkanivo, preto sú v súčasnosti uprednostňované sofistikovanejše ko-kultúrne modely kombinujúce intestinálne epitelové bunky spolukultivované s imunitnými bunkami ako sú napríklad dendritové bunky alebo makrofágy (Kämpfer et al., 2017).

MATERIÁL A METODIKA

IPEC-J2 bunky sme nadobudli darom od profesora J.J. Garrida z Oddelenia genetiky a chovu zvierat Univerzity v Kordobe (Španielsko). Bunky sme kultivovali v médiu DMEM/Ham´s F-12 presne tak ako je to opísané v článku Kiššová et al., (2022). Pre získanie z monocytov derivovaných dendritových buniek (moDC) sme použili monocyty izolované

z venóznej krvi mladých ošípaných, kde mononukleárne leukocyty (MNL) sa izolovali z heparizovanej krvi centrifugáciou pomocou separačnej tekutiny (LSM1077 „*Lymphocyte Separation Medium*"; PAA, Rakúsko) v skúmavkach Leucosep™ (Greiner-Bio-One, Rakúsko) a monocyty zo suspenzie MNL sme získali pomocou nemagnetických mikročastíc (S-pluriBead®; pluriSelect Life Science, Nemecko). Monocyty sme nasadili do 12 jamkovej platničky a uchovávali v médiu RPMI 1640 obohatené o rekombinantné prasacie cytokíny rpGM-CSF (20 ng.ml^{-1}; R&D Systems, USA) a rpIL-4 (50 ng.ml^{-1}; R&D Systems, USA) a kultivovali pri 37 °C v atmosfére 5 % CO_2 po dobu 5 dní.

Baktérie ETEC sme kultivovali v Luria-Broth médiu (LB; Sigma-Aldrich, USA) pri teplote 37 °C za stáleho miešania (160 rpm) po dobu 18 h. Nočné kultúry baktérií sa použili ako inokulum do LB bujónu na prípravu 2 h čerstvej kultúry. EPS bol izolovaný z *L. reuteri* L26 Biocenol™ presne podľa postupu, ktorý je uvedený v štúdiu Kšonžeková a kol (2016).

IPEC-J2 bunky sme nasadili na Transwell®-COL inzertové vložky v počte 2,5 x 10^5 buniek na inzert v triplikátoch. Bunky sme kultivovali pri 37 °C v atmosfére 5 % CO_2 po dobu 15 dní, kým sme nedosiahli maximálne hodnoty TEER (2145 ± 80 Ω.cm^2) pre vykonanie experimentov. Po dosiahnutí požadovaných hodnôt TEER sme inzerty s bunkami vložili do kultivačných platničiek s pripravenými nematurovanými moDC bunkami a spoločne sme ich kultivovali cez noc pri 37 °C v atmosfére 5 % CO_2 v médiu DMEM/F-12.

Experimentálny protokol vyzeral nasledovne: k moDC bunkám sme pridali DMEM/F12 médium bez suplementácie a IPEC-J2 bunky sme ošetrili EPS (100 µg.ml^{-1}) po dobu 4 h alebo inkubovali s ETEC (MOI 50:1) po dobu 2 h. Experimentálna skupina pred-ošetrenie sa najskôr ošetrila s EPS (100 µg.ml^{-1}) po dobu 4 h, po čom nasledovala čelenž s ETEC (MOI 50:1) po dobu 2 h.

Celkovú RNA sme z buniek izolovali pomocou reagencie PureZOL™ (BioRad, USA) a prepísali do cDNA pomocou kitu QuantiTect (Qiagen, Nemecko). Analýzu génovej expresie (qPCR) sme uskutočnili cez softvér CFX Manager Software (CFX Manager version 2.0, BioRad, USA) pomocou prístroja iCycler CFX 96 (BioRad, USA). Použité primery sú uvedené v Tabuľke č. 1. Koncentráciu IL-8 v bunkových sekretómoch sme hodnotili pomocou ELISA testov (Thermo Fisher, USA).

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Bunky črevného epitelu sú schopné v prítomnosti LAB vylučovať cytokíny spôsobom závislým od bakteriálneho kmeňa, preto vzájomné pôsobenie LAB a enterocytov predstavuje rozhodujúci faktor pre syntézu cytokínov v čreve. K tejto probiotikami sprostredkovanej imunomodulačnej aktivite dochádza pred samotným stretnutím baktérii s bunkami imunitného

systému v organizme (Ruiz a kol., 2005). Hlavným predstaviteľom antigén prezentujúcich buniek (APC) sú dendritové bunky (DC), ktoré pôsobia v organizme ako imunologické stráže vďaka ich drozhodujúcej úlohe v lymfoidných tkanivách a orgánoch s prebiehajúcou infekciou, kde koordinujú imunitné reakcie. Práve preto sú DC strategicky umiestnené na miestach s najvyšším predpokladom vstupu infekčných agensov do organizmu, pretože dokážu interagovať s patologickými vzormi mikroorganizmov vedúc tak k autoaktivácii, produkcii cytokínov a chemokínov, čím ovplyvňujú výsledok ochorenia (Shin a kol., 2019).

Výsledky získané z experimentálnej skupiny IPEC-J2 infikovaných s ETEC na inzertových vložkách poukazujú na zvýšenú hladinu génovej expresie pre prozápalové cytokíny IL-8 ($P < 0,001$) a IL-6 ($P < 0,05$) v porovnaní s kontrolou IPEC-J2, taktiež v priamo neinfikovaných bunkách moDC sme zaznamenali podobné zvýšenie génovej expresie pre IL-6 ($P < 0,001$) a IL-8 ($P < 0,01$) (Obr. 1) v porovnaní s kontrolou moDC. Rovnako v experimentálnej skupine ETEC v bunkách moDC, ktoré boli nepriamo infikované cez spoločnú kultiváciu s IPEC-J2, sme zistili signifikantné zvýšenie génov kódujúcich TLR4 receptor ($P < 0,05$) a intracelulárnu signalizačnú molekulu Myd88 ($P < 0,05$) (Obr. 1). Získané výsledky z nášho štúdia poukazujú na efektívnu komunikáciu medzi bunkami cez sekretóm buniek, čím sme dokázali nepriamu indukciu moDC buniek. Podobne v ďalších prácach študujúcich ko-kultúrne modely buniek dokázali komunikáciu medzi spolukultivovanými bunkami nárastom génovej expresie sledovaných cytokínov v obidvoch použitých bunkových kultúrach (Paszti-Gere a kol., 2014; Loss a kol., 2018).

Ošetrenie buniek IPEC-J2 purifikovaným EPS-L26 po dobu 4 h pôsobilo na bunky v smere imunoregulácie, kedy analyzované hladiny mRNA prozápalových cytokínov IL-6 ($P < 0,05$) a IL-8 ($P < 0,001$) boli znížené v porovaní s ETEC infekciou (Obr. 1). Toto zníženie sme dosiahli aj v priamo neošetrených bunkách moDC, kde došlo k zníženiu mRNA hladiny pre IL-8 ($P < 0,01$) a IL-6 ($P < 0,001$) v porovnaní so skupinou moDC+ETEC. Podobné výsledky dosiahli v práci *Waschi a kol.* (2014) kde poukázali na imunoregulačnú kapacitu použitých EPS (tvorených *L. delbrueckii* TUA4408L), schopných zmierniť zvýšenú expresiu prozápalových cytokínov MCP-1, IL-8 a IL-6 vyvolaných ETEC infekciou v porcinných intestinálnych bunkách PIE (Wachi a kol., 2014).

Relevantné výsledky sme dosiahli v experimentálnej skupine pred-ošetrenie buniek IPEC-J2 kultivovaných na inzertoch pomocou EPS-L26 a následnej infekcie s patogénnymi ETEC, kedy predbežnou inkubáciou buniek s EPS-L26 sme dosiahli down-reguláciu cytokínu IL-6 ($P < 0,001$) v priamo neošetrených bunkách moDC v porovnaní s experimentálnou skupinou moDC+ETEC. Obdobne výsledky dosiahli v ďalších štúdiách kde použité EPS v intestinálnych bunkových kultúrach zoslabili nadmernú expresiu génov indukovaných

infekciou patogénnych mikroorganizmov (Kšonžeková a kol., 2016; Tkáčiková a kol., 2020; Yuan a kol., 2021).

Kvôli validácii výsledkov dosiahnutých z génovej expresie použitím qPCR sme analyzovali hladinu uvoľňovaných proteínov IL-8 zo supernatantov bunkových kultúr pomocou ELISA testov. V ko-kultúrnom bunkovom modely, kde predpokladáme komunikáciu medzi dvoma spoločne kultivovanými bunkovými monokultúrami sme zaznamenali zvýšenú sekréciu IL-8 do bunkového supernatantu moDC buniek, ktoré boli nepriamo ovplyvnené v kultivačných jamkách, v prípade ETEC čelenže, t.j. experimentálnej skupine moDC+ETEC (585 ± 190 $pg.ml^{-1}$; $P < 0,05$) (Obr. 2). V ostatných skupinách bola hladina IL-8 vyššia s porovnaním s kontrolnou skupinou buniek moDC avšak bez štatistickej významnosti. Výsledky získané kvantifikáciou proteínu IL-8 v bunkových supernatantoch sú v súlade so zmenou génovej expresie pre cytokín IL-8 bunkách moDC v danej experimentálnej skupine. Obdobne v iných prácach, kde používali ko-kultúrny model dvoch odlišných bunkových kultúr dokázali zvýšenú hladinu sledovaných cytokínov nie len na úrvni mRNA ale aj kvantifikáciou hladín extracelulárnych proteínov zo zíkaných supernatantov buniek (pomocou ELISA testov) (Hagemann a kol., 2004; Paszti-Gere a kol., 2014; Gayer a kol., 2022).

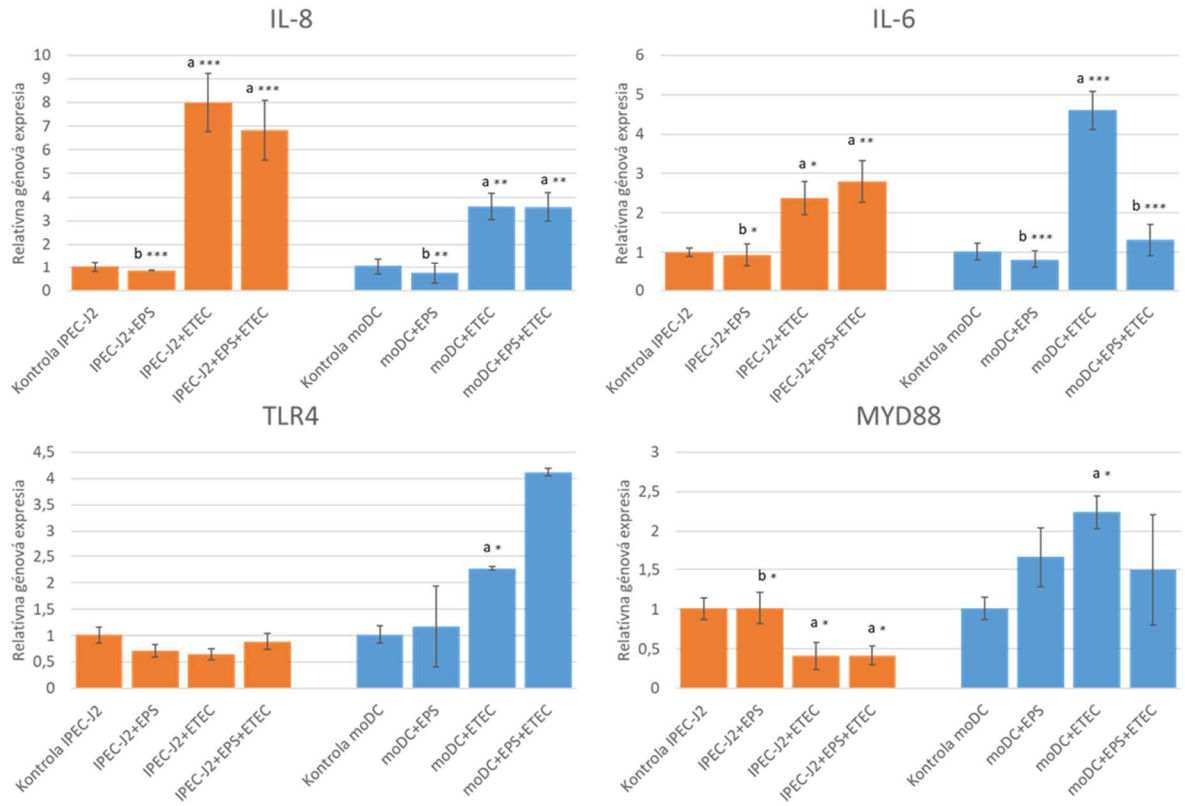
Tabuľka č. 3, Primery použité v práci

Gén	Názov primeru	Sekvencia 5´→ 3´	Veľkosť produktu	Referencie
β-aktín	BA/F	CAT CAC CAT CGG CAA CGA	143 bp	Moue a kol. 2008
	BA/R	GCG TAG AGG TCC TTC CTG ATG T		
GAPDH	GA/F	ACT CAC TCT TCT ACC TTT GAT GCT	100 bp	Loss a kol. 2018
	GA/R	TGT TGC TGT AGC CAA ATT CA		
IL-6	IL-6/F	TGG ATA AGC TGC AGT CAC AG	109 bp	Moue a kol. 2008
	IL-6/R	ATT ATC CGA ATG GCC CTC AG		
IL-8	IL-8/F	CGC ATT CCA CAC CTT TCC ACC CC	130 bp	Chytilová a kol. 2008
	IL-8/R	TCC TTG GGG TCC AGG CAG ACC		
TLR4	TLR4/F	CTC TGC CTT CAC TAC AGA GA	321 bp	Moue a kol. 2008
	TLR4/R	CTC TGC CTT CAC TAC AGA GA		
Myd88	MYD88/F	TGA AGC GCA GCA GGA GGC A	160 bp	Chytilová a kol. 2008
	MYD88/R	TCG CTG GGG CAG TAG CAG ATG A		

Protokol pre relatívnu kvantifikáciu génovej expresie pozostával z nasledovných krokov: denaturácia pri 95 °C po dobu 5 min, amplifikácia v 40 cykloch tvorených 4 krokmi, a to denaturáciou pri 94 °C po dobu 30 s, hybridizáciou pri 60 °C po dobu 30 s a extenziou pri

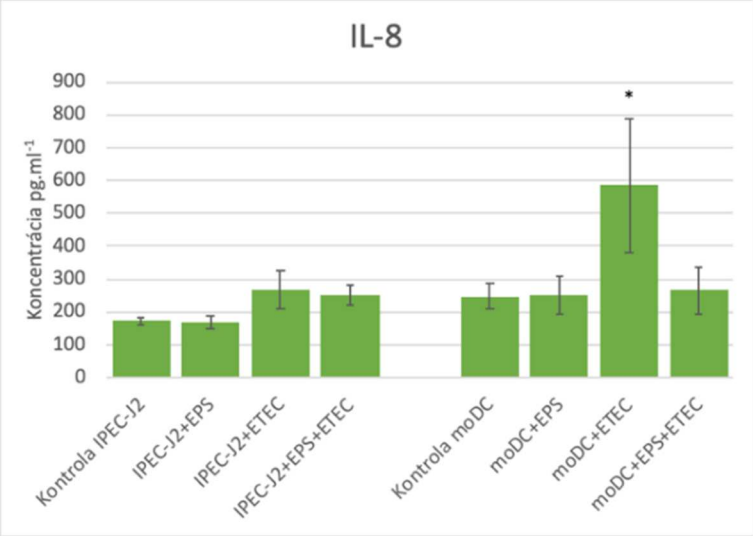
72 °C po dobu 30 s a meraním fluorescencie. Po finálnej extenzii pri 72 °C po dobu15 min bola urobená analýza krivky topenia. Relatívnu normalizovanú expresiu sme hodnotili pomocou metódy $2^{-\Delta\Delta CT}$. GAPDH slúžil ako referenčný gén pre vnútornú kontrolu v prípade IPEC-J2 buniek a β-aktín pre vnútornú kontrolu pre moDC.

Obrázok č. 1, Imunomodulačná aktivita EPS a ETEC v ko-kultúrach IPEC-J2/moDC



Výsledky sú vyjadrené ako priemer ± SD dvoch nezávislých experimentov. Štatistická významnosť rozdielov bola vyhodnotená pomocou Dunnettovho viacnásobného porovnávacieho testu. a - Výsledky sa významne líšili v porovnaní s kontrolnou skupinou buniek bez ošetrenia ($p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$) v príslušnej bunkovej kultúre. b - Výsledky sa významne líšili v porovnaní s ETEC (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$) v príslušnej bunkovej kultúre. Chybové úsečky predstavujú štandardné odchýlky.*

Obrázok č. 2, Sekrécia IL-8 do bunkového supernatantu v IPEC-J2/moDC ko-kultúrach



Výsledky sú vyjadrené ako priemer ± SD dvoch nezávislých experimentov. Štatistická významnosť rozdielov bola vyhodnotená pomocou Dunnettovho viacnásobného porovnávacieho testu. Výsledky sa významne líšili v porovnaní s kontrolnou skupinou buniek bez ošetrenia ($p < 0,05$) v príslušnej bunkovej kultúre. Chybové úsečky predstavujú štandardné odchýlky.*

ZÁVER

Spoločná kultivácia buniek *in vitro* predstavuje všeobecne uznávanú a akceptovanú metódu pri štúdii ich vzájomnej interakcie počas pôsobenia rôznych druhov baktérii napodobňujúc tak skutočnú situáciu prebiehajúcu v *in vivo* podmienkach. Pomocou ko-kultivačného modelu intestinálnych IPEC-J2 buniek a moDC získaných z mononukleárov izolovaných z periférnej krvi ošípaných sme skúmali imunomodulačnú schopnosť patogénnych ETEC ako aj biopolymérov EPS získaných z apatogéneho probiotického kmeňa *L. reuteri* L26 Biocenol™. Spoločnou kultiváciou dvoch bunkových kultúr sme odhalili medzibunkovú komunikáciu prostredníctvom parakrínnej signalizácie, ktoré sa prejavilo zvýšením mRNA hladiny prozápalových cytokínov IL-6 a IL-8, receptoru TLR4 a intracelulárnej signalizačnej molekuly Myd88 v nepriamo infikovaných bunkách moDC. Imunomodulačný potenciál v smere imunosupresie použitých purifikovaných EPS sme potvrdili zníženou hladinov génov kódujúcich cytokíny IL-8 a IL-6 v bunkách IPEC-J2 ako aj v nepriamo ošetrených bunkách moDC. Tento imunomodulačný potenciál sme potvrdili aj v experimentálnej skupine pred-ošetrenie buniek IPEC-J2, kde sme zaznamenali zníženie hladiny cytokínu IL-6 prostredníctvom medzibunkovej komunikácie v bunkách moDC. Výsledky získané analýzou mRNA hladiny IL-8 sme potvrdili ELISA testom. Predložené výsledky z našej práce navrhujú

použité EPS ako vhodnú alternatívu pre prevenciu proti infekčným ochoreniam spôsobených patogénnymi baktériami ETEC vo forme doplnku výživy v diéte ošípaných.

POĎAKOVANIE

Práca vznikla v rámci riešenia projektu podporovaného Vedeckou grantovou agentúrou s číslom zmluvy VEGA 1/0633/17.

POUŽITÁ LITERATÚRA

1. ABEDFAR, A. a HOSSININEZHAD, M. Overview of the most important characterization of exopolysaccharides produced by probiotics bacteria and their biological function. In *IOSR Journal of Environmental Science* [online]. 2016, vol. 10, no. 11. Dostupné na internete: doi:10.9790/2402-1011034755. ISSN 23192399
2. CASTRO-BRAVO, N. et al. Interactions of surface exopolysaccharides from bifidobacterium and lactobacillus within the intestinal environment. In *Frontiers in Microbiology* [online]. 2018, vol. 9, no. 8. Dostupné na: doi:10.3389/fmicb.2018.02426. ISSN 1664302X.
3. CHYTILOVÁ, M. et al. Štúdium imunomodulačného účinku probiotického kmeňa L. plantarum– Biocenol™ LP96 in vitro. In *ČSM. 26. Kongres Československé Společnosti Mikrobiologické s Mezinárodní Účastí*; Československá spoločnosť mikrobiologická: Brno, Czech Republic, 2008; ISBN 978-80-260-4507-6
4. GAYER, F.A. et al. A Coculture Model Mimicking the Tumor Microenvironment Unveils Mutual Interactions between Immune Cell Subtypes and the Human Seminoma Cell Line TCam-2. In *Cells* [online]. 2022, vol. 11, no. 5. Dostupné na internete: doi:10.3390/cells11050885. ISSN 20734409.
5. HAGEMANN, T. et al. Enhanced invasiveness of breast cancer cell lines upon co-cultivation with macrophages is due to TNF-α dependent up-regulation of matrix metalloproteases. In *Carcinogenesis* [online]. 2004, vol. 25, no. 8. Dostupné na internete: doi:10.1093/carcin/bgh146. ISSN 01433334.
6. KÄMPFER, A.A.M. et al. Development of an in vitro co-culture model to mimic the human intestine in healthy and diseased state. In *Toxicology in Vitro* [online]. 2017, vol. 45. Dostupné na internete: doi:10.1016/j.tiv.2017.08.011. ISSN 18793177.
7. KIM, K. et al. Enterotoxigenic Escherichia coli infection of weaned pigs: Intestinal challenges and nutritional intervention to enhance disease resistance. In *Frontiers in Immunology* [online]. 2022, vol 13, no. 4. Dostupné na internete: doi:10.3389/fimmu.2022.885253. ISSN 1664-3224.

8. KIŠŠOVÁ, Z. et al. Immunomodulatory Effect of Lactobacillus reuteri (Limosilactobacillus reuteri) and Its Exopolysaccharides Investigated on Epithelial Cell Line IPEC-J2 Challenged with Salmonella Typhimurium. In *Life* [online]. 2022, vol. 12, no 1955. Dostupné na internete: doi: 10.3390/life12121955. ISSN 20751729.
9. KŠONŽEKOVÁ, P. et al. Exopolysaccharides of Lactobacillus reuteri: Their influence on adherence of E. coli to epithelial cells and inflammatory response. In *Carbohydrate Polymers* [online]. 2016, vol. 141, no. 10. Dostupné na internete: doi:10.1016/j.carbpol.2015.12.037. ISSN 01448617.
10. LOSS, H. et al. The inflammatory response to enterotoxigenic E. Coli and Probiotic E. Faecium in a Coculture Model of Porcine Intestinal Epithelial and Dendritic Cells. In *Mediators of Inflammation* [online]. 2018, vol. 2018, no. 6. Dostupné na internete: doi: 10.1155/2018/9368295.
11. MOUE, M. et al. Toll-like receptor 4 and cytokine expression involved in functional immune response in an originally established porcine intestinal epitheliocyte cell line. In *Biochimica et Biophysica Acta* [online]. 2008, vol. 134, no. 44. Dostupné na internete: doi: 10.1016/j.bbagen.2007.11.006. ISSN 1872-8006
12. PASZTI-GERE, E. et al. The effects of intestinal LPS exposure on inflammatory responses in a porcine enterohepatic co-culture system. In *Inflammation* [online]. 2014, vol. 37, no. 1. Dostupné na internete: doi:10.1007/s10753-013-9735-7. ISSN 03603997.
13. RUIZ, P.A. et al. Innate mechanisms for Bifidobacterium lactis to activate transient pro-inflammatory host responses in intestinal epithelial cells after the colonization of germ-free rats. In *Immunology* [online]. 2005, vol. 115, no. 4. Dostupné na internete: doi:10.1111/j.1365-2567.2005.02176.x. ISSN 00192805.
14. SØRENSEN, H.M. et al. Exopolysaccharides of Lactic Acid Bacteria: Production, Purification and Health Benefits towards Functional Food. In *Nutrients* [online]. 2022, vol. 14, no. 14. Dostupné na internete: doi:10.3390/nu14142938. ISSN 20726643.
15. TKÁČIKOVÁ, Ľ. et al. Comprehensive mapping of the cell response to E. coli infection in porcine intestinal epithelial cells pretreated with exopolysaccharide derived from Lactobacillus reuteri. In *Veterinary Research* [online]. 2020, vol. 51, no. 1. Dostupné na internete: doi:10.1186/s13567-020-00773-1. ISSN 12979716.
16. WACHI, S. et al. Lactobacillus delbrueckii TUA4408L and its extracellular polysaccharides attenuate enterotoxigenic Escherichia coli-induced inflammatory response in porcine intestinal epitheliocytes via Toll-like receptor-2 and 4. In

Molecular Nutrition and Food Research [online]. 2014, vol. 58, no. 10. Dostupné na internete: doi:10.1002/mnfr.201400218. ISSN 16134133.

17. YUAN, L. et al. Exopolysaccharides from bifidobacterium animalis ameliorate escherichia coli-induced IPEC-J2 cell damage via inhibiting apoptosis and restoring autophagy. In *Microorganisms.* [online]. 2021, vol. 9, no. 11. Dostupné na internete: doi:10.3390/microorganisms9112363. ISSN 20762607.

Kontaktná adresa: Kiššová Zuzana, Department of Microbiology and Immunology, University of Veterinary Medicine and Pharmacy in Košice, Komenského 73, 041 81 Košice, Slovak Republic; E-mail: zuzana.kissova@student.uvlf.sk

VLIV MÍRY PORUŠENÍ CHLADÍRENSKÉHO ŘETĚZCE NA CELKOVÉ POČTY MIKROORGANISMŮ VZORKŮ SYROVÉHO MLÉKA MALÝCH PŘEŽVÝKAVCŮ

THE EFFECT OF COLD CHAIN DISRUPTION ON THE TOTAL PLATE COUNT OF SMALL RUMINANTS MILK SAMPLES

Klimešová Marcela[1], Nejeschlebová Ludmila[1], Necidová Lenka[2], Hanuš Oto[1], Bursová Šárka[2], Vorlová Lenka[2]

[1]Výzkumný ústav mlékárenský Praha, Česká republika

[2]Ústav hygieny a technologie potravin živočišného původu a gastronomie, Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární univerzita Brno, Česká republika

ABSTRACT

In this study, the effect of storage temperatures of 8, 11, 14, 17, 20, and 25 ºC as well as of storage time on the total plate count (TPC) in sheep's and goat's milk was monitored. Milk samples were kept at the respective temperature and analyzed after 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, and 4 hours, respectively. After each analysis, the samples were stored in a refrigerator at 8 ºC and reanalyzed after 3 and 24 hours. The resulting values of the total number of microorganisms and the limit of reproducibility of 0.45 log were used to determine the maximum time of exposure to the respective temperatures, which still supported the analysis of the samples without compromising their microbiological quality. The TPC values in the milk of small ruminants were mostly within the reproducibility limits. In goat's milk, the upper reproducibility limit was exceeded only in samples exposed to temperatures of 17, 20, or 25 °C for 4 hours analyzed only 24 hours after the cold chain interruption. In sheep's milk, it was exceeded only in samples stored at 25 °C hours, with analyses postponed by 24 hours.

Key words: sheep's milk, goat's milk, transport, bacteria

ÚVOD

Kontrola hygienické kvality syrového mléka a jeho zdravotní nezávadnosti závisí na znalostech a dodržování všech hygienických předpisů. Hlavním hygienickým ukazatelem pro syrové kravské mléko a mléko malých přežvýkavců je celkový počet mezofilních mikroorganismů (CPM). Dle nařízení (ES) č. 853/2004 nesmí mléko malých přežvýkavců určené k výrobě konzumního tepelně ošetřeného mléka nebo mléčných výrobků přesáhnout hodnotu 1 500 000 KTJ/ml. Vedle toho nesmí být u mléka malých přežvýkavců určeného pro výrobu výrobků ze syrového mléka postupem, který nezahrnuje tepelnou úpravu, překročen

limit ≤ 500 000 KTJ/ml. CPM je klíčovým ukazatelem hygienických standardů v produkci mléka, a proto se používá jako hlavní indikátor kvality (Sandrucci a kol., 2019). Podle Ročenky chovu skotu (Bucek a kol., 2021) měly v České republice průměrné hodnoty CPM v kravském mléce v letech 2016 až 2020 mírně klesající tendenci (37, 34, 28, 29, 24 tis. KTJ/ml). Co se týče malých přežvýkavců, nejsou hodnoty CPM v Ročenkách chovů ovcí a koz v ČR uváděny (Bucek a kol., 2021).

Počet mezofilních mikroorganismů je závislý na teplotě, při které se mléko uchovává, transportuje do laboratoře nebo do mlékárny. Podle nařízení (ES) č. 853/2004 musí být mléko v případě, že je sváženo každý den, ihned zchlazeno na teplotu nejvýše 8 °C, a v případě, že svoz není prováděn každý den, zchlazeno na teplotu nejvýše 6 °C. Během přepravy musí být zachován chladicí řetězec a při přepravě nekonzervovaného vzorku mléka je nutné jeho doručení do laboratoře v co nejkratší době dodání do cílového zařízení, přičemž teplota mléka nesmí přesáhnout 8 °C (ČSN EN ISO 707, 2009; ČSN EN ISO 7218, 2008).

Práce je zaměřena na stanovení a kontrolu CPM v syrovém nekonzervovaném kozím a ovčím mléce při porušení chladicího řetězce, tj. při zvýšení teploty úchovy vzorku z 8 °C na teplotu 11, 14, 17, 20 a 25 °C při různé době expozice 0,5 až 4 hodiny.

MATERIÁL A METODIKA

Kultivace a vyhodnocení bazénových vzorků mléka probíhala podle platné normy ČSN EN ISO 4833-1 (2014). Mléko bylo uloženo do testované teploty a analyzováno v příslušném časovém intervalu. V tabulce č. 1 je podrobně uvedena metoda, popisující porušení teploty během transportu do laboratoře a další zacházení se vzorky. Získané výsledky byly logaritmovány a konfrontovány s hodnotou reprodukovatelnosti (0,45 log) podle platné normy ČSN EN ISO 4833-1 (2014).

Tabulka č. 1, Schéma analýzy vzorků mléka pro stanovení celkového počtu mikroorganismů

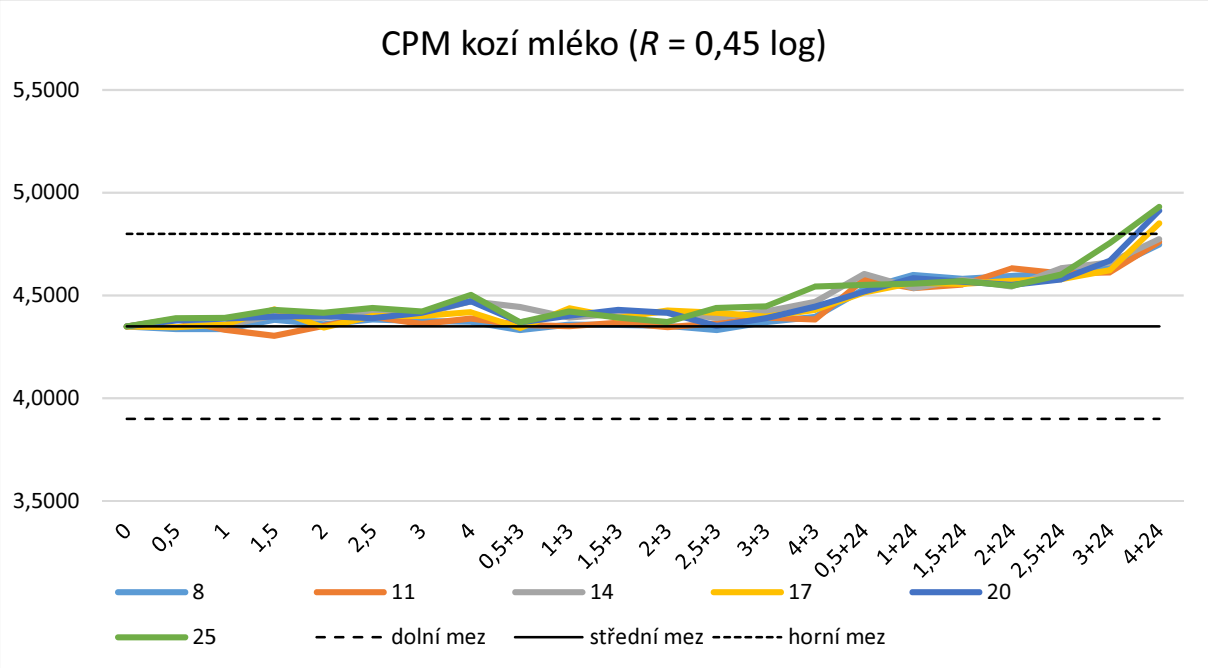
Svoz vzorků a uložení	max. 8 °C
Tržní druhy	syrové kozí a ovčí mléko bez konzervace
Objem vzorku	100 ml
Testovaná teplota	8, 11, 14, 17, 20, 25 °C
Doba expozice	0, 0:30, 1, 1:30, 2, 2:30, 3, 4 h
Dílčí vzorky	vychlazený výrobek (kontrola, 0 h), ihned po expozici zvýšené teplotě, za 3 h uložení při teplotě 8 °C a za 24 h při teplotě 8 °C

VÝSLEDKY A DISKUSE

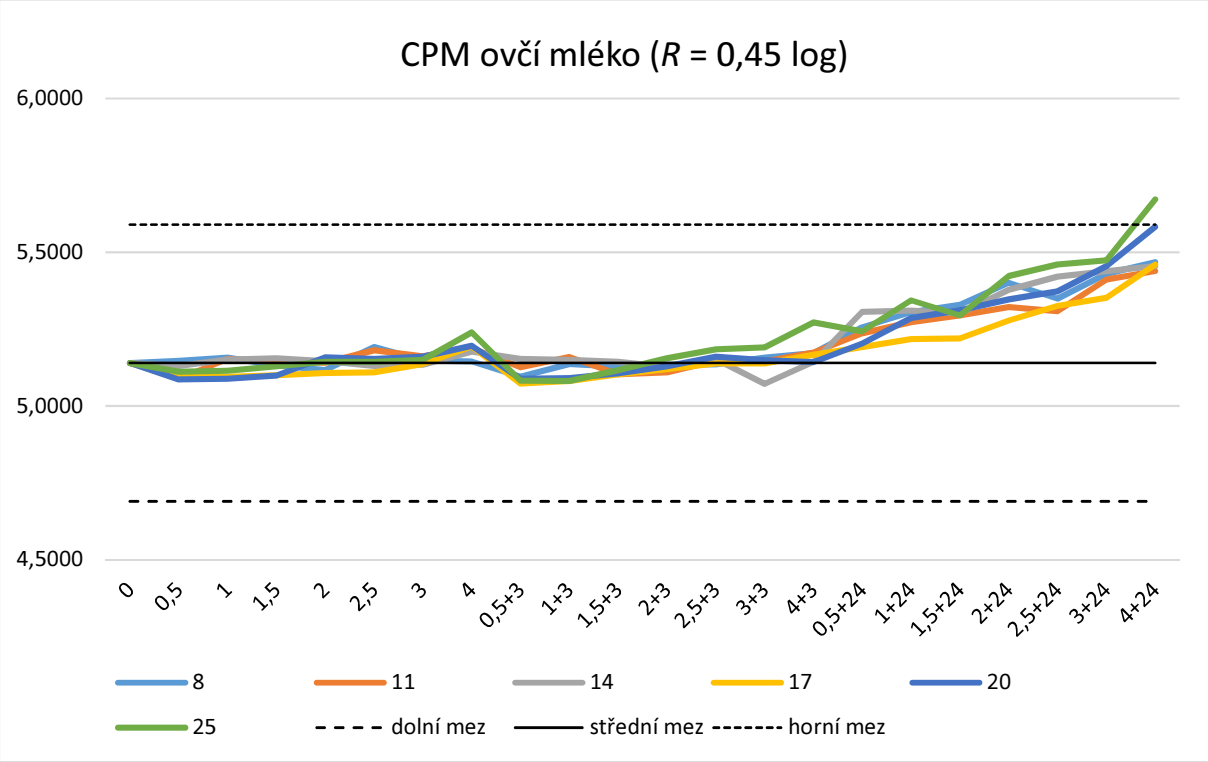
Výsledky CPM v kozím a ovčím mléce jsou znázorněny v tabulce č. 2 a grafech č. 1 a 2. Na rozdíl od kravského mléka (Klimešová a kol., 2022) dochází v mléce malých přežvýkavců k pomalejšímu nárůstu CPM s teplotou a časem uchování vzorků, a to maximálně o 0,6 (kozí mléko) a 0,5 logaritmického řádu (ovčí mléko). Mléku malých přežvýkavců, především kozímu, jsou obecně přisuzovány bakteriostatické účinky, jako např. aktivity laktoferinu, lysozymu, mastných kyselin, ale zejména gamaglobulinů z povrchů somatických buněk, jejichž počet je u malých přežvýkavců obvykle výrazně vyšší, než v mléce kravském. To je i příčinou obtížnější výroby jogurtů (pomalejší fermentace) z mléka malých přežvýkavců. Je pravděpodobné, že uvedené je i příčinou zjištěného jevu pomalejšího nárůstu CPM v mléce ovčím a kozím oproti kravskému v čase za sledovaných teplotních podmínek (Triprisila a kol., 2016; Mekri a kol., 2015).

V tabulce č. 2 jsou žlutě znázorněny časy a teploty, při kterých již není vhodné vzorek analyzovat. Ve vzorcích ovčího mléka je možné stanovit CPM i po 24 hodinách u všech teplot a časů, vyjma teploty 25 ºC a času 4 hodiny, pokud jsou tyto vzorky uloženy v chladničce při 8 ºC. U kozího mléka je analýza CPM možná po 24 hodinách pouze u teploty 8 až 14 ºC, u vyšších teplot a expozičního času 4 hodiny, nejsou již výsledné hodnoty hodnověrné a překračují horní mez reprodukovatelnosti.

Graf č. 1, Vývoj celkového počtu mikroorganismů (log KTJ/ml) v kozím mléce a mezní hodnoty reprodukovatelnosti *R* (± 0,45 log)



Graf č. 2, Vývoj celkového počtu mikroorganismů (log KTJ/ml) v ovčím mléce a mezní hodnoty reprodukovatelnosti R (± 0,45 log)



Tabulka č. 2, Výsledky celkového počtu mikroorganismů (log KTJ/ml) v kozím a ovčím mléce

teplota (°C)	8	11	14	17	20	25	8	11	14	17	20	25
čas (hod)	kozí mléko (log KTJ/ml)						ovčí mléko (log KTJ/ml)					
0	4,3495	4,3495	4,3495	4,3495	4,3495	4,3495	5,1399	5,1399	5,1399	5,1399	5,1399	5,1399
0,5	4,3363	4,3852	4,3843	4,3449	4,3782	4,3895	5,1469	5,0886	5,1302	5,0940	5,0862	5,1111
1	4,3356	4,3334	4,3558	4,3581	4,3879	4,3905	5,1573	5,1534	5,1514	5,0949	5,0882	5,1149
1,5	4,3819	4,3036	4,4019	4,4336	4,3976	4,4291	5,1321	5,1438	5,1555	5,0999	5,0990	5,1289
2	4,3594	4,3521	4,3914	4,3437	4,3996	4,4155	5,1170	5,1410	5,1456	5,1069	5,1589	5,1438
2,5	4,3831	4,3974	4,4227	4,4002	4,3886	4,4398	5,1921	5,1815	5,1305	5,1095	5,1530	5,1435
3	4,3746	4,3611	4,4117	4,4001	4,4152	4,4213	5,1484	5,1619	5,1343	5,1370	5,1607	5,1505
4	4,3728	4,3870	4,4713	4,4195	4,4720	4,5025	5,1447	5,1884	5,1772	5,1934	5,1957	5,2398
0,5+3	4,3312	4,3570	4,4436	4,3412	4,3687	4,3688	5,0957	5,1262	5,1536	5,0726	5,0882	5,0828
1+3	4,3577	4,3506	4,3925	4,4384	4,4014	4,4217	5,1368	5,1593	5,1500	5,0818	5,0905	5,0813
1,5+3	4,3562	4,3670	4,4104	4,3908	4,4300	4,3926	5,1283	5,1030	5,1438	5,1036	5,1061	5,1167
2+3	4,3515	4,3458	4,4195	4,4271	4,4165	4,3713	5,1341	5,1098	5,1273	5,1201	5,1292	5,1553
2,5+3	4,3311	4,3650	4,3905	4,4162	4,3526	4,4384	5,1359	5,1485	5,1518	5,1389	5,1607	5,1845
3+3	4,3707	4,3929	4,4222	4,3968	4,3886	4,4462	5,1576	5,1452	5,0716	5,1390	5,1486	5,1910
4+3	4,3951	4,3834	4,4680	4,4296	4,4455	4,5441	5,1720	5,1737	5,1441	5,1672	5,1431	5,2716

Pokračovanie tabuľky: Výsledky celkového počtu mikroorganismů (log KTJ/ml) v kozím a ovčím mléce

0,5+24	4,5308	4,5775	4,6035	4,5138	4,5187	4,5509	5,2563	5,2360	5,3058	5,1914	5,2037	5,2430
1+24	4,5991	4,5364	4,5360	4,5616	4,5841	4,5578	5,3051	5,2724	5,3102	5,2174	5,2862	5,3432
1,5+24	4,5806	4,5536	4,5766	4,5559	4,5667	4,5698	5,3295	5,2945	5,3014	5,2202	5,3118	5,2949
2+24	4,5953	4,6322	4,5438	4,5720	4,5516	4,5473	5,4005	5,3221	5,3776	5,2778	5,3466	5,4226
2,5+24	4,6111	4,6076	4,6325	4,5798	4,5773	4,6018	5,3492	5,3086	5,4203	5,3253	5,3725	5,4599
3+24	4,6318	4,6123	4,6601	4,6229	4,6699	4,7554	5,4299	5,4118	5,4385	5,3517	5,4547	5,4738
4+24	4,7478	4,7612	4,7736	**4,8513**	**4,9125**	**4,9314**	5,4674	5,4390	5,4550	5,4597	5,5829	**5,6719**

ZÁVĚR

Výsledky studie slouží k nastavení maximální délky přerušení teplotního řetězce, která nebude mít negativní dopad na výsledný mikrobiologický profil mléka ovcí a koz bez konzervace. Tyto výsledky umožňují definovat přijatelný postup při odběru a transportu vzorků, především s ohledem na minimalizaci případného znehodnocení vzorku či zpochybnění výsledků analýz. Hodnocení výsledků dále posuzuje, jakým způsobem se na počtu mikroorganismů projeví doba zahájení vyšetření vzorku, která uplyne od skončení působení teploty porušení.

PODĚKOVÁNÍ

Práce byla zpracována s podporou projektu NAZV QK21020245 a MZe RO1423.

POUŽITÁ LITERATURA

1. BUCEK, P. et al. Ročenka. Chov skotu v České republice. Hlavní výsledky a ukazatele za rok 2020. Vydala Českomoravská společnost chovatelů, a. s., Hradišťko; Výzkumný ústav živočišné výroby, v. v. i., Praha – Uhříněves; Svaz chovatelů českého strakatého skotu, z. s.; Svaz chovatelů holštýnského skotu ČR, z. s.; Český svaz chovatelů masného skotu, z. s., Praha, září 2021, 42 p.
2. KLIMEŠOVÁ, M. et al. Vliv teploty na vybrané ukazatele syrového mléka. *Mlékařské listy*, ISSN 1212 - 950X, 2022, vol. 33, no. 5, p. 16-22.
3. NAŘÍZENÍ EVROPSKÉHO PARLAMENTU A RADY (ES) č. 853/2004 ze dne 29. dubna 2004, kterým se stanoví zvláštní hygienické předpisy pro potraviny živočišného původu. *Úřední věstník Evropské unie,* 2004, L. 139, 30. 4. 2004, 78 p. (ve znění pozdějších předpisů).

4. ČSN EN ISO 4833-1 Mikrobiologie potravinového řetězce - Horizontální metoda pro stanovení počtu mikroorganismů - Část 1: Technika přelivem a počítání kolonií vykultivovaných při 30 °C. 2013.
5. ČSN EN ISO 707 Mléko a mléčné výrobky - Návod pro odběr vzorků. 2009.
6. ČSN EN ISO 7218 Mikrobiologie potravin a krmiv. Všeobecné požadavky a doporučení pro mikrobiologické zkoušení. 2008.
7. MEKRI, M. et al. .Antibacterial activity of lactic acid bacteria isolated from raw goat's milk against spoilage and pathogenic bacteria. *Global Veterinaria*, ISSN 1992-6197, 2015, vol. 15, no. 5, p. 485-492.
8. SANDRUCCI, A. et al. Management practices and milk quality in dairy goat farms in Northern Italy. *Italien Journal of Animal Sciences*, ISSN 15944077, 2019, vol. 18, p. 1-12.
9. TRIPRISILA, L. et al. The Comparing of antimicrobial activity of CSN1S2 protein of fresh milk and yoghurt goat breed Ethawah inhibited the pathogenic bacteria. *Materia Socio Medica*, ISSN 1512-7680, 2016, vol. 28, no. 4, p. 244-248.

Kontaktná adresa: doc. MVDr. Necidová Lenka, Ph.D., Ústav hygieny a technologie potravin živočišného původu a gastronomie, Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární univerzita Brno, Palackého tř. 1946/1, 612 42 Brno, Česká republika; E-mail: necidoval@vfu.cz

VEDĽAJŠÍE ŽIVOČÍŠNE PRODUKTY V MLIEKARENSKOM PRIEMYSLE A PRAVIDLÁ ICH ÚRADNÝCH KONTROL

ANIMAL BY PRODUCTS IN THE DAIRY INDUSTRY AND RULES FOR THEIR OFFICIAL CONTROLS

Korénekova Beáta, Kožárová, Ivona

Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach,

Katedra hygieny, technológie a zdravotnej bezpečnosti potravín

ABSTRACT

The work deals with animal by-products (ABP) arising in the dairy industry, the most important of which are whey and buttermilk. It points to their biological and dietary value as well as their use. The work also includes ABP that are not suitable for human consumption and are created during the processing and marketing of milk and milk products. These ABP can belong to category materials: CM1, CM2 and CM3. The work presents the currently valid legislation in the field of ABP. Emphasis is placed on the specific rules of official inspections of ABP in the dairy industry and on the necessity of strict compliance with currently legislation.

Key words: animal by - products, official controls, dairy industry

ÚVOD

Mliekarenský priemysel produkuje okrem mlieka a mliekarenských produktov aj vedľajšie živočíšne produkty (VŽP) a odvodené produkty (OP). Z VŽP produktov má najväčší význam srvátka a cmar. Okrem toho vytvára aj cenné druhotné suroviny ako sú syrové odrezky, povrchový maz syra, úletové mlieko a odpadové vody. Vzhľadom nato, že čoraz viac sa niektoré vedľajšie produkty používajú aj humánnej výžive, treba pri ich výrobe a distribúcii zabezpečovať také podmienky ako pri výrobe mliekarenských výrobkov (Nagy a kol., 2013).

Srvátka vzniká ako vedľajší produkt pri výrobe syrov alebo kazeínu z mlieka. Podľa spôsobu spracovania, ktorý sa používa pri odstraňovaní kazeínu z mlieka rozlišujeme 2 typy srvátky a to sladkú a kyslú. Sladká srvátka má pH cca 5,6 a získava sa pri výrobe väčšiny druhov syrov a niektorých kazeínových výrobkov. Kyslá srvátka má pH cca 4,5. Chemické zloženie srvátky sa líši v závislosti na type použitého mlieka a spôsobe spracovania. Srvátky sa líšia obsahom minerálnych látok, hodnotou pH a zložením frakcie srvátkových proteínov. Srvátka má vysokú nutričnú a biologickú hodnotu. Hlavnou zložkou srvátky je voda, druhou najviac zastúpenou zložkou je laktóza, potom sú to srvátkové bielkoviny a minerálne látky. Srvátka

získaná zvlášť z ovčieho mlieka, obsahuje aj rôzne bielkoviny viažuce železo a iné minerálne látky, vitamín A, vitamín D, vitamín B12, riboflavín, kyselinu listovú (Herian 2014). Vzhľadom na chemickú a biologickú hodnotu je srvátka surovinou na výrobu rôznych výrobkov, ktoré sa používajú na výživu ľudí, ale aj hospodárskych zvierat. Srvátka sa používa buď v pôvodnej forme, alebo nepriamo po predchádzajúcej úprave a spracovaní. Okrem toho sa z nej získavajú významné nutričné zložky ako srvátkové bielkoviny a laktóza, ktoré sa využívajú v potravinárskom, farmaceutickom a krmovinárskom priemysle. Laktóza prítomná v srvátke môže slúžiť aj ako zdroj uhlíka pre rast a syntézu mnohých produktov v rôznych biotechnologických procesoch. Biokonverziou srvátky prípadne laktózy možno produkovať bioetanol, ocot, antibiotiká (nizín), povrchovo aktívne látky ako glykolipid - soforolipid, polyhydroxyalkanáty (PHA), prípadne kyselinu mliečnu vo forme kyseliny polymliečnej (Ryan a Walsh, 2016). Srvátka získaná pri výrobe ovčieho hrudkového syra sa používa na skrmovanie hospodárskych zvierat (Makovický a Margetín, 2017).

Cmar je vedľajší produkt pri výrobe masla a predstavuje významnú surovinu s dietetickými a funkčnými vlastnosťami. Sladký cmar vzniká ako vedľajší produkt pri masle z nezakysanej smotany, kyslý cmar je zo zakysanej smotany. Dietetický význam cmaru spočíva vo zvýšenom obsahu fosfolipidov, lipoproteínov, voľných mastných kyselín a ďalších zložiek, ktoré majú pôvod v mlieku. Hlavne zvýšený obsah esenciálnych mastných kyselín robí z cmaru významnú surovinu na výrobu zakysaných mliečnych výrobkov, niektorých druhov syrov, šľahaného a konzumného cmaru. Cmar, či už v čerstvom stave alebo sušený, má výborné emulgačné a stabilizačné účinky, pre ktoré sa využíva v rôznych výrobách potravinárskeho priemyslu, napr. pri výrobe mrazených smotanových krémov, mliečnych pien, ale aj v pekárstve a pri výrobe sušených mliečnych krmných zmesí. Cmar sa používa tiež na skrmovanie v tekutej forme, čiastočne vo forme sušených krmných zmesí (Linkešová a Paveleková, 2007)

VŽP neurčené na ľudskú spotrebu sa rozdeľujú sa podľa Nariadenia (ES) č. 1069/2009, do 3 materiálových kategórii (MK). Je to MK 1 určený len na likvidáciu, MK 2 nevhodný pre živočíšnu spotrebu a MK 3 je nevhodný pre ľudskú spotrebu. VŽP, ktoré vznikajú pri spracovaní a uvádzaní na trh mlieka a mliečnych výrobkov môžu patriť do MK1, MK2 a MK3.

Ku MK1 patria VŽP zo zvierat, ktoré boli podrobené nezákonnému ošetreniu (čl.1 ods. 2 písm. d) smernice 96/22/ES alebo čl. 2, písm. b) smernice 96/23/ES, ďalej VŽP, obsahujúce rezíduá kontaminantov zo životného prostredia uvedených v sk. B, ods.3 Prílohy 1, smernici 96/23/ES ak prekračujú povolené limity ustanovené v právnych predpisoch spoločenstva, alebo tieto chýbajú vo vnútroštátnych predpisoch.

Ako MK2 sú VŽP, ktoré obsahujú rezíduá povolených látok alebo kontaminantov prekračujúce povolené limity v zmysle čl. 15, ods.3 smernice 96/23/ES, produkty živočíšneho

pôvodu (ŽP)vyhlásené za nevhodné pre ľudskú výživu v dôsledku možnej prítomnosti cudzorodých častíc v týchto produktoch. Produkty ŽP iné než MK1, ktoré sú dovezené, alebo uvedené z tretej krajiny a nespĺňajú veterinárne požiadavky Spoločenstva na ich dovoz alebo uvedenie podmienené osobitnými obmedzeniami alebo ich vrátením do tretej krajiny, alebo odoslané do iného členského štátu a nespĺňajú požiadavky ustanovené alebo povolené v právnych predpisoch spoločenstva, ak sa nevrátia s povolením príslušného orgánu členského štátu pôvodu.

Ako MK3 je zaradený kal z odstrediviek alebo separátorov zo spracovania mlieka, ktorý je VŽP čistenia surového mlieka a separácie odstredeného mlieka a smotany zo surového mlieka. Produkty ŽP, alebo potraviny obsahujúce produkty ŽP, ktoré už nie sú určené na ľudskú spotrebu z komerčných dôvodov alebo v dôsledku výrobných, baliacich nedostatkov alebo iných nedostatkov, ktoré nepredstavujú žiadne riziko pre verejné zdravie, alebo zdravie zvierat.

Možnosti odstraňovania v prípade MK3 nevhodného pre ľudskú spotrebu a to: surového mlieka, mledziva a produktov z nich odvodených, v súvislosti s ktorými príslušný orgán nepredpokladá, že by predstavovali riziko akejkoľvek choroby prenosnej prostredníctvom týchto produktov na ľudí alebo zvieratá je, že sa *pridá do pôdy bez spracovania.* Podobne v prípade mlieka, mliečnych výrobkov a mledziva v súvislosti s ktorými príslušný orgán nepredpokladá, že by predstavovali riziko šírenia akejkoľvek vážnej prenosnej choroby *sa pridá do pôdy bez spracovania.* Ďalšou možnosťou je, že sa MK3 kompostuje alebo transformuje na bioplyn. Môže to byť po prvotnom spracovaní alebo bez neho v prípade mlieka, mliečnych výrobkov a mledziva, v súvislosti s ktorými príslušný orgán nepredpokladá, že by predstavovali riziko šírenia akejkoľvek vážnej prenosnej choroby. Nariadenie ES) č. 1069/2009 sa však neuplatňuje na surové mlieko, mledzivo a výrobky z nich, ktoré sa získavajú, skladujú, odstraňujú alebo používajú *na farme pôvodu.*

Špecifické pravidlá pre úradné kontroly VŽP

Predmetom úradných kontrol orgánov veterinárnej správy je kontrola dodržiavania podmienok, ktoré sú určené legislatívou pri akomkoľvek nakladaní, zbere, preprave, skladovaní, likvidácii, spracovaní, obchodovaní s VŽP a OP v rámci Európskej únie uvádzaní na trh v SR a vývoze do tretích krajín. Úradnej kontrole podliehajú producenti VŽP a OP, ku ktorým patria všetky farmy a majitelia, ktorí držia zvieratá, všetky prevádzkarne, ktoré spracúvajú ŽP a celá obchodná sieť, kde sa predávajú potraviny živočíšneho pôvodu.

V Nariadení EP a RADY (EÚ) 2017/625 sa stanovujú pravidlá vykonávania úradných kontrol a iných úradných činností príslušnými orgánmi členských štátov. Stanovujú sa tiež pravidlá prevencie a minimalizácie rizík pre zdravie ľudí a zvierat vyplývajúcich z VŽP a OP.

Úradné kontroly vykonávané na overenie dodržiavania pravidiel v súvislosti **s** produktmi ŽP určenými na ľudskú spotrebu zahŕňajú overenie dodržiavania požiadaviek stanovených podľa vhodnosti v nariadeniach (ES): č. 852/2004, č. 853/2004, č. 1069/2009. Špecifické pravidlá pre úradné kontroly a opatrenia, ktoré príslušné orgány prijmú v súvislosti so zvieratami, produktmi ŽP, VŽP a OP sú uvedené v Nariadení EP a RADY (EÚ) 2017/625 v čl. 20. Vzhľadom na produkty živočíšneho pôvodu sa v ňom uvádza:

1. Úradné kontroly živočíšnych produktov (ŽP) majú sa vykonávať na ktoromkoľvek stupni výroby, spracovania a distribúcie.

2. Komisia stanovuje pravidlá vykonávania úradných kontrol produktov ŽP, ako aj VŽP a OP na overenie dodržiavania pravidiel Únie. Tiež aj pravidlá pre opatrenia, ktoré príslušné orgány prijmú na základe úradných kontrol. V uvedených delegovaných aktoch sa stanovia pravidlá a špecifické požiadavky na vykonávanie úradných kontrol:

a) produktov ŽP s cieľom reagovať na známe nebezpečenstvá a riziká pre zdravie ľudí a zvierat, ktoré sa vykonávajú na overenie dodržiavania opatrení na prevenciu a kontrolu chorôb uvedenými v čl. 1, ods. 2d. a to požiadaviek na zdravie zvierat.

b) VŽP a OP s cieľom reagovať na špecifické nebezpečenstvá a riziká pre zdravie ľudí a zvierat prostredníctvom úradných kontrol, ktoré sa vykonávajú na overenie dodržiavania pravidiel v čl.1 ods. 2e) a 2 c) a to:

- *prevencie a minimalizácie rizík* pre zdravie ľudí a zvierat vyplývajúcich z VŽP a OP.
- *krmív a bezpečnosti krmív* na ktoromkoľvek stupni výroby, spracovania a distribúcie krmív a ich používania vrátane pravidiel zameraných na zabezpečenie slušných obchodných praktík a na ochranu zdravia, záujmov a informovanosti spotrebiteľov.

c) Pri podozrení na nedodržiavanie pravidiel je potrebné prijať 1 alebo viac opatrení (čl. 137, ods. 2), kde príslušné orgány uskutočnia v prípade podozrenia na nedodržiavanie pravidiel. Tieto vyšetrovania sú s cieľom potvrdiť alebo vyvrátiť toto podozrenie. Opatrenia podľa potreby zahŕňajú vykonávanie:

a) *zintenzívnených úradných kontrol tovaru a prevádzkovateľov* počas primeraného obdobia,

b) *úradné pozastavenie* tovaru a akýchkoľvek nepovolených látok alebo produktov.

Ak sa preukáže nedodržanie pravidiel, príslušné orgány prijmú opatrenia (čl.138 ods.1 a 2).

a) *akékoľvek opatrenie* potrebné na určenie pôvodu a rozsahu nedodržiavania pravidiel a na určenie zodpovednosti prevádzkovateľa a

b) *vhodné opatrenia* na zabezpečenie toho, aby dotknutý prevádzkovateľ napravil nedodržiavanie pravidiel a zabránil ďalšiemu výskytu takéhoto nedodržiavania pravidiel.

Príslušné orgány pri rozhodovaní o tom, ktoré opatrenia prijmú, zohľadnia povahu nedodržiavania pravidiel a minulé záznamy prevádzkovateľa ako aj dodržiavanie pravidiel.

3. Komisia môže (čl. 20 ods.3) pomocou vykonávacích aktov stanoviť pravidlá týkajúce sa jednotných praktických opatrení, pokiaľ ide o jednotnú minimálnu frekvenciu vykonávania úradných kontrol:

a) *produktov ŽP v prípadoch, keď je potrebná minimálna úroveň úradných kontrol* s cieľom reagovať na známe jednotné nebezpečenstvá a riziká pre zdravie ľudí a zvierat cez tieto úradné kontroly, ktoré sa vykonávajú na overenie dodržiavania opatrení na prevenciu a kontrolu chorôb v súlade s pravidlami (v čl. 1 ods. 2d) týkajúcimi sa požiadaviek na zdravie zvierat.

b) *jednotnú minimálnu frekvenciu vykonávania úradných kontrol* VŽP a OP v prípadoch, keď je potrebná minimálna úroveň úradných kontrol s cieľom reagovať na špecifické nebezpečenstvá a riziká pre zdravie ľudí a zvierat cez úradné kontroly, ktoré sa vykonávajú na overenie dodržiavania pravidiel (čl.1 ods. 2e) týkajúce sa prevencie a minimalizácie rizík pre zdravie ľudí a zvierat vyplývajúcich z VŽP a OP.

4. Povoľuje sa delegovanie určitých úloh úradných kontrol uvedených v tomto článku na jednu alebo viaceré fyzické osoby.

ZÁVER

Podobne ako v prípade mlieka hlavnej suroviny v mliekarenskom priemysle tak aj v prípade VŽP a OP mliekarenského priemyslu je bezpečnosť a kvalita týchto produktov zabezpečovaná na všetkých stupňoch pravidelnými úradnými veterinárnymi kontrolami.

LITERATÚRA

1. Herian, K.: Prínos ovčích mliečnych výrobkov pre zdravie ľudí, Mlékařské listy č. 143,
2. 2014, s. 1-6.
3. Mária Linkešová, Ivona Paveleková, Vybrané kapitoly z chemickej a potravinárskej technológie, Trnavská univerzita, 2007, 237s.
4. Makovický, P., Margetín, M.: Ovca ako hospodárske zviera s významnou mimo produkčnou funkciou, Agritech Science, 17, 2017, ISSN 1802-8942, s. 1-10.
5. Nagy, J., a kol.: Hygiena a technológia produkcie a spracovania vedľajších živočíšnych produktov, UVLF Košice, 2013, 456s.
6. Nariadenie EPaR (EÚ) č. 2017/625 z 15. 3. 2017 o úradných kontrolách a iných úradných činnostiach vykonávaných na zabezpečenie uplatňovania potravinového a

krmivového práva a pravidiel pre zdravie zvierat a dobré životné podmienky zvierat, pre zdravie rastlín a pre prípravky na ochranu rastlín.

7. Nariadenie EPaR (ES) č. 852/2004 z 29. apríla 2004 o hygiene potravín.
8. Nariadenie EPaR (ES) č. 853/2004 EPaR z 29. 4. 2004, ktorým sa ustanovujú osobitné hygienické predpisy pre potraviny živočíšneho pôvodu.
9. Nariadenie EPaR (ES) č. 1069/2009 z 21. 10. 2009, ktorým sa ustanovujú zdravotné predpisy pre VŽP neurčené na ľudskú spotrebu.
10. Ryan, M. Walsh, G.: . The biotechnological potential of whey. Reviews in Environmental Science and Bio/Technology, 2016, 15, 3, s. 479-498
11. Smernica 96/22/ES, z 29. apríla 1996 o zákaze používania určitých látok s hormonálnym účinkom a beta-agonistov pri chove dobytka
12. Smernica 96/23/ES, z 29. apríla 1996 o opatreniach na monitorovanie určitých látok a ich rezíduí v živých zvieratách a živočíšnych produktoch

POĎAKOVANIE

Predkladaná práca bola podporená projektom KEGA 015UVLF-4/2021.

Kontaktná adresa: MVDr. Beáta Koréneková, PhD., Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, Katedra hygieny, technológie a zdravotnej bezpečnosti potravín, Komenského 73, 041 81 Košice, Slovenská republika; E-mail: beata.korenekova@uvlf.sk

VPLYV BIOGÉNNYCH AMÍNOV NA PRÍTOMNOSŤ *TORULASPORA DELBRUECKII* V PROCESE FERMENTÁCIE VÍNA

THE EFFECT OF BIOGENEIC AMINES ON THE PRESENCE OF *TORULASPORA DELBRUECKII* IN THE WINE FERMENTATION PROCESS

Kováčová Mariana, Regecová Ivana, Výrostková Jana, Semjon Boris, Marcinčák Slavomír, Očenáš Peter

Katedra hygieny a technológie potravín, Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, Komenského 73, 041 81 Košice, Slovenská republika

ABSTRACT

Biogenic amines are low molecular weight compounds which are present in fermented food and beverages, including wine. Of the many biogenic amines tyramine and histamine are the most important in wine. Composition of biogenic amines is affected by the present microorganisms and especially yeast. This study is focused on detection of biogenic amines tyramine and histamine and their correlation with *Torulaspora delbrueckii* during the fermentation process in samples collected from soil, leaves, berries of grapes, must and wine. The highest percentage of *Torulaspora delbrueckii* was found on day 4. and day 6. of wine fermentation same as amount of biogenic amine tyramine and histamine. There was strong correlation between presents of *Torulaspora delbrueckii* and concentration of tyramine.

Key words: wain, *Torulaspora delbrueckii*, fermentation, yeast, biogenic amines

ÚVOD

Za účelom zlepšenia parametrov kvality vína v procese fermentácie sa v súčasnosti čoraz viac venuje pozornosť využívaniu kvasiniek iných ako *Saccharomyces cerevisiae* (Benito, 2018). Použitím iných druhov kvasiniek než *Saccharomyces cerevisiae* môže byť znížený obsah škodlivých zlúčeniny ako sú biogénne amíny (BA), ktoré ovplyvňujú bezpečnosť potravín (Benito a kol., 2015). Spomedzi kvasiniek iných ako *Saccharomyces* je najlepšie študovaná a využívaná na priemyselnej úrovni *Torulaspora delbrueckii* (Belda a kol., 2017). *T. delbrueckii* produkuje nízke koncentrácie kyseliny octovej, jedného z hlavných kvalitatívnych parametrov pri výrobe vína. *T. delbrueckii* tiež produkuje vína s nižšími koncentráciami etanolu a zvýšeným obsahom glycerolu (Belda a kol., 2015). Táto vlastnosť môže pomôcť vyhnúť sa problémom vyplývajúcim z klimatických zmien. Vzhľadom na senzorické vlastnosti *T. delbrueckii* vykazuje pozoruhodnú schopnosť uvoľňovať manoproteíny

a polysacharidy vo víne, čo zvyšuje jeho kvalitu (Belda a kol., 2016). *T. delbrueckii* taktiež ovplyvňuje aromatické vlastnosti finálnych vín veľmi pozitívnym spôsobom, pretože dokáže produkovať vyššie hladiny ovocných esterov, tiolov a terpénov a nižšie množstvá vyšších alkoholov (Azzolini a kol., 2015; Renault a kol., 2016; Belda a kol., 2017).

Obsah biogénnych amínov predstavuje významný ukazovateľ kvality vín. BA predstavujú skupinu organických dusíkatých zlúčenín vznikajúcich a degradovaných metabolizmom živých organizmov (mikroorganizmy, rastliny a živočíchy). Jedným z hlavných faktorov ovplyvňujúcich vznik BA je proces fermentácie. Dominantné biogénne amíny spojené s vínom sú histamín, tyramín, putrescín a kadaverín. BA môžu byť prítomné vo všetkých druhoch vín. V bielych vínach je obsah BA menší ako v červených vínach, t.j. 0–10 mg/l pre biele vína a 0–30 mg/l pre červené vína (Costantini a kol., 2019). Poznatkami o BA v potravinách a nápojoch sa v posledných rokoch venuje stále väčšia pozornosť, ktorej cieľom je zabezpečiť a zlepšenie kvality vína, ale najmä zaručiť bezpečnosť potravín z dôvodu potenciálnych toxických účinkov BA na spotrebiteľa.

Táto práca sa zaoberá stanoveniu vplyvu koncentrácie biogénnych amínov tyramínu a histamínu, nachádzajúcich sa v mušte a v mladom víne odrody Tramín červený, vo vzťahu k prítomnosti *Torulaspora delbrueckii* v procese fermentácie.

MATERIÁL A METODIKA

Vzorky analyzované v tejto práci pochádzali z vinohradníckej obci Orechová, ktorá sa nachádza sa vo Východoslovenskej vinohradníckej oblasti. Vyšetrované vzorky boli odobraté z pôdy, listov viniča, bobúľ, muštu a mladého vína odrody Tramín červený. Odber vzoriek bol uskutočnený v Septembri 2021. Získané vzorky muštu s obsahom cukru 21,5 °Brix boli prenesené do 100 litrovej nerezovej nádoby, vplyvom čoho došlo k začatiu fermentačného procesu. Vzorky muštu boli vyšetrené na nultý, druhý, štvrtý, šiesty, ôsmy deň a po období štyroch týždňov stále prebiehajúcej fermentácie. Analýza vzoriek bola zameraná na analýzu vplyvu BA (tyramínu a histamínu) na kvasinky *Torulaspora delbrueckii*.

Stanovenie obsahu biogénnych amínov t.j. tyramínu a histamínu bolo vykonané za použitia systému ultra-vysokoúčinnej kvapalinovej chromatografie (UHPLC) Thermo Scientific (Dionex UltiMate 3000 RS) spojeného s fluorescenčným detektorom (FLD). Oddelenie jednotlivých biogénnych amínov vo vyšetrovaných vzorkách bolo vykonané kolónou YMC-Triart PFP (150 x 3,0 mm, 1,9 µm) s prietokom 0,4 ml/min. Kolóna bola udržiavaná na teplotu 25 ± 0,5 °C. Mobilnú fázu tvoril (A) acetonitril a (B) 0,1 mol/l octan amónny. Delenie biogénnych amínov bolo uskutočnené použitím izokratickej elúcií 55 % (A): 45 % (B). Štandardný zásobný roztok skúmaných biogénnych amínov bol pripravený

rozpustením štandardu v deionizovanej vode na koncentráciu 1000 mg/l^{-1}. Vzorky vína sa prvotne zriedili kyselinou chlorovodíkovou (0,1 mol/l) v pomere 1:1 a následne boli odparené do vysušenia. Následne bolo alikvótne množstvo týchto štandardných zásobných roztokov biogénnych amínov (do koncentrácie 100 mg/l^{-1})/zvyšku vzorky pridané do 2 ml deionizovanej vody. K roztokom bolo následne pridaných 0,3 g $NaHCO_3$ a roztok dansylchloridu (2 mg/ml^{-1}). Reakcia prebehla v tme pri izbovej teplote (20 ± 1 °C) počas 90 minút. Po ukončení reakcie bol pridaný toluén (4 ml), do ktorého boli následne extrahované derivatizované biogénne amíny. Z toluénového extraktu bol odobratý jeden mililiter, ktorý bol následne odparený do sucha. Zvyšok bol rozpustený v 1 ml acetonitrilu a prefiltrovaný cez 0,2 um nylonový injekčný filter. V ďalšom kroku boli takto prefiltrované roztoky v množstve 5 ul použité na UHPLC analýzu. V detektore FLD boli vlnové dĺžky excitácie a emisie nastavené na 320 nm a 523 nm. Identifikácia BA bola vykonaná porovnaním ich zodpovedajúcemu štandardu s retenčným časom. Kvantifikácia BA vo vzorkách vína bola uskutočnená pomocou štandardnej krivky vytvorenej pomerom koncentrácie každého biogénneho amínu ku ploche piku.

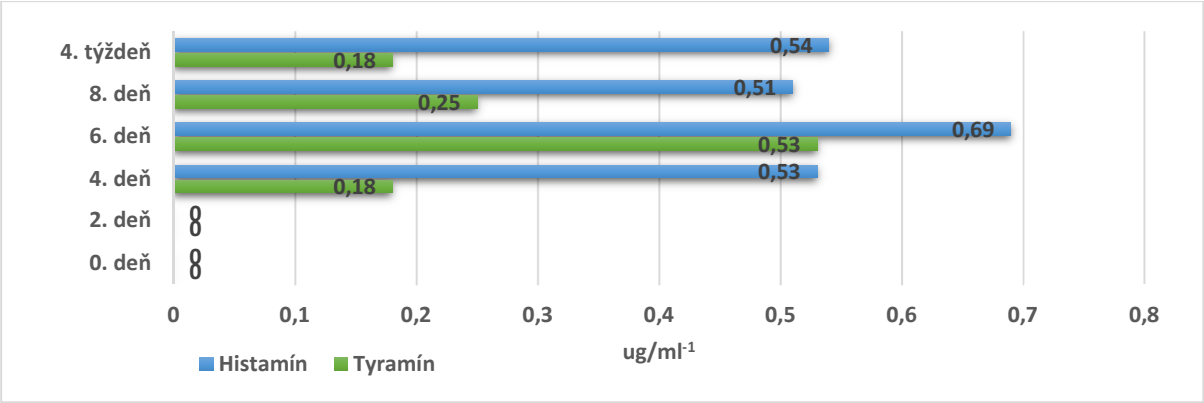
Stanovenie počtu kvasiniek a mikroskopických vláknitých húb bolo vykonané v súlade s normou ISO 21527-1. Vybrané riedenia boli vyočkované na povrch agaru Dichloran Rose-Bengal Chloramfenikol (DRBC) (Hi-Media, India) s pH 5,6±0,2. Inkubácia prebehla pri 25 °C po dobu 5 dní. Petriho misky obsahujúce počet kolónií nižší ako 150 boli následne použité na stanovenie kvantitatívneho zastúpenia. Z každej skupiny kolónii s rovnakými fenotypovými charakteristikami bolo vybraných päť kolónií na ďalšiu anylýzu.

Druhová identifikácia kvasiniek a mikroskopických vláknitých húb bola uskutočnená metódou hmotnostnej spektrometrie (MS) MALDI-TOF porovnaním PMF nachádzajúceho sa v databáze s PMF neznámeho organizmu. Príprava vzoriek bola vykonaná s použitím kyseliny mravčej a acetonitrilu v súlade so štandardným protokolom prípravy vzorky. Výsledky boli analyzované softvérom Flex Analysis (verzia 3.0) použitím prístroja Ultra-flex III (Bruker, Billerica, Massachusetts, USA). Konečná analýza a vyhodnotenie výsledkov bola uskutočnená softvérom BioTyper (verzia 1.1) (Bruker, Billerica, MA, USA).

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Výsledky tejto práce uvádzajú neprítomnosť BA vo vzorkách muštu a mladého vína počas nultého a druhého dňa fermentačného procesu. K nárastu BA došlo počas štvrtého dňa fermentácie (Obrázok č. 1). Najvyššie hodnoty BA tyramínu (0,53 µg/ml^{-1}) a histamínu (0,69 µg/ml^{-1}) boli detegované počas šiesteho dňa fermentačného procesu. S predlžujúcou sa dobou fermentačného procesu bol zaznamenaný pokles obsahu sledovaných BA.

Obrázok č. 1, Kvantitatívne vyšetrenie biogénnych amínov vo vzorkách muštu a vína v priebehu fermentačného procesu.



Počet kvasiniek a mikroskopických vláknitých húb sa v skúmaných vzorkách značne líšil, pričom sa pohyboval od 3,8 ± 0,1 do 5,3 ± 0,1 log KTJ/g^{-1}. Najvyššie počty kvasiniek boli detegované vo vzorkách pôdy 5,3 ± 0,1 log KTJ/g^{-1} a vo vzorkách pochádzajúcich z listov viniča 5,0 ± 0,1 log KTJ/g^{-1}. Plody hroznových bobúľ obsahovali výrazne nižší počet kvasiniek 3,7 ± 0,1 log KTJ/g^{-1}. Počet kvasiniek a mikroskopických vláknitých húb sa vo vzorkách muštu a mladého vína pohyboval od 4,5 ± 0,1 do 6,9 ± 0,1 log KTJ/g^{-1}. Najnižšie hodnoty boli zaznamenané vo vzorkách čerstvo vylisovaného hroznového muštu (deň 0) 4,5 ± 0,1 log KTJ/g^{-1}. S predlžujúcou sa dobou fermentačného procesu obsah kvasiniek a mikroskopických vláknitých húb stúpal. Najvyššie počty boli zaznamenané na 6. a 8. deň fermentácie, čo bolo spôsobené takzvaným „búrlivím kvasením“. Prítomné kvasinky sú zodpovedné za naštartovanie fermentačného procesu v mušte, ale po premnožení typických vínnych kvasiniek ich počet postupne klesá.

Po kvantitatívnom mikrobiologickom kultivačnom vyšetrení vzoriek bola vykonaná podrobná identifikácia jednotlivých izolátov na základe ich makroskopických a fenotypových znakov. Spolu bolo zozbieraných 55 izolátov. Následne bola prevedená identifikácia pomocou metódy MALDI-TOF hmotnostnej spektrometrie (MS). Prítomnosť *Torulaspora delbrueckii* sa v jednotlivých analyzovaných vzorkách líšila (Tabuľka č. 1).

Tabuľka č. 1, Kvantitatívne mikrobiologické kultivačné vyšetrenie vzoriek pôdy, listov viniča, bobúľ hrozna muštu a vína.

druh	pôda [%]	listy viniča [%]	bobule hrozna [%]	mušt a mladé víno [%]					
				0. deň	2. deň	4. deň	6. deň	8. deň	4.týždeň
Torulaspora delbrueckii	2	2	3	7	11	16	22	5	1

Zastúpenie *Torulaspora delbrueckii* vo vzorkách pôdy, listov viniča a bobul hrozna bolo pomerne nízke (Tabuľka č. 1). Proces fermentácie muštu a mladého vína odrody Tramín červený podporil nárast počtu počas druhého (11 %), štvrtého (16 %) a šiesteho dňa (22 %). S predlžujúcou sa dobou fermentácie mladého vína sa prítomnosť *Torulaspora delbrueckii* znižovala čo ovplyvnené s nárastom počtu iných druhov vínnych kvasiniek a baktérií.

Viel a kol. (2017) skúmali genetickú diverzitu populácie *Saccharomyces cerevisiae* vo vinohradoch nachádzajúcich sa v severovýchodnom Taliansku. Zistili, že priemyselné izoláty kvasiniek pridané pred fermentáciou muštu potláčajú pôvodné izoláty kvasiniek prítomných v mušte. Taktiež zistili, že rody askomycét ako sú *Torulaspora, Metschnikowia*, *Hanseniaspora, Candida* a *Pichia,* môžu prežiť dlhšie a dominovať počas fermentačného procesu, až kým *Saccharomyces cerevisiae* neprevezme alkoholovú fermentáciu. Sú to práve rody *Torulaspora, Metschnikowia, Hanseniaspora, Candida, Kluyveromyces, Cryptococcus, Kloeckera, Pichia, Metschnikowia, Rhodotorula* a *Saccharomyces cerevisiae*, ktoré sa významnou mierou podieľajú na tvorbe vône vína (Lambrechts, Pretourius, 2020).

Ako vyplýva z Obrázka č. 1 a Tabuľky č. 1. prítomnosť BA vo vyšetrovaných vzorkách muštu a mladého vína odrody Tramín červený nebola potvrdená v období nultého a prvého dňa fermentačného procesu, kedy bolo stanovené pomerne nízke zastúpenie *Torulaspora delbrueckii.* V období "búrlivej fermentácie", ktorá sa uskutočnila počas štvrtého a šiesteho dňa fermentácie došlo k prudkému nárastu *Torulaspora delbrueckii* a obsahu BA. V vzhľadom ku klesajúcemu charakteru zastúpenia *Torulaspora delbrueckii* a obsahu BA s predlžením doby fermentačného procesu bola detegovaná silná korelácia medzi koncentráciou *Torulaspora delbrueckii* a obsahom tyramínu. Na druhej strane korelácia medzi kvasinkami a histamínom nebola dostatočná. Landete a kol. (2007) vo svojej práci uvádzajú, že produkcia BA je výsledkom prítomnosti baktérií, ktoré sú schopné dekarboxylovať aminokyseliny. Tieto výsledky vedú k záveru, že kvasinky nepredstavujú hlavný zdroj produkcie väčšiny biogénnych amínov nachádzajúcich sa vo víne.

ZÁVER

Táto práca potvrdila vplyv fermentačného procesu na prítomnosť *Torulaspora delbrueckii,* ktoré predstavujú významnú časť mikrobióty vína. Taktiež bola zistená silná korelácia medzi prítomnosťou *Torulaspora delbrueckii* a koncentráciou tyramínu, a nedostatočná korelácia medzi kvasinkami a histamínom.

POĎAKOVANIE

Táto práca bola podporená Vedeckou grantovou agentúrou Ministerstva školstva, vedy, výskumu a športu Slovenskej republiky a Slovenskej akadémie vied projektom VEGA 1/0156/21.

POUŽITÁ LITERATÚRA

1. AZZOLINI, M. et al. Contribution to the aroma of white wines by controlled *Torulaspora delbrueckii* cultures in association with *Saccharomyces cerevisiae*. In *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. ISSN 1573-0972, 2015, vol. 31, p. 277-293.
2. BELDA, I. et al. Dynamic analysis of physiological properties of *Torulaspora delbrueckii* in wine fermentations and its incidence on wine quality. In *Applied Microbiology and Biotechnology.* ISSN 1432-0614, 2015, vol. 99, p. 1911-1922.
3. BELDA, I. et al. Outlining the influence of non-conventional yeasts in wine ageing over lees. In *Yeast*. ISSN 1097-0061, 2016, vol. 33, p. 329-338.
4. BELDA I. et al. Influence of *Torulaspora delbrueckii* in varietal thiol (3-SH and 4-MSP) release in wine sequential fermentations. In *Journal og Food Microbiology*. ISSN 1879-3460, 2017, vol. 257, p.183-191.
5. BENITO, Á. et al. Combine use of selected *Schizosaccharomyces* pombe and *Lachancea thermotolerans* yeast strains as an alternative to thetraditional malolactic fermentation in red wine production. In *Molecules*. ISSN 1420-3049, 2015, vol. 20, p. 9510-9523.
6. BENITO, S. The impact of *Torulaspora delbrueckii* yeast in winemaking. In *Applied Microbiology and Biotechnology*. ISSN 1432-0614, 2018, vol. 102, p. 3081-3094.
7. COSTANTINI, A. et al. An Overview on Biogenic Amines in Wine. In *Beverages*. ISSN 2306-5710, 2019, vol. 5, p. 19.
8. ISO 21527-1: 2010. Microbiology of food and animal feeding stuffs. Horizontal method for the enumeration of yeasts and moulds. Part 1:Colony count technique in products with water activity greater than 0,95; Slovak Standards Institute: Bratislava, Slovakia.

9. LAMBRECHTS, M. G., PRETORIUS, I. S. Yeast and its importance to wine aroma-a review. In *South African Journal of Enology and Viticulture.* ISSN 0253-939X, 2020, vol. 21, p. 97-129.
10. LANDETE, J. M. et al. Molecular methods for the detection of biogenic amine-producing bacteria on foods. In *International Journal od Food Microbiology.* ISSN 1879-3460, 2007, vol. 117, p. 258-269.
11. RENAULT, P. et al. Enhanced 3-sulfanylhexan-1-ol production in sequential mixed fermentation with *Torulaspora delbrueckii/Saccharomyces cerevisiae* reveals a situation of synergistic interaction between two industrial strains. In *Frontiers of Microbiology*. ISSN 1664-302X, 2016, vol. 7, p. 293.
12. VIEL, A. et al. The geographic distribution of *Saccharomyces cerevisiae* isolates within three Italian neighboring winemaking regions reveals strong differences in yeast abundance, genetic diversity and industrial strain dissemination. In *Frontiers of Microbiology.* ISSN 1664-302X, 2017, vol. 8, p. 1595.

Kontaktná adresa: Kovačová Mariana, Department of Food Hygiene, Technology and Safety, University of Veterinary Medicine and Pharmacy in Košice, Komenského 73, 041 81 Košice, Slovak Republic; E-mail: mariana.kovacova@uvlf.sk

PSEUDOMONAS SPP. ZO SUROVÉHO MLIEKA A JEHO ANTIBIOTICKÁ REZISTENCIA

PSEUDOMONAS SPP. FROM RAW MILK AND ITS ANTIBIOTIC RESISTANCE

Kováčová Mariana, Výrostková Jana, Dudriková Eva, Regecová Ivana, Zahumenská Jana, Zuzana Hanzelová

Katedra hygieny, technológie a zdravotnej bezpečnosti potravín, Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, Komenského 73, 041 81 Košice, Slovenská republika

ABSTRACT

Psychrotrophic bacteria present in raw milk are well known for their spoilage potential and significant economic losses which they cause to the dairy industry. Food-related psychrotrophic bacteria are increasingly reported to have resistance properties on many antibiotics. The aim of this study was to evaluate the antibiotic resistance of *Pseudomonas putida*; *Pseudomonas fragi*; *Pseudomonas lundensis* and *Pseudomonas* spp. isolated from raw cow's milk. By determining antibiotic resistance, we confirmed resistance to two types of antibiotics in 25% (PP2; PP5; PL2; PS1and PS4) of isolates, multiresistance to three types of antibiotics in 50% (PP1; PP4; PF1; PF2; PF3; PF4; PL1; PL4; PL5; and PS4) of isolates and to four types of antibiotics in 25% (PP3; PF5; PL3; PS2 and PS3) of isolates.

Key words: psychrotrophic bacteria, milk, *Pseudomonas* spp., antibiotic resistance, food safety

ÚVOD

Neustále sa zvyšujúca spotreba antimikrobiálnych látok, ktorých cieľom je predchádzať alebo liečiť rôzne infekcie, vedie k nárastu baktérií odolných voči antibiotikám. Rod *Pseudomonas*, vďaka svojej dlhej evolučnej histórii, patrí medzi jednu z najrozmanitejších a ekologicky najvýznamnejších skupín baktérií na planéte (Mena a Gerba, 2009). *Pseudomonas* spp., ktoré patria medzi psychrotrofné baktérie, sú dôležité baktérie spôsobujúce kazenie potravín. Sú to Gram-negatívne baktérie so širokú metabolickou všestrannosť, čo im umožňuje aklimatizovať sa v rôznych biotopoch s teplotami v rozmedzí od 4 do 42 °C. Okrem toho *Pseudomonas* spp. sa môžu multiplikovať pri nízkych teplotách a predstavovať viac ako polovicu všetkých baktérií nachádzajúcich sa v mlieku (Meng a kol., 2020). Izoláty *Pseudomonas* spp. pochádzajúce zo surového mlieka vykazujú rozsiahlu rezistenciu voči mnohým antibiotikám (Munsch-Alatossava a Alatossava, 2007; Decimo a kol., 2016).

Pseudomonas spp. rezistentné na antimikrobiálne látky vyvolávajú obavy, kedže antimikrobiálna rezistencia je kľúčovým faktorom pri vzniku infekčných chorôb (Jones a kol., 2008). Riziko šírenia génov rezistencie *Pseudomonas* spp. na antibiotiká sa zvyšuje na základe ich schopnosti zostať životaschopné vo vodnom prostredí po dlhú dobu vďaka mechanizmom vrodenej rezistencie. Výmena genetického materiálu kódujúceho gény rezistencie môže viesť k prenosu rezistencie medzi patogénnymi a nepatogénnymi baktériami (Meng a kol., 2020).

Odolnosť *Pseudomonas* spp. voči antibiotikám je predmetom viacerých výskumov patogénov súvisiacich s potravinami a mastitíd v mlieku. Cieľom tejto práce bolo zhodnotiť profily antibiotickej rezistencie *Pseudomonas* spp. izolovaných zo surového kravského mlieka.

MATERIÁL A METODIKA

Izoláty rodu *Pseudomonas* (n = 20, z ktorých n = 5 *Pseudomonas putida*; n = 5 *Pseudomonas fragi*; n = 5 *Pseudomonas lundensis*; n = 5 *Pseudomonas* spp.) pochádzajúce zo vzoriek surového kravského mlieka (SKM) produkovaného slovenským strakatým dobytkom boli testované na citlivosť voči vybraným druhom antibiotík. Pri odbere vzoriek SKM sme postupovali podľa zásad STN EN ISO 707 (2011). Z odobratých vzoriek SKM sme následne pripravili desaťnásobné riedenia podľa STN EN ISO 6887-5. Vybrané riedenia boli vyočkované na povrch vopred predsušeného média Pseudomonas Agar Base (HiMedia, India). Inkubácia prebehla po dobu 48 hod. pri teplote 25 °C (ISO/TS 11059, 2009). Získané izoláty *Pseudomonas* spp. boli identifikovali použitím metódy PCR (Spilker a kol., 2004). Testovanie citlivosti vybraných izolátov bolo vykonané použitím diskovo difúznej metódy (DDM; CLSI, 2021). DDM metódou bola testovaná citlivosť izolátov na šesť antibiotík: penicilín G (10 µg); ampicilín (10 µg); streptomycín (10 µg); vankomycín (30 µg); erytromycín (15 µg) a gentamicín (10 µg). Na povrch agaru podľa Müller-Hintona (Hi-Media, India) bolo vyočkované množstvo 0,1 ml 24-hodinovej bakteriálnej suspenzie testovaných kmeňov *Pseudomonas* spp. nariedených podľa McFarlandovho zákalového štandardu stupňa 0,5 ($1x10^8$ $KTJ.ml^{-1}$). Platne boli následne inkubované po dobu 24 hodín pri teplote 37 °C. V tejto štúdii boli izoláty testované aj proti antibiotikám, pre ktoré neboli v CLSI (2021) a EUCAST (2022) poskytnuté interpretačné kritériá citlivosti. V našej interpretácii testovania boli za rezistentné považované tie kmene, ktoré nevykazovali žiadnu haló zónu, pričom sme si boli vedomí toho, že intermediárne citlivé kmene by sa mohli podceňovať. Pri zisťovaní citlivosti izolátov voči vybraným druhom antibiotík stanovených použitím DDM boli ako kontrola použité referenčné kmene *Pseudomonas fragi* CCM 1974T, *Pseudomonas putida* CCM 7156T, *Pseudomonas lundensis* CCM 3503T (Česká zbierka mikroorganizmov, Brno, Česká republika).

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Testovaním antibiotickej rezistencie bola potvrdená 100 % rezistencia na vankomycín a penicilín G u bakteriálneho druhu *Pseudomonas putida*; *Pseudomonas fragi*; *Pseudomonas lundensis* a *Pseudomonas* spp. (Tabuľka č. 1). Výsledky tejto práce taktiež potvrdili rezistenciu voči ampicilínu u testovaných izolátov druhu *P. putida* (40 %, 2 izoláty); *P. fragi* (60 %, 3 izoláty); *P. lundensis* (20 %, 1 kmeň) a *Pseudomonas* spp. (40 %, 2 izoláty). Stanovenie citlivosti izolátov na erytromicín potvrdilo rezistenciu u druhu *P. putida* (40 %, 2 izoláty); *P. fragi* (60 %, 3 izoláty); *P. lundensis* (80 %, 4 izoláty) a *Pseudomonas* spp. (60 %, 3 izoláty). Všetky testované izoláty vykazovali citlivosť voči gentamicínu (100 %) a streptomycínu (100 %), kde sme nezistili prítomnosť rezistentných izolátov.

Tabuľka č. 1, Citlivosť izolátov *P. putida*; *P. fragi*; *P. lundensis* a *Pseudomonas* spp. voči vybraným druhom antibiotík

Izolát	Druh	PEN	AMP	STR	ERY	GEN	VAN
		veľkosť zón inhibície [mm]					
PP1	*P. putida*	0	13	14	0	18	0
PP2	*P. putida*	0	12	15	9	16	0
PP3	*P. putida*	0	0	14	0	17	0
PP4	*P. putida*	0	0	15	10	16	0
PP5	*P. putida*	0	12	14	9	16	0
PF1	*P. fragi*	0	0	15	8	16	0
PF2	*P. fragi*	0	11	15	0	15	0
PF3	*P. fragi*	0	0	14	8	16	0
PF4	*P. fragi*	0	12	15	0	17	0
PF5	*P. fragi*	0	0	14	0	15	0
PL1	*P. lundensis*	0	8	14	0	17	0
PL2	*P. lundensis*	0	13	15	9	15	0
PL3	*P. lundensis*	0	0	14	0	16	0
PL4	*P. lundensis*	0	10	13	0	15	0
PL5	*P. lundensis*	0	8	13	0	15	0
PS1	*Pseudomonas* spp.	0	10	17	9	16	0
PS2	*Pseudomonas* spp.	0	0	17	0	19	0
PS3	*Pseudomonas* spp.	0	0	14	0	16	0
PS4	*Pseudomonas* spp.	0	15	15	9	17	0
PS5	*Pseudomonas* spp.	0	12	14	0	13	0
ΣR		20 (100%)	8 (40 %)	0 (0%)	12 (60 %)	0 (0 %)	20 (100 %)
ΣC		0 (0 %)	12 (60 %)	20 (100%)	9 (40 %)	20 (100%)	0 (0%)

ΣR - počet všetkých rezistentných kmeňov; ΣC - počet všetkých citlivých kmeňov; PEN - penicilín; AMP - ampicilín; STR - streptomycín; ERY - erytromycín; GEN - gentamicín; VAN - vankomycín

Testované izoláty vykazovali rezistenciu na viacero antibiotík. Rezistencia na dva druhy antibiotík (PEN - VAN) bola detegovaná u piatich testovaných izolátov (PP2; PP5; PL2; PS1a PS4). Výsledky tejto práce preukázali multirezistentný potenciál baktérií rodu *Pseudomonas* voči vybraným antibiotikám. U desiatich izolátov bola detegovaná rezistencia voči trom typom antibiotík, z čoho u siedmich testovaných izolátov (PP1; PF2 ; PF4; PL1; PL4; PL5 a PS5) sme zaznamenali rezistenciu na PEN - VAN – ERY, a u troch izolátov (PP4; PF1 a PF3) sme zistili rezistenciu voči antibiotikám PEN - VAN – AMP. Antibiotickú rezistenciu voči štyrom druhom antibiotík PEN - VAN - ERY – AMP bola detegovali u piatich izolátov (PP3; PF5; PL3; PS2 a PS3).

Decimo a kol. (2016), vo svojej práci študovali 63 izolátov patriacich do rodu *Pseudomonas* voči 16 druhom antibiotík. Ich výsledky udávajú vysoké percento izolátov *Pseudomonas* spp. rezistentných voči oxacilínu, vankomycínu, penicilínu G a o niečo nižšie percento rezistenciu na quinupristín/dalfopristín a ampicilín.

Prítomnosť a antibiotickú rezistenciu izolátov *Pseudomonas* spp. izolovaných z domácich čerstvých mäkkých syrov študovali Arslan a kol. (2011), ktorý pozorovali u (n = 32) izolátov *Pseudomonas* spp. 100 % rezistenciu na penicilín, čo potvrdzuje zistenia našej práce.

Meng a kol. (2020) vo svojom výskume, kde testoval 15 druhov antibiotík, potvrdili rezistenciu na erytromycín u 95 % izolátov *Pseudomonas* spp.

V súlade s našimi výsledkami aj Jensen a kol. (2001) a Arslan (2011) vo svojich prácach nezaznamenali antibiotickú rezistenciu testovaných izolátov *Pseudomonas* spp. voči gentamicínu.

ZÁVER

Antibiotická rezistencia predstavuje celosvetový problém v oblasti medicíny, životného prostredia, poľnohospodárstva a potravinárstva. Výsledky tejto práce udávajú pomerne vysokú antibiotickú rezistenciu izolátov *Pseudomonas* spp. izolovaných zo SKM. Prítomnosť miltirezistentných baktérií rodu *Pseudomonas* predstavuje rastúcu hrozbu pre zdravie nie len zvierat ale i ľudí.

POUŽITÁ LITERATÚRA

1. ARSLAN, S. et al. Spoilage potentials and antimicrobial resistance of *Pseudomonas* spp. isolated from cheeses. In *Joural of Dairy Science.* ISSN 0022-0302, 2011, vol. 94, p. 5851-5856.

2. Clinical and Laboratory Standards Institute [CLSI] (2021). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. CLSI Document M100. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.
3. DECIMO, M. et al. Antibiotic Resistance Patterns of Gram-Negative Psychrotrophic Bacteria from Bulk Tank Milk. In *Journal of Food Science*. ISSN 1750-384, 2016, vol. 81, p. M944-M951.
4. DECIMO, M. et al. Antibiotic Resistance Patterns of Gram-Negative Psychrotrophic Bacteria from Bulk Tank Milk. In *Journal of Food Science*. ISSN 1750-384, 2016, vol. 81, p. M944-M951.
5. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing [EUCAST]. [online]. [cit. 2022-02-02]. Dostupné na internete: <https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_12.0_Breakpoint_Tables.pdf >.
6. ISO/TS 11059. Technická Norma - Mlieko a mliečne výrobky - Metóda pre stanovenie počtu *Pseudomonas* spp. 2009.
7. JENSEN, L. B. et al. Antimicrobial resistance among *Pseudomonas* spp. and *Bacillus cereus* group isolated from Danish agricultural soil. In *Environment. International*. ISSN 0160-4120, 2001, vol. 26, p. 581-587.
8. JONES, K. E. et al. Global trends in emerging infectious diseases. In *Nature.* ISSN 1476-4687, 2008, vol. 451, p. 99-993.
9. MENA, K.D., GERBA, C. P. Risk assessment of *Pseudomonas aeruginosa* in water. In *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*. ISSN 2197-6554, 2009, vol. 201, p. 71-115.
10. MENG, L. et al. Antibiotic Resistance Patterns of *Pseudomonas* spp. Isolated From Raw Milk Revealed by Whole Genome Sequencing. In *Frontiers in Microbiology*. ISSN 1664-302X, 2020, vol. 3, p. 1005.
11. MENG, L. et al. Characterization of *Pseudomonas* spp. and Associated Proteolytic Properties in Raw Milk Stored at Low Temperatures. In *Frontiers in Microbiology*. ISSN 1664-302X, 2017, vol. 8, p. 2158.
12. MUNSCH-ALATOSSAVA, P., ALATOSSAVA, T. Antibiotic resistance of raw-milk-associated psychrotrophic bacteria. In *Microbiological Research.* ISSN 0944-5013, 2007, vol. 162, p. 115-123.
13. SPILKER, T. et al. PCR-based assay for differentiation of *Pseudomonas aeruginosa* from other *Pseudomonas* species recovered from cystic fibrosis patients. In *Journal of Clinical Microbiology*. ISNN 1098-660X, 2004, vol. 42, p. 2074-2079.

14. STN EN ISO 6887-5. Slovenská Technická Norma - Mikrobiológia potravinárskeho reťazca. Úprava analytických vzoriek, príprava základnej suspenzie a desaťnásobných riedení na mikrobiologické skúšanie. Časť 5: Špecifické pokyny na úpravu mlieka a mliečnych výrobkov. 2020.
15. STN EN ISO 707. Slovenská Technická Norma - Mlieko a mliečne výrobky. Návod na odber vzoriek. 2011.

Kontaktná adresa: Kováčová Mariana, Mgr., PhD., Department of Food Hygiene, Technology and Safety, University of Veterinary Medicine and Pharmacy in Košice, Komenského 73, 041 81 Košice, Slovak Republic; E-mail: mariana.kovacova@uvlf.sk

ŠPECIFICKÉ PRAVIDLÁ PRE ÚRADNÉ KONTROLY V SÚVISLOSTI S REZÍDUAMI PRÍSLUŠNÝCH LÁTOK V MLIEKU

SPECIAL RULES FOR OFFICIAL CONTROLS IN RELATION TO RESIDUES OF RELEVANT SUBSTANCES IN MILK

Kožárová Ivona, Regecová Ivana, Hriciková Simona

Katedra hygieny, technológie a zdravotnej bezpečnosti potravín, UVLF v Košiciach, Komenského 73, 041 81 Košice, Slovenská republika

ABSTRACT

Regulation of the European Parliament and the Council (EU) 2017/625 and its delegated and implementing acts establish a regulatory framework for the enforcement of the European Union food safety legislation related to the use of pharmacologically active substances and their residues. Milk contaminated with antibiotic residues threatens human health. This manuscript approximates specific requirements for the performance of official controls on the use of pharmacologically active substances authorised as veterinary medicinal products or as feed additives and of prohibited or unauthorised pharmacologically active substances and residues thereof and the practical arrangements for the performance of official controls as regards of pharmacologically active substances and their residues in milk.

Key words: milk, pharmacologically active substances, residues, official control

ÚVOD

V nariadení Európskeho parlamentu a Rady (EÚ) č. 2017/625 sa stanovujú pravidlá úradných kontrol a iných úradných činností vykonávaných príslušnými orgánmi členských štátov s cieľom overiť dodržiavanie právnych predpisov Únie, a to okrem iného v oblasti bezpečnosti potravín na všetkých stupňoch výroby, spracovania a distribúcie. Stanovujú sa v ňom osobitné pravidlá pre úradné kontroly týkajúce sa látok, ktorých použitie môže viesť k rezíduám v potravinách a krmive.

Kontinuita pravidiel stanovených v smernici 96/23/ES pre úradné kontroly rezíduí látok s farmakologickým účinkom, ich metabolitov a iných látok prenositeľných do živočíšnych produktov, ktoré by mohli byť škodlivé pre ľudské zdravie je zabezpečená delegovaným nariadením Komisie (EÚ) č. 2022/1644, ktorým sa dopĺňa nariadenie Európskeho parlamentu a Rady (EÚ) č. 2017/625 o špecifické požiadavky na vykonávanie úradných kontrol používania

farmakologicky účinných látok povolených ako veterinárne lieky alebo ako kŕmne doplnkové látky a zakázaných alebo nepovolených farmakologicky účinných látok a úradných kontrol ich rezíduí. V záujme zabezpečenia účinného zacielenia kontrol vo všetkých členských štátoch Únie sa rovnako týmto delegovaným nariadením stanovujú pravidlá pre kombinácie skupín látok a skupín komodít, z ktorých majú členské štáty odoberať vzorky, ako aj pre stratégiu odberu vzoriek vrátane kritérií na vymedzenie obsahu národných plánov založených na riziku a plánov randomizovaného dohľadu a pre vykonávanie súvisiacich úradných kontrol. Kontrole rezíduí podliehajú látky patriace do skupiny A – zakázané alebo nepovolené farmakologicky účinné látky u zvierat určených na výrobu potravín alebo látky, ktoré nie sú povolené na použitie v krmivách pre zvieratá určené na výrobu potravín a látky patriace do skupiny B - farmakologicky účinné látky povolené na použitie u zvierat určených na výrobu potravín, pre ktoré sú v právnych predpisoch Únie stanovené. maximálne hladiny a maximálne limity rezíduí.

ZDRAVOTNÉ POŽIADAVKY NA PRODUKCIU SUROVÉHO MLIEKA A MLEDZIVA

Zdravotné požiadavky na produkciu surového mlieka a mledziva sú ustanovené nariadením Európskeho parlamentu a Rady (ES) č. 853/2004, ktorým sa ustanovujú osobitné hygienické predpisy pre potraviny živočíšneho pôvodu. Surové mlieko znamená mlieko produkované sekréciou mliečnej žľazy zvierat chovaných na farmách, ktoré nebolo zohriate na viac ako 40 °C alebo nebolo podrobené inému ošetreniu, ktoré by malo rovnocenný účinok. Surové mlieko musí pochádzať od zvierat: a) ktoré neprejavujú žiadne príznaky infekčných chorôb prenosných mliekom alebo mledzivom na ľudí; b) ktoré sú v dobrom celkovom zdravotnom stave, neprejavujú žiadne príznaky chorôb, ktoré môžu mať za následok kontamináciu mlieka, a netrpia žiadnymi infekciami pohlavného ústrojenstva s výtokom, ani enteritídou s hnačkou a horúčkou alebo rozpoznateľným zápalom vemena; c) ktoré nemajú žiadne poranenie vemena, ktoré by mohli ovplyvniť mlieko a mledzivo; d) ktorým neboli podané žiadne nepovolené látky alebo produkty alebo ktoré neboli podrobené nezákonnému ošetreniu v zmysle smernice delegovaného nariadenia Komisie (EÚ) č. 2022/1644, e) ktorým boli po podaní povolených produktov alebo látok dodržané ochranné lehoty predpísané pre tieto produkty alebo látky.

Dojenie sa musí vykonávať hygienickým spôsobom, pričom sa musí zabezpečiť najmä, aby sa identifikovali zvieratá, ktoré sa podrobujú liečeniu, ktoré by mohlo zapríčiniť vylučovanie rezíduí do mlieka a mledziva, a aby sa mlieko a mledzivo získané od takýchto zvierat nepoužilo na ľudskú spotrebu pred ukončením predpísanej ochrannej lehoty. Rovnako surové mlieko nesmie byť uvedené na trh, ak: a) obsahuje rezíduá antibiotík v množstve, ktoré

prekračuje hodnotu maximálnych limitov rezíduí; alebo b) kombinovaný celkový obsah rezíduí antibiotických látok prekračuje akúkoľvek maximálnu prípustnú hodnotu. Ak surové mlieko nespĺňa tieto limity, musí to prevádzkovateľ potravinárskeho podniku oznámiť príslušnému orgánu a prijať opatrenia na nápravu tohto stavu.

ÚRADNÉ KONTROLY V SÚVISLOSTI S REZÍDUAMI PRÍSLUŠNÝCH LÁTOK V MLIEKU

V zmysle delegovaného nariadenia Komisie (EÚ) č. 2022/1644 sa surové mlieko (kravské, kozie, ovčie), okrem rutinnej kontroly rezíduí antibiotík prevádzkovateľom potravinárskeho podniku po jeho príjme do spracovateľskej prevádzkarne povinne, v rámci národných plánov kontroly rezíduí založených na riziku súvisiacom s látkami, analyzuje na: a) zakázané látky (chloramfenikol, nitrofurány, dimetridazol, metronidazol, ronidazol a iné nitro-imidazoly a iné látky); b) prípravky na ochranu rastlín a biocídy, ktoré sa môžu používať pri chove zvierat určených na výrobu potravín; c) antimikrobiálne látky nepovolené na liečbu a na použitie v krmivách; d) protizápalové látky, sedatíva a akékoľvek iné farmakologicky účinné látky. Ak existujú náznaky alebo podozrenia, že v prípade rezídua alebo skupín látok, na ktoré sa nevzťahuje povinná kontrola rezíduí, môže dochádzať k nezákonnej liečbe, tieto kontroly sa zahrnú do plánu kontroly založeného na riziku. V prípade farmakologicky účinných látok povolených na použitie u zvierat určených na výrobu potravín, je odber vzoriek zacielený u tých zvierat, u ktorých je najpravdepodobnejšie, že boli liečené konkrétnou farmakologicky účinnou látkou alebo látkou v rámci terapeutickej triedy veterinárnych liekov s cieľom overiť dodržiavanie maximálnych limitov rezíduí a maximálnych hladín. Odber vzoriek sa vykonáva v premenných intervaloch rovnomerne rozložených počas všetkých mesiacov roka alebo príslušného výrobného obdobia.

V prípade plánov randomizovaného dohľadu zameraných na úradné kontroly používania farmakologicky účinných látok povolených ako veterinárne lieky alebo ako kŕmne doplnkové látky a zakázaných alebo nepovolených farmakologicky účinných látok sa surové mlieko (kravské, kozie, ovčie) analyzuje na: a) látky s hormonálnym a tyreostatickým účinkom (stilbény, antityreoidné látky, laktóny kyseliny rezorcylovej vrátane zeranolu) a betaagonisty, a b) kokcidiostatiká a histomonostatiká povolené podľa právnych predpisov Únie, pre ktoré sú stanovené maximálne hladiny a maximálne limity rezíduí. Odobraté vzorky sú kombináciou skupín látok navyše k tomu, čo nie je stanovené v národnom pláne kontroly rezíduí založenom na riziku. Odber vzoriek musí byť náhodný a v prípade látok s hormonálnym a tyreostatickým účinkom a betaagonistov sa vykonáva počas celého produkčného procesu zvierat. V prípade kokcidiostatík a histomonostatík sa odoberajú len vzorky, ktoré neprešli ďalším spracovaním

alebo zmiešaním. Vzorky musia byť reprezentatívnou vzorkou výroby/spotreby v členských štátoch. Plán randomizovaného dohľadu zároveň slúži na zber informácií na účely nasmerovania budúcich kontrol založených na riziku.

V zmysle vykonávacieho nariadenia Komisie (EÚ) č. 2022/1646, ktorým sa ustanovujú jednotné praktické opatrenia na vykonávanie úradných kontrol, pokiaľ ide o používanie farmakologicky účinných látok povolených ako veterinárne lieky alebo ako kŕmne doplnkové látky a zakázaných alebo nepovolených farmakologicky účinných látok a o ich rezíduá, analytické výsledky a interpretácia výsledkov v rámci národných plánov kontroly rezíduí a plánov randomizovaného dohľadu musia byť porovnateľné. Porovnateľnosť výsledkov sa zabezpečuje špecifikáciou typu analytickej metódy, požiadavkami na metódu a charakterizáciou jej pracovných kritérií. V prípade plánu dohľadu nad zakázanými a nepovolenými látkami sú okrem potvrdzujúcich metód na identifikáciu neočakávaného nezákonného použitia povolených, zakázaných a nepovolených farmakologicky účinných látok účinné aj metódy cieleného a necieleného skríningu. V prípade plánu dohľadu nad povolenými látkami sa používajú skríningové alebo potvrdzujúce metódy, ktoré dokážu kvantifikovať rezíduá na alebo pod úrovňou ich maximálnych limitov rezíduí.

Vykonávacie nariadenie Komisie (EÚ) č. 2022/1646 zároveň stanovuje jednotnú minimálnu frekvenciu úradných kontrol so zreteľom na nebezpečenstvá a riziká produktov súvisiace s látkami. Minimálna frekvencia odberu vzoriek v národnom pláne kontroly rezíduí založenom na riziku pre mlieko hovädzieho dobytka, oviec a kôz je pre látky skupiny A a skupiny B stanovená jednotne v počte minimálne 1 vzorka na 30 000 ton ročnej produkcie mlieka. Vzorky sa odoberajú zo všetkých druhov s prihliadnutím na príslušný objem produkcie jednotlivých druhov. Minimálna frekvencia odberu vzoriek v národnom pláne randomizovaného dohľadu individuálne nezahŕňa jednotlivé druhy a ich produkty a stanovuje sa v počte 95 vzoriek pre všetky druhy a ich produkty spoločne. Vzorky sa rozvrhujú medzi jednotlivé druhy a produkty podľa ich podielu na domácej produkcii a spotrebe. 25 % vzoriek sa analyzuje na látky skupiny A a 75 % vzoriek na látky skupiny B.

S cieľom overiť súlad s právnymi predpismi Únie o používaní farmakologicky účinných látok povolených ako veterinárne lieky alebo ako kŕmne doplnkové látky a zakázaných alebo nepovolených farmakologicky účinných látok a ich rezíduí, členské štáty vykonávajú kontroly založené na riziku aj v prípade zvierat určených na výrobu potravín a produktov živočíšneho vstupujúcich do Únie z tretích krajín. Minimálna frekvencia odberu vzoriek v národnom pláne kontroly založenom na riziku v prípade dovozu mlieka (vrátane surového mlieka, mliečnych výrobkov, mledziva a výrobkov na báze mledziva všetkých živočíšnych druhov) z tretích krajín je pre látky skupiny A a skupiny B stanovená na 7 % dovezených zásielok. Na výpočet

minimálnych frekvencií odberu vzoriek používajú členské štáty najaktuálnejšie údaje o počte zásielok vstupujúcich do Únie cez ich hraničné kontrolné stanice aspoň z predchádzajúceho roka alebo maximálne z predposledného roka. Ak je počet zásielok vstupujúcich do Únie nižší ako počet zásielok zodpovedajúci jednej vzorke, odber vzoriek sa môže vykonať raz za dva alebo tri roky. Ak je počet zásielok vstupujúcich do Únie v období troch rokov nižší ako počet zásielok zodpovedajúci jednej vzorke, raz za tri roky sa uskutoční odber aspoň jednej vzorky.

ZÁVER

Členské štáty kontrolujú používanie farmakologicky účinných látok povolených ako veterinárne lieky alebo ako kŕmne doplnkové látky a prítomnosť zakázaných alebo nepovolených farmakologicky účinných látok a ich rezíduí. Rezíduum alebo skupiny látok sa analyzujú vo vzorkách odobratých zo zvierat určených na výrobu potravín, v prípade potreby vrátane ich výkalov, telesných tekutín a nespracovaných živočíšnych produktov, krmiva, vody a vedľajších živočíšnych produktov. V prípade podozrenia na nedodržiavanie alebo zisteného nedodržiavania pravidiel v súvislosti s látkami a rezíduami sú príslušné orgány povinné prijať donucovacie opatrenia nevyhnutné na ochranu verejného zdravia, zistenie príčin nedodržiavania pravidiel a stanovenie miery zodpovednosti za ohrozenia verejného zdravia. Mlieko svojim zložením patrí medzi najkomplexnejšie produkty živočíšneho pôvodu. Zodpovedné používanie látok s farmakologickým účinkom u zvierat určených na produkciu mlieka je preto nevyhnutné.

POĎAKOVANIE

Spracovanie príspevku bolo podporené projektom KEGA č. 015UVLF-4/2021.

POUŽITÁ LITERATÚRA

1. Delegované nariadenie Komisie (EÚ) č. 2022/1644 zo 7. júla 2022, ktorým sa dopĺňa nariadenie Európskeho parlamentu a Rady (EÚ) 2017/625 o špecifické požiadavky na vykonávanie úradných kontrol používania farmakologicky účinných látok povolených ako veterinárne lieky alebo ako kŕmne doplnkové látky a zakázaných alebo nepovolených farmakologicky účinných látok a úradných kontrol ich rezíduí. Úradný vestník Európskej únie L 248, 26. 9. 2022, s. 3–17.
2. Nariadenie Európskeho parlamentu a Rady (ES) č. 853/2004 z 29. apríla 2004, ktorým sa ustanovujú osobitné hygienické predpisy pre potraviny živočíšneho pôvodu. Úradný vestník Európskej únie L 139, 30. 4. 2004, s. 55–205.

3. Nariadenie Európskeho parlamentu a Rady (EÚ) č. 2017/625 z 15. marca 2017 o úradných kontrolách a iných úradných činnostiach vykonávaných na zabezpečenie uplatňovania potravinového a krmivového práva a pravidiel pre zdravie zvierat a dobré životné podmienky zvierat, pre zdravie rastlín a pre prípravky na ochranu rastlín. Úradný vestník Európskej únie L 95, 7. 4. 2017, s. 1–142.
4. Smernica Rady (ES) č. 96/23 o opatreniach na monitorovanie určitých látok a ich rezíduí v živých zvieratách a živočíšnych produktoch a o zrušení smerníc 85/358/EHS, 86/469/EHS a rozhodnutí 89/187/EHS a 91/664/EHS. Úradný vestník Európskej únie L 125, 1996, s. 10–32.
5. Vykonávacie nariadenie Komisie (EÚ) č. 2022/1646 z 23. septembra 2022 o jednotných praktických opatreniach na vykonávanie úradných kontrol, pokiaľ ide o používanie farmakologicky účinných látok povolených ako veterinárne lieky alebo ako krmné doplnkové látky a zakázaných alebo nepovolených farmakologicky účinných látok a o ich rezíduá, o špecifickom obsahu viacročných národných plánov kontroly a špecifických opatreniach na ich prípravu. Úradný vestník Európskej únie L 248, 26. 9. 2022, s. 32–45.

Kontaktná adresa: Kožárová Ivona, Department of Food Hygiene, Technology and Safety, University of Veterinary Medicine and Pharmacy in Košice, Komenského 73, 041 81 Košice, Slovak Republic; E-mail: ivona.kozarova@uvlf.sk

STANOVENÍ LAKTÓZY V KOBYLÍM MLÉCE POMOCÍ FT-NIR SPEKTROMETRIE

DETERMINATION OF LACTOSE IN MARE'S MILK BY FT-NIR SPECTROSCOPY

Králová, M., Vorlová, L., Pospíšil, J., Navrátilová, P.

Ústav hygieny a technologie potravin živočišného původu a gastronomie, FVHE, Veterinární univerzita Brno, Palackého tř. 1946/1, 612 42 Brno, Česká republika

ABSTRACT

The aim of this study was to verify the possibility of using FT-NIR spectroscopy for the determination of lactose in mare's milk. Sixty samples were used to calibrate the instrument by partial least squares (PLS) method. Spectra were measured in the reflectance mode with a transflectance cell between 10000 and 4000 cm^{-1}, averaging 100 scans. The following statistical values were obtained: correlation coefficient (R) = 0.904 and standard error of calibration (SEC) = 0.124. The calibration model developed were verified by cross validation with results corelation coefficient (R) = 0.868 and standard error of validation (SECV) = 0.144. A statistically insignificant difference was found between the reference and predicted values ($p > 0.05$). The study showed that FT-NIR is a potentially useful technique for evaluating the lactose content in mare's milk.

Keywords: milk, near infrared spectroscopy, lactose

ÚVOD

Laktóza je hlavním sacharidem kobylího mléka. Pro její vyšší obsah je lépe přijímáno jako náhrada mléka mateřského, příznivě ovlivňuje složení mikroflóry gastrointestinálního traktu a podporuje absorpci vápníku ve střevě, což je příznivé pro mineralizaci kostí v prvních měsících života (Navrátilová *et al*., 2016).

V současné době se prosazují časově nenáročné metody, které jsou vhodné pro rutinní analýzu a lze je použít i on-line při výrobě potravin. Klasické metody jsou přesné a reprodukovatelné, ale časově velmi náročné. Nelze je však opomenout, protože se používají jako standardizační metody ke kontrole přesnosti a správnosti výsledků získaných instrumentálními metodami. Mezi tyto metody patří i blízká infračervená spektrometrie (Dvořák *et al*., 2016). Jednoduchost, neinvazivní a nedestruktivní vlastnosti blízkých infračervených (NIR) a infračervených spektrometrů s Fourierovou transformací (FT-NIR)

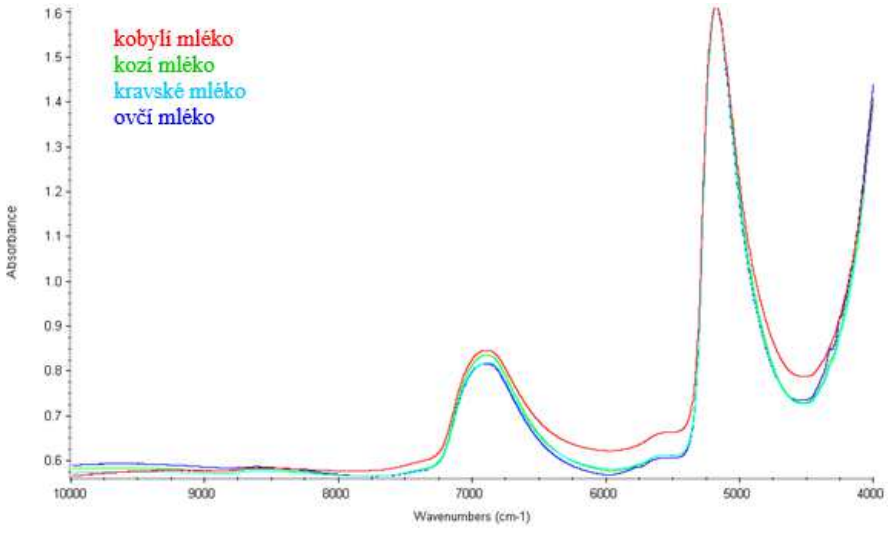
spolu s nízkou cenou a přenosností činí tyto instrumentální techniky vynikajícími nástroji volby (Fakayode *et al*., 2020).

Cílem práce bylo využití blízké infračervené spektrometrie s Fourierovou transformací pro stanovení laktózy v kobylím mléce.

MATERIÁL A METODIKA

Vzorky kobylího mléka (n = 60) pocházely od 10 plemenných kobyl ohřebených v období březen až květen 2016, s frekvencí odběru 1x za měsíc po dobu 6 měsíců. Koncentrace laktózy byla stanovena enzymovou metodou MEGAZYME (Megazyme International Ireland Ltd.).

Vzorky mléka byly homogenizovány zahřátím na 40 °C, promíchány, následně ochlazeny na 20 °C a proměřeny na FT-NIR spektrometru NIR Nicolet Antaris (Thermo Electron Corporation, USA) ve spektrálním rozsahu 10 000 - 4 000 cm^{-1}, se spektrálním rozlišením 8 cm^{-1} a se 100 scany (Jankovská a Šustová, 2003). Spektra (obrázek 1) byla měřena na integrační sféře v režimu reflektance s použitím transflektanční kyvety o tloušťce vrstvy 0,1 mm. Každý vzorek byl proměřen třikrát. Pro vytvoření kalibračního modelu metodou částečných nejmenších čtverců (PLS) v programu TQ Analyst verze 6.2.1.509 (Thermo Electron Corporation, Madison, USA) bylo použito průměrné spektrum.



Obrázek č. 1: Spektra syrového mléka (z databáze pracoviště)

VÝSLEDKY A DISKUSE

Pomocí FT-NIR spektrometrie s využitím algoritmu PLS byl vytvořen kalibrační model pro stanovení obsahu laktózy v kobylím mléce. Byla využita funkce *Merge Like Standards*, která umožnila vytvoření kompozitního standardu, vypočítaného jako průměrné spektrum

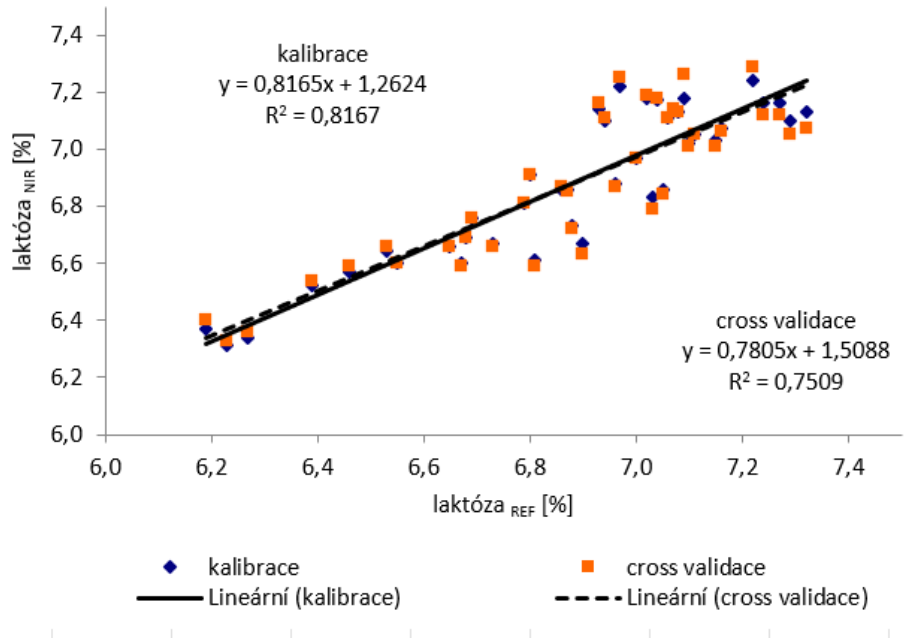
z naměřených kalibračních standardů s identickými údaji o koncentraci stanovované složky. Kompozitní standard pak reprezentuje všechny koncentračně korespondující spektra (Nicolet CZ, 2011). Pro identifikaci odlehlých spekter (n = 6) byly použity diagnostiky *Spectrum Outlier* a *Leverage*. Region pro kalibraci byl nalezen v rozmezí 7 139,18 – 4 744,03 cm^{-1}. Byla použita matematická úprava spekter 2. derivací. Metodou křížové validace byla ověřena spolehlivost kalibračního modelu. Naměřené výsledky pro kobylí mléko (viz tabulka 1) byly posouzeny na základě korelace mezi referenčními a predikovanými hodnotami, směrodatných odchylek kalibrace a křížové validace (RMSEC a RMSECV).

Tabulka č. 1: Naměřené kalibrační a validační výsledky pro laktózu kobylího mléka ve srovnání s výsledky jiných autorů

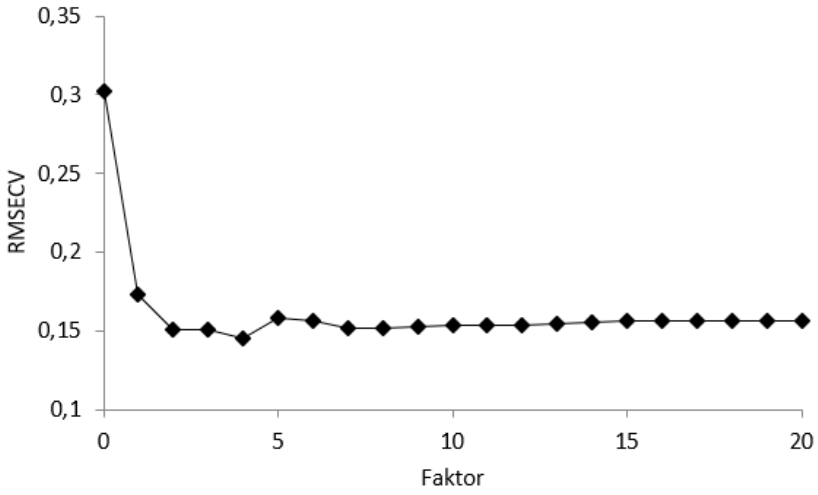
Druh mléka	Kalibrace				Validace				*Liter. zdroj*
	R	R^2	SEC	CCV [%]	R	R^2	SECV	PCV [%]	
kobylí	0,904	0,817	0,124	1,80	0,868	0,751	0,144	2,09	
kozí	0,997	x	0,011	0,24	0,935	x	0,050	1,09	3
kravské	0,931	x	0,080	1,63	0,750	x	0,150	3,05	7
kravské	x	0,960	0,050	x	x	0,920	0,060	x	8
kravské	0,934	0,873	0,285	7,38	0,826	0,682	0,464	x	11*
ovčí	0,999	0,998	0,027	0,61	0,998	0,995	0,047	1,06	13
ovčí	0,980	x	0,070	1,49	0,962	x	0,090	1,91	14

R – korelační koeficient, R^2 – koeficient determinace, SEC – RMSECV průměrná chyba kalibrace, CCV – kalibrační variační koeficient, SECV – RMSECV průměrná chyba křížové validace, PCV – predikční variační koeficient, x – hodnota neuvedena, * – kolostrum

Mezi hodnotami byla nalezena těsná závislost (viz obrázek 2), to poukazuje na robustnost kalibračního modelu, kterou potvrdila i křivka PRESS (hodnota sumy čtverců predikované reziduální chyby) a počet PLS faktorů 2 (viz obrázek 3). Spolehlivost kalibrace byla dále posouzena z výpočtů kalibračního variačního koeficientu (CCV) a predikčního variačního koeficientu (PCV), které popisují kalibraci za velmi spolehlivou (viz tabulka 1). Podle Albanell *et al*. (1999) je za velmi spolehlivou považována hodnota CCV pod 5 % a hodnota PCV pod 10 %. Ke statistickému srovnání byl použit párový t-test, kterým byl zjištěn mezi referenčními a predikovanými hodnotami statisticky nevýznamný rozdíl ($p > 0,05$). Výsledky statistického testování jsou uvedeny v tabulce 2.



Obrázek č. 2: Kalibrační a validační výsledky pro laktózu v kobylím mléce



Obrázek č. 3: Funkce PRESS

Tabulka č. 2: Výsledky statistického testování

Kalibrovaná veličina	n	xREF	xNIR	|xREF|-|xNIR|	p
Laktóza (%)	41	6,879	6,878	0,001	0,958

n – počet vzorků v kalibračním modelu při použití funkce *Merge Like Standards*, xREF – průměr referenčních hodnot, xNIR – průměr predikovaných hodnot, |xREF|-|xNIR| - rozdíl mezi hodnotami referenčními a predikovanými, p – pravděpodobnost vypočítaná párovým t-testem

Naměřené výsledky byly porovnány s hodnotami, které zjistili různí autoři pro různé druhy mléka (tabulka 1). Autorský kolektiv Mohamed *et al*. (2021) se zabývali srovnáním stanovení laktózy v kravském a velbloudím mléce pomocí metod střední a blízké infračervené spektrometrie. Mezi těmito metodami byly zjištěny korelace R = 0,821 pro kravské a R = 0,818 pro velbloudí mléko. NIR spektrometrii pro on-line měření laktózy v oslím mléce použili Altieri *et al*. (2016). Analýzou kobylího mléka NIR spektrometrií se také zabývali Hayes a Younge (2021). Pomocí algoritmu *Principal component analysis* (PCA) získali nejlepší model pomocí druhé derivace a Savitsky-Golay filtrem s RPD (*Ratio of Performance to Deviation*) 1,13, R^2 0,99 a RMSE (*Root Mean Square Error*) = 2,012. Zatímco pro R^2 se ukázalo, že data dobře odpovídají modelu, RPD a hodnoty RMSE naznačují, že model nepředpovídá přesně.

ZÁVĚR

Pomocí blízké infračervené spektrometrie s Fourierovou transformací byl, v kombinaci s metodou částečných nejmenších čtverců (PLS), vytvořen kalibrační model pro stanovení obsahu laktózy v kobylím mléce. Posouzení výsledků bylo provedeno na základě korelace mezi referenčními a vypočtenými hodnotami z kalibračních rovnic a na základě směrodatných odchylek kalibrace a validace (SEC, SECV). Studie ukázala, že FT-NIR je potenciálně vhodná technika pro hodnocení obsahu laktózy v kobylím mléce.

PODĚKOVÁNÍ

Práce vznikla za finanční podpory projektu IGA VFU Brno 203/2016/FVHE. Poděkování patří také Mgr. Simoně Horákové, která prováděla odběr vzorků.

LITERATURA

1. Albanell, E., Cáceres, P., Caja, G., Molina, E., Gargouri, A. Determination of fat, protein and total solids in ovine milk by near-infrared spectroscopy. *Journal of AOAC International,* 1999, vol. 82, p. 753-758.
2. Altieri, G., Genovese, F., Admane, N., Di Renzo, G. C. On-line measure of donkey's milk properties by near infrared spectrometry. *LWT – Food Science and Technology*, 2016, vol. 69, p. 348-357.
3. Dračková, M., Hadra, L., Janštová, B., Navrátilová, P., Přidalová, H., Vorlová, L. Analysis of goat milk by near-infrared specroscopy. *Acta Veterinaria Brno*, 2008, vol. 77, p. 415-422.
4. Dvořák, L., Šustová, K., Mlček, J. Blízká infračervená spektroskopie jako pomocník při kontrole kvality potravin. *Chemické Listy*, 2016, vol. 110, p. 868-873.

5. Fakayode, S. O., Baker, G. A., Bwambok, D. K., Bhawawet, N., Elzey, B., Siraj, N., Macchi, S., Pollard, D. A., Perez, R. L., Duncan, A. V., Warner, I. M. Molecular (Raman, NIR, and FT-IR) spectroscopy and multivariate analysis in consumable products analysis. *Applied Spectroscopy Reviews*, 2020, vol. 55, no. 8, p. 647-723.
6. Hayes, E., Younge, B. Analysis of mare's milk by near infrared spectroscopy. *Animal –Science Proceedings*, 2021, vol. 12, p. 156.
7. Jankovská, R., Šustová, K. Analysis of cow milk by near-infrared spectroscopy. *Czech Journal of Food Sciences*, 2003, vol. 21, no. 4, p. 123-128.
8. Melfsen, A., Hartung, E., Haeussermann, A. Accuracy of in-line milk composition analysis with diffuse reflectance near-infrared spectroscopy. *Journal of Dairy Science*, 2012, vol. 95, p. 6465-6476.
9. Mohamed, H., Nagy, P., Agbaba, J., Kamal-Eldin, A. Use of near and mid infra-red spectroscopy for analysis of protein, fat, lactose and total solids in raw cow and camel milk. *Food Chemistry*, 2021, vol. 334, p. 127436.
10. Navrátilová, P., Borkovcová, I., Pospíšil, J. Nutriční a terapeutické vlastnosti kobylího mléka. *Mlékařské listy*, 2016, vol. 27, p. 16-19.
11. Navrátilová, P., Hadra, L., Dračková, M., Janštová, B., Vorlová, L., Pavlata, L. Use of FT_NIR spectroscopy for bovine colostrum analysis. *Acta Veterinaria Brno*, 2006, vol. 75, p. 57-63.
12. Nicolet CZ. Spektroskopický software TQ Analyst, stručný návod. Praha, 2011, 113 s.
13. Procházková, Z., Dračková, M., Remešová, A., Janštová, B., Přidalová, H., Vorlová, L. Využití blízké infračervené spektroskopie pro stanovení základních fyzikálně-chemických parametrů ovčího mléka. *Potravinárstvo*, 2010, vol. 4, no. 1, p. 70-73.
14. Šustová, K., Kuchtík, J., Kráčmar, S. Analysis of ewe's milk by FT near infrared spectroscopy: measurement of samples on Petri dishes in reflectance mode. *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis*, 2006, vol. 54, no. 2, p. 131-138.

Kontaktní adresa: prof. MVDr. Lenka Vorlová, Ph.D., Ústav hygieny a technologie potravin živočišného původu a gastronomie, Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární univerzita Brno, Palackého tř. 1946/1, 612 42 Brno, Česká republika; E-mail: vorloval@vfu.cz

VPLYV ENVIROMENTÁLNYCH FAKTOROV NA BAKTERIÁLNU KONTAMINÁCIU OVČIEHO MLIEKA

THE EFFECT OF ENVIRONMENTAL FACTORS ON BACTERIAL CONTAMINATION OF SHEEP´S MILK

Lacková Zuzana[1], Zigo František[1], Farkašová Zuzana[1], Arvaiová Juliana[1], Halás Šimon[1], Vargová Mária [2], Pecka-Kielb Ewa[3]

[1]Katedra výživy a chovu zvierat, Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, Komenského 73, Košice; [2] Katedra verejného veterinárskeho lekárstva a welfare zvierat, Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, Komenského 73, Košice; [3] Department of Animal Physiology and Biostructure, Wroclaw University of Environmental and Life Sciences, Norwida 31, Wroclaw, Poland

ABSTRACT

The aim of the work was to monitor the microbiological load of the raw sheep's milk and the sources of contamination with *Staphylococcus* spp. Two sheep farms with hand and machine milking technology were included in the work with 370 pcs and 250 pcs of sheep, respectively. Over a three-year period, the microbiological load of the raw sheep's milk was monitored using bacteriological examination methods of 4,332 individual milk samples and 432 swabs from the surfaces of the milking parlor, cisterns and work clothes. In both farms, a significant occurrence of *Staphylococcus* spp. was confirmed, which represented 76% of all positive samples in the farm with machine milking technology and 68% in the farm with hand milking. Likewise, a significant proportion of staphylococci were isolated in swabs from the environment of the milking parlor during the machine milking and milk cisterns during hand milking, which is related to the permanent exposure of the environment to pathogens.

Key words: mastitis, sheep milk, *Staphylococcus spp*., environment, contamination

ÚVOD

Mastitída zahŕňa zápalovú reakciu vo vemene. Na vzniku zápalu sa vo väčšine prípadov podieľajú mikroorganizmy. Tieto prestupujú z povrchu mliečnej žľazy do mliečneho kanála. Významným faktorom pre vznik zápalovej reakcie je makroorganizmus a jeho fyzikálna a chemická obrana. Infekčné mikroorganizmy sú schopné rásť a rozmnožovať sa v mliečnej žľaze a prenášať sa z bahnice na bahnicu procesom dojenia, hlavne rukami dojičov, dojacím zariadením, kontaminovanou vodou, mliekom, nástrojmi a predmetmi, ktoré sa používajú

v čase dojenia. Nešpecifické mikroorganizmy pochádzajú z vonkajšieho prostredia predovšetkým z podstielky, hnoja, pôdy a do vemena prechádzajú nedokonale uzavretým ceckovým kanálikom. Cieľom zápalového procesu je eliminovať infekčné agensy a prinavrátiť funkčnosť poškodeného sekrečného epitelu mliečnej žľazy, teda obnoviť zníženú mliečnu produkciu vo vemene (Tančin, 2008).

Potenciál patogenity *Staphylococcus spp.* ako jednej skupiny baktérií, ktorá celosvetovo predstavuje významný podiel etiológie pri mastitídach oviec (Bergonier et al., 2003; Contreras et al., 2007; Fagundes et al., 2010). Za zdroj rezistentných stafylokokov v chovoch oviec bývajú označované skryté intramammárne infekcie polovičiek vemena, čo v praxi je možné potvrdiť iba bakteriologickým vyšetrením (Ergün et al., 2009; Kiosis et al., 2007).

Cieľom práce bolo sledovať mikrobiologickú zaťaženosť produkovaného ovčieho mlieka a zdroje kontaminácie *Staphylococcus spp.* v dvoch chovoch oviec s rozdielnou technológiou dojenia.

MATERIÁL A METODIKA

Do sledovania boli zaradené dva chovy oviec plemena zošľachtená valaška s rozdielnym spôsobom dojenia. V prvom chove sa 370 oviec dojilo technológiou strojového dojenia v dojárni (chov A), v druhom bolo 250 oviec ručne dojených v klasických salašníckych podmienkach (chov B). V priebehu trojročného obdobia bola sledovaná mikrobiologická zaťaženosť produkovaného ovčieho mlieka metódami bakteriologického vyšetrenia individuálnych vzoriek mlieka a sterov z povrchov, pri ktorých sa predpokladá kontakt so surovým nadojeným mliekom. Vyšetrenie sme vykonali trikrát počas obdobia laktácie s nasledovným časovým odstupom: 1. vyšetrenie (apríl) uskutočnené po odstave jahniat počas prvého týždňa dojenia; 2. vyšetrenie (júl) približne v polovici sezóny dojenia a 3. vyšetrenie (september) týždeň pred záverom sezóny dojenia.

Vzorky mlieka sme odoberali do sterilných, vopred označených skúmaviek z ľavej a pravej polovičky vemena každej ovce za aseptických podmienok (umyté, osušené konce ceckov boli dezinfikované 70 % etylalkoholom). Bakteriologické vyšetrenie individuálnych vzoriek ovčieho mlieka boli vykonané podľa zásad ako uvádzajú autori Fthenakis 1994; Mørk et al.2004. Dôraz bol kladený na aseptický odber a transport zmiešaných individuálnych vzoriek ovčieho mlieka určených na bakteriologické vyšetrenie. Inokulum každej vzorky ovčieho mlieka bolo nanesené na platne s 5% krvným agarom, inkubované pri 37°C a po 24 hodinách odčítavané. Pri poraste viac ako 7 kolónií jedného druhu boli kolónie preočkovávané a kultivované na selektívnych živných pôdach. Identifikácia *Staphylococcus spp.* suspektných bakteriálnych kultúr prebiehala podľa posúdenia rastových vlastností baktérii na živných

pôdach (5 % krvný agar, Agar N° 110, Baird-Parker agar, Brilliance^{TM} UTI Clarity Agar (OXOID Ltd. Basingstoke, Hants, UK) - tvorba pigmentu a hemolýzy, potvrdenie Gram pozitivity, tvorby katalázy, potvrdenie voľnej a viazanej koagulázy a ďalších znakov. Určenie jednotlivých druhov bolo vykonané súpravou STAPHYtest 24 a vyhodnotené programom TNW 7.0 ProAuto (Erba-Lachema, Brno, ČR) s pravdepodobnosťou správneho určenia druhu nad 90%. Funkčnosť súpravy bola kontrolovaná pomocou kmeňa *Staphylococcus aureus* CCM 7113 (CCM, Masarykova Univerzita, Brno, ČR).

Stery pomocou detoxikovaných tampónov boli odobraté pri strojovom dojení z konštrukcie dojárne, podlahy, rúk a pracovných odevov dojičov. Pri ručnom dojení boli stery odoberané z každej nerezovej kanvy, prostredia, rúk a pracovných odevov dojičov. Z každého sledovaného povrchu sa odobralo v rámci jedného odberu 6 sterov. Vzorky sterov boli po kultivácii v živnom bujóne vyočkované na selektívne živné pôdy a vyhodnotené postupmi ako pri vyšetrení vzoriek mlieka.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Staphylococcus spp. tvoria viac ako 50% izolovaných baktérií z mlieka. Výskyt 713 izolácií stafylokokov zo všetkých vyšetrených 2618 vzoriek v priebehu troch sezón dojenia oviec v chove A so strojovým dojením predstavuje 27,1 %, čo v rámci celkového nálezu 35,7% (938 všetkých bakteriologicky pozitívnych) tvorí podiel až 75,9%. Pri porovnaní rovnako hodnotených parametrov v chove B s ručným dojením 271 izolácií *Staphylococcus spp*. (15,6%) zo všetkých vyšetrených 1714 vzoriek v chove s ručným dojením, čo z počtu pozitívnych vzoriek 395 ks činí podiel 68,6 % (Tabuľka 1).

Za hlavného patogéna, ktorý spôsobuje väčšinu klinických mastitíd v chovoch vysokoprodukčných bahníc sa považuje *Staphylococcus aureus*. Subklinické formy intramamárnej infekcie sú prisudzované koaguláza negatívnym stafylokokom (Švrček a kol., 2006). S podobným výrokom prichádza aj Ozenc (2011), ktorý poznamenáva, že *Staphylococcus aureus* je uznávaný po celom svete ako hlavný patogén, ktorý spôsobuje klinické alebo subklinické intramamárne infekcie u bahníc. Výskyt bakteriologicky pozitívnych vzoriek mlieka v oboch chovoch mal v priebehu sledovaného obdobia klesajúcu tendenciu. Pri porovnaní výskytu *Staphylococcus spp*. došlo v treťom roku sledovania k ich nárastu v chove s ručným dojením. V chove A so strojovým dojením bol zaznamenaný vyšší výskyt *Staphylococcus spp*. v prvých dvoch rokoch sledovania (43,0% a 25,0% oproti 21,1% a 11,8% v chove B).

Tabuľka č. 1, Výskyt *Staphylococcus spp*. v individuálnych vzorkách ovčieho mlieka v chovoch oviec s rozdielnou technológiou dojenia

Chov/obdobie hodnotenia		Počet vyšetrených (n) a bakteriologicky pozitívnych (np) vzoriek mlieka			Výskyt *Staphylococcus spp.* v individuálnych vzorkách ovčieho mlieka	
Chov oviec	Rok	n	np	%	n	%
A	1.	902	488	54,1	387	43,0
	2.	836	296	35,4	209	25,0
	3.	880	154	17,5	117	13,3
	Spolu	2618	938	35,7	713	27,1
B	1.	451	127	28,1	95	21,1
	2.	642	138	21,4	76	11,8
	3.	621	130	20,9	100	16,1
	Spolu	1714	395	23,0	271	15,8

Tabuľka č. 2, Počet vyšetrených a bakteriologicky pozitívnych vzoriek sterov z povrchov prostredia prvovýroby mlieka v chovoch oviec v priebehu trojročného sledovania

Chov/miesta odberu sterov		Počet vyšetrených (n) a bakteriologicky pozitívnych (np) vzoriek		
Chov oviec	Miesta odberu sterov	n	np	%
A	prostredie	54	41	76,0
	dojacie zariadenie	54	36	66,6
	ruky dojičov	54	17	31,5
	pracovné odevy dojičov	54	24	44,5
	Spolu	216	118	54,65
B	prostredie	54	23	42,5
	nerezová kanva	54	24	44,3
	ruky dojičov	54	20	37,0
	pracovné odevy dojičov	54	14	26,0
	Spolu	216	81	37,45

Vzhľadom na svoje zloženie a vlastnosti je mlieko ideálnym substrátom pre široké spektrum mikroorganizmov. Sekundárna kontaminácia mlieka, ktorá nastáva po jeho vydojení z vemena, môže mať rôzne zdroje - fekálie, podstielku, krmivo, prach, ale aj nedostatočne

sanitované stroje a zariadenia, s ktorými mlieko prichádza do kontaktu (Laktičová et al., 2006), voda, ruky a odev dojičov (Fabianová et al., 2010). Prehl'ad o počte bakteriologicky pozitívnych vzoriek sterov, ako aj o výskyte *Staphylococcus spp*. vo vzorkách sterov z technológií, rúk a odevov dojičov odobratých v priebehu troch rokov sledovania uvádzajú tabuľky 2 a 3. Vyšší výskyt bakteriologicky pozitívnych vzoriek sterov bol zaznamenaný v chove A, a to hlavne zo sterov z prostredia (76,0%) a dojacieho zariadenia (66,6%). Výskyt koagulázopozitívnych kmeňov z hľadiska množstva vyšetrených sterov bol minimálny. V chove A predstavoval v priemere 1% a v chove B 2,8%. Najvýznamnejším zdrojom *Staphylococcus spp*. v chove A predstavuje povrch dojacieho stroja (35,2%), nasleduje prostredie dojárne (27,9%), ruky dojičov 13% a pracovné odevy dojičov (5,5%). V chove s ručným dojením najväčším zdrojom kontaminácie nerezová kanva 20,5%, prostredie a ruky dojičov zhodne po 16,8% a nemalý význam pri ručnom dojení predstavujú pracovné odevy dojičov (13%).

Tabuľka č. 3, Výskyt *Staphylococcus spp.* v steroch z povrchov prostredia prvovýroby mlieka v chovoch oviec v priebehu trojročného sledovania

Chov/miesta odberu sterov		Výskyt *Staphylococcus spp.* v steroch technológie strojového a ručného dojenia					
Chov oviec	Miesta odberu sterov	Koaguláza pozitívne		Koaguláza negatívne		Spolu	
		n	%	n	%	n	%
A	prostredie	1	2,0	14	25,8	15	27,9
	dojacie zariadenie	0	0,0	19	35,2	19	35,2
	ruky dojičov	1	2,0	6	11,0	7	13,0
	pracovné odevy dojičov	0	0,0	3	5,5	3	5,5
	Spolu	2	1,0	42	19,4	44	20,4
B	prostredie	2	3,8	7	13,0	9	16,8
	nerezová kanva	3	5,5	8	14,9	11	20,5
	ruky dojičov	1	2,0	8	14,9	9	16,8
	pracovné odevy dojičov	0	0,0	7	13,0	7	13,0
	Spolu	6	2,8	30	14,0	36	16,7

ZÁVER

Potvrdenie výskytu *Staphylococcus* spp. a zároveň výrazného podielu koagulázonegatívnych stafylokokov vo vzorkách mlieka a sterov upozorňujú na trvalé riziko expozície oviec environmentálnymi patogénmi s možným výskytom zdravotných rizík v prípade spracovania nepasterizovaného ovčieho mlieka na hrudkový syr pre priamy konzum bez tepelnej úpravy. Výskyt *Staphylococcus* spp., aj celkové ročné nálezy v oboch chovoch mali klesajúcu tendenciu. Zo vzájomného porovnania priemerných hodnôt ročného výskytu *Staphylococcus* spp. obidvoch chovov vyplýva, že počas tretieho roku sledovania nastala zmena v prospech vyššieho výskytu stafylokokov v chove s ručným dojením.

POĎAKOVANIE

Realizácia experimentu bola finančne podporená grantami KEGA č. 009UVLF-4/2021 a VEGA č. 1-0162-23.

POUŽITÁ LITERATÚRA

1. BERGONIER D., - DE CRÉMOUX, R., - RUPP, R., - LAGRIFFOUL, G., - BERTHELOT, X. Mastitis of dairy Small ruminants. In *Veterinary Research*. 2003, vol. 34, p. 689-716. DOI: 10.1051/vetres:2003030
2. CONTRERAS, A., - SIERRA, D., - SÁNCHEZ, A.et al: Mastitis in small ruminants. In *Small Ruminant Res*., 2007, vol. 68, p. 145-153.
3. ERGÜN, Y., - ASLANTAS, Ö., - DOGRUER, G. et al.: Prevalence and etiology of subclinical mastitis in Awashi dairy ewes in southern Turkey. In *Turkish Journal of Veterinary & Animal Science,* 2009, vol. 33, no. 6, p. 477- 483.
4. FABIANOVÁ, J., - DUCKOVÁ, V., - ČANIGOVÁ, M., - KROČKO, M. Presence of Enterococci in cow milk and their antibiotic resistance. In *Potravinarstvo*, 2010, vol. 4, no. 2, p. 17-21.
5. FAGUNDES, H., - BARCHES, L., - FILHO N.A., - MENEZES FERREIRA, M.L., - FERNANDES OLIVEIRA C.A.. Occurrence of Staphylococcus aureusin raw milk produced in dairy farms in Sao Paulo Stat, Brazil. In *Brazilian Journal of Microbiology*, 2010, vol. 41, no. 2, p. 376-380
6. FTHENAKIS, G. C. Prevalence and aetiology of subclinical mastitis in ewes of Southern Greece. In *Small Ruminant Research*. 1994, vol. 13, p. 293 – 300.
7. KIOSSIS, E., - BROZOS, C.N., - PETRIDOU, E., - BOSCOS, C.: Program forthecontrol of subclinical mastitis in dairy Chios breed ewes during lactation. In *Small Ruminant Res.* 2007, vol. 73, p. 194-199.

8. LAKTIČOVÁ, K., - ONDRAŠOVIČ, M., - ONDRAŠOVIČOVÁ, O., - SASÁKOVÁ, N., VARGOVÁ, M., - ŠMIRJÁKOVÁ, S., - JURIŠ, P. Čistenie a dezinfekcia v potravinárskom priemysle. In *Slovenský veterinársky časopis*, 2006, no. 3, p. 150- 152.
9. MØRK, T., - WAAGE, S., - TOLLERSRUD, T., - KVITLE, B., - SVILAND, S. Clinicalmastitis in ewes, bacteriology, epidemiology and clinicalfeatures. In *Acta Veteterinaria Scandinavica* 2007, vol. 49, p. 23.
10. OZENC, E. et al. The importance of Staphyloccoci and threshold value of somatic cell count diagnosis of subclinical mastitis in Pirlak sheep at mid-lactation. In *Reproduction in Domestic Animals*. 2011, vol. 6, p. 970 – 974.
11. ŠVRČEK, Š. a kol. *Infekčné choroby zvierat, 1.časť, bakteriálne a mykotické choroby.* Košice: UVLF, 2006. s. 441 – 452. ISBN 80-8077-037-9.
12. TANČIN, V. – TANČINOVÁ, D.: *Strojové dojenie mlieka a kvalita mlieka*. Nitra: SCPV, 2008. s. 47 – 74, ISBN 978-80-88872-80-1.

Kontaktná adresa: MVDr. Zuzana Lacková, PhD., Department of animal nutrition and husbandry, University of Veterinary Medicine and Pharmacy in Košice, Komenského 73, 04181 Košice, Slovak Republic, E-mail: zuzana.lackova@uvlf.sk

ENKAPSULOVANÉ PROSPEŠNÉ KMENE A ICH STABILITA V OVČO-KOZÍCH JOGURTOCH

ENCAPSULATED BENEFICIAL STRAINS AND THEIR STABILITY IN EWES -GOATS YOGHURTS

Lauková Andrea, Kandričáková Anna, Pogány Simonová Monika

Centrum biovied SAV v.v.i. Ústav fyziológie hospodárskych zvierat, Šoltésovej 4-6, 04 01 Košice, Slovenská republika

ABSTRACT

A form in which beneficial bacteria have benn applied in a product is very important. If those bacteria have to fulfil their aim in a product, their application form has to prove their stability. Therefore, in this study was controlled stability of beneficial strains in yoghurts made from ewes-goats milk which are available at the market. They were applied in the simplest encapsulated form as dry freezing form represents. *Lacticaseibacillus paracasei* LPa12/1, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* MK1/3, *Enterococcus mundtii* EM2/2 were isolated from raw goats milk and *Lactiplantibacillus plantarum* LP17L/1 was from ewes milk cheese. To differ them from the other microbiota, their by rifampicin labeled variants were prepared and encapsulated (dry frozen). They were applied into yoghurts in amount 10^9 CFU/g. Yoghurts were maintained at 4˚C and the counts of strains were checked on MRS agar with rifampicin and/or on M-Enterococcus agar with rifampicin (100 µg) continually. Also pH value was checked. While LPa12/1, Ll MK1/3 and LP17L/1 survived sufficiently in yoghurts also at day 10 (up to 10^5 CFU/g resp. 10^2 CFU/g) meaning their counts were more or less stable, EM 2/2 was reduced from the initial count 4.0 (24 h) to less than 1.0 CFU/g (log 10) at day 10. The pH was not influenced. Encapsulation-dry freezing looks as suitable form to apply beneficial strains in the products to keep their stability; however, in dependance on the applied strain species.

Key words: ewes-goats milk yoghurt, encapsulation, beneficial strains, surviving

ÚVOD

Jogurty patria medzi obľúbené mliekarenské produkty. Tie, vyrobené z kravského mlieka sú najčastejšou súčasťou stravovania našej populácie. Avšak stále viac si získavajú obľubu i jogurty pripravené z ovčo-kozieho mlieka (Slottová et al., 2013; Lauková et al., 2023). Tie sú vítané najmä tou časťou populácie, ktorá trpí laktózovou intoleranciou a takýto typ jogurtov je pre týchto ľudí prijateľnejší. Najmä vtedy, ak sú obohatené špecifickými aditívnymi

baktériami, ktoré môžu prospešne pôsobiť na ich imunitný systém, čím výrobok napĺňa charakter funkčnej potraviny. Ak však prospešné kmene majú splniť svoju úlohu v produkte, musia byť aplikované vo vhodnej forme, v ktorej zostanú dostatočne stabilné. Preto cieľom tejto práce bolo overiť stabilitu niektorých na našom pracovisku študovaných prospešných a bakteriocíny-produkujúcich kmeňov v ovčo-kozích jogurtoch dostupných v obchodnej sieti. Zvolili sme pre aplikovanie najjednoduchšiu formu enkapsulácie, ktorou je lyofilizácia. Použité kmene produkujú aj bakteriocíny teda antimikrobiálne pôsobiace substancie bielkovinového charakteru s inhibičným účinkom na viac či menej príbuzné baktérie (Franz et al., 2007). Kmene *Lacticaseibacillus paracasei* LPa12/1, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* MK1/3 a *Enterococcus mundtii* EM2/2 boli izolované zo surového kozieho mlieka a kmeň *Lactiplantibacillus plantarum* LP17L/1 bol z ovčieho syra.

MATERIÁL A METODIKA

Pre experiment boli pripravené rifampicínom značené varianty aplikovaných kmeňov (Lauková et al., 2023). Kmene boli enkapsulované (lyofilizované), tak aby ich iniciačné množstvo bolo 10^9 KTJ/g. Ovčo-kozie jogurty dostupné z obchodnej siete boli skontrolované na mikrobiálnu čistotu (krvný agar) a následne boli naočkované príslušným množstvom enkapsulovaného kmeňa (P). Kontrolné jogurty (K) boli bez prídavku prospešných kmeňov. Jogurty boli držané pri teplote 4˚C. Následne v pravidelných intervaloch boli sledované ich počty na MRS agare s rifampicínom pre laktobacily a kmeň *Lactococcus lactis* a na M-Enterococcus agare s rifampicínom (100 µg) pre kmeň *E. mundtii* EM2/2. Štandardné mikrobiologické riedenia z odobratých vzoriek boli robené v peptónovej vode (Merck, Nemecko) a následne boli vysievané na vyššie uvedené agarové médiá. Sledované bolo aj pH (pH Meter s elektródou).

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Po 24 h od pridania kmeňov laktobacilov LP17L/1 a LPa12/1 do ovčo-kozích jogurtov boli ich počty dostatočne vysoké; v obidvoch prípadoch dosahovali až 5,1 KTJ/g (log 10). Aj kmeň *Lactococcus lactis* MK1/3 a *E. mundtii* EM2/2 boli dostatočne zastúpené v ovčo-kozích jogurtoch pri kontrole po 24 h (Tabuľka č. 1); dosiahli takmer 10^5 KTJ/g resp. 10^4 KTJ/g. Aj pH produktov bolo vyrovnané. Zatiaľ čo kmene LPa12/1, Ll MK1/3 a LP17L/1 dostatočne prežívali v jogurte aj na 7. deň (do 10^5 KTJ/g resp. 5,15 KTJ/g, log 10) teda boli stabilné, počty kmeňa EM 2/2 klesli na 7. deň na menej ako 1,0 z 4,0 po 24 h. Hodnoty pH opäť neboli negatívne ovplyvnené. Najlepšie sa v ovčo-kozom jogurte etabloval kmeň LPa12/1, ktorého počty na 10. deň dosiahli až 6,1 KTJ/g (log 10). Rovnako aj v prípade kmeňa Ll MK1/3 boli

počty na 10. deň stabilné-4,66 KTJ/g (log 10). V prípade kmeňa LP17L/1 na 10. deň počty prudko poklesli na 1,90 KTJ/g (log 10) a kmeň EM2/2 dosiahol len menej ako 1,0 KTJ/g (log 10). Opäť bez vplyvu na hodnoty pH. Dobu úchovy 10 dní sme zvolili z dôvodu zachovaných vlastností produktu a kvôli jednotnosti, pretože senzorika v jogurte s kmeňom EM2/2 sa po tejto dobe začala meniť.

Enkapsulácia je v súčasnosti najčastejší spôsob ochrany účinnosti prospešných baktérií (Sohail et al., 2012, Unal Turhan et al., 2017). Existujú viaceré spôsoby enkapsulácie, ale medzi najjednoduchšie patrí práve lyofilizácia. Táto metóda sa osvedčila aj pri kontrole stability nami aplikovaných prospešných kmeňov v ovčo-kozích jogurtoch. Vždy je vhodnejšie, ak sú produkty konzumované bližšie ku dátumu výroby ako ku dátumu expirácie, čo nasvedčujú i naše výsledky so sledovaním stability aplikovaných prospešných kmeňov.

Tabuľka č. 1, Počty aplikovaných kmeňov a hodnoty pH (vyjadrené v KTJ/g, log 10)

	pH	**LP17L/1**	**pH**	**LPa12/1**	**pH**	**MK1/3**	**pH**	**EM2/2**
P/24h	4,10	5,1	3,90	5,1	3,91	4,61	4,22	4,0
K/24h	4,10	nt	3,91	nt	3,93	nt	3,80	nt
P/7. deň	4,21	4,60	4,55	5,15	4,10	4,43	3,80	< 1,0
K/7. deň	4,05	nt	4,89	nt	4,09	nt	3,61	nt
P/10.deň	4,25	1,90	3,70	6,1	3,90	4,66	3,73	<1,0
K/10.deň	4,20	nt	3,85	nt	3,85	nt	3,86	nt

nt-netestované;< menej ako1,0; P-pokusná vzorka; K-kontrolná vzorka; KTJ/g, kolónie tvoriace jednotky na gram

ZÁVER

Enkapsulácia (lyofilizácia) sa javí ako vhodná forma pre aplikáciu prospešných kmeňov v jogurtoch, avšak v závislosti od druhu aplikovaného kmeňa.

POĎAKOVANIE

Výsledky boli dosiahnuté v rámci projektov APVV-20-0204 a APVV-17-0028.

POUŽITÁ LITERATÚRA

1. FRANZ, CH.M.P.A. et al. Diversity of enterococcal bacteriocins and their grouping in a new classification scheme. In *FEMS Microbiology Review*, 2017, vol. 31, p. 293-310.

2. LAUKOVÁ, A. et al. *Lactiplantibacillus plantarum* LP17L/1 from ewes stored cheese, promising strain for use not inly in dairy products. In *Proceedings of Scientific works from XX. conference „Food safety and quality*„ Nitra-Piešťany,29.3-31.3.2023, (in Slovak), eds. Golian and Čapla,. ISBN 78-80-8266-028-2, 2023, p. 34-36, https://doi.org/10.15414/2023.sqf23-psp.
3. SLOTTOVÁ, A. et al. Characterization of certain dairy startersisolated from traditional Slovak milk specialities. In *Proceedings of lectures and posters from the XXXIV. Conference „Hygiena Alimentorum*“, Štrbské Pleso, 8.-10.5.2013, Slovakia eds. Baranová, M., Dudríková, E., Maľa, P. (in Slovak), 2013, p. 103-106. ISBN 978-80-8077-334-2.
4. SOHAIL, A. et al. Evaluation of *Lactobacillus rhamnosus* GG and *Lactobacillus acidophilus* NCFM encapsulated using a novel impinging aerosol method in fruit food products. In *International Journal of Food Microbiology*, 2012, vol. 157, p. 162-166, doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2012.04.025.
5. UNAL TURHAN, E. et al. Design of probiotic dry fermented sausage (sucuk) production with microencapsulation and free cells *of Lactobacillus rhamnosus.*In *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences,* 2017, vol. 41, p. 598-603, doi:10.3906/vet-1701-76.

Kontaktná adresa: Lauková Andrea, Centre of Biosciences of the Slovak Academy of Sciences, Institute of Animal Physiology, Šoltésovej 4-6, 040 01 Košice, Slovak Republic; E-mail: laukova@saske.sk

VPLYV FERMENTOVANÝCH KRMÍV NA KVALITATÍVNE PARAMETRE PRSNEJ SVALOVINY BROJLEROVÝCH KURČIAT

THE INFLUENCE OF FERMENTED FEEDS ON THE QUALITY PARAMETERS OF THE BREAST MEAT OF BROILER CHICKENS

Makiš Andrej, Semjon Boris, Bartkovský Martin , Reitznerová Anna, Koréneková Beáta, Marcinčáková Dana, Marcinčák Slavomír

Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, Komenského 73, 041 81 Košice, Slovenská republika

ABSTRACT

The aim of this study was to investigate the effect of fermented feed (10%) and humic substances (0.7% HL) in broiler chicken diet and its subsequent effect on breast muscle meat quality. Fermented feed (FF) was prepared by solid-state fermentation technique from food by-products, using microscopic filamentous fungi, suitable for polyunsaturated fatty acid (PUFA) production. 120 COBB 500 one-day-old chicks were used and randomly divided into 3 equal groups, K (control group), F (experimental group with 10% FF supplementation) and FH (experimental group with 10% FF supplementation and 0.7% HL supplementation). The results confirmed that addition of FF and HL had a positive effect on the monitored parameters. When analysing the chemical composition of the meat, we observed statistically significant values for protein and fat among all groups ($p < 0.001$). Statistical analysis of blood parameters also showed several significant results (decrease in total lipids, increase in triacylglycerol).

Key words: fatty acids, fermented product, chicken meat

ÚVOD

Fermentácia je dynamický proces zahŕňajúci mikroorganizmy, substráty a podmienky prostredia na premenu zložitých substrátov na jednoduchšie zlúčeniny (Niba a kol., 2009). Je to jedna z najstarších techník konzervovania potravín. Fermentované produkty sú produkty, ktoré boli podrobené pôsobeniu mikroorganizmov alebo ich enzýmov tak, že žiadúce biochemické zmeny, ktoré nastali pôsobením týchto mikroorganizmov, spôsobujú kladnú a žiadúcu modifikáciu potravín. Tieto fermentačné procesy spôsobujú, že daná produkovaná potravina môže byť vo výsledku stráviteľnejšia, výživnejšia alebo chutnejšia. Nami podávané fermentované krmiva boli pripravené pomocou techniky Solid-state fermentation (SSF), ktorá sa využíva na biologické obohatenie druhotných potravinárskych surovín a krmív. Podstata SSF

je vo využití mikroorganizmov, rastúcich na tuhom substráte v kontrolovaných podmienkach bez prítomnosti voľnej vody. Najdôležitejším cieľom tejto fermentácie je produkcia enzýmov, organických kyselín a iných metabolitov, ktoré sa tvoria počas rastu mikroorganizmov (Semjon a kol., 2020).

Prostredníctvom SSF bolo dokázané znižovanie antinutričných faktorov a zlepšenie biologickej dostupnosti živín v krmive zvierat (Zhu a kol., 2020). Určité druhy mikroskopických vláknitých húb z čeľadí *Mucoraceae*, *Mortierellaceae*, *Umbelopsidaceae*, *Cunninghamellaceae* dokážu nakumulovať veľké množstvo triacylglycerolov s vysokým obsahom polynenasýtených mastných kyselín (PUFA). Biomasa produkovaná týmito mikroskopickými vláknitými hubami obsahuje oleje s vysokým podielom esenciálnych n-3 a n-6 PUFA a je považovaná za hodnotný fermentovaný produkt s aplikáciou v potravinárskom a krmovinárskom priemysle (Slaný a kol. 2020). Jednou z najväčších výhod fermentovaného produktu získaného prostredníctvom SSF je možnosť jeho priameho použitia ako doplnku výživy pre ľudí alebo hospodárske zvieratá bez ďalšieho následného spracovania (Marcinčák a kol., 2018). U hydiny sú mastné kyseliny (MK) obsiahnuté v krmive vstrebané z gastro-intestinálneho traktu do krvi a prenášané do tukových tkanív. Ich koncentrácia a zloženie v krmive tak priamo ovplyvňuje zloženie tukov v mäse (Koniecka a kol., 2017). Ukázalo sa, že takýmto nepriamym spôsobom je možné modifikovať zloženie tukov, ktoré sa nachádzajú v mäse zvierat v prospech zvýšeného obsahu PUFA, čím sa stávajú dostupnými aj vo výžive ľudí. Technika SSF predstavuje možnosť obohatenia výživy, bez akéhokoľvek zásahu do genómu rastlín alebo živočíchov (Marcinčák a kol., 2018).

Cieľom nášho výskumu bolo zistiť vplyv skrmovania fermentovaných krmív obohatených o významné mastné kyseliny (10 % podiel v kŕmnej dávke) samostatne a v kombinácii s humínovými látkami na kvalitu prsnej svaloviny a biochemický profil krvi brojlerových kurčiat.

MATERIÁL A METODIKA

Výskum bol realizovaný v priestoroch experimentálneho zverinca UVLF KE. Do pokusu bolo zapojených 120 kusov 1-dňových brojlerových kurčiat plemena COBB 500, ktoré boli privezené od dodávateľa (Hydina Slovensko s.r.o.). Následne boli zvieratá náhodne rozdelené do troch rovnomerných skupín po 40 zvierat (kontrola K a 2 experimentálne F a FH). Kurčatá mali prístup k vode *ad libitum* a boli kŕmené základnými kŕmnymi zmesami (KZ) BR1 (1. – 10 deň), BR2 (11. – 30. deň) a BR3 (31. – 37. deň) (De Heus s.r.o., Česká republika). Kontrolnej skupine (K) boli počas celej doby výkrmu podávané len základné kŕmne zmesi. Prvá experimentálna skupina (F) dostavala od 11. dňa kŕmenia do základných KZ BR2 a BR3

prídavok fermentovaných krmív (FF) v množstve 10 % (zdroj kys. γ – linolénovej, kys. α – linolénovej a eikozapentaénovej). F skupina mala takto obohatené krmivo až do konca výkrmu. Druhej experimentálnej skupine (FH) boli do základných kŕmnych zmesí od 2. dňa pridávané humínové látky (HL; Humac® Natur AFM Mycotoxisorb, Humac s.r.o. Košice) a od 11. dňa výkrmu aj 10 % FF. Vo experimentálnych skupinách bol objem základných kŕmnych zmesi znížený o objem pridaných zložiek (FF a HL). Po ukončení výkrmu, na 38. deň, boli zvieratá omráčené a usmrtené a prsná svalovina skladovaná v chladničke po dobu 7 dní pri teplote 4 °C a analyzovaná. Vzorky krvi boli od kurčiat získané počas procesu vykrvovania.

Chemické zloženie prsnej svaloviny bolo vykonané podľa metód AOAC (1990). Obsah vody sme stanovili rozdielom hmotnosti, medzi surovou vzorkou a vzorkou po vysušený pri 105 °C. Obsah bielkovín sme stanovovali pomocou Kjeldahlovej metódy pomocou automatického analyzátora VELP UDK 159 (VELP, Taliansko) a obsah tukov bol analyzovaný prostredníctvom Soxhletovej metódy v extraktore (Det Gras J.P. Selecta S.A., Barcelona, Španielsko) s použitím petroléteru. Rozkladné zmeny tukov boli stanovované podľa metódy Reitznerová a kol. (2017). Oxidácia lipidov bola hodnotená, ako látky reagujúce s kyselinou tiobarbiturovou (TBA). Hodnoty TBA boli merané spektrofotometricky pri vlnovej dĺžke 532 nm (Helios γ, v. 4. 6. Thermo spectronic, Cambridge, UK). Hodnoty TBA sme stanovili do 24 hodín po zabití a po 7 dňoch skladovania v chladničke (4 °C). Výsledky obsahu TBA boli následné prepočítané a stanovené ako obsah malóndialdehydu (MDA) v miligramoch na kilogram vzorky. Stanovenie biochemických parametrov krvi bolo vykonané podľa Semjon a kol. (2020). Obsah minerálov a enzýmov bol stanovený spektrofotometricky na základe merania absorbancie.

Štatistické spracovanie výsledkov bolo urobené prostredníctvom štatistického programu Graph Pad Prism 8.3 (2018, GraphPad Software, San Diego, California, USA).

VÝSLEDKY A DISKUSIA

V tabuľke 1 sú uvedené výsledky stanovenia chemického zloženia mäsa prsnej svaloviny (obsah vody, tuku a bielkovín). Najnižší obsah vody v mäse bol zaznamenaný v F skupine (74,28 % ± 0,171). V tomto ukazovateli kvality mäsa sme znamenali aj štatistickú významnosť ($p < 0,001$). Ibrahim a kol. (2020) vo svojej štúdii tiež zistil, že skrmovanie fermentovaných krmív nemá vplyv na obsah vody resp. sušiny v prsnej svalovine kurčiat. Najnižší obsah tuku bol zaznamenaný v experimentálnej skupine F (0,52 % ± 0,325), štatistické porovnanie Tukeyho testom medzi jednotlivými skupinami nám preukázalo štatisticky významný rozdiel ($p < 0,001$). Najvyšší podiel bielkovín bol zaznamenaný v experimentálnej skupine F (22,45 % ± 0,159), a aj v tomto ukazovateli sme zaznamenali štatistický významný rozdiel. Výsledky

fyzikálno-chemickej analýzy nám poukazujú na to, že experimentálna skupina F má v prsnom svalstve najnižší obsah vody a najvyšší obsah bielkovín a aj najnižší obsah tuku, taktiež sme v každom ukazovateli zaznamenali aj štatistickú významnosť ($p < 0,001$).

Tabuľka č. 4, Chemické zloženie mäsa prsnej svaloviny (priemer ± SD)

Skupina / zložka	Voda %	Tuk %	Bielkoviny %
K	$75,28 \pm 0,113^{b}$	$1,46 \pm 0,080^{a}$	$20,93 \pm 0,183^{c}$
F	$74,28 \pm 0,171^{c}$	$0,52 \pm 0,325^{b}$	$22,45 \pm 0,159^{a}$
FH	$75,72 \pm 0,329^{a}$	$1,62 \pm 0,045^{a}$	$21,96 \pm 0,119^{b}$
***p* - hodnota**	< 0,001	< 0,001	< 0,001

K – kontrolná skupina, F – experimentálna skupina s prídavkom 10 % fermentovaných produktov, FH – experimentálna skupina s prídavkom 10 % fermentovaných produktov a 0,7 % humínových látok.

Tabuľka 2 nám ukazuje výsledky stanovenia oxidácie tukov do 24 hodín po usmrtení a po 7 dňoch skladovania prsnej svaloviny v chladničke pri teplote do 4 °C. Hodnoty stanovenia malóndialdehydu do 24 hodín po jatočnom opracovaní sú štatisticky významné ($p < 0,001$) medzi všetkými skupinami, avšak nárast, aj keď je štatisticky významný, je z pohľadu zdravia konzumenta zanedbateľný. Po 7-dňovom skladovaní mäsa v chladničke nebol zaznamenaný žiadny štatisticky významný rozdiel medzi skupinami. V štúdií Guo a kol. (2020) opisuje, že prídavok 7,5 % fermentovaného krmiva mal pozitívny účinok na zníženie MDA v prsnej svalovine. V nami získaných výsledkoch, kde sme pridávali 10 % fermentovaných krmív bol obsah MDA najnižší v kontrolnej skupine, avšak po 7 dnovom skladovaní bol obsah MDA najnižší v FH skupine. Z tohto pohľadu môžeme konštatovať, že prídavok fermentovaných krmív a humínových látok má vplyv na obsah MDA, ale ďalším skúmaním bude potrebné nájsť správne množstvo a druh týchto suplementov krmiva.

Tabuľka č. 5, Stanovenie oxidácie tukov počas skladovania vzoriek mäsa prsnej svaloviny v pri teplote 4°C , (mg/kg)

deň / skupina	K	F	FH	*p - hodnota*
MDA 1deň	$0,06 \pm 0,03^{ab}$	$0,15 \pm 0,16^{a}$	$0,10 \pm 0,10^{b}$	0,0057
MDA 7 deň	0,17 ± 0,06	0,22 ± 0,03	0,12 ± 0,03	0,4706

Hodnoty zahŕňajúce rovnaký horný index (a, b, c) nie sú štatisticky významné (Tukeyho test, $p < 0,001$).

Tabuľka č. 3 nám vyhodnocuje vybraných minerálnych prvkov a enzýmov v krvi. Aj v týchto ukazovateľoch sme zaznamenali niekoľko štatisticky významných výsledkov. Najvyšší obsah horčíka bol stanovený v experimentálnej skupine F (0,97 ± 0,02) ($p < 0,001$). Ostatné nami hodnotené minerálne prvky (Ca 2,82 ± 0,12; P 1,92 ± 0,24; K 5,99 ± 0,36) mali najvyššie

zastúpenie v experimentálnej skupine FH, ale *Tukeyho test* nám nepreukázal žiadnu štatistickú významnosť. Pri stanovený vybraných enzýmov v krvi kurčiat nám *Tukeyho test* taktiež preukázal štatistickú významnosť v niektorých parametroch. Najnižší obsah AST bol stanovený v F skupine (5,01 ± 0,78; $p < 0,001$). Naopak najvyšší obsah TG bol zaznamenaný v F skupine (0,85 ± 0,21; , $p < 0,001$). Hodnoty celkového cholesterolu nie sú síce štatisticky významné, ale najnižšie hodnoty boli zaznamenané v F skupine, čo potvrdzuje vo svojej štúdii aj Semjon a kol. (2020), ktorý taktiež pridával 10 % podiel fermentovaného krmiva do krmiva brojlerov. Ide a kol. (2017) taktiež pozorovali účinky pridanej GLA na biochemické parametre krvi u potkanov. Ich výskum potvrdil, že prídavok GLA ovplyvňuje hodnoty celkového cholesterolu, ale aj jeho jednotlivé frakcie HDL, LDL, čo následne môže viesť k zvýšeniu TG. Celkové lipidy mali najnižšie zastúpenie v experimentálnej F skupine (5,22 ± 0,44; $p < 0,001$). Safaa a kol. (2014) tiež zaznamenal, že pridanie vlákniny v podobe fermentovaného krmiva má pozitívny vplyv na zníženie celkových lipidov v krvnom sére.

Tabuľka č. 6, Obsah (%) vybraných minerálnych látok a enzýmov v krvi brojlerov

Minerál, enzým / skupina	K	F	FH	*p* – hodnota
Ca	2,72 ± 0,16	2,72 ± 0,14	2,82 ± 0,12	0,2007
Mg	0,93 ± 0,06^{ab}	0,97 ± 0,02^{a}	0,88 ± 0,06^{b}	0,00069
P	1,87 ± 0,08	1,87 ± 0,13	1,92 ± 0,24	0,7797
K	5,93 ± 0,33	5,87 ± 0,18	5,99 ± 0,36	0,6913
NEFA	0,42 ± 0,07	0,40 ± 0,07	0,44 ± 0,11	0,5428
AST	6,07 ± 0,44^{ab}	5,01 ± 0,78^{b}	6,91 ± 1,70^{a}	0,0028
GGT	0,69 ± 0,19	0,77 ± 0,12	0,71 ± 0,20	0,5429
AF	58,61±17,67	60,96±26,51	52,60±13,58	0,633
TCH	3,81 ± 0,48	3,70 ± 0,29	3,80 ± 0,94	0,9054
TL	5,32 ± 0,45^{b}	5,22 ± 0,44^{b}	6,14 ± 1,08^{a}	0,01476
TG	0,65 ± 0,14^{b}	0,85 ± 0,21^{a}	0,79 ± 0,17^{ab}	0,04729
HDL	2,77 ± 0,40	2,65 ± 0,24	2,55 ± 0,40	0,3978
LDL	0,61 ± 0,17	0,57 ± 0,14	0,77 ± 0,56	0,385

Ca- vápnik, Mg – horčík, P- fosfor, K –draslík; NEFA – neesterifikované mastné kyseliny, AST – aspartátaminotransferáza, GGT – gama-glutamyltransferáza, AF – alkalická fosfatáza, TCH – celkový cholesterol, HDL – vysokodenzný lipoprotein, LDL – lipoprotein s nízkou denzitou, TL – celkové lipidy, TG - triacylglycerol
Hodnoty zahŕňajúce rovnaký horný index (a, b, c) nie sú štatisticky významné (*Tukeyho test, $p < 0,001$*).

ZÁVER

Tento výskum nám preukázal, že prídavok fermentovaných krmív, či už samostatne alebo v kombinácii s humínovými látkami má pozitívny vplyv na niektoré kvalitatívne parametre mäsa brojlerových kurčiat. Avšak aj v tejto oblasti je ešte potrebné ďalšie testovanie na potvrdenie našich výsledkov.

POUŽITÁ LITERATÚRA

1. AOAC, M. 1990. Association of official analytical chemists. Official methods of analysis.
2. Gao, M., Cieślak, A., Kierończyk, B., Huang, H., Yanza, Y. R., Zaworska-Zakrzewska, A., Józefiak, D., Szumacher-Strabel, M. 2020. Effects of Raw and Fermented Rapeseed Cake on Growth Performance, Methane Production, and Breast Meat Fatty Acid Composition in Broiler Chickens. In Animals, vol. 10, no. 12.
3. Guo, S., Zhang, Y., Cheng, Q., Xv, J., Hou, Y., Wu, X., ... & Ding, B. 2020. Partial substitution of fermented soybean meal for soybean meal influences the carcass traits and meat quality of broiler chickens. In Animals, vol. 10, no. 2.
4. Ibrahim, D., Abdelfattah-Hassan, A., Arisha, A. H., Abd El-Aziz, R. M., Sherief, W. R., Adli, S. H., ... & Metwally, A. E. 2020. Impact of feeding anaerobically fermented feed supplemented with acidifiers on its quality and growth performance, intestinal villi and enteric pathogens of mulard ducks. In Livestock Science, vol. 242, no. 104299. Dostupné na: <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2020.104299>. ISSN 1871 – 1413.
5. Ide, T.; Iwase, H.; Amano, S.; Sunahara, S.; Tachihara, A.; Yagi, M.; Watanabe, T. Physiological effects of γ- linolenic acid and seasamin on hepatic fatty acid synthesis and oxidation. J. Nutr. Biochem. 2017, 41, 42−55
6. Konieczka, P., Barszcz, M., Chmielewska, N., Cieślak, M., Szlis, M., Smulikowska, S. 2017. Interactive effects of dietary lipids and vitamin E level on performance, blood eincosanoids, and response to mitogen simulation in broiler chickens of different ages. In Poultry Science. vol. 96, no. 2 Dostupné na: <https://doi.org/10.3382/ps/pew219>. ISSN 0032-5791.
7. Marcinčák, S., Klempová, T., Bartkovský, M., Marcinčáková, D., Zdolec, N., Popelka, P., Mačanga, J., Čertík, M. 2018. Effect of fungal solid-state fermented product in broiler chicken nutrition on quality and safety of produced breast meat. In BioMed Research International. Art. ID 2609548 [online]. Dostupné na: <https://doi.org/10.1155/2018/2609548>. ISSN 2578-8892.

8. Niba, A.T., Beal, J.D., Kudi, A.C., Brooks, P.H. 2009. Potential of bacterial fermentation as a biosafe method of improving feeds for pigs and poultry. In African Journal of Biotechnology. vol. 8, no. 9, p1758 – 1767. ISSN 1684-5315.
9. Reitznerová, A.; Šuleková, M.; Nagy, J.; Marcinčák, S.; Semjon, B.; Čertík, M.; Klempová, T. 2017. Lipid Peroxidation Process in Meat and Meat Products: A Comparison Study of Malondialdehyde Determination between Modified 2-Thiobarbituric Acid Spectrophotometric Method and Reverse-Phase High-Performance Liquid Chromatography. In *Molecules* 2017, vol. *22*, no. 11. p 1988. [online]. Dostupné na <https://doi.org/10.3390/molecules22111988>.
10. Slaný, O., Klempová, T., Shapaval, V., Zimmermann, B., Kohler, A., Čertík, M. 2020. Biotransformation of Animal Fat-By Products into ARA-Enriched Fermented Bioproducts by Solid-State Fermentation of Mortierella alpina. In Journal of Fungy. [online]. vol. 6, no. 4. [online] Dostupné na: <https://doi.org/10.3390/jof6040236>. ISSN 2309-608X.
11. Safaa, H.M.; Jimenez-Moreno, E.; Frikha, M.; Mateos, C.G. Plasma lipid metabolites and liver lipid components in broilers at 21 days of age in response to dietary different fibre sources. Egpt. J. Anim. Prod. 2014, 51, 115–127
12. Semjon, B., Bartkovský, M., Marcinčáková, D., Klempová, T., Bujnák, L., Hudák, M., Jaďuttová, I., Čertík, M., Marcinčák, S. 2020. Effect of Solid-State Fermented Wheat Barn Supplemented with Agrimony Extract on Growth Performance, Fatty Acid Profile, and Meat Quality of Broiler Chickens, In Animals. [online], vol. 10, no. 6 [online] Dostupné na: <https://doi.org/10.3390/ani10060942>. ISSN 2076-2615.
13. Zhu. F., Zhang, B., Li, J., Zhu, L. 2020. Effects of fermented feed on growth performance immune response, and antioxidant capacity in laying hen chicks and the underlying molecular mechanism involving nuclear factor-κB. In Poultry Science. [online]. vol. 99, no. 5, p. 2573 – 2580 [online] Dostupné na: <https://doi.org/10.1016/j.psj.2019.12.044>. ISSN 0032-5791.

POĎAKOVANIE:

Štúdia vznikla vďaka podpore Agentúry na podporu výskumu a vývoja na základe Zmluvy č. APVV-18-0039

Kontaktná adresa: Makiš Andrej, Katedra hygieny, technológie a zdravotnej bezpečnosti potravín, Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, Komenského 73, 041 81 Košice, Slovenská republika; E-mail: andrej.makis@student.uvlf.sk

APLIKÁCIA FERMENTOVANÝCH PRODUKTOV A HUMÍNOVÝCH LÁTOK HYDINE, NOVÝ PRÍSTUP K PRODUKCII BEZPEČNÝCH A FUNKČNÝCH POTRAVÍN

APPLICATION OF FERMENTED PRODUCTS AND HUMIC SUBSTANCES TO POULTRY, A NEW APPROACH TO THE PRODUCTION OF SAFE AND FUNCTIONAL FOODS

Marcinčák Slavomír[1], Semjon Boris[1], Mesarčová Lýdia[1], Reitznerová Anna[1], Bartkovský Martin[1], Marcinčáková Dana[1], Klempová Tatiana[2], Nagy Joze[1]f

[1]Katedra hygieny, technológie a zdravotnej bezpečnosti potravín, Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, Komenského 73, 041 81 Košice, Slovenská republika

[2]Fakulta chemickej a potravinárskej technológie, Slovenská technická univerzita v Bratislave, Radlinského 9, 812 37 Bratislava, Slovenska republika

ABSTRACT

One of the main intention of biotechnology application is to produce health-promoting substances by means of suitable microorganism. In production of these substances the filamentous fungi are very important. They are able to produce significant amounts of active substances on various substrates including by-products of food industry. The solid-state fermentation enriches these by-products with hydrolytic enzymes, important fatty acids (PUFA), microbial sterols, chitin, chitosan, coenzym Q, betaglucans and pigments. The profile of fatty acids in poultry meat can be significantly affected by feeding. The enriched by-product feeding enhances amounts of active substances in meat. Humic substances represent natural source of substances that significantly improve animal health and are usefull in production of food without contaminants. The addition of fermented bioproducts and humic substances to poultry feed significantly improve production parameters and animal health status.

Key words: fatty acids, fermentation, chicken, meat quality

ÚVOD

Funkčné potraviny boli v roku 1994 definované ako potraviny, ktoré môžu poskytovať zdravotný úžitok. Mnohopočetné vedecké štúdie potvrdili správnosť konceptu takýchto potravín (Yeung et al., 2018). Ukazujú, že nevyváženosť stravy v spojení so životným štýlom napomáha vzniku rôznych neinfekčných civilizačných ochorení, ako je obezita, rakovina, kardiovaskulárne alebo neurodegeneratívne ochorenia. Funkčné potraviny dokážu slúžiť ako

prevencia takýchto ochorení, preto sa v poslednom období dostávajú do popredia. Medzi najzaujímavejšie chemické zlúčeniny, u ktorých sa potvrdili pozitívne účinky na ľudský organizmus a ktoré sa prirodzene nachádzajú v potravinách patria napr. polynenasýtené mastné kyseliny (PUFA), karotenoidné pigmenty, fenolové kyseliny, tokoferoly, koenzým Q, vláknina, prebiotiká atď. Väčšina týchto látok je obsiahnutá prevažne v rastlinných zložkách potravy, ktoré výrazne chýbajú v strave západnej civilizácie. Zároveň sa vo vyspelých štátoch zvyšuje príjem tukov v potrave, hlavne nasýtených tukov. To všetko negatívne ovplyvňuje fyziológiu organizmu a často vedie ku vzniku širokej škály neinfekčných ochorení.

FERMENTOVANÉ PRODUKTY A KVALITA MÄSA

Mäso spolu s rastlinnými olejmi je hlavným zdrojov tukov v ľudskej výžive. Zloženie bežne dostupných olejov ako je masť, repkový olej, slnečnicový olej alebo hovädzie, bravčové alebo kuracie mäso však neobsahuje dostatočné množstvá „funkčných zlúčenín“. V posledných rokoch bol preto zaznamenaný záujem o možnosť modifikácie najmä tukov pochádzajúcich z mias zvierat pomocou výživy. Ide najmä o zvyšovanie množstva PUFA v krmive prostredníctvom pridávania napr. morských rias, rybieho oleja alebo rastlinných olejov do krmiva týchto zvierat. Ukázalo sa, že takýmto nepriamym spôsobom je možné modifikovať zloženie tukov, ktoré sa nachádza v mäse zvierat, v prospech zvýšeného obsahu PUFA, čím sa stávajú dostupnými aj vo výžive ľudí. U monogastrických zvierat (ošípané alebo hydina) sú mastné kyseliny krmiva vstrebávané z gastrointestinálneho traktu do krvi a prenášané do tukových tkanív. Ich koncentrácia a zloženie v krmive tak priamo ovplyvňuje zloženie tukov v mäse (Konieczka et al. 2016). Podobný efekt krmív bol popísaný aj na zloženie vajec nosníc, ktorým bolo podávané krmivo so zvýšenom obsahom najmä n-3 PUFA a karotenoidných pigmentov. Pomocou modifikácie animálnej stravy, tak dokážeme produkovať živočíšne produkty (mäso a vajcia), ktoré prinášajú obrovský potenciál nielen z nutričného pohľadu finálneho spotrebiteľa, ale zároveň prinášajú atraktívny marketingový potenciál pre nové technológie využívajúce prirodzené obohacovanie výživy, bez akéhokoľvek zásahu do genómu či už rastlín alebo živočíchov.

Za najbežnejší zdroj PUFA sú považované rybie oleje získavané z morských rýb. Súčasne snahy o rozvoj udržateľnej miery rybolovu bez závažných ekologických dôsledkov však redukujú množstvo dostupného rybieho oleja. Zvýšený záujem o získavanie funkčných lipidov tak otvára dvere alternatívnym zdrojom týchto látok. Boli objavené a popísané rôzne mikroorganizmy, ktoré majú obrovský produkčný potenciál. Do praxe boli uvedené technológie, ktoré využívajú na získavanie olejov s vysokou pridanou hodnotou a sú založené na mikrobiálnych fermentáciách (Ochsenreither et al., 2016). Cena takejto produkcie je však

pomerne vysoká najmä vzhľadom na cenu bežne dostupných olejov. Aj preto sa súčasný výskum produkcie funkčných lipidov orientuje na znižovanie nákladov najmä prostredníctvom znižovania ceny vstupných substrátov. Medzi komerčne najúspešnejších producentov PUFA patria nižšie vláknité huby z triedy *Zygomycetes* a to najmä kmene *Mortierella* sp., *Umbelopsis* sp., *Thamnidium* sp. a *Cunninghamella* sp. (Klempova et. al., 2013). Nižšie vláknité huby sú z fermentačného hľadiska pomerne unikátne mikroorganizmy. Čo ich robí unikátnymi je ich obrovská schopnosť využívať rôzne druhy substrátov a to nie len rozpustných vo vodnom prostredí, ale i na tuhých substrátoch s dostatočnou vlhkosťou. Tento typ fermentácií sa nazýva polosuché fermentácie (SSF; z angl. solid-state fermentation) a sprevádza ľudskú spoločnosť od nepamäti. Aj v súčasnosti je to bežný spôsob prípravy fermentovaných potravín najmä v krajinách juhovýchodnej a východnej Ázie. Atraktívnosť týchto kultivácií spočíva najmä vo využívaní ľahko dostupných a lacných substrátov, ktoré predstavujú zvyšky poľnohospodárskej výroby ako sú napr. cereálne otruby, mláto, repkové a slnečnicové výlisky. Fermentácia odpadov a obohatenie ich o významné aktívne látky je aj pre tieto firmy zaujímavý spôsob zhodnocovania odpadov. Po SSF uskutočnených na odpadových produktoch získavame produkt obohatený o významné PUFA (kyselina gama-linolénová, GLA, dihomo-gamalinolénová DGLA, arachidónová ARA alebo eikozapentaénová, EPA), ktorý môže byť priamo použitý ako prídavok do krmiva hospodárskych zvierat. Niektoré kmene vláknitých húb okrem produkcie PUFA, dokážu produkovať aj karotenoidné pigmenty. Pigmenty ako beta-karotén sú z hľadiska funkčných potravín veľmi zaujímavé pre ich antioxidačné a radikál-zhášajúce vlastnosti. Pomocou SSF tak získavame krmivo obohatené nielen o jednu ale dve skupiny látok, u ktorých bol preukázaný jednoznačný pozitívny účinok na zdravie organizmov (Mudroňová et al. 2018b). Bunková stena vláknitých húb je tvorená polysacharidickými zlúčeninami ako je chitín a chitozan. Tieto patria medzi látky tvoriace významnú súčasť potravinovej vlákniny. Vlákninu takisto radíme do skupiny látok s pozitívnym účinkom na organizmy. Vláknité huby sú však aj výborný producenti extracelulárnych hydrolytických enzýmov. Medzi takýchto nepatria len už spomenuté zygomycétne huby, ale i vyššie vláknité huby ako je *Aspergillus* sp. Význam takýchto enzýmov v animálnej strave je dvojaký. Ako už bolo spomínané medzi zaujímavé „funkčné“ zlúčeniny patria aj fenolické kyseliny. Tie sa veľmi často vyskytujú práve v rastlinných odpadových materiáloch akým sú napr. pšeničné otruby. V takom materiáli sú však viazané na nerozpustné polysacharidové reťazce, čo ich z hľadiska výživy robí nevyužiteľnými. Extracelulárne hydrolytické enzýmy produkované vláknitými hubami počas SSF však dokážu tieto kyseliny uvoľniť z rastlinnej matrice a tak ich spraviť využiteľnými pre organizmus. SSF tak prináša ďalšiu pridanú hodnotu z pohľadu funkčných potravín a krmív. Produkcia extracelulárnych enzýmov pomocou vláknitých húb

v SSF procesoch však môže priniesť okrem nutričného aj ekonomický bonus. Vláknité huby sú schopné produkcie enzýmov, ktoré sú schopné štiepiť rôzne typy polysacharidových reťazcov ale i tukov, ktoré sa nachádzajú v tuhých substrátoch. Medzi najzaujímavejšie radíme enzýmy z triedy amyláz, xylanáz a lipáz. Konzumáciou takýchto enzýmov hospodárskymi zvieratami zvyšujeme schopnosť organizmov stráviť energiu dodávanú vo forme rastlinného krmiva. Enzýmy obsiahnuté v SSF bioprodukte napomáhajú štiepeniu polymérov prítomných v krmive, čo zabezpečí dostatočné množstvo uhlíka pre metabolizmus zvierat. Účinnejšie využívanie podávaného krmiva tak znižuje nevyhnutné dávky, ktoré je nutné zvieratám podávať, čím sa jednoznačne vylepšuje ekonomika celého procesu.

HUMÍNOVÉ LÁTKY A KVALITA MÄSA

Humínové látky (HL) predstavujú heterogénnu skupinu prírodných organických molekúl, ktoré sú súčasťou pôdnej a vodnej organickej hmoty. Ide o látky s celou škálou pozitívnych účinkov na zdravie. HS môžu zvyšovať tvorbu mucínu na epiteli gastrointestinálneho traktu, čím zvyšujú odolnosť voči infekciám a toxínom a tým sa aj zabezpečí zlepšenie využívania krmív pri zvieratách (Mudroňová a kol., 2018). Imunostiumulačný účinok HS je sprostredkovaný jednak aktiváciou buniek vrodenej imunity, a to fagocytov a NK buniek. Ako ale naznačujú posledné štúdie, ktorých je zatiaľ veľmi málo, HL majú vplyv aj na bunky získanej imunity, kde bola imunostimulácia zaznamenaná predovšetkým v podobe zvýšenia zastúpenia všetkých lymfocytov v krvi (Cetin et al. 2011), ako aj T pomocných CD4+ lymfocytov (Mudroňová a kol., 2018) Podpora imunitných funkcií prostredníctvom HL samozrejme umožňuje aj podporu zdravia a produkčných parametrov hospodárskych zvierat. HL podávané brojlerovým kurčatám ovplyvňovali základné chemické zloženie mäsa. Vo vykonaných experimentoch bol zaznamenaný pokles obsahu tuku a zvýšenie obsahu bielkovín v prsnej, ale nárast obsahu tuku a mierny pokles obsahu bielkovín v stehennej svalovine kurčiat (Ozturk a kol., 2012). Vplyv HS na profil mastných kyselín nebol doposiaľ sledovaný. Preto sme náš výskum zamerali aj na vplyv pridávania humínových látok do kŕmnych zmesí brojlerových kurčiat na zloženie mastných kyselín tukov mäsa a telovej dutiny. Významný je tiež nárast podielu kyseliny olejovej a pokles podielu kyseliny arachidónovej v porovnaní so stehnovou svalovinou kontroly (tabuľka 1).

Pridávanie fermentovaného produktu (10 %, obohateného o GLA, ALA a EPA) a humínových látok (0,7 %) do kŕmnych zmesí brojlerových kurčiat malo výrazne pozitívny vplyv na zloženie mastných kyselín v tuku mäsa a telových dutín. Pri analýze mastných kyselín tuku mäsa stehnovej svaloviny kurčiat sa jednoznačne preukázal pozitívny vplyv prídavku fermentovaného produktu do kŕmnej zmesi (tabuľka 1). Vo vzorkách skupín F a FH je

evidentný nárast kyseliny ALA, GLA, EPA a DHA v celkových mastných kyselinách. Výrazne pozitívny účinok prídavku fermentovaného produktu však vidíme najmä na vzájomnom pomere obsahu n-6 a n-3 mastných kyselín. Prídavok fermentovaného produktu znížil tento pomer z hodnoty 12,1 na 8,6 resp. 8,7, čo jednoznačne svedčí o náraste množstva n-3 polynenasýtených mastných v tuku experimentálnych zvierat.

Tabuľka 1, Obsah a percentuálne zastúpenie vybraných mastných kyselín (MK) tepelne opracovanej (70 °C, 10 min) stehnovej svaloviny kurčiat po skrmovaní humínových látok a fermentovaného produktu.

MK	K	H	F	FH
C16:0	25,648 ± 0,103^{a}	24,152 ± 0,118^{ab}	25,331 ± 0,180^{ab}	23,917 ± 0,456^{b}
C16:1, PO	7,838 ± 0,553	7,347 ± 1,109	8,043 ± 0,118	7,470 ± 0,208
C18:0	5,447 ± 0,540	6,257 ± 1,323	6,023 ± 0,107	6,532 ± 0,210
C18:1, OA	38,904 ± 0,698	38,831 ± 2,333	37,357 ± 0,342	34,838 ± 0,609
C18:1	1,808 ± 0,162	2,483 ± 0,452	2,331 ± 0,125	2,896 ± 0,004
C18:2, LA	15,697 ± 0,035^{b}	15,317 ± 0,464^{b}	15,679 ± 0,042^{b}	17,414 ± 0,106^{a}
C18:3, GLA	0,259 ± 0,016^{a}	0,175 ± 0,001^{b}	0,190 ± 0,001^{b}	0,158 ± 0,002^{b}
C18:3, ALA	0,958 ± 0,024^{b}	0,886 ± 0,050^{b}	1,394 ± 0,005^{a}	1,310 ± 0,027^{a}
C20:3, DGLA	0,197 ± 0,027^{b}	0,272 ± 0,113^{a}	0,207 ±0,004^{b}	0,353 ± 0,028^{a}
C20:4, ARA	0,871 ± 0,391^{b}	1,498 ± 0,731^{ab}	0,942 ± 0,063^{b}	1,930 ± 0,129^{a}
C20:5, EPA	0,052 ± 0,019^{c}	0,069 ± 0,030^{b}	0,080 ± 0,003^{b}	0,130 ± 0,012^{a}
C22:5, DPA	0,192 ± 0,069^{b}	0,351 ± 0,176^{ab}	0,205 ± 0,015^{b}	0,474 ± 0,037^{a}
C22:6, DHA	0,052 ± 0,024^{b}	0,095 ± 0,051^{ab}	0,072 ± 0,004^{b}	0,123 ± 0,021^{a}
Σ NMK	32,127 ± 0,471	31,418 ± 1,269	32,489 ± 0,298	31,631 ± 0,716
Σ MNMK	49,365 ± 1,062	49,575 ± 2,915	48,492 ± 0,339	46,098 ± 0,824
Σ PNMK	18,508 ± 0,592^{b}	19,006 ± 1,646^{ab}	18,989 ± 0,0401^{b}	22,271 ± 0,108^{a}
Σ PNMK N-3	1,253 ± 0,088^{c}	1,401 ± 0,207^{c}	1,752 ± 0,010^{b}	2,037 ± 0,042^{a}
Σ PNMK N-6	17,255 ± 0,503^{b}	17,606 ± 1,439^{ab}	17,237 ± 0,030^{b}	20,233 ± 0,660^{a}
Σ N-6/N-3	13,789 ± 0,569^{a}	12,631 ± 0,835^{a}	9,838 ± 0,041^{b}	9,934 ± 0,173^{b}

K – kontrola, H – kurčatá kŕmené s prídavkom 0,7 % humínových látok, F- kurčatá kŕmené s prídavkom 10 % fermentovaného produktu, FH – kurčatá kŕmené s prídavkom 0,7 % humínových látok a 10 % fermentovaného produktu; SFA – nasýtené mastné kyseliny, MUFA – mononenasýtené mastné kyseliny, PUFA – polynenasýtené mastné kyseliny, GLA – k. gamalinolénová, ALA – k. alfalinolénová, ARA – k. arachidónová, EPA – k. eikozapentaénová, DHA – k. dokazapentaénová

ZÁVER

Fermentované produkty, s priaznivým obsahom PUFA dokážu priaznivo ovplyvňovať obsah a zastúpenie mastných kyselín v mäse brojlerových kurčiat. Vzájomnou kombináciou vhodne pripravených fermentovaných produktov a humínových látok, ako zložiek krmív pre výkrm kurčiat, dokážeme pripraviť produkt, mäso kurčiat, ktorý môže priaznivo ovplyvniť zdravie ľudí.

LITERATÚRA

1. Cetin E., Berrin K.G., Nazmi C.:Effect of dietary humate and organic acid supplementation on social stress induced by high stocking density in laying hens. J. Anim. Vet. Adv. 2011, 10: 2402-2407.
2. Klempová, T., Basil, E., Kubatová, A., Čertík, M.: Biosynthesis of gamma-linolenic acid and beta-carotene by Zygomycetes fungi. Biotechnology Journal, 2013, 8, 794–800.
3. Konieczka, P., Barszcz, M., Chmielewska, N., Ciešlak, M., Szlis, M., Smulikowska S.: Interactive effects of dietary lipids and vitamin E level on performance, blood eicosanoids, and response to mitogen stimulation in broiler chickens of different ages. *Poultry Science*, 2017, 96, 2, 359–369.
4. Marcinčák, S., Klempová, T., Bartkovský, M., Marcinčáková, D., Zdolec, N., Popelka, P., Mačanga, J., Čertík, M. Effect of fungal solid-state fermented product in broiler chicken nutrition on quality and safety of produced breast meat (2018) BioMed Research International, 2018a, art. no. 2609548.
5. Mudroňová, D., Pešulová, T., Karaffová, V., Koščová, J., Marcinčáková, D., Marcinčák, S.: Vplyv humínových kyselín na črevnú mikrobiotu a imunitnú odpoveď brojlerov. Lazarove dni výživy a veterinárnej dietetiky XIII, 6. – 7. 9. 2018, Košice. ISBN: 978-80-8077-581-0, s. 186-189.
6. Mudroňová, D., Karraffová, V., Koščová, J., Bartkovský, M., Marcinčáková, D., Popelka, P., Čertík, M., Klempová, T., Mačanga, J., Marcinčák, S.: Effect of fungal gamma-linolenic acid and beta-carotene containing prefermented feed on immunity and gut of broiler chickens. Poultry Science, 2018b, http://dx.doi.org/10.3382/ps/pey306
7. Ochsenreither, K., Glück, C., Stressler, T., Fischer, L., Syldatk, CH.: Production strategies and applications of microbial single cell oils. Frontiers in Microbiology, 2016, 7, 1539
8. Ozturk, E.; Ocak, N.; Turan, A.; Erener, G.; Altop, A.; Cankaya, S. Performance, carcass, gastrointestinal tract and meat quality traits, and selected blood parameters of

broilers fed diets supplemented with humic substances. Journal of Science and Food Agriculture, 2012, 92, 59 – 65.

9. Yeung, A.W.K., Mocan, A., Atanasov A.G.: Let food be thy medicine and medicine be thy food: A bibliometric analysis of the most cited papers focusing on nutraceuticals and functional foods. Food Chemistry. 2018, 269, 455 – 565.

POĎAKOVANIE

Štúdia vznikla vďaka podpore Agentúry na podporu výskumu a vývoja na základe Zmluvy č. APVV-18-0039

Kontaktná adresa: Slavomír Marcinčák, prof., MVDr., PhD., Katedra hygieny, technológie a zdravotnej bezpečnosti potravín, Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, Komenského 73, 041 81 Košice, Slovenská republika. E-mail: slavomir.marcincak@uvlf.sk

VPLYV EXTRAKČNÉHO ČINIDLA NA BIOLOGICKÉ VLASTNOSTI EXTRAKTOV REPÍKA LEKÁRSKEHO

EFFECT OF EXTRACTION REAGENT ON BIOLOGICAL PROPERTIES OF SELECED EXTRACTS OF AGRIMONY

Marcinčáková Dana[1], Kolesárová Mária[1], Snaková Marianna[1], Miłek Michał[2], Fedorová Monika[3], Legáth Jaroslav[1], Marcinčák Slavomír[4]

[1]Katedra farmakológie a toxikológie, [3]Katedra lekárenstva a sociálnej farmácie, [4]Katedra hygieny a technológie potravín Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, Komenského 73, 041 81 Košice, Slovenská republika

[2]Department of Chemistry and Food Toxicology, Institute of Food Technology and Nutrition, University of Rzeszów, Ćwiklinskiej 1a, 35-601 Rzeszow, Poland

ABSTRAKT

Cieľom práce bolo hodnotenie vplyvu extrakčného činidla (etanol v 30, 50 a 70 % koncentrácii) na biologické vlastnosti extraktov repíka lekárskeho (*Agrimonia eupatoria* L.). Monitorovaním modelového organizmu VERO buniek v reálnom čase pomocou xCELLigence systému (Real-Time Cell Analyser RTCA) počas 48 hodín sme sledovali adherenciu a proliferáciu buniek, ktorá prejavila signifikantný pokles so zvyšujúcou sa koncentráciou všetkých sledovaných extraktov ($P < 0,001$). Ako druhý bol použitý MTT test metabolickej aktivity buniek. Nižšie koncentrácie 125 a 250 µg/ml spôsobili zvýšenie metabolickej aktivity ošetrovaných buniek ($P < 0,001$), zatiaľ čo najnižšia metabolická aktivita bola detegovaná pri najvyššej použitej koncentrácii 1000 µg/ml etanolového extraktu. Koncentrácia extrakčného činidla ovplyvnila biologické vlastnosti pripravených extraktov, so stúpajúcou koncentráciou bol zaznamenaný výraznejší pokles proliferácie aj metabolickej aktivity buniek, čo naznačuje proliferatívne účinky repíka lekárskeho v nižších koncentráciách a antiproliferatívna aktivita so zvyšujúcou sa koncentráciou extraktu.

Kľúčové slová: repík lekársky, biologická aktivita, viabilita, proliferácia

ÚVOD

Liečivé rastliny sa pokladajú za bohatý zdroj zložiek využiteľných pri terapeutických postupoch a vývoji syntézy liekov. Nakoľko väčšina z nich nebola doteraz súčasťou klinických skúšaní, majú potenciálne využitie v budúcich liečebných postupoch.

Repík lekársky (*Agrimonia eupatoria*) je rastlina patriaca do čeľade *Rosaceae* a rodu *Agrimonia* pôvodom z mierneho podnebného pásma, najmä zo severnej a strednej Európy, Ázie a Severnej Ameriky. Je trvácou rastlinou charakteristickou drobnými žltými kvetmi, krátkym podzemkom a stonkou s trichómami (Malheiros et al. 2022). Patrí medzi rastliny so širokým využitím. Doterajšie vykonané štúdiu potvrdzujú jeho antioxidačné, protizápalové, antibakteriálne, hepatoprotektívne, antidiabetické účinky inhibovaním α-glukozidázy a absorpciu glukózy, rovnako aj jeho pozitívny vplyv na rýchlosť hojenia rán. Imunoprotektívny vplyv dosahuje znižovaním prozápalových cytokínov a zvyšovaním cytokínov protizápalových. Vychytáva voľné radikály a interferuje s reguláciou NO a stimuluje expresiu antioxidačných enzýmov. Antiproliferatívne pôsobí na bunky karcinogénne bez ovplyvnenia zdravej bunkovej línie (Paluch et al. 2020). Je pestrým zdrojom polyfenolov a bioaktívnych zlúčenín s potenciálom na terapeutické využitie, preto je zaujímavým subjektom na výskum a hodnotenie biologických vlastností v podmienkach *in vitro*.

Príprava liečivých rastlín na experimentálne účely je kľúčová k dosiahnutiu kvalitného výsledku výskumu. Spočíva v extrakcii a stanovení kvality a množstva bioaktívnych zložiek. Medzi rozpúšťadlá bežne používané pri extrakcii liečivých rastlín sa radia polárne rozpúšťadlá (napr. voda, alkoholy), stredné polárne (napr. acetón, dichlórmetán) a nepolárne rozpúšťadlá (napr. n-hexán, éter, chloroform) (Abubakar a Haque 2020).

Správne zvolený typ rozpúšťadla v extrakčnom postupe je záruka úspešného stanovenia bioaktívnej zlúčeniny z rastlinnej vzorky. Nízka toxicitu, ľahké odparovanie pri nízkej teplote, podpora rýchlej fyziologickej absorpcie extraktu, konzervačné pôsobenie a neschopnosť spôsobiť komplex alebo disociáciu extraktu sú vlastnosti dobrého rozpúšťadla. Keďže konečný produkt pri extrakcii bude obsahovať stopy zvyškového rozpúšťadla, rozpúšťadlo by malo byť netoxické a nemalo by interferovať s biologickým testom. Správne zvolené rozpúšťadlo závisí aj od látok, ktoré sa budú extrahovať (Gurjar et al. 2012).

Cieľom práce je porovnanie biologických účinkov etanolových extraktov repíka lekárskeho, ktoré boli pripravené pomocou odlišných koncentrácií extrakčného činidla etanolu (30, 50, 70 %) a stanoviť vplyv týchto extraktov na proliferáciu a viabilitu modelového organizmu bunkovej kultúry VERO (epitelové bunky obličiek opice).

MATERIÁL A METODIKA

Extrakty rastliny repíka lekárskeho boli pripravené pomocou extrakčného činidla etanolu v rozličnej koncentrácii 30 %, 50 % a 70 % a následne boli lyofilizované a uchovávané do dňa experimentu. Pre testovanie boli extrakty nariedené sterilnou deionizovanou vodou tak, aby výsledné koncentrácie pôsobiace na bunkách boli 125, 250, 500 a 1000 µg/ml. Na

hodnotenie biologickej aktivity bol použitý modelový organizmus buniek obličkového epitelu opice (VERO – CCL-81™, ATCC – American Type Culture Collection, USA).

Vplyv na proliferáciu buniek (xCELLigence system)

Schopnosť adhézie a proliferácie buniek bola analyzovaná xCELLigence systémom (Acea Bioscience, USA). Odlišná adherencia buniek na dno jamiek E-platne obsahujúcich zlaté elektródy vedie k zmenám impedancie, ktoré boli vyjadrené ako bunkový index (CI), ktorý je výsledným údajom zaznamenávajúcim sa do grafickej podoby pomocou xCELLigence softvéru. Experiment bol vykonaný podľa práce Milek a kol. (2022).

Vplyv na viabilitu buniek (MTS test)

Na štúdium viability bol použitý test merania metabolickej aktivity buniek MTS test, počas ktorého bola sledovaná zmena sfarbenia žltej tetrazóliovej soli na fialový formazán, ktorého redukcia prebieha v mitochondriách životaschopných buniek (Milek a kol. 2022). Z nameranej hodnoty absorbancie pomocou kontrolných buniek (metabolická aktivita 100 %) bolo vypočítané % metabolickej aktivity. Rovnako bolo pre lepšie porovnanie dosiahnutých výsledkov vypočítané aj % zmeny adherencie buniek pomocou kontrolných buniek, ktorých % adherencie bolo považované za 100 %.

Štatistické spracovanie výsledkov

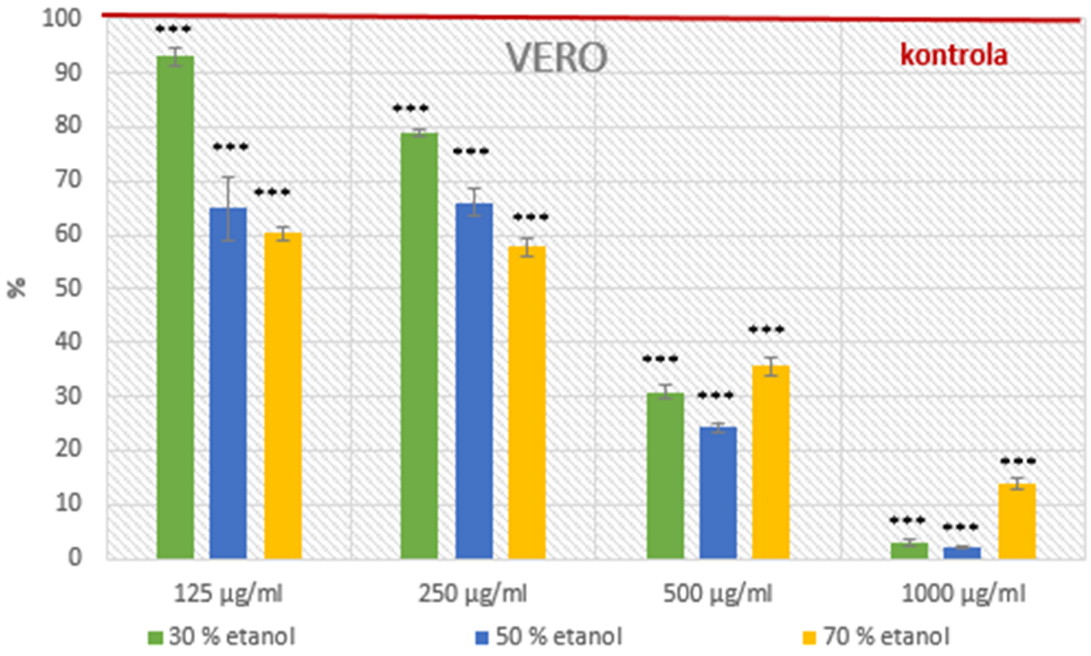
Výsledky boli spracované pomocou programu Microsoft Excell (2016) a štatistického programu Graph Pad Prism 8.3.1 (USA), jednocestným Anova testom, konkrétne Dunettovým porovnávacím testom. Hodnota $P < 0,05$ bola považovaná za štatisticky významný rozdiel oproti kontrolným bunkám bez vystavenia účinkom extraktov. Všetky merania boli vykonané v triplikátoch.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Hodnotenie biologických vlastnosti vybraných extraktov z repíka v podmienkach *in vitro* bolo vykonané pomocou modelového organizmu VERO buniek z obličkového epitelu opice. Systémom xCELLigence sme analyzovali adherenciu buniek, ktoré boli ošetrené rôznymi etanolovými extraktami repíka lekárskeho každú hodinu počas 48 hodín trvania experimentu. Tento systém analyzuje len bunky adherované na dno platničky, kde sa nachádzajú zlaté mikroelektródy. V závislosti od adhezivity, jej sily a bunkovej morfológie sa mení interakcia buniek s mikroelektródami, ktorá je zaznačená ako zmena impedancie a jej miera vyjadrená ako bunkový index. VERO bunky boli ošetrované 30, 50 a 70 % etanolovými

extraktami so štyrmi rôznymi koncentráciami 125, 250, 500 a 1000 µg/ml. U všetkých sledovaných extraktov sme zaznamenali signifikantný pokles adherencie buniek oproti kontrole, ktorá predstavovala 100 % adherencie buniek bez ošetrenia repíkovými extraktami (Graf č. 1). Adherencia mala klesajúci charakter v závislosti od koncentrácie použitých extraktov. Najnižšia adherencia bolo pozorovaná u buniek vystavených účinku najvyššej sledovanej koncentrácii 1000 µg/ml a to vo všetkých etanolových extraktoch.

Graf č. 1, Porovnanie adherencie u buniek VERO v 48. hodine pôsobenia extraktov



****** - P < 0,001 – štatisticky významná zmena oproti kontrole***

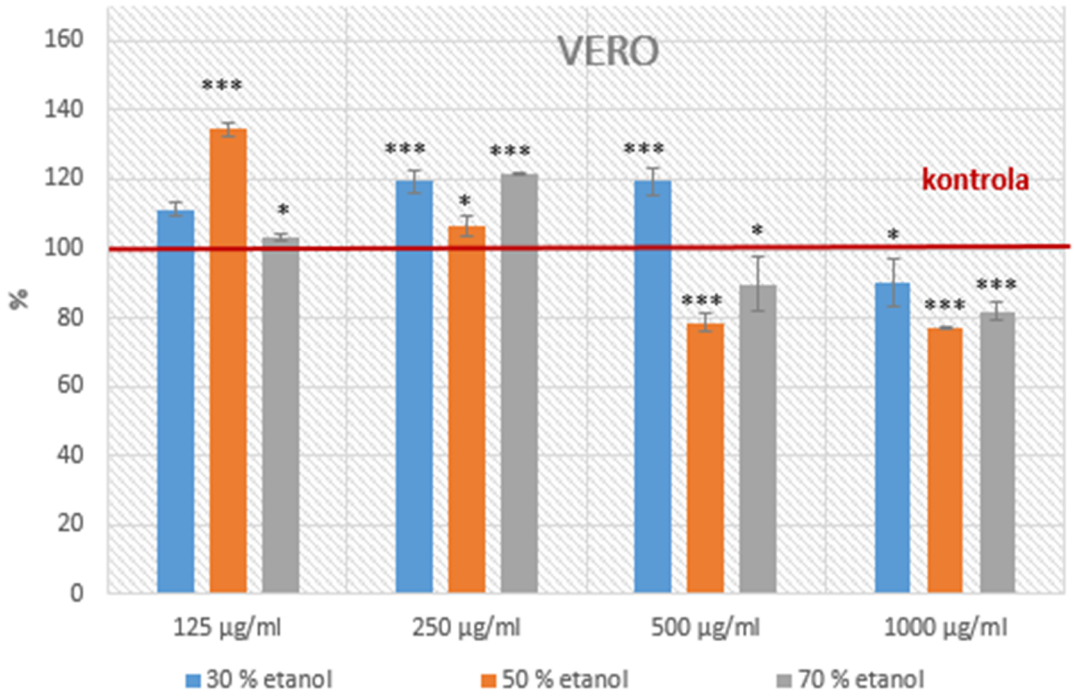
Antiproliferatívny účinok repíka, ktorý je závislý na koncentrácii extraktu zhodne v porovnaní s našimi výsledkami zistili Al-Bederi a Al-Sammarrae (2013), ktorí skúmali inhibičný účinok 8 rôznych koncentrácií vodného a metanolového extraktu repíka nie len na rast modelového organizmu ľudských buniek rabdomyosarkómu RD, ale aj na karcinogénnych bukových línii HeLa metódou *in vitro*. Antiproliferatívny účinok bol selektívny len na bunky rakovinové a zároveň bol výsledný účinok závislý na koncentrácii a doby inkubácie, pretože extrakty s tromi najnižšími koncentráciami 1,0; 2,0; 3,0 µg/ml nevykazovali nijakú účinnú inhibíciu rastu, naopak extrakt s najvyššou koncentráciou 96,0 vykazoval najvyššie percento inhibície rastu počas troch časových úsekoch analýzy. Antiproliferatívne účinky pripisujú obsahovým zložkám repíka, najmä flavonoidom a polyfenolom.

Vplyv extraktu repíka lekárskeho na modelovom organizme metódou *in vitro* bol popísaný aj v štúdii Marcinčáková a kol. (2022), v ktorej bol potvrdený vplyv etanolového

extraktu repíka proti enviromentálnemu účinku bisfenolu A (BPA) využitím črevných epitelových buniek prasaťa IPEC-1. Najnižšie hodnoty bunkové indexu boli zaznamenané pri najvyšších koncentráciách 100 a 200 µg/ml extraktu repíka v porovnaní s kontrolou bez ošetrenia.

V ďalšej časti experimentu sme stanovovali životaschopnosť buniek meraním ich metabolickej aktivity MTT testom. Výsledky sú uvedené v grafe č. 2. Metabolická aktivita bola vyhodnotená po 48 hodinách od exponovania modelového organizmu testovanými extraktami. Vitalita buniek pre jednotlivé koncentrácie extraktov repíka bola vyhodnotená ako percento metabolickej aktivity vzhľadom na kontrolné bunky bez ošetrenia extraktami. Po 48 hodinách bol zaznamenaný signifikantný nárast metabolickej aktivity u buniek ošetrených najnižšími koncentráciami (125 a 250 µg/ml) extraktov. So zvyšujúcou sa koncentráciou bol zaznamenaný výrazný pokles životaschopnosti buniek. V prípade buniek, ktoré boli exponované extraktami v koncentrácii 500 a 1000 µg/ml (50 a 70 % etanolu) bol detegovaný výrazný pokles metabolizmu v porovnaní s bunkami neošetrenými pripravenými extraktami repíka. Koncentrácia použitého extrakčného činidla mala mierny vplyv na bunkovú odpoveď, metabolická aktivita stúpla najvýraznejšie pri nižších koncentráciách extraktu repíka pripraveného pomocou 30 % etanolu, zatiaľ čo najvýznamnejší pokles metabolickej aktivity aj adherencie spôsobil extrakt pripravený pomocou 70 % etanolu.

Graf č. 2, Metabolická aktivita buniek po 48 hodinách pôsobenia extraktov repíka



**** - P < 0,05; *** - P < 0,001 – štatisticky významná zmena oproti kontrole***

Odlišnosť výsledkov analýz experimentu je pochopiteľná z dôvodu rôznych princípov použitých výskumných metód a iných faktorov. A preto bunky, ktoré majú vyhodnotený pokles adherencie, môžu stále vykazovať zvýšenú metabolickú aktivitu, a naopak. Prehľad a porovnanie hodnotených zmien sú sumarizované v tabuľke č. 1.

Tabuľka č. 1, Porovnanie percentuálnych hodnôt adherencie a metabolickej aktivity buniek VERO 48 hodín po expozícii testovanými extraktami

koncentrácia	*µg/ml*	*% adherencie*	*±sd*	*% metabolickej aktivity*	*±sd*
etanol 30 %	125	93,13	±0,06***	111,41	±1,86***
	250	78,98	±6,50***	119,34	±3,52***
	500	30,88	±1,36***	119,37	±3,76***
	1000	2,99	±0,67***	90,34	±6,78*
etanol 50 %	125	64,91	±5,34***	134,41	±1,67***
	250	66,06	±1,27***	106,48	±2,98*
	500	24,22	±0,49***	78,52	±2,6***
	1000	2,24	±0,19***	77,1	±0,17***
etanol 70 %	125	60,38	±2,02***	103,06	±1,01*
	250	57,73	±1,87***	121,87	±0,33***
	500	35,58	±2,04***	89,76	±7,98*
	1000	13,82	±0,23***	82,03	±2,54***

**** - P < 0,05 a *** - P < 0,001 – štatisticky významná zmena oproti kontrole***

Získané výsledky je možné porovnať s japonskou štúdiou, v ktorej Cojocaru-Toma (2020) vykonával štúdium cytotoxického potenciálu stanovovaných extraktov z repíka lekárskeho na metabolizmus pečeňových buniek pomocou MTT testu. Zhodne zistil, že najvyššia analyzovaná koncentrácia 1000 mg/ml spôsobila najnižšiu životaschopnosť testovaných buniek 49,9 % a metabolická aktivita klesala so zvyšujúcou sa koncentráciou extraktu repíka.

V najnovšej štúdii Tsirigotis-Maniecka et al. (2023) analyzovali cytotoxicitu extraktov repíka lekárskeho v koncentráciách v rozmedzí od 1,9 do 1000 µg/ml na dvoch typoch bunkových línií, a to zdravých a rakovinových bunkách, konkrétne meraním rastu bunkovej línie ľudského adenokarcinómu pľúc (A549) a myšacích fibroblastových buniek (L929). Z výsledkov stanovili netoxické pôsobenie extraktu až do koncentrácie 500 µg/ml. Toxické pôsobenie bolo zachytené pri koncentrácii 1000 µg/ml, čo sa prejavilo premenou morfológie buniek, prítomnosťou granúl v cytoplazme s nastávajúcou smrťou buniek.

Na druhej strane, zistený proliferatívny účinok repíka lekárskeho v nižších koncentráciách má potenciálne využitie v terapii hojenia rán. Vasilenko a kol. (2022) v nedávnej slovenskej štúdií vyhodnocovali bunkovú proliferáciu sledovaním reepitelizácie a tvorby granulačného tkaniva *in vivo* a farbením antigénu Ki67 *in vitro*. Zistili pozitívny nárast počtu fibroblastov v mieste rany a rýchlejšiu epidermálnu regeneráciu po ošetrení repíkom. Expresia Ki67 bola závislá od koncentrácie. Najvýraznejší poliferatívny účinok mal extrakt repíka s najnižšou koncentráciou. Všetky testované koncentrácie pôsobili proliferatívne, okrem najvyššej, ktorá inhibovala rast buniek, teda preukázala antiproliferatívny účinok.

ZÁVER

Biologické vlastnosti extraktov repíka boli hodnotené u etanolových extraktov pripravených pomocou 30, 50 a 70 % etanolu pomocou modelového organizmu buniek VERO, ktoré pochádzajú z epitelu obličiek opice.

Systémom xCELLigence (Real-Time Cell Analyser RTCA) sme monitorovali bunkovú odpoveď v reálnom čase (počas 48 hodín), respektíve adherenciu buniek exponovaných etanolovými extraktami repíka. Vo všetkých testovaných koncentráciách sme zaznamenali signifikantné zníženie adherencie buniek oproti kontrolným bunkám bez exponovania pripravenými extraktami. Najvýraznejší pokles adherencie buniek bol detegovaný pri najvyššej použitej koncentrácii 1000 µg/ml etanolového extraktu, pričom adherencia klesala so zvyšujúcou sa koncentráciou extraktov.

Kolorimetrickým testom MTT sme hodnotili zmeny metabolickej aktivity testovaných buniek, ktoré boli rovnako ošetrované etanolovými extraktami repíka testovanej koncentrácie. Bunky vystavené najnižším koncentráciám (120 a 250 µg/ml) sledovaných extraktov a koncentrácii 500 µg/ml (30 % etanolový extrakt) vykazovali signifikantný nárast metabolickej aktivity ($P < 0,05$). So zvyšujúcou sa koncentráciou extraktov repíka sme sledovali výrazný pokles metabolizmu modelových buniek ($P < 0,001$).

Na základe zistených výsledkov môžeme potvrdiť proliferatívne účinky repíka lekárskeho v nižších koncentráciách a antiproliferatívnu aktivitu so zvyšujúcou sa koncentráciou extraktu. Potenciál repíka vo využívaní pri terapii ochorení, či v podpornej liečbe bol potvrdený aj v našej práci, nevyhnutná je však správna voľba extrakčného činidla a aj výber vhodných koncentrácií extraktov vzhľadom na požadovaný farmakoterapeutický zámer.

POĎAKOVANIE

Štúdia vznikla vďaka podpore Agentúry na podporu výskumu a vývoja na základe Zmluvy č. APVV-18-0039 a Národného referenčného laboratória pre pesticídy Univerzity veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach.

POUŽITÁ LITERATÚRA

1. MALHEIROS, J. et al. Vascular Effects of Polyphenols from *Agrimonia eupatoria* L. and Role of Isoquercitrin in Its Vasorelaxant Potential in Human Arteries. In Pharmaceuticals [online]. 2022, vol. 15, no. 5 [cit. 2022-12-11]. Dostupné na internete: <https://doi.org/10.3390/ph15050638>. ISSN 1424-8247.
2. PALUCH, Z. et al. The Therapeutic Effects of *Agrimonia eupatoria* L. In *Physiological Research* [online]. 2020, vol. 69. no. 4 [cit. 2022-12-1]. Dostupné na internete: <https://doi.org/10.33549/physiolres.934641>. ISSN 1802-9973.
3. ABUBAKAR, A. – HAQUE, M. Preparation of Medicinal Plants: Basic Extraction and Fractionation Procedures for Experimental Purposes. In *Journal of Pharmacy And Bioallied Sciences* [online]. 2020, vol. 12, no 1 [cit. 2022-12-14]. Dostupné na internete: <http://dx.doi.org/10.4103/jpbs.JPBS_175_19>. ISSN 0975-7406.
4. GURJAR, M. S. et al. Efficacy of plant extracts in plant disease management. In *Agricultural Sciences* [online]. 2012, vol. 3, no. 3 [cit. 2022-12-14]. Dostupné na internete: <http://dx.doi.org/10.4236/as.2012.33050>. ISSN 2156-8561.
5. MILEK, Michal - MARCINČÁKOVÁ, Dana - KOLESÁROVÁ, Mária - LEGÁTHOVÁ, Diana - DZUGAN, Malgorzata. The effect of adding spices to green walnut tinctures on their polyphenolic profile, antioxidant capacity and action on renal cells. In *Applied Sciences*. ISSN 2076-3417, 2022, vol. 12, no. 7, art. no. 3669, p. [1-13]. (2020: 2.679 - IF, 2.736 - IF 5y, 52 - H-index, 0.435 - SJR, Q2 - SJR Best Q, Q2 - JCR Best Q). Dostupné na internete: <https://www.mdpi.com/2076-3417/12/7/3669>.
6. MARCINČÁKOVÁ, D. et al. POTENTIAL ROLE OF *AGRIMONIA EUPATORIA L.* EXTRACT IN CELL PROTECTION AGAINST TOXICITY INDUCED BY BISPHENOL A. In *FOLIA VETERINARIA* [online]. 2022, vol. 66, no. 1 [cit. 2023-01-12]. Dostupné na internete: <https://doi.org/10.2478/fv-2022-0004>. ISSN 2453-7837.
7. COJOCARU-TOMA, M. Agrimonia eupatoria l. as a source of biologically active compounds. In *Perspectives of world science and education.* Osaka : CPN Publishing Group, 2020. ISBN 978-4-9783419-8-3. p. 18-27.
8. TSIRIGOTIS-MANIECKA, M. Antioxidant and Protective Effects of the Polyphenolic Glycoconjugate from *Agrimonia eupatoria L*. Herb in the Prevention of Inflammation

in Human Cells. In *Journal of Functional Biomaterials* [online]. 2023, vol. 14, no. 4 [cit. 2022-12-17]. Dostupné na internete: <https://doi.org/10.3390/jfb14040182>. ISSN 2079-4983.

9. VASILENKO, T. et al. *Agrimonia eupatoria L*. Aqueous Extract Improves Skin Wound Healing: An In Vitro Study in Fibroblasts and Keratinocytes and In Vivo Study in Rats. In *In vivo* [online]. 2022, vol. 36, no. 3 [cit. 2022-12-5]. Dostupné na internete: < https://doi.org/10.21873/invivo.12822>. ISSN 1791-7549.

Kontaktná adresa: Marcinčáková Dana, Department of Pharmacology and Toxicology, University of Veterinary Medicine and Pharmacy in Košice, Komenského 73, 041 81 Košice, Slovak Republic; E-mail: dana.marcincakova@uvlf.sk

VPLYV PROBIOTÍK A HUMÍNOVYCH LÁTOK NA CHEMICKÉ ZLOŽENIE A MINERÁLNY PROFIL SVALOVINY HYDINY

THE EFFECT OF PROBIOTICS AND HUMIC SUBSTANCES ON THE CHEMICAL COMPOSITION AND MINERAL PROFILE OF POULTRY MUSCLE

Mesarčová Lýdia, Koréneková Beáta, Reitznerová Anna, Makiš Andrej, Naď Pavel, Jevinová Pavlína, Pipová Monika, Koščová Jana, Bujňák Lukáš, Bartkovský Martin

Katedra hygieny a technológie potravín, Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, Komenského 73, 041 81 Košice, Slovenská republika

ABSTRACT

The purpose of this study was to assess the impact of adding probiotics and humic substances, as well as their combination, on turkey meat quality and muscle development (basic chemical composition and mineral profile of breast muscle). In the experiment, 40 seven-week-old turkeys were divided into 4 groups at random. Throughout the experiment, the control group (KS) was given a conventional feed mixture made for turkeys. The standard feed mixture was supplemented with 0.5% Humac MycotoxiSorb containing humic acids for the second group of animals (HK), *Lactobacillus fermentum* 2I3 probiotic supplement was added to the animals' water every morning for the third group (HKP), and the standard feed mixture and probiotic supplement were given to the fourth group of animals (P). Although the protein content of the meat was unaffected, the addition of humic compounds, probiotics, and their combination significantly reduced the amount of fat in the turkeys' breast muscles. In the experimental groups that contained HL, we noticed a considerable rise in the amount of calcium, iron, sodium, and zinc in the turkey breast muscle.

Key words: humic acid, probiotics, turkey muscle, minerals, chemical composition

ÚVOD

Existuje viacero dôvodov, prečo je morčacie mäso medzi spotrebiteľmi obľúbené. Patrí do skupiny potravín, ktoré sú zaradzované do diéty vhodnej pri znižovaní hmotnosti. Obsahujú vysoké množstvo vitamínov, minerálov, cenných aminokyselín a nízky obsah cholesterolu. Je značne obľúbené aj kvôli pomerne krátkemu času potrebnému na kulinársku prípravu. Vo veľkochovoch, kde sa chová hydina, je častý výskyt problémov súvisiacich s rôznymi ochoreniami a zhoršenými environmentálnymi podmienkami vedúcimi k ekonomickým stratám. Získanie kontroly nad chorobami a preventívne opatrenia prispeli k nárastu využívania

veterinárnych antimikrobiálnych prípravkov, avšak obavy z vývoja antimikrobiálnej rezistencie patogénnych baktérií vedú k neustálemu hľadaniu vhodných alternatív.

Jednou z možných súčasných alternatív stimulácie a podpory rastu, zdravia hydiny a jej úžitkovosti sú humínové látky (HL) (Arif et al., 2019). Sú to prirodzene sa vyskytujúce rozložené organické zložky pôdy a lignitu, ktoré sú komplexnými zmesami polyaromatických a heterocyklických zlúčenín s viacerými bočnými reťazcami karboxylových kyselín (Mac-Carthy, 2001).

Suplementácia komerčných prípravkov s obsahom HL pridávaná do pitnej vody alebo do krmiva brojlerov sa podieľala na zvýšení množstva spotrebovaného krmiva, jeho využití a zvyšovaní hmotnostných prírastkov brojlerových kurčiat a tiež zlepšila hmotnosti vajec a mala za následok zvýšenie produkcie vajec u nosníc (Arif et al., 2019). Okrem stimulácie rastu sa HL uplatnili v podpore imunity a zvyšovaní odolnosti voči stresu u vtákov (Mudroňová et al., 2020) a konkrétne u brojlerov sa zlepšila ileálna stráviteľnosť energie a zadržiavanie živín (Gomez-Rosales a Angeles, 2015). Od roku 2015 boli humínové látky povolené Európskou komisiou na používanie vo výžive všetkých druhov zvierat ako produkt, ktorý vznikol prírodnou humifikáciou rastlinných zložiek (Humac Portal, 2017). Bolo potvrdené, že pridávanie HL do krmiva prispieva k dobrému zdravotnému stavu zvierat, má pozitívny vplyv na produkčné parametre a pri ich podávaní navyše nie je nutné dodržiavanie ochranných lehôt (Skalicka et al., 2021).

Za jednu z ďalších možných alternatív sa považujú probiotiká. V súčasnosti farmy, vrátane hydinárskych, používajú komplexné biologicky aktívne látky, prebiotiká a probiotiká najmä na podporu vývoja a rastu mladých hospodárskych zvierat a hydiny (Amirkhanov et al., 2017).

FAO/WHO aktuálne definuje probiotiká ako: „živé mikroorganizmy, ktoré pri podávaní v primeraných množstvách prinášajú hostiteľovi zdravotný prínos“ (FAO/ WHO, 2001). Probiotiká sú jednou z doplnkových látok do vody a krmiva – sú to živé mikroorganizmy, ktoré pri správnom dávkovaní vhodne ovplyvňujú mikrobiálny ekosystém čreva hostiteľa tým, že zabezpečujú priaznivú rovnováhu medzi komenzálnou a patogénnou mikroflórou (Śmiałek et al., 2021).

Probiotické druhy patriace k *Bacillus, Bifidobacterium, Enterococcus, Aspergillus, Lactobacillus, Streptococcus, Candida* a *Saccharomyces* sa uplatňujú vo výžive brojlerových kurčiat. Medzi ich najvýznamnejšie benefity pre rast a vývoj brojlerov sa potvrdili priaznivý vplyv na moduláciu črevnej mikroflóry a inhibíciu patogénov (Higgins et al., 2007), pozitívny vplyv na úžitkovosť (Ashayerizadeh et al., 2009), histologické zmeny na sliznici čriev (Chichlowski et al., 2007), úpravu niektorých biochemických parametrov, vrátane krvných

(Mathivanan et al., 2007), vylepšenie senzorických vlastností kulinársky upraveného mäsa brojlerov (Pelicano et al., 2003) a podporu mikrobiologickej kvality brojlerov (Kabir et al., 2004).

V tomto experimente sa preto skúmal vývin prsnej svaloviny u moriek a to, aký vplyv malo podávanie kombinácie humínových látok a probiotík na jej vývin a tiež vplyv podávania kombinácie týchto suplementov na minerálny profil a základné chemické parametre prsnej svaloviny moriek.

MATERIÁL A METODIKA

Sedemtýždňové morky plemena Hybrid Converter (*farma Nadbudvar, Hungary*) boli zvážené a náhodne rozdelené do 4 skupín (n=40). Vytvorené skupiny boli kŕmené nasledovným spôsobom: 1. KS – kontrolná skupina dostávala počas celej doby trvania experimentu štandardnú kŕmnu zmes (KZ) určenú pre morky (*De Heus, a.s., Česká republika*). 2. skupina - HK mala štandardnú KZ doplnenú o 0,5 % prídavok Humac MycotoxiSorb primiešanú ku základnej kŕmnej zmesi, 3. skupina HKP dostávala počas celej doby trvania experimentu prídavok 0,5 % Humac MycotoxiSorb k základnej kŕmnej zmesi a zároveň mala vodu obohatenú prídavkom probiotík kmeňa *Lactobacillus fermentum* 2I3, získaný z Českej zbierky mikroorganizmov z Brna. Inokulum bolo pripravované v čerstvom stave, v bujónovej suspenzii, so zabezpečením počtu baktérií 1,1×108 KTJ/ml aplikovaných v množstve 1 ml/kus do malého objemu vody pri rannom napájaní. 4. skupina P bola kŕmená štandardnou KZ a dostávala prídavok probiotík v pitnej vode každé ráno pri kŕmení. Zvieratá boli kŕmené adlibitne a mali neobmedzený prístup k pitnej vode počas celej doby trvania experimentu (70 dní).

Na štatistické spracovanie výsledkov bol použitý Graph Pad Prism 8.3 (2018, GraphPad Software, San Diego, California, USA). Výsledky pokusu boli vyjadrené ako priemery a smerodajné odchýlky (priemer ± SD).

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Hodnoty chemického zloženia v prsnej svalovine moriek sú uvedené v tabuľke 1. V skupine zvierat HKP, ktorej boli podávané probiotiká v kombinácii s HL bolo namerané štatisticky významne najnižšie množstvo tuku ($P < 0,05$). Nižšie množstvá tuku boli zistené aj v skupine HK (1,667 % ± 0,49), najviac tuku v prsnej svalovine bolo stanovené v kontrolnej skupine (2,089 %), podobne ako v štúdii Semjon et al. (2020). Skrmovanie humínových látok, probiotík ani ich kombinácie nemalo vplyv na celkový obsah bielkovín v prsnej svalovine morčacieho mäsa, čo podporila aj štúdia kolektívu autorov Korsakov et al. (2019), kde pri obohatení pitnej vody prídavkom HL (v množstve 0,5 $ml.l^{-1}$) sa množstvo bielkovín vo

svalovine bojlerových kurčiat oproti kontrolnej skupine nezmenilo. Na druhej strane, v štúdii Semjon et al. (2020) obohatenie krmiva prídavkom HL u brojlerových kurčiat malo vplyv na výslednú kvalitu mäsa, a to zvýšením obsahu bielkovín a znížením podielu tuku. Aj v nami zaznamenaných výsledkoch je obsah celkových bielkovín vyšší v pokusných skupinách v porovnaní s kontrolou ($P > 0,05$), pričom najvyšší obsah celkových bielkovín bol zaznamenaný v pokusnej skupine P po pridávaní probiotického kmeňa do vody moriek.

V tabuľke č. 2 je uvedený obsah vybraných minerálnych prvkov nameraných v svalovine morčacieho mäsa (v mg.kg-1). Obsah minerálnych látok (sodík, vápnik, železo a zinok) v morčacom mäse bol u pokusných skupín a kontroly rozdielny. Štatisticky významné rozdiely medzi kontrolou a experimentálnymi skupinami boli zaznamenané hlavne u pokusných skupín HK a HKP, kde bol do KZ morkám pridávaný prípravok s obsahom HL. Aj obsah draslíka bol u pokusných skupín HK a HKP vyšší ako u kontroly ($P > 0,05$). Podobne aj Skalicka et al. (2021) v štúdii uvádza, že použitie 0,7 % a 0,3 % Humac Natur AFM Mycotoxisorb ako doplnku krmiva prispelo k zvýšeniu obsahu vápnika a horčíka v svalovine brojlerov. Popisuje sa, že zmeny v koncentráciách po pridaní humínových kyselín boli spôsobené vzájomnými interakciami a tvorbou chelátových komplexov s prvkami (Skalicka et al. 2021).

Tabuľka č. 1, Chemické zloženie morčacieho mäsa

vzorka	sušina %	voda %	tuk %	bielkoviny %
KS	$31,76 \pm 1,14^{ab}$	$68,33 \pm 1,10^{ab}$	$2,09 \pm 0,54^{a}$	$25,62 \pm 1,74$
HK	$31,89 \pm 0,89^{ab}$	$68,11 \pm 0,89^{ab}$	$1,67 \pm 0,49^{ab}$	$26,20 \pm 0,61$
HKP	$30,80 \pm 0,86^{b}$	$69,15 \pm 0,90^{a}$	$1,31 \pm 0,33^{b}$	$26,29 \pm 0,27$
P	$32,53 \pm 1,35^{a}$	$67,47 \pm 1,34^{b}$	$1,99 \pm 0,68^{a}$	$26,54 \pm 0,29$

KS — kontrolná skupina bez prídavkov vo výžive, HK - 0,5 % prídavok Humac MycotoxiSorb s obsahom humínových kyselín; HKP —0,5 % prídavok Humac MycotoxiSorb + fortifikácia vody probiotikami 1 ml/kus, P – fortifikácia vody probiotikami 1 ml/kus. Priemery zdieľajúce rozdielny horný index (a - b) sú štatisticky významné (Tukeyho test, $p < 0,05$).

Tabuľka č. 2, Obsah vybraných minerálnych prvkov vo svalovine morčacieho mäsa (mg.kg^{-1})

	KS mg.kg^{-1}	HK mg.kg^{-1}	HKP mg.kg^{-1}	P mg.kg^{-1}
sodík	400,95 ± 32,17^{a}	462,45 ± 19,45^{b}	453,95 ± 1,48^{b}	472,10 ± 31,40^{b}
horčík	278,55 ± 22,98	297,74 ± 16,64	293,45 ± 8,56	284,50 ± 3,54
draslík	2733,50 ± 170,41	2813,00 ± 159,81	2787,50 ± 89,80	2598,00 ± 89,10
vápnik	84,63 ± 4,42^{b}	95,41 ± 1,83^{a}	91,50 ± 2,97^{ab}	93,98 ± 3,85^{a}
železo	7,70 ± 1,25^{b}	15,41 ± 2,67^{a}	12,56 ± 0,32^{a}	6,77 ± 1,62^{b}
zinok	4,30 ± 0,03^{b}	5,48 ± 0,98^{a}	5,23 ± 0,19^{a}	5,08 ± 0,72^{ab}

KS — kontrolná skupina bez prídavkov vo výžive, HK - 0,5 % prídavok Humac MycotoxiSorb s obsahom humínových kyselín; HKP —0,5 % prídavok Humac MycotoxiSorb + fortifikácia vody probiotikami 1 ml/kus, P – fortifikácia vody probiotikami 1 ml/kus. Priemery zdieľajúce rozdielny horný index (a - b) sú štatisticky významné (Tukeyho test, $p < 0,05$).

ZÁVER

Z uvedených výsledkov je možné konštatovať, že prídavok samotných humínových látok v podobe prípravku Humac MycotoxiSorb v dávke 0,5 % do kŕmnej dávky moriek určených na výkrm mal vplyv na zníženie obsahu tuku v morčacom mäse, a to i v kombinácii s prídavkom probiotík. Zdá sa, že obohatenie vody probiotikami *Lactobacillus fermentum* 2I3 nemá vplyv na chemické zloženie mäsa moriek. Fortifikácia výživy moriek vyššie uvedenými aditívami nemá vplyv na obsah bielkovín vo svalovine. Zmeny v obsahu minerálnych látok v morčacom mäse po pridávaní uvedených kŕmnych aditív sa potvrdili hlavne u pokusných skupín s prídavkom HL v krmive, kde došlo k nárastu obsahu vápnika, železa, sodíka a zinku.

POĎAKOVANIE

Táto publikácia vznikla vďaka podpore v rámci Operačného programu Integrovaná infraštruktúra pre projekt: *Dopytovo-orientovaný výskum pre udržateľné a inovatívne potraviny, Drive4SIFood 313011V336*, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

POUŽITÁ LITERATÚRA

1. AMIRKHANOV, K. et al. Comparative analysis of red and white Turkey meat quality. In *Pakistan Journal of Nutrition*. 2009, vol. pp. 16 (6): 412-416.

2. ARIF, M. et al. Humic acid as a feed additive in poultry diets: a review In *Iran Journal of Veterinary Research*. 2019, Summer; vol, 20(3), pp. 167-172. PMID: 31656520; PMCID: PMC6811714.
3. ASHAYERIZADEH, A. et al. Effect of dietary antibiotic, probiotic and prebiotic as growth promoters, on growth performance, carcass characteristics and hematological indices of broiler chickens. In *Pakistan Journal of Biological Sciences*. 2009, vol, 12, pp. 52–57.
4. FAO/WHO. Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. In Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation on Evaluation of Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food Including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria; FAO/WHO: Amerian Córdoba Park Hotel, Córdoba, Argentina, 2001, pp. 1–34.
5. HIGGINS, J.P. et al. Temporal effects of lactic acid bacteria probiotic culture on Salmonella in neonatal broilers. In *Poultry Science*. 2007, vol, 86, pp. 1662–1666.
6. HUMACPORTAL. Certifikát o voľnom predaji. [cit. 1. 2. 2023]. Dostupné na: https://humac-portal.eu/certificate/humac-natur-afm-pufer/
7. MUDROŇOVÁ, D. et al. The effect of humic substances on gut microbiota and immune response of broilers. In *Food and Agricultural Immunology*. 2020, vol, 31, pp. 137–149.
8. CHICHLOWSKI, M. et al. Microarchitecture and spatial relationship between bacteria and ileal, cecal, and colonic epithelium in chicks fed a direct-fed microbial, primalac, and salinomycin. In *Poultry Science*. 2007, vol, 86, pp. 1121–1132.
9. KABIR, S.M.L. et al. Potentiation of probiotics in promoting microbiological meat quality of broilers. In *Journal of the Bangladesh Society for Agricultural Science and Technology*. 2005, vol, 2, p. 93–96.
10. KORSAKOV, K. et al. The effect of humic acids on the natural resistance of the body of broiler chickens and the quality of their meat. In *Agronomy Research*. 2019, vol, 17(S2), pp. 1356–1366. . Dostupné na: https://doi.org/10.15159/AR.19.088
11. MACCARTHY, P. The principles of humic substances. In *Soil Science*. 2001, 166:738–751.
12. MATHIVANAN, R., AND KALAIARASI, K. Panchagavya and Andrographis paniculata as alternative to antibiotic growth promoters on haematological, serum biochemical parameters and immune status of broilers. In *Journal of Poultry Science*. 2007, vol, 44, pp. 198–204.
13. PELICANO, E.R.L. et al. Effect of different probiotics on broiler carcass and meat quality. In British *Poultry Science*. 2003, vol, 5, pp. 207–214.

14. SEMJON, B. et al. Multiple factorial analysis of physicochemical and organoleptic properties of breast and thigh meat of broilers fed a diet supplemented with humic substances, In *Poultry Science*. 2020, vol, 99 (3), pp. 1750-1760. ISSN 0032-5791. Dostupné na: https://doi.org/10.1016/j.psj.2019.11.012.
15. SKALICKÁ, M. et al. Impact of Dietary Humic Substances Supplementation on Selected Minerals in Muscles of Broiler Chickens. In *Folia Veterinaria*. 2021, vol.65, no.3, 2021, pp.51-59. Dostupné na: https://doi.org/10.2478/fv-2021-0027
16. ŚMIAŁEK, M. et al. The Use of Probiotics in the Reduction of Campylobacter spp. Prevalence in Poultry. In *Animals.* 2021, vol. 11, pp. 1355. Dostupné na: https://doi.org/10.3390/ani11051355.

Kontaktná adresa: Mesarčová Lýdia, Department of Food Hygiene and Technology, University of Veterinary Medicine and Pharmacy in Košice, Komenského 73, 041 81 Košice, Slovak Republic; E-mail: lydia.mesarcova@uvlf.sk

RAST PROSPEŠNÝCH BAKTÉRIÍ V PRÍTOMNOSTI RÔZNYCH KONCENTRÁCIÍ A FORIEM HUMÍNOVÝCH LÁTOK

GROWTH OF BENEFICIAL BACTERIA IN THE PRESENCE OF DIFFERENT CONCENTRATION AND FORMS OF HUMIC SUBSTANCES

Moskáľová Lenka, Mudroňová Dagmar, Chomová Natália, Ratvaj Marek

Katedra mikrobiológie a imunológie, Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, Komenského 73, 041 81 Košice, Slovenská republika

ABSTRACT

Humic substances (HS) are a frequent subject of research not only in agriculture but also in human and especially veterinary medicine. However, interactions with probiotic bacteria are still not sufficiently studied. HS are substances of natural, organic origin. The aim of this work was to test the effect of different concentrations (0.4%, 0.6%, 0.8% and 1%) and forms (solid and liquid) of HS on the growth of the beneficial probiotic strains Levilactobacillus brevis B50 (CCM 8618), Apilactobacillus kunkeei V18, Lactobacillus plantarum R2 and Lactobacillus fermentum R3. HS were added directly to growth medium (MRS broth) with the respective probiotic strain and then evaluated by plate method after 48 h anaerobic cultivation. We found that the liquid form of HS had a more significant effect on the growth of the beneficial strains compared to the solid form of HS. Also, concentrations of 0.4 - 0.6% did not significantly affect the growth of beneficial bacterial strains. At concentrations of 0,8 - 1% there was in some cases a significant effect on the growth of the tested bacterial strains. Based on our results, we determined the appropriate non-inhibitory concentrations of each HS type for the tested strains. These concentrations will be used for further experiments.

Key words: Humic substances, lactic acid bacteria, probiotics, inhibition

ÚVOD

HL sú látky prírodného, organického pôvodu s jedinečným netoxickým zložením. Vznikajú rozkladom rastlín a prirodzene sa vyskytujú vo vode, rašeline, pôde a hnedom uhlí (Van Rensburg, 2015). Z chemického hľadiska predstavujú HL heterogénnu a veľmi hojnú skupinu organických zlúčenín, široko rozšírenú na zemskom povrchu. Humínové látky obsahujú humus, humínové kyseliny, fulvonové kyseliny a minerálne látky (Stevenson, 1994). Využitie HL je uplatňované najmä v poľnohospodárstve, veterinárnej ako aj humánnej

medicíne. Vďaka špecifickému zloženiu sa vyznačujú detoxikačným, antivirotickým, baktericídnym a protizápalovým účinkom na organizmus (Islam et al., 2005). Tak isto sú využívané pri terapii hypersenzitívnej oneskorenej reakcie, terapii poodstavovej hnačky a vďaka ich schopnosti znižovať hladinu C-reaktívneho proteínu u pacientov trpiacich osteoartrózou kolena (Van Rensburg, 2015). Vo veterinárnej medicíne sú HL vyhľadávané aj vďaka ich schopnosti naviazať mykotoxíny a ťažké kovy. Aj napriek ich bohatému spektru účinkov, vplyv na prospešnú mikrobiotu nie je dodnes dostatočne preskúmaný. Zloženie črevného mikrobiómu úzko súvisí s imunitou organizmu a môže ovplyvniť zdravie hostiteľa tým, že moduluje jeho imunitný systém (Kwong et al., 2017). Narušenie mikrobioty v dôsledku vystavenia organizmu stresovým faktorom ako aj pesticídom, xenobiotikám priamo ovplyvňuje toto krehké zloženie a zvyšuje náchylnosť organizmu k patogénnym agensom. Aplikácia probiotických prípravkov potvrdila potenciál probiotík zvyšovať imunitu a teda zvyšovať odolnosť organizmu voči patogénom, stresu a lepšie využívať krmivo(Maruščáková et al., 2020; Cingeľová Maruščáková et al., 2021).

Keďže interakcia medzi humínovými látkami a probiotickými baktériami nie je dodnes dostatočne preskúmaná, cieľom tejto práce bol sledovať vplyv humínových látok a ich rôznych koncentrácií a foriem, na rast probiotických kmeňov *Levilactobacillus brevis* B50, *Apilactobacillus kunkeei* V18, *Lactobacillus plantarum* R2, *Lactobacillus fermentum* R3.

MATERIÁL A METODIKA

Probiotické kmene

Na experiment boli použité probiotické kmene včiel: *Levilactobacillus brevis* B50, *Apilactobacillus kunkeei* V18 a rýb: *Lactobacillus plantarum* R2 a *Lactobacillus fermentum* R3.

Humínové látky

Použité boli HL tekutej (HUMAC® Natur AFM Liquid) ako aj tuhej formy (HUMAC® Natur AFM, HUMAC® Natur AFM MycotoxiSorb, HUMAC® Nativ). HL boli pridávané do MRS bujónu (Biolife) pre všetky testované kmene, v koncentáciách: 0% (kontrola), 0,4%, 0,6%, 0,8%, 1%. Použité boli prípravky HUMAC® Natur AFM Liquid (humínové kyseliny v sušine min. 45%), HUMAC® Natur AFM (humínové kyseliny v sušine min 65%), HUMAC® Natur AFM MycotoxiSorb (humínové kyseliny min 65%) a HUMAC® Nativ (humínove kyseliny 71,86%).

Príprava suspenzie

Z kolónií príslušných kmeňov bolo pripravené inokulum v koncentrácii MacFarland 1 (5 ml fyziologického roztoku + bakteriálne kolónie). Inokulum bolo následne naočkované do MRS

bujónu (40 ml MRS bujónu +0,4 ml inokula) s prídavkom HL (prídavok : 0,4%, 0,6%, 0,8%, 1%). Kultivácia prebiehala pri stálom trepaní, pri teplote 37°C, počas noci. Po kultivácií boli počty stanovené po desiatkovom riedení štandardnou platňovou metódov na MRS agare (Merck). Výsledky boli vyhodnocované po 48 hodinovej anaeróbnej kultivácii za požitia vyvíjačov anaeróbneho prostredia (AnaeroGen™ 2.5L, Thermo Scientific™) .

Štatistické vyhodnocovanie výsledkov

Na štatistické vyhodnotenie bol použitý GraphPad Prism verzia 8.3.0, aplikovaná bola jednorozmerná Anova s doplnkovým testom Dunnett.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

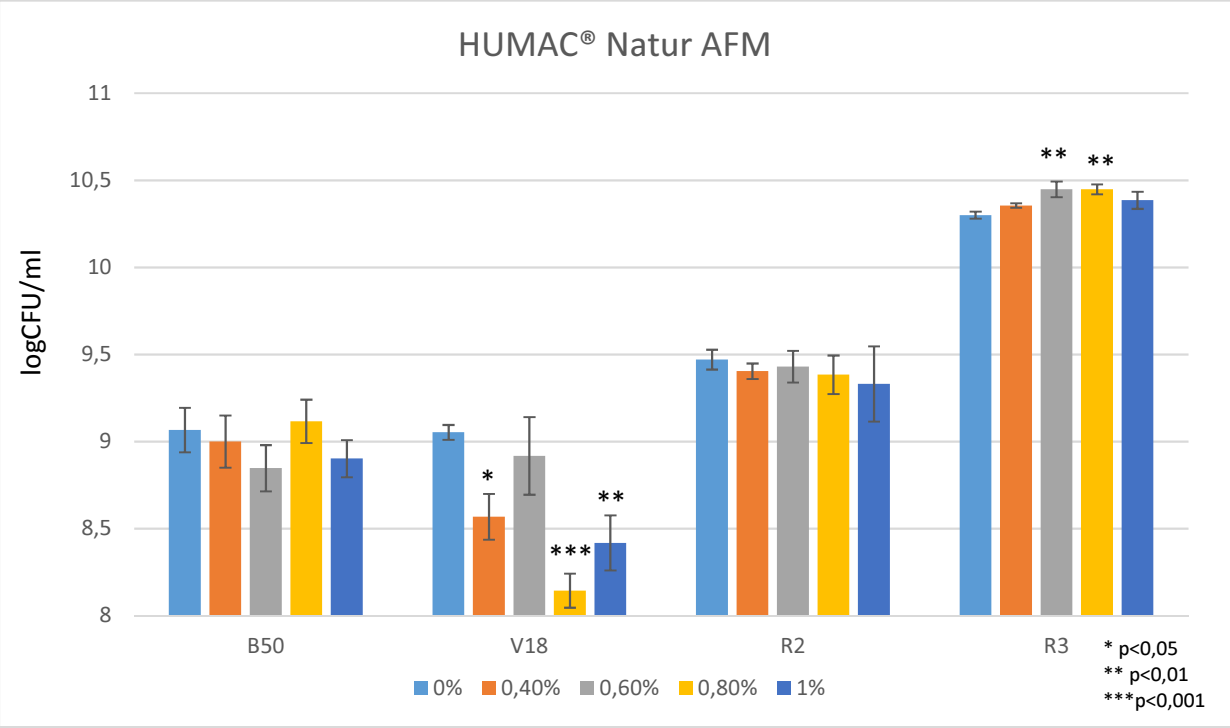
V súčasnej dobe sa záujem o využitie prírodných látok v terapií ako aj podpore imunitného systému zvýšil aj vďaka ich schopnosti nezaťažovať životné prostredie. HL sa preukázali ako prospešné nie len v oblasti produkcie plodín ale aj oblasti zdravia ľudí a zvierat(Goel et al., 2021). Látky prírodného pôvodu sú vyhľadávané pre terapeutické a profilaktické účely aj v dôsledku zákazu používania antibiotických preparátov v chove včely medonosnej (*Apis Mellifera*) v EÚ, ako aj regulácie a minimalizácie ich používania u ďalších druhov hospodárskych zvierat vrátane rýb. Naším cieľom bolo testovanie vplyvu HL na rast vybraných probiotických baktérií.

Naše výsledky (Graf č. 1-4)pre *L. brevis* B50 CCM (8618) poukazujú na fakt, že HUMAC® Natur AFM Liquid najvýznamnejšie ovplyvňoval jeho rast a to pri koncentráciách 0,6 % ($p<0,05$) a 1% ($p<0,01$) prídavku. *A. kunkeei* V18 vykazoval signifikantnejší pokles rastu v prítomnosti HL a to najmä v prítomnosti HUMAC® Natur AFM (Graf č. 1), pri koncentráciách 0,4% ($p<0,05$), 0,8% ($p<0,001$), a 1% ($p<0,01$), v prítomnosti HUMAC® Natur AFM Liquid (Graf č.2) pri koncentráciách 0,6% ($p<0,01$), 0,8% ($p<0,05$), a 1% ($p<0,05$) a v prítomnosti HUMAC® Nativ (Graf č. 4) pri koncentrácií 1% ($p<0,05$). Signifikantný vplyv na rast *L. plantarum* R2 mal HUMAC® Nativ (Graf č.4), a to pri koncentráciách 0,6% ($p<0,01$) a 1% ($p<0,01$). Pre ostatné HL nebol pri danom kmeni zaznamenaný signifikantný vplyv na jeho rast. Štúdia zameraná na vplyv HL na moduláciu bakteriálneho zloženia u rýb poukázala na nižšie zastúpenie rodov *Enterobacteriales a Bacillales* v črevách rýb po aplikácií HL(Louvado et al., 2021). Naše výsledky pre kmeň *L. fermentum* R3 zaznamenali signifikantné zmeny v prospech rastu pri použití HL HUMAC® Natur AFM (Graf č.1), a to pri koncentráciách 0,6% ($p<0,01$) a 0,8% ($p<0,01$). HL HUMAC® Nativ (Graf č. 4) tak isto preukázala pozitívny vplyv na rast *L. fermentum* R3 pri prídavku 1% ($p<0,05$). Štúdia zameraná na vplyv HL na rast baktérií poukazuje na schopnosť HL stimulovať rast pôdnych baktérií ako aj baktérií spojených s tráviacim traktom dážďovky a taktiež poukázala na rôznorodú reakciu

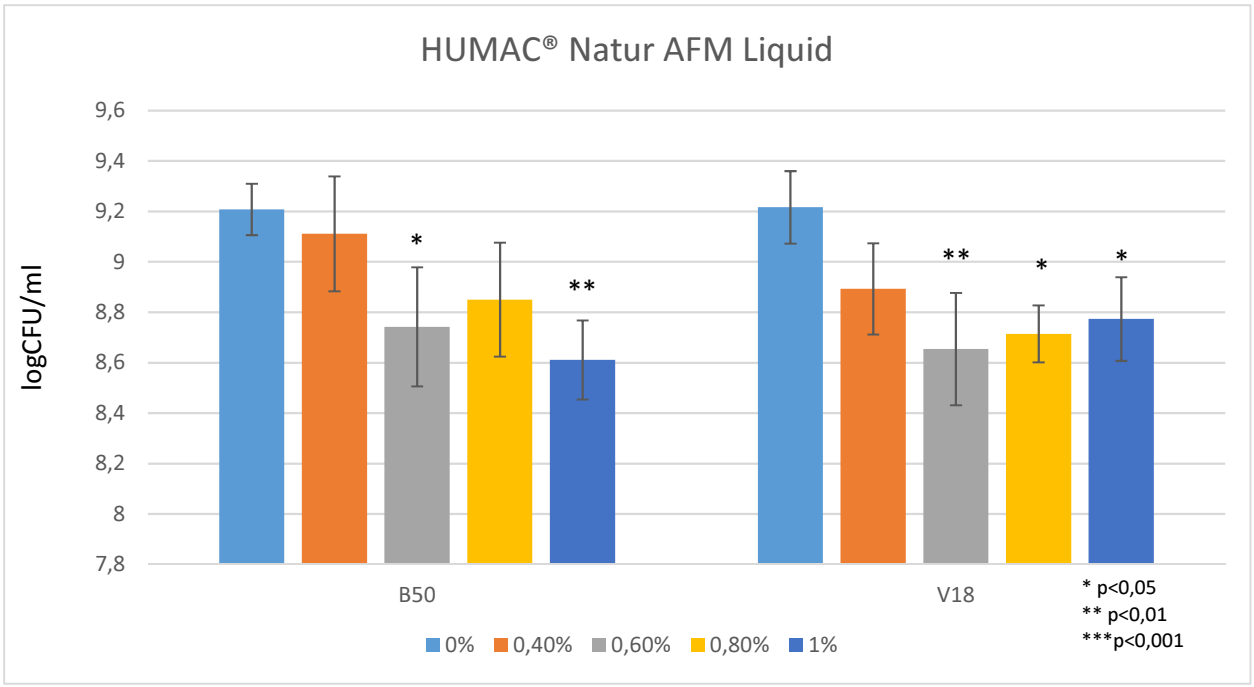
baktérií (na úrovni kmeňov) na prítomnosť humínových kyselín (Tikhonov et al., 2010). Je zrejmé, že humínové kyseliny sú bohatým zdrojom na organický uhlík, draslík fosfor a ďalšie živiny, ktoré môžu baktérie využívať ako substrát (Maguey-González et al., 2022)

Naopak nepriaznivý vplyv na rast *L. fermentum* R3 bol zaznamenaný pri použití HUMAC® Natur AFM MycotoxiSorb (Graf č.3) a to pri koncentráciách 0,4%($p<0,05$) a 0,6% ($p<0,05$). Experimentálna štúdia, podľa Mudroňová et al., (2020), na bojlerových kurčatách poukazuje na fakt, že prídavok humínových látok nie len že znížil výskyt *Enterobacteriaceae* v zložení mikrobioty ale zároveň pozitívne ovplyvnil zastúpenie baktérií mliečneho kvasenia. Na podobné výsledky poukazuje aj Aksu, et al., (2009). Avšak koncentrácia HL hrá rolu v ovplyvnení črevnej mikrobioty. Na tento fakt poukazuje štúdia zameraná na prežúvavce, kde pri použití dávky 3,0 g humínovej substancie na deň sa znížila hojnosť a diverzita mikrobiálneho spoločenstva (Terry et al., 2018). Je však potrebné dodať, že vplyv HL na probiotické kmene a mikrobióm si vyžaduje ďalšie experimenty.

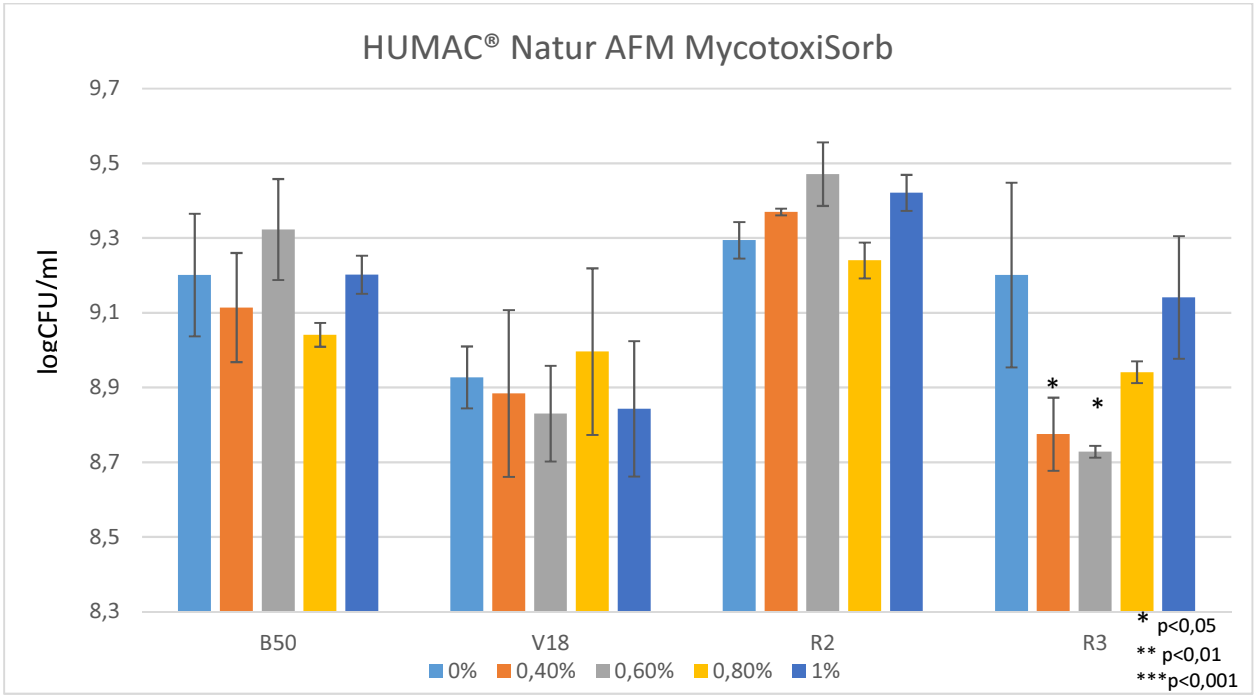
Graf č. 1, Vplyv prídavku HUMAC® Natur AFM do kultivačného média na počty baktérií mliečneho kvasenia *L. brevis* B50, *A. kunkeei* V18, *L. plantarum* R2 a *L. fermentum* R3



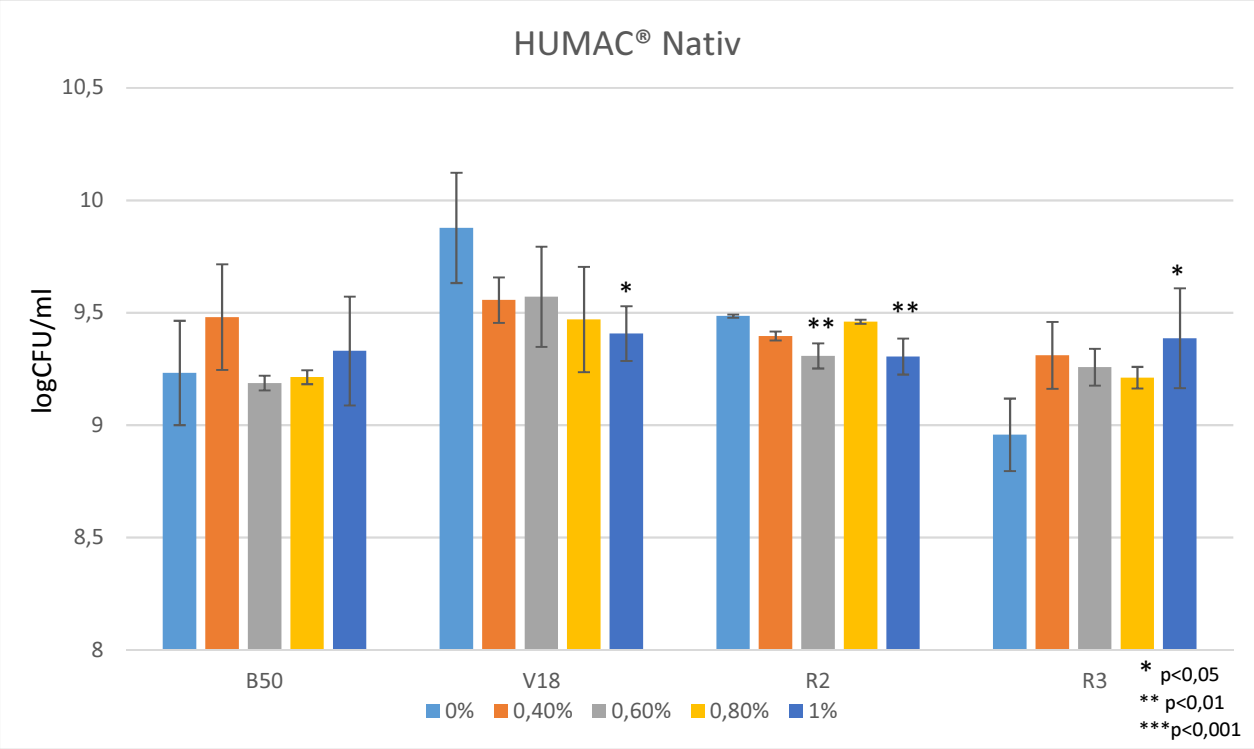
Graf č. 2, Vplyv prídavku HUMAC® Natur AFM Liquid do kultivačného média na počty baktérií mliečneho kvasenia *L. brevis* B50, *A. kunkeei* V18, *L. plantarum* R2 a *L. fermentum* R3



Graf č. 3, Vplyv prídavku HUMAC® Natur AFM MycotoxiSorb do kultivačného média na počty baktérií mliečneho kvasenia *L. brevis* B50, *A. kunkeei* V18, *L. plantarum* R2 a *L. fermentum* R3



Graf č. 4, Vplyv prídavku HUMAC® Nativ do kultivačného média na počty baktérií mliečneho kvasenia *L. brevis* B50, *A. kunkeei* V18, *L. plantarum* R2 a *L. fermentum* R3



ZÁVER

V tejto práci sme študovali ako prítomnosť humínových látok, rôznej koncentrácie a formy, vplýva na rast prospešných probiotických bakteriálnych kmeňov. Na základe výsledkov môžme konštatovať, že kmeň *A. kunkeei* V18 citlivejšie reagoval na prídavok HL HUMAC® Natur AFM Liquid a HUMAC® Natur AFM v porovnaní s ostatným sledovaným kmeňom. Taktiež môžeme konštatovať, že koncentrácie 0,4% - 0,6% výrazne neovplyvňujú rast prospešných bakteriálnych kmeňov. V prípade koncentrácií0,8 - 1% došlo v niektorých prípadoch k signifikantnému vplyvu na rast testovaných bakteriálnych kmeňov. Pre HL HUMAC® Natur AFM, HUMAC® Nativ a HUMAC® Natur AFM MycotoxiSorb sa zdá, vo väčšine sledovaných kmeňov, prídaok 0,4% až 0,6% ako vhodný a teda výrazne neovplyvňuje rast skúmaných probiotických kmeňov. Pre HL HUMAC® Natur AFM Liquid, teda tekutú formu HL, sa javí koncentrácia 0,4% ako vhodná voľba.

Budúce ciele predstavujú použitie vybraných koncentrácií v ďalších experimentoch.

POĎAKOVANIE

Táto práca vznikla vďaka podpore projektov APVV-19-0234 a VEGA 1/0454/22

POUŽITÁ LITERATÚRA

1. AKSU, T.; BOZKURT, S. A., Effect of dietary essential oils and/or humic acids on broiler performance, microbial population of intestinal content and antibody titres in the summer season. 2009. *Journal of the Faculty of Veterinary Medicine, University of Kafkas*, 15, 180–190.
2. CINGEĽOVÁ MARUŠČÁKOVÁ, I., SCHUSTEROVÁ, P., POPELKA, P., GANCARČÍKOVÁ, S., CSANK, T., FEČKANINOVÁ, A., RATVAJ, M., MUDROŇOVÁ, D., 2021. Effect of autochthonous lactobacilli on immunologically important molecules of rainbow trout after bacterial infection studied on intestinal primoculture. Fish Shellfish Immunol. 119, 379–383. https://doi.org/10.1016/j.fsi.2021.10.021
3. GOEL, P.; DHINGRA, M., 2021. Humic Substances. IntechOpen.
4. ISLAM, K. Md S.; SCHUHMACHER, A.; GROPP, J. M. Humic acid substances in animal agriculture. *Pakistan Journal of nutrition*, 2005, 4.3: 126-134.
5. KWONG, W.K., MANCENIDO, A.L., MORAN, N.A., 2017. Immune system stimulation by the native gut microbiota of honey bees. R. Soc. Open Sci. 4, 1–9. https://doi.org/10.1098/rsos.170003
6. LOUVADO, A., CLEARY, D.F.R., PEREIRA, L.F., COELHO, F.J.R.C., POUSÃO-FERREIRa, P., OZÓRIO, R.O.A., GOMES, N.C.M., 2021. Humic substances modulate fish bacterial communities in a marine recirculating aquaculture system. Aquaculture 544. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.737121
7. MAGUEY-GONZÁLEZ, J.A., GÓMEZ-ROSALES, S., ANGELES, M. de L., LÓPEZ-HERNÁNDEZ, L.H., RODRÍGUEZ-HERNÁNDEZ, E., SOLÍS-CRUZ, B., HERNÁNDEZ-PATLÁN, D., MERINO-GÚZMAN, R., TÉLLEZ-ISAÍAS, G., 2022. Effects of humic acids on the recovery of different bacterial strains in an in vitro chicken digestive model. Res. Vet. Sci. 145, 21–28. https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2022.01.004
8. MARUŠČÁKOVÁ, I.C., SCHUSTEROVÁ, P., BIELIK, B., TOPORČÁK, J., BÍLIKOVÁ, K., MUDROŇOVÁ, D., 2020. Effect of Application of Probiotic Pollen Suspension on Immune Response and Gut Microbiota of Honey Bees (Apis mellifera). Probiotics Antimicrob. Proteins 12, 929–936. https://doi.org/10.1007/s12602-019-09626-6

9. MUDROŇOVÁ, D., KARAFFOVÁ, V., PEŠULOVÁ, T., KOŠČOVÁ, J., MARUŠČÁKOVÁ, I.C., BARTKOVSKÝ, M., MARCINČÁKOVÁ, D., ŠEVČÍKOVÁ, Z., MARCINČÁK, S., 2020. The effect of humic substances on gut microbiota and immune response of broilers. Food Agric. Immunol. 31, 137–149. https://doi.org/10.1080/09540105.2019.1707780
10. STEVENSON, F.J., 1994. Humus chemistry: genesis, composition, reactions. John Wiley & Sons, 1994. John Wiley & Sons New York, N.Y.
11. TERRY, S.A., RAMOS, A.F.O., HOLMAN, D.B., MCALLISTER, T.A., BREVES, G., CHAVES, A. V., 2018. Humic substances alter ammonia production and the microbial populations within a RUSITEC fed a mixed hay - Concentrate diet. Front. Microbiol. 9, 1–9. https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01410
12. TIKHONOV, V. V., YAKUSHEV, A. V., ZAVGORODNYAYA, Y.A., BYZOV, B.A., DEMIN, V. V., 2010. Effects of humic acids on the growth of bacteria. Eurasian Soil Sci. 43, 305–313. https://doi.org/10.1134/S1064229310030087
13. VAN RENSBURG, C.E.J., 2015. The antiinflammatory properties of humic substances: A mini review. Phyther. Res. 29, 791–795. https://doi.org/10.1002/ptr.5319

Kontaktná adresa: Moskáľová Lenka, Department of Microbiology and Imunology, University of Veterinary Medicine and Pharmacy in Košice, Komenského 73, 041 81 Košice, Slovak Republic; E-mail: lenka.moskalova@student.uvlf.sk

VPLYV APLIKÁCIE PROBIOTICKÝCH BAKTÉRIÍ NA PEĽOVOM NOSIČI VČELÁM MEDONOSNÝM NA KVALITU MEDU

THE EFFECT OF THE APPLICATION OF PROBIOTIC BACTERIA ON THE POLLEN CARRIER TO HONEY BEES ON THE QUALITY OF HONEY

Mudroňová Dagmar[1], Koreneková Beáta[1], Bíliková Katarína[2], Toporčák Juraj[1], Kuzyšinová Katarína[1], Ratvaj Marek[1], Chomová Natália[1], Moskáľová Lenka[1]

[1]Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, Komenského 73, 041 81 Košice, Slovenská republika

[2]Ústav molekulárnej fyziológie a genetiky SAV, Dúbravská cesta 9, 840 05 Bratislava, Slovenská republika

ABSTRACT

Probiotic bacteria are also used to treat bees, but there are few studies on their effect on the quality of bee products. The aim of the work was to monitor the qualitative properties of honey after the application of a probiotic preparation based on the autochthonous bee *Levilactobacillus brevis* B50 on a pollen carrier to bee colonies. Control honeys and honeys from treated colonies met the requirements of the Decree of the Ministry of the Slovak Republic No. 41/2012 Coll. about honey. Water activity, honey pH, titratable acidity, water content, and HMF content did not differ between control honeys (n=5) and honeys from probiotic-treated colonies (n=5). The electrical conductivity of the control honeys (0.72 ± 0.05 mS/cm) was significantly higher than the experimental ones (0.53 ± 0.11 mS/cm; $p<0.05$), which correlated with the protein content in the honeys, where the content in the control honeys it was 1554.6 ± 488.9 µg/ml and in honeys from the probiotic group 1260.1 ± 456.4 µg/ml, which was significantly less compared to the control ($p<0.01$). The obtained results confirmed that the application of the probiotic preparation does not have a negative effect on the resulting honey quality.

Key words: floral honey, pollen, probiotic bacteria, quality

ÚVOD

Kvalita a zloženie, a tým pádom aj senzorické vlastnosti medu sú priamo ovplyvnené výživou včiel. Medy sa rozdeľujú na kvetové, produkované z nektáru a medovicové produkované včelami z výlučkov hmyzu cicajúceho rastlinné šťavy. Všeobecne kvetové medy sú svetlejšie a ich chuť je jemnejšia ako u medovicových medov. Avšak aj medzi kvetovými medmi je veľký kvalitatívny aj senzorický rozdiel podľa pôvodu nektáru, napríklad

monokultúrne medy ako repkový, agátový, lipový, levanduľový a podobne sa výrazne líšia od zmesných medov z rôznych druhov kvetov. Kvalitu medu významne ovplyvňuje aj dokrmovanie včiel umelými sacharidmi (napr. sacharóza, kukuričný sirup), aplikácia rôznych medikamentov do včelstva (napr. organické kyseliny) či nesprávne spracovanie a skladovanie, keďže med veľmi ľahko pohlcuje pachy z okolia (Beckh a Bogdanov, 2014). Všetky medy na Slovensku by však mali spĺňať normy podľa vyhlášky MP SR č.41/2012 Z. z. o mede.
Keďže na ošetrovanie včiel sa začali používať probiotické prípravky, tak ako je tomu u iných druhov zvierat, je potrebné zistiť, či aplikácia takýchto prípravkov nebude mať negatívny vplyv na kvalitu medu. Preto cieľom tejto práce bolo sledovať kvalitatívne vlastnosti medu po aplikácii probiotického prípravku na báze autochtónneho včelieho kmeňa *Levilactobacillus brevis* B50 na peľovom nosiči.

MATERIÁL A METODIKA

V rámci experimentu bolo 75 včelstiev ošetrených 3 dávkami probiotického prípravku obsahujúceho 50 g obnôžkového zmesného kvetového peľu a 10^8 – 10^9 cfu/ml *L. brevis* B50. Do každého včelstva boli s týždňovými odstupmi aplikované 3 dávky po 500 ml. Z náhodne vybraných 5 úľov boli priamo z plástov získané vzorky medov. Vzorky kontrolných medov boli odobrané z neošetrených úľov.

V medoch bolo odmerané pH, bola stanovená titračná kyslosť, obsah vody refraktometrom (Refraktomer RHN1-ATC, ČR) a elektrická vodivosť vyjadrená ako µS/cm pomocou konduktometra (VARIO WTW 2X00-001 A, Nemecko). Aktivita vody medu bola stanovená prístrojom Labmaster-aw (Novasina, Švajčiarsko) pri teplote 25 °C. Koncentrácia hydroxymetylfurfuralu (mg/g) v mede bola stanovená pomocou testovacích stripov a prístroja RQflex reflectometer (Merck, Nemecko). Pre stanovenie koncentrácie celkových proteínov v mede bola použitá Bradfordova metóda s použitím hovädzieho sérového albumínu (Sigma, USA) ako štandardy (Bradford, 1976).

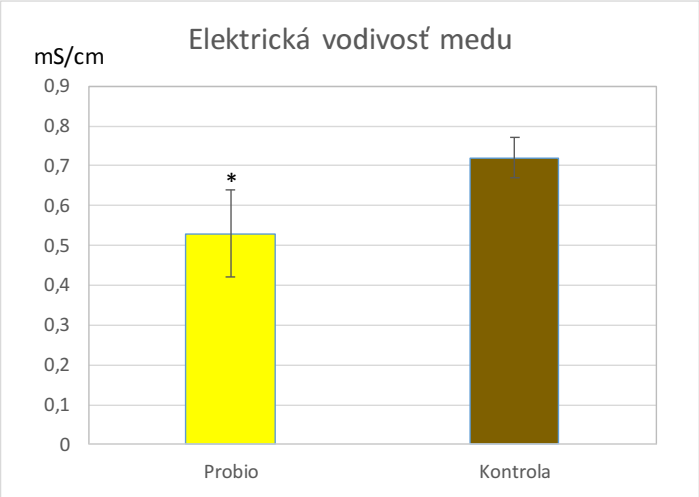
Výsledky sú vyjadrené ako priemer ± smerodajná odchýlka. Štatistická analýza výsledkov bola vykonaná v programe GraphPad Prism Version 3.00 a bol použitý nepárový T-test. Pre stanovenie korelácie bola použitá korelačná analýza podľa Pearsona.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

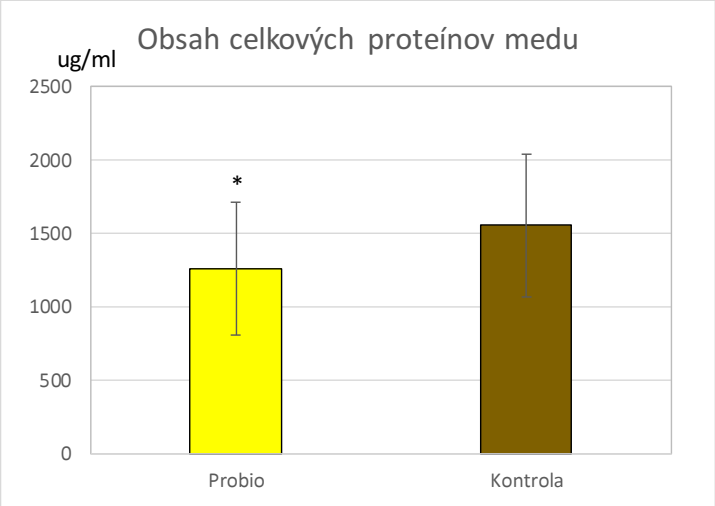
Výsledky ukázali, že aplikácia probiotického preparátu počas znáškovej sezóny nemala signifikantný vplyv na pH medu, kedy v kontrolnej skupine bolo zaznamenané pH 4,28 ± 0,20 a v pokusnej 4,46 ± 0,15, napriek tomu, že sme očakávali nižšie hodnoty v probiotických vzorkách, keďže baktérie mliečneho kvasenia produkujú organické kyseliny, a tým značne

znižujú pH probiotického prípravku. Naopak, vyššie hodnoty, aj keď nesignifikantne, sme zaznamenali u kontrolných medov. To potvrdili aj výsledky titračnej kyslosti, kedy hodnoty kontrolných medov (2,55 ± 1,16 mev/100 g medu) boli nesiginifikantne vyššie ako medov zo včelstiev ošetrených probiotikami (1,85 ± 0,48 mev/100 g medu). Rovnako aplikácia probiotika nemala významný vplyv na obsah vody ani aktivitu vody v testovaných medoch. V medoch od ošetrených včiel sa mierne zvýšil obsah HMF (20,8 ± 5,4 mg/ kg), avšak bez štatisticky významného rozdielu oproti kontrolným medom (14,5 ± 3,1 mg/kg). Signifikantne bola ovplyvnená elektrická vodivosť medu, kedy u experimentálnej skupiny (0,53 ± 0,11 mS/cm) boli hodnoty významne nižšie v porovnaní s kontrolou (0,72 ± 0,05 mS/cm; $p < 0,05$; Graf č. 1). V medoch od včiel ošetrených probiotikom sme zaznamenali signifikantne nižší obsah celkových proteínov (1260,05 ± 456,36 µg/ml) v porovnaní s kontrolnými medmi (1554,60 ± 488,90 µg/ml; $p < 0,05$; Graf č.2). Keďže elektrickú vodivosť významne ovplyvňuje obsah proteínov v mede, tieto hodnoty signifikantne korelovali ($r = 0,8$). Elektrická vodivosť závisí od prítomnosti H^+ iónov. Baktérie mliečneho kvasenia produkujú organické kyseliny, najmä kyselinu mliečnu a kyselinu octovú, ktoré sú zdrojom H^+ iónov. Zdrojom H^+ iónov môžu byť aj proteíny, či karbohydráty, anorganické ióny alebo polyfenoly (Machado-de-Melo et al., 2017).

Obrázok č. 1, Vplyv aplikácie probiotického prípravku do včelstiev na elektrickú vodivosť medu (* - $p < 0,05$).



Obrázok č. 2, Vplyv aplikácie probiotického prípravku do včelstiev na celkový obsah proteínov v medoch (* - p < 0,05).



ZÁVER

Všetky sledované kvalitatívne parametre vzoriek medu z včelstiev ošetrených probiotickým prípravkom, ktoré sú potrebné pre uvedenie na trh spĺňajú požadované normy podľa vyhlášky MP SR č.41/2012 Z. z. o mede. Aplikácia probiotického prípravku signifikantne ovplyvnila len obsah proteínov, čo následne korelovalo aj s nižšou elektrickou vodivosťou medu. Probiotický prípravok nemal negatívny vplyv na kvalitu medu. Jeho vplyv na obsah proteínov v mede bude predmetom ďalšieho skúmania.

POĎAKOVANIE

Táto práca vznikla vďaka podpore projektu VEGA 1/0454/22.

POUŽITÁ LITERATÚRA

1. BECKH, G., BOGDANOV, S. Bee products. In *Bee health and veterinarians*. (Ritter, W. ed.) Paris : World Organisation for Animal Health, 2014, p. 67-74. ISBN 987-92-9044-923-2.
2. BRADFORD, M. M.. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. In Analytical Biochemistry. [online]. 1976, vol. 72 [cit. 2022-02-26]. Dostupné na internete: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/942051/>.
3. MACHADO DE-MELO, A. A. et al. Composition and properties of Apis mellifera honey: A review. In *Journal of Apicultural Research.* [online]. 2017, vol. 57, no. 1. Dostupné na internete:

of_Apis_mellifera_honey_A_review>. ISSN 0021-8839.

4. Vyhláška Ministerstva pôdohospodárstva a rozvoja vidieka SR č. 41/2012 Z. z. o mede, [online]. Dostupné na internete: <https://www.epi.sk/zz/2012-41#prilohy>.

Kontaktná adresa: Mudroňová Dagmar, Department of Microbiology and Immunology, University of Veterinary Medicine and Pharmacy in Košice, Komenského 73, 041 81 Košice, Slovak Republic; E-mail: dagmar.mudronova@uvlf.sk

PRÁVNA ÚPRAVA ZDRAVOTNEJ BEZPEČNOSTI MLIEKA

MILK SAFETY LEGISLATION

Nagyová Alena[1], Korim Peter[1], Takáčová Daniela[1], Nagy Jozef[2]

[1]*Katedra verejného veterinárskeho lekárstva a welfare zvierat*

[2]*Katedra hygieny, technológie a zdravotnej bezpečnosti potravín*

ABSTRACT

Livestock production is one of the most important sectors of agricultural production. Livestock farming provides animal products in the form of meat and milk. The production focus of cattle farming is milk production, which accounts for a significant proportion of the value of agricultural production. Milk and dairy products belong to the traditional foods in the human diet. The proteins, fats, milk sugar-lactose, essential substances, vitamins and minerals (calcium, phosphorus, potassium, magnesium, etc.) contained in milk form a nutritionally balanced food. The European Union is a major producer of milk and milk products. Total milk production in the EU is estimated at around 155 million tonnes annually. Dairy farms at the primary production level, operators from production to the placing on the market or export of milk and milk products, i.e. every food business operator in the food chain, has a duty to ensure that food safety and public health are not compromised. Member States' competent authorities carry out official controls to verify that operators comply with the rules laid down in legislation.

Key words: milk, safety, legislation

ÚVOD

Jedným z kľúčových opatrení Európskej zelenej dohody je stratégia „z farmy na stôl“, ktorej cieľom je zabezpečiť potravinovú bezpečnosť, výživu, verejné zdravie a prístup k bezpečným, výživným a udržateľným potravinám. Mlieko a mliečne výrobky patria medzi potraviny živočíšneho pôvodu, ktoré môžu predstavovať špecifické nebezpečenstvá pre zdravie ľudí. Nariadením (EÚ) č. 1308/2013 sa vytvára spoločná organizácia trhov s poľnohospodárskymi výrobkami aj pre sektor mlieka a mliečnych výrobkov. Aj v súvislosti so spoločnou poľnohospodárskou politikou bola prijatá právna úprava na úrovni Európskej únie a členských štátov, ktorá stanovuje právne normy pre výrobu a uvádzanie mlieka a mliečnych výrobkov na trh, aby bola zabezpečená ochrana verejného zdravia. Chov na produkciu mlieka je prevádzkareň, kde sa drží jedno alebo viac hospodárskych zvierat na produkciu mlieka s cieľom uviesť mlieko ako potravinu na trh. Surové mlieko je mlieko produkované sekréciou

mliečnej žľazy zvierat chovaných na farmách, ktoré nebolo zohriate na viac ako 40 °C alebo nebolo podrobené inému ošetreniu, ktoré by malo rovnocenný účinok.

Zdravotne bezpečná potravina je výsledkom dodržiavania potravinového práva prevádzkovateľmi potravinárskych podnikov. Príslušné orgány prostredníctvom organizácie úradných kontrol monitorujú a overujú či sa relevantné požiadavky právnych predpisov dodržujú a presadzujú.

VŠEOBECNÉ POTRAVINOVÉ PRÁVO

Všeobecné zásady, ktoré sa vzťahujú na bezpečnosť potravín na úrovni Európskej únie a vnútroštátnej úrovni stanovuje nariadenie (ES) č. 178/2002. Prevádzkovatelia potravinárskych podnikov sú povinní uplatňovať všeobecné zásady a požiadavky potravinového práva na všetkých stupňoch výroby, spracúvania a distribúcie potravín a overovať, či sa požiadavky plnia. Komplexný systém vysledovateľnosti stanovený v článku 18 nariadenia a zavedený v potravinárskych podnikoch zabezpečuje cielené a presné stiahnutia z obehu potravín, poskytnutie informácií spotrebiteľom, príslušným orgánom a tak predchádza problémom v zdravotnej bezpečnosti potravín. Vysledovateľnosť je potrebné zaistiť najmä vo vzťahu k potravinám živočíšneho pôvodu. Vykonávacie nariadenie Komisie (EÚ) č. 931/2011 stanovuje povinnosť prevádzkovateľov potravinárskych podnikov zabezpečiť, aby prevádzkovateľom, ktorým sa potraviny dodávajú, a na požiadanie aj príslušnému orgánu boli k dispozícii informácie o zásielkach potravín živočíšneho pôvodu (čl. 3 ods. 1).

Systém rýchleho varovania na oznamovanie priameho alebo nepriameho rizika pre ľudské zdravie pochádzajúceho z potravín je nástrojom, ktorý poskytuje kontrolným orgánom výmenu informácií o vykonaných opatreniach v rámci zaistenia bezpečnosti potravín.

ŠPECIFICKÉ POTRAVINOVÉ PRÁVO

V súvislosti so spoločnou poľnohospodárskou politikou boli prijaté právne predpisy na ochranu verejného zdravia (povinnosti výrobcov a príslušných orgánov, stavebno-technické, prevádzkové a hygienické požiadavky na prevádzkarne, postupy pre schvaľovanie prevádzkarní, požiadavky na skladovanie a prepravu, zdravotné značky), ktoré tvoria spoločný základ pre hygienickú výrobu všetkých potravín, vrátane produktov živočíšneho pôvodu. Prvotnú zodpovednosť za opatrenia a podmienky potrebné na kontrolu nebezpečenstiev a na zabezpečenie vhodnosti mlieka na ľudskú spotrebu majú prevádzkovatelia v celom potravinovom reťazci počnúc prvovýrobou. Podľa nariadenia (ES) č. 852/2004 o hygiene potravín musia prevádzkovatelia potravinárskych podnikov na všetkých stupňoch

potravinového reťazca spĺňať všeobecné hygienické požiadavky uvedené v prílohách I a II tohto nariadenia.

Určité potraviny môžu predstavovať špecifické nebezpečenstvá pre zdravie ľudí, ktoré si vyžadujú ustanovenie špecifických hygienických predpisov. Mlieko a mliečne výrobky patria medzi potraviny živočíšneho pôvodu, ktoré môžu obsahovať mikrobiologické a chemické nebezpečenstvá. Nariadenie (ES) č. 853/2004 ustanovuje pre prevádzkovateľov potravinárskych podnikov osobitné predpisy o hygiene potravín živočíšneho pôvodu. Zákon č. 39/2007 Z. z. ustanovuje povinnosť prevádzkovateľov potravinárskych podnikov, ktorí vykonávajú prvovýrobu a činnosti súvisiace s prvovýrobou požiadať o registráciu (§ 40) a v prípade prevádzkarne, v ktorej sa spracúva surové mlieko na tepelne ošetrené mlieko a vyrábajú sa mliečne výrobky zo surového mlieka, balí surové mlieko na priamu ľudskú spotrebu v surovom stave do obalov určených pre konečného spotrebiteľa o schválenie prevádzkarne, ktorá je pod ich kontrolou príslušnú regionálnu veterinárnu a potravinovú správu.

Prevádzkovatelia potravinárskych podnikov, ktorí vyrábajú alebo zberajú surové mlieko musia zabezpečiť dodržiavanie zdravotných požiadaviek stanovených v nariadení (ES) č. 853/2004 (oddiel IX, kapitola 1). Surové mlieko musí pochádzať od zvierat, ktoré neprejavujú žiadne príznaky infekčných chorôb (brucelóza, tuberkulóza) prenosných mliekom na ľudí, sú v dobrom celkovom zdravotnom stave, neprejavujú žiadne príznaky chorôb, ktoré môžu mať za následok kontamináciu mlieka, netrpia žiadnymi infekciami pohlavného ústrojenstva, enteritídou s hnačkou a horúčkou alebo rozpoznateľným zápalom vemena, zvieratá nemajú žiadne poranenie vemena, ktoré by mohlo ovplyvniť mlieko, a neboli im podané žiadne nepovolené látky alebo produkty a neboli podrobené nezákonnému ošetreniu a po podaní povolených produktov alebo látok boli dodržané predpísané ochranné lehoty.

Tuberkulóza a brucelóza patria medzi zoonózy, preto surové mlieko musí pochádzať od kráv, byvolíc, oviec alebo kôz, ktoré patria do chovu/stáda bez brucelózy alebo úradne bez brucelózy a kráv alebo byvolíc, ktoré patria do stáda, ktoré je úradne bez tuberkulózy. Samice iných druhov zvierat musia patriť do stád pravidelne kontrolovaných na brucelózu alebo tuberkulózu v rámci plánu kontroly schváleného príslušným orgánom, ak ide o vnímavé druhy. Ak sa kozy držia spolu s kravami, musia byť tieto kozy prehliadané a testované na tuberkulózu. Surové mlieko pochádzajúce od zvierat, v prípade ktorých nie sú splnené zdravotné požiadavky sa však s povolením príslušného orgánu môže použiť po takom tepelnom ošetrení, po ktorom mlieko vykazuje negatívnu reakciu na alkalický fosfatázový test, ak ide o mlieko pochádzajúce od kráv alebo byvolíc, ktoré nevykazujú pozitívnu reakciu v testoch na tuberkulózu alebo brucelózu a ktoré nemajú žiadne príznaky uvedených ochorení. Ak ide o ovce alebo o kozy, ktoré nevykazujú pozitívnu reakciu v testoch na brucelózu alebo ktoré boli očkované proti

brucelóze v rámci schváleného eradikačného programu, a ktoré neprejavujú žiadne príznaky tejto choroby, buď na výrobu syra s časom zretia najmenej dva mesiace, alebo po takom tepelnom ošetrení, po ktorom mlieko vykazuje negatívnu reakciu na alkalický fosfatázový test, a po ošetrení, ktoré zaisťuje jeho bezpečnosť, ak ide o samice ostatných druhov, ktoré nevykazujú pozitívnu reakciu v testoch na tuberkulózu a brucelózu a nemajú príznaky uvedených ochorení, ale patria do stáda, v ktorom bola zistená brucelóza alebo tuberkulóza na základe pravidelných kontrol v rámci plánu kontroly schváleného príslušným orgánom. Surové mlieko pochádzajúce od zvieraťa, v prípade ktorého nie sú splnené uvedené zdravotné požiadavky sa nesmie použiť na ľudskú spotrebu.

Chov na produkciu mlieka musí spĺňať hygienické požiadavky na priestory a vybavenie, dojenie, zber, hygienu zamestnancov a preprava mlieka sa musí vykonávať hygienickým spôsobom. Mlieko sa musí ihneď schladiť na teplotu najviac 8 ºC v prípade, že sa vykonáva každodenný zber, alebo na teplotu najviac 6 ºC, ak sa zber mlieka nevykonáva denne.

Prevádzkovatelia potravinárskych podnikov musia zabezpečiť aby surové kravské mlieko spĺňalo kritériá na celkový počet mikroorganizmov (pri 30 ºC (na ml) ≤ 100 000, kĺzavý geometrický priemer hodnôt za obdobie dvoch mesiacov pri najmenej dvoch vzorkách na mesiac), počet somatických buniek (na ml ≤ 400 000, kĺzavý geometrický priemer za obdobie troch mesiacov pri najmenej jednej vzorke za mesiac, pokiaľ príslušný orgán neurčí inú metodiku kvôli zohľadneniu sezónnych odchýlok v množstvách produkcie) a surové mlieko iných druhov zvierat musí spĺňať kritéria na celkový počet mikroorganizmov (pri 30 ºC (na ml) ≤ 1 500 000, kĺzavý geometrický priemer hodnôt za obdobie dvoch mesiacov pri najmenej dvoch vzorkách na mesiac). Ak je surové mlieko od iných živočíšnych druhov ako kráv určené na výrobu výrobkov vyrábaných so surovým mliekom procesom, ktorý nezahŕňa žiadne tepelné ošetrenie surové mlieko musí spĺňať kritérium na celkový počet mikroorganizmov (pri 30 ºC (na ml) ≤ 500 000, kĺzavý geometrický priemer hodnôt za obdobie dvoch mesiacov pri najmenej dvoch vzorkách na mesiac). Surové mlieko nesmie obsahovať rezíduá antibiotík v množstve, ktoré prekračuje povolenú hodnotu alebo kombinovaný celkový obsah rezíduí antibiotických látok, ktorý prekračuje akúkoľvek maximálnu prípustnú hodnotu uvedenú nariadení Komisie (EÚ) č. 37/2010. Ak surové mlieko nespĺňa uvedené podmienky musí to prevádzkovateľ potravinárskeho podniku oznámiť príslušnému orgánu a prijať opatrenia na nápravu.

Surové mlieko a produkty zo surového mlieka, nepasterizované mlieko a niektoré výrobky z neho môžu predstavovať vysoké riziko pre verejné zdravie. Bez toho, aby boli dotknuté špecifické predpisy na kontrolu mikroorganizmov pre potraviny živočíšneho pôvodu ustanovené v nariadení (ES) č. 853/2004 prevádzkovatelia potravinárskych podnikov musia

zabezpečiť, aby potraviny spĺňali príslušné mikrobiologické kritériá ustanovené v prílohe I nariadenia Komisie (ES) č. 2073/2005. Na tieto účely musia prevádzkovatelia potravinárskych podnikov v rámci svojich postupov založených na zásadách HACCP spolu so zavedením správnej hygienickej praxe prijímať na všetkých stupňoch produkcie, spracovania a distribúcie potravín vrátane maloobchodu opatrenia na zabezpečenie toho, aby sa vykonávalo dodávanie, zaobchádzanie so surovinami a potravinami a spracovanie surovín a potravín, ktoré je pod ich kontrolou, takým spôsobom, aby boli splnené kritériá hygieny procesu a mohli pri odôvodnene predvídateľných podmienkach distribúcie, skladovania a použitia dodržiavať kritériá bezpečnosti potravín uplatniteľné počas celej doby uchovateľnosti produktov.

Do mlieka môžu preniknúť v ktoromkoľvek stupni potravinového reťazca kontaminujúce látky, ktoré neboli zámerne pridané do potraviny, a ktoré sú v potravine prítomné ako dôsledok výroby (vrátane operácií uskutočnených v rámci pestovania a zberu plodín, chovu dobytka a veterinárneho lekárstva) zhotovení, spracovaní, úprave, ošetrení, zabalení, balíčkovaní, doprave a úschove alebo ako dôsledok kontaminácie životného prostredia. Potraviny, ktoré obsahujú kontaminujúce látky v množstve, ktoré nie je akceptovateľné z hľadiska zdravia ľudí hlavne z titulu toxikologikej hladiny, nemôžu byť uvedené na trh. Nariadenie (EHS) 315/1993 stanovuje postupy spoločenstva u kontaminujúcich látok v potravinách.

V čerstvých, spracovaných a/alebo kombinovaných rastlinných a živočíšnych výrobkoch určených pre ľudskú spotrebu alebo pre kŕmenie zvierat, môžu byť prítomné rezíduá pesticídov. Ochrana verejného zdravia musí byť zabezpečená aj voči rezíduám pesticídov, ktoré môžu kontaminovať mlieko. Nariadenie (ES) č. 396/2005 stanovuje maximálne hladiny rezíduí pesticídov v alebo na potravinách a krmivách rastlinného a živočíšneho pôvodu.

Ochrana zdravia spotrebiteľa si vyžaduje právo na informácie o potravinách, ktoré konzumuje. Určité zložky alebo výrobky môžu byť, ak sa použijú pri výrobe potravín, ktoré ich stále obsahujú, príčinou alergií alebo neznášanlivosti u niektorých ľudí, pričom niektoré z týchto alergií alebo neznášanlivostí predstavujú nebezpečenstvo pre zdravie dotknutých osôb. V nariadení (EÚ) č. 1169/2011 o poskytovaní informácií o potravinách spotrebiteľom sú stanovené látky alebo výrobky spôsobujúce alergie alebo neznášanlivosť medzi ktoré patrí aj mlieko a mliečne výrobky. Je dôležité poskytovať informácie o prítomnosti prídavných látok v potravinách, technologických pomocných látok a iných látok alebo výrobkov s vedecky preukázaným účinkom v podobe alergie alebo neznášanlivosti, aby si spotrebitelia, najmä tí, ktorí trpia na potravinovú alergiu alebo neznášanlivosť, mohli informovane vyberať potraviny, ktoré sú pre nich bezpečné.

ÚRADNÁ KONTROLA

Nariadenie (EÚ) 2017/625 o úradných kontrolách stanovuje pravidlá vykonávania úradných kontrol príslušnými orgánmi v oblasti potravín a ich bezpečnosti. Osobitné požiadavky na úradné kontroly mlieka a mliečnych výrobkov a ich jednotnú minimálnu frekvenciu ustanovuje vykonávacie nariadenie (EÚ) 2019/627. Úradný veterinárny lekár overuje dodržiavanie zdravotných požiadaviek na produkciu surového mlieka najmä zdravotný stav zvierat absenciu známok použitia zakázaných alebo nepovolených farmakologicky účinných látok a to, či prípadná prítomnosť rezíduí povolených farmakologicky účinných látok, pesticídov alebo kontaminantov nepresahuje úrovne stanovené v nariadeniach (EÚ) č. 37/2010, (ES) č. 396/2005 alebo (ES) č. 1881/2006. Úradné kontroly sa môžu vykonať pri príležitosti veterinárnych kontrol uskutočňovaných podľa právnych predpisov Únie o zdraví ľudí alebo zvierat, alebo o dobrých podmienkach zvierat. Ak existujú dôvody na podozrenie, že neboli dodržané zdravotné požiadavky úradný veterinárny lekár skontroluje všeobecný zdravotný stav zvierat. Zo strany príslušných orgánov sa v chovoch na produkciu mlieka vykonávajú úradné kontroly na overenie dodržiavania hygienických požiadaviek stanovených v nariadení (ES) č. 853/2004. Ak sa preukáže, že hygiena nie je vyhovujúca, príslušné orgány overia, že sa uskutočnili príslušné kroky s cieľom napraviť situáciu. V prípade surového mlieka príslušné orgány monitorujú kontroly vykonávané v súlade s oddielom IX kapitolou I časťou III prílohy III k nariadeniu (ES) č. 853/2004 (dodržiavanie limitov stanovených pre surové mlieko). Ak prevádzkovateľ potravinárskeho podniku zodpovedný za chov na produkciu mlieka situáciu nenapraví do troch mesiacov od dátumu, keď bolo príslušným orgánom prvýkrát oznámené nedodržiavanie kritérií počtu mikroorganizmov a/alebo počtu somatických buniek stanovených pre surové mlieko, príslušné orgány overia, či sa pozastavili dodávky surového mlieka z daného chovu na ich produkciu alebo sa na surové mlieko uplatňujú požiadavky na ich ošetrenie a používanie nevyhnutné na ochranu zdravia ľudí v súlade s osobitným povolením alebo so všeobecnými pokynmi príslušných orgánov. Toto pozastavenie alebo tieto požiadavky zostanú v platnosti podľa rozhodnutia príslušných orgánov, kým prevádzkovateľ potravinárskeho podniku nepreukáže, že surové mlieko opäť spĺňa uvedené kritériá.

ZÁVER

Mlieko patrí medzi najvýživnejšie potraviny pre obsah vysokokvalitných bielkovín, minerálnych živín a vitamínov a súčasná veda ho považuje za funkčnú potravinu. Potravinové právo ustanovuje požiadavky na zdravotnú bezpečnosť mlieka a povinnosti prevádzkovateľov potravinárskych podnikov od prvovýroby až po umiestnenie na trh. Dodržiavanie požiadaviek na zdravotnú bezpečnosť mlieka overuje úradný veterinárny lekár.

POUŽITÁ LITERATÚRA

1. Nariadenie (ES) č. 178/2002 Európskeho parlamentu a Rady z 28. januára 2002, ktorým sa ustanovujú všeobecné zásady a požiadavky potravinového práva, zriaďuje Európsky úrad pre bezpečnosť potravín a stanovujú postupy v záležitostiach bezpečnosti potravín (Ú. v. ES L 031 1.2.2002, s. 1).
2. Vykonávacie nariadenie Komisie (EÚ) č. 931/2011 z 19. septembra 2011 o požiadavkách na vysledovateľnosť stanovených nariadením Európskeho parlamentu a Rady (ES) č. 178/2002 v súvislosti s potravinami živočíšneho pôvodu (Ú. v. ES L 31, 1.2.2002, s. 1.).
3. Nariadenie Európskeho parlamentu a Rady (ES) č. 852/2004 z 29. apríla 2004 o hygiene potravín (Ú. v. ES L 139 30.4.2004, s. 1).
4. Nariadenie Európskeho parlamentu a Rady (ES) č. 853/2004 z 29. apríla 2004, ktorým sa ustanovujú osobitné hygienické predpisy pre potraviny živočíšneho pôvodu (Ú. v. ES L 139 30.4.2004, s. 55).
5. Nariadenie Komisie (ES) č. 2073/2005 z 15. novembra 2005, o mikrobiologických kritériách pre potraviny (Ú. v. ES L 338 22.12.2005, s. 1).
6. Nariadenie Rady (EHS) č. 315/93 z 8. februára 1993, ktorým sa stanovujú postupy spoločenstva u kontaminujúcich látok v potravinách (Ú. v. ES L 037, 13.2.1993, p.1).
7. Nariadenie Európskeho parlamentu a Rady (EÚ) 2017/625 z 15. marca 2017 o úradných kontrolách a iných úradných činnostiach vykonávaných na zabezpečenie uplatňovania potravinového a krmivového práva a pravidiel pre zdravie zvierat a dobré životné podmienky zvierat, pre zdravie rastlín a pre prípravky na ochranu rastlín, o zmene nariadení Európskeho parlamentu a Rady (ES) č. 999/2001, (ES) č. 396/2005, (ES) č. 1069/2009, (ES) č. 1107/2009, (EÚ) č. 1151/2012, (EÚ) č. 652/2014, (EÚ) 2016/429 a (EÚ) 2016/2031, nariadení Rady (ES) č. 1/2005 a (ES) č. 1099/2009 a smerníc Rady 98/58/ES, 1999/74/ES, 2007/43/ES, 2008/119/ES a 2008/120/ES a o zrušení nariadení Európskeho parlamentu a Rady (ES) č. 854/2004 a (ES) č. 882/2004, smerníc Rady 89/608/EHS, 89/662/EHS, 90/425/EHS, 91/496/EHS, 96/23/ES, 96/93/ES a 97/78/ES a rozhodnutia Rady 92/438/EHS (nariadenie o úradných kontrolách) (Ú. v. ES L 095 7.4.2017, s. 1).
8. Nariadenie Komisie (EÚ) č. 37/2010 z 22. decembra 2009 o farmakologicky účinných látkach a ich klasifikácii, pokiaľ ide o maximálne limity rezíduí v potravinách živočíšneho pôvodu (Ú. v. ES L 015 20.1.2010, s. 1).
9. Nariadenie Európskeho parlamentu a Rady (ES) č 396/2005 z 23. februára 2005 o maximálnych hladinách rezíduí pesticídov v alebo na potravinách a krmivách

rastlinného a živočíšneho pôvodu a o zmene a doplnení smernice Rady 91/414/EHS (Ú. v. ES L 070 16.3.2005, s. 1).

10. Nariadenie Európskeho parlamentu a Rady (EÚ) č. 1169/2011 z 25. októbra 2011 o poskytovaní informácií o potravinách spotrebiteľom, ktorým sa menia a dopĺňajú nariadenia Európskeho parlamentu a Rady (ES) č. 1924/2006 a (ES) č. 1925/2006 a ktorým sa zrušuje smernica Komisie 87/250/EHS, smernica Rady 90/496/EHS, smernica Komisie 1999/10/ES, smernica Európskeho parlamentu a Rady 2000/13/ES, smernice Komisie 2002/67/ES a 2008/5/ES a nariadenie Komisie (ES) č. 608/2004 (Ú. v. ES L 304 22.11.2011, s. 18).
11. Vykonávacie nariadenie Komisie YKONÁVACIE NARIADENIE KOMISIE (EÚ) 2019/627 z 15. marca 2019, ktorým sa stanovujú jednotné praktické opatrenia na vykonávanie úradných kontrol produktov živočíšneho pôvodu určených na ľudskú spotrebu v súlade s nariadením Európskeho parlamentu a Rady (EÚ) 2017/625 a ktorým sa mení nariadenie Komisie (ES) č. 2074/2005, pokiaľ ide o úradné kontroly (Ú. v. ES L 131 17.5.2019, s. 51).

Kontaktná adresa: Nagyová Alena, Katedra verejného veterinárskeho lekárstva a welfare zvierat, Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, Komenského 73, 041 81 Košice, Slovenská republika; E-mail: alena.nagyova@uvlf.sk

ANALÝZA MLIEKA A JEHO ZLOŽIEK VO VZŤAHU K POČTU SOMATICKÝCH BUNIEK

ANALYSES OF MILK YIELD AND ITS QUALITATIVE TRAITS IN RELATION TO SOMATIC CELL COUNT

Oravcová Marta[1], Mačuhová Lucia[1], Tančin Vladimír[1,2], Uhrinčať Michal[1]

[1]*Národné poľnohospodárske a potravinárske centrum, Hlohovecká 2, 951 41 Lužianky, SR*

[2]*Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre, Trieda Andreja Hlinku, 949 76 Nitra, SR*

ABSTRACT

The objective of the study was to explore relationships of milk traits (daily milk yield, fat, protein and lactose contents) of Holstein cows with somatic cell count (SCC). The data were collected on three herds; cows produced between 2018 and 2020. A total, 34,445 milk performance records of 2,435 cows were collected. Six SCC classes, evaluated within each herd, were defined: SCC (<100ths., 100ths.<200ths., 200ths.<400ths., 400ths.<600ths., 600ths.<1mil., ≥1mil.ml^{-1}). Contribution of other possible factors (parity, month in milk, season and cow) were also taken into account. With increasing SCC, milk yield and lactose content decreased. Differences in milk yield and lactose content between the lowest and highest SCC class were up to 4.7kg and 0.20pp. Fat and protein contents showed opposite trend; they increased by 0.30 and 0.15pp. The proportion of measurements with SCC<200 ths.ml^{-1} was 75% to 78% in each herd. The proportions of SCC between 200 and 400 ths., between 400ths. and 1 mil. and above 1 mil.ml^{-1} were 9 % to 11%, 7% to 8% and 6%. This indicates that the majority of individual measurements met EU regulatory standard of hygienic milk (86% and 87%). Diminishing of SCC and its maintaining on low levels are a long-term priority of breeders of dairy cows.

Key words: cows, somatic cells, milk performance, udder health

ÚVOD

Mlieko a jeho kvalita sú dôležité z hľadiska udržateľnosti a ekonomickej efektívnosti chovu dojníc. Počet somatických buniek (PSB) sa považuje za dôležitý indikátor kvality mlieka a zdravia vemena (Bobbo a kol., 2017). Somatické bunky prevažne pozostávajú z buniek imunitného systému (80 % v neinfikovanom, 99 % v infikovanom vemene). Zahrnujú lymfocyty, makrofágy, polymorfolukleové bunky a indikujú zápalový proces mliečnej žľazy (Marinov a kol., 2011). Limit 400 tis. PSB v 1 ml je hraničná hodnota pre spracovanie

hygienicky vyhovujúceho mlieka v krajinách EÚ podľa nariadenia č. 853/2004 Európskej komisie (Ruegg a Pantoja, 2013).

Cieľom práce bolo skúmať dennú produkciu mlieka a obsah tuku, bielkovín a laktózy kráv z troch chovov vo vzťahu k PSB. Keďže predmetom analýzy boli záznamy z rutinnej kontroly úžitkovosti, bolo potrebné zohľadniť vplyv ďalších faktorov, ktoré mohli premenlivosť ukazovateľov taktiež ovplyvniť.

MATERIÁL A METODIKA

Boli analyzované denné nádoje (34 445 záznamov) z Kontroly mliekovej úžitkovosti hovädzieho dobytka Plemenárskych služieb SR, š.p.; obsahovali údaje o dennej produkcii mlieka (kg) a obsahu tuku, bielkovín a laktózy (%), prináležiace 2 435 holštajnským kravám z troch chovov (887, 1 142 a 406 kráv) za obdobie troch rokov (2018, 2019 a 2020). Kravy boli na prvej až tretej laktácii (3 237 laktácií), počas laktácie bolo vykonaných 5 až 10 kontrolných meraní. Podľa počtu somatických buniek (PSB) boli údaje rozdelené do šiestich tried: <100 tis., 100 tis.<200 tis., 200 tis.<400 tis., 400 tis.<600 tis., 600 tis.<1mil., ≥1mil. somatických buniek v 1 ml mlieka. Okrem vplyvu triedy PSB použitý zmiešaný model (SAS Studio 3.8, 2022) zohľadnil ďalšie faktory premenlivosti (mesiac a poradie laktácie, rok, ročné obdobie kontroly, náhodný vplyv zvieraťa). Analýzy rozptylu boli hodnotené Fisherovým F-testom, rozdiely medzi odhadnutými úrovňami faktorov boli hodnotené Scheffého testom mnohonásobných porovnaní.

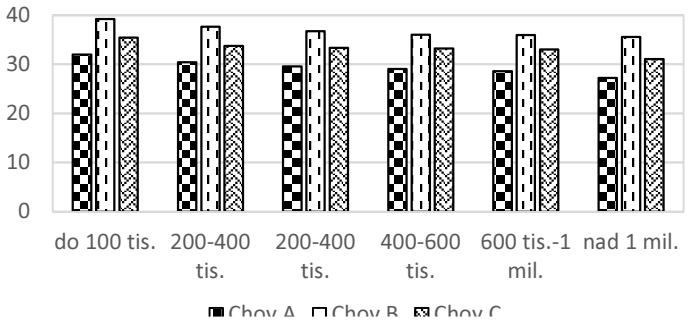
VÝSLEDKY A DISKUSIA

Bol zistený štatisticky významný vplyv ($P<0,05$; $P<0,01$) uvažovaných faktorov na ukazovatele mliekovej úžitkovosti s výnimkou roku kontroly na dennú produkciu mlieka. V súvislosti so zdravím vemena a produkciou hygienicky vyhovujúceho mlieka je PSB určujúci, preto mu venujeme osobitnú pozornosť.

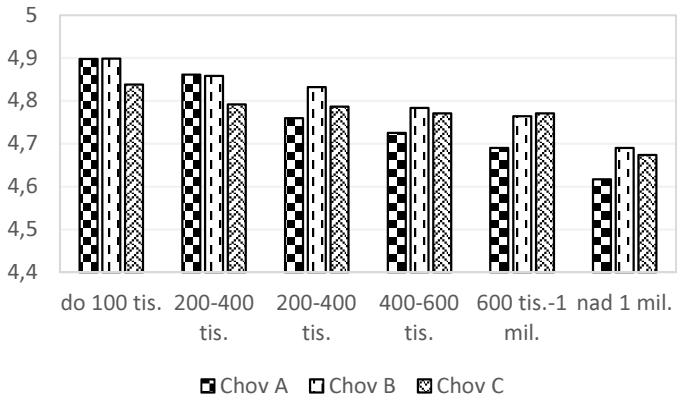
Odhady produkcie mlieka a obsah tuku, bielkovín a v závislosti od PSB (v členení podľa jednotlivých chovov) sú uvedené na obrázkoch 1 až 4. V súlade s poznatkami autorov (Cinar a kol., 2015; Tančin a kol., 2022) sa s rastúcim PSB denná produkcia mlieka a obsah laktózy znižovali (o 4 kg, resp. 0,2 perc. bodov). Naopak, obsah tuku a bielkovín sa zvýšil o 0,3 a 0,2 perc. bodov. Približne rovnaký nárast týchto zložiek našli El-Tahawy a El-Far (2010). Zníženie produkcie mlieka je spôsobené tým, že s vyšším PSB rastie počet patogénov v mlieku, čo má za následok prítomnosť subliklinickej, resp. klinickej mastitídy a zhoršenie technologických vlastností mlieka (Cinar a kol., 2015). Európskemu limitu na hygienické mlieko podľa

nariadenia č. 853/2004 Európskej komisie (do 400 tis. somatických buniek v 1 ml) vyhovelo v prezentovanej analýze 86 % (chov B) a 87% (chovy A a C).

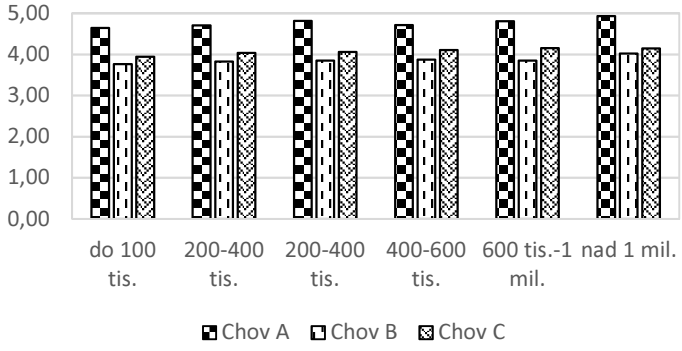
Obrázok č. 1, Odhady dennej produkcie mlieka v závislosti od PSB



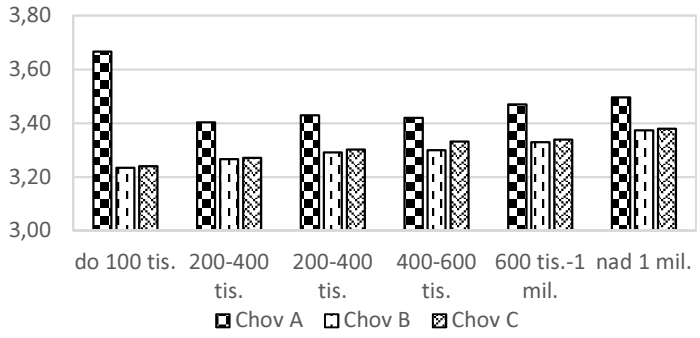
Obrázok č. 2, Odhady obsahu laktózy v závislosti od PSB



Obrázok č. 3, Odhady obsahu tuku v závislosti od PSB



Obrázok č. 4, Odhady obsahu bielkovín v závislosti od PSB



ZÁVER

Potvrdil sa vplyv počtu somatických buniek na množstvo mlieka a jeho zložky, ktorý indikuje zdravotný stav vemena nielen na úrovni jednotlivých kráv ale aj chovov. Jeho pravidelné zisťovanie je predpokladom kvalifikovaných manažérskych rozhodnutí pre zlepšovanie úžitkových vlastností i zdravotného stavu zvierat. Znižovanie počtu somatických buniek a jeho udržanie na nízkej úrovni patrí medzi priority chovateľov dojníc.

POĎAKOVANIE

Autori ďakujú PS SR š.p. za poskytnutie údajov z Kontroly mliekovej úžitkovosti hovädzieho dobytka. Práca bola podporená projektom APVV-18-0121 a projektom 313011V387 spolufinancovaným Európskym fondom regionálneho rozvoja.

POUŽITÁ LITERATÚRA

1. Bobbo, T. a kol. Associations between pathogen-specific cases of subclinical mastitis and milk yield, quality, protein composition, and cheese-making traits in dairy cows. In *Journal of Dairy Science*. ISSN 0022-03022017, vol. 100, p. 1-16.
2. Cinar, M. a kol. Effect of somatic cell count on milk yield and composition of first and second lactation dairy cows. In *Italian Journal of Animal Science*. ISSN 15944077, 2015, vol. 14, p. 105-108.
3. El-Tahawy, A.S., El-Far, A.H. Influences of somatic cell count on milk composition and dairy farm profitability. In *International Journal of Dairy Technology*. ISSN 1471-0307 online, 2010, vol. 63, p. 463-469.
4. Marinov, I. a kol. Somatic cell count and its relation with productive traits in dairy cows milk fat, protein and s. In *Agricultural Science and Technology*. ISSN 1313-412X online, 2021, vol. 13, p.417-424.

5. Regulation (EC) No. 853/2004 of the European Parliament and of the Council of 29 April 2004 laying down specific hygiene rules for the hygiene of foodstuffs, 151 p.
6. Ruegg, P.L., Pantoja, J.C.F. Understanding and using somatic cell counts to improve milk quality. In *Irish Journal of Agricultural and Food Research*. ISSN 2009-9029 online, 2013, vol. 52, p. 101-117.
7. SAS Institute Inc. SAS OnlineDoc® Studio 3.8. Cary, NC: SAS Institute Inc., 2022, USA.
8. Tančin,V. a kol. Vzťah somatických buniek v mlieku dojníc k množstvu a jeho zloženiu. In Bezpečnosť a kvalita potravín: zborník vedeckých prác. Nitra: Garmond, 2022. ISBN 978-80-8266-007-7, s. 170-174.

Kontaktná adresa: Oravcová Marta, Research Institute for Animal Production Nitra, National Agricultural and Research Centre, Hlohovecká 2, Hlohovecká 2, 951 41 Lužianky, Slovak Republic; E-mail: marta.oravcova@nppc.sk

MULTIREZIDUÁLNA ANALÝZA PESTICÍDOV V CITRUSOCH V ROKOCH 2020 - 2022

MULTIRESIDUE ANALYSIS OF PESTICIDES IN CITRUS FRUITS BETWEEN 2020 AND 2022

Pigošová Petronela, Marcinková Lenka

Štátny veterinárny a potravinový ústav, Veterinárny a potravinový ústav v Bratislave, Botanická 15, 842 52, Slovenská republika

ABSTRACT

Pesticides are substances used to kill, repel, or control certain forms of plant or animal life that are considered to be pests. The traces pesticides leave in treated products are called "residues". A maximum residue level (MRL) is the highest level of a pesticide residue that is legally tolerated in or on food or feed when pesticides are applied correctly. Legal limits for pesticide residues in food are covered by Regulation (EC) No 396/2005, which also contains provisions on official controls on pesticide residues in food, both for produce treated within the EU and for imported produce. Pesticide active substances can be banned at EU-level if they do not meet the safety criteria to protect human or animal health, the environment or ground water. The Rapid Alert System for Food and Feed (RASFF) is a key tool to ensure the proper flow of information across borders when public health risks are detected. The analysis of notifications on pesticide residues in citrus fruits submitted in the RASFF between 2020 and 2022 with a focus on banned pesticides was done and compared with situation in Slovakia. Over 150 samples of citrus fruits have been investigated in Veterinary and Food Institute in Bratislava between 2020 and 2022. The positive samples of citrus fruits from Third Countries represented 10 % before and 20 % after of the approvals of some active substances were not renewed. Some samples exceeded maximum residue levels of several pesticides residues.

Key words: pesticides, multiresidue analysis, citrus fruits, MRL

ÚVOD

Pesticídy sú prípravky určené na tlmenie chorôb rastlín a na ochranu rastlín, skladových zásob, technických produktov, bytov, domov, ale aj zvierat a človeka. Najčastejšie sa používajú v poľnohospodárstve. Pri používaní pesticídov je dôležitých niekoľko krokov. Ide o použitie vhodného prípravku, jeho správnu aplikáciu v poľnohospodárskej praxi a nakoniec je dôležitá aj efektívna kontrola rezíduí pesticídov v potravinách a v krmivách. V Nariadení Európskeho

parlamentu a Rady (ES) č. 396/2005 z 23. februára 2005 sa uvádzajú maximálne povolené množstvá rezíduí pesticídov (MRL-maximum residue level). MRL znamená legislatívne dovolenú najvyššiu hladinu koncentrácie rezíduí pesticídov. Hodnoty MRL pre pesticídy sa na základe rôznych zdravotných (mutagenita, kancerotoxicta, genotoxicita, neurotoxicita) a environmentálnych kritérií prehodnocujú a následne dochádza k zmenám hodnôt MRL. V posledných rokoch došlo k výraznému zníženiu MRL viacerých pesticídov, čo malo za následok zvýšenie počtu nadlimitných hlásení v rýchlom výstražnom systéme pre potraviny a krmivá (RASFF).

MATERIÁL A METODIKA

V Nariadení Európskeho parlamentu a Rady (ES) č. 396/2005 z 23. februára 2005 sa uvádzajú maximálne povolené množstvá rezíduí pesticídov. V období od roku 2019 došlo k výraznej zmene MRL viacerých pesticídov. V Tabuľke č.1 je uvedené maximálne povolené množstvo (MRL) rezíduí pesticídov chlorpyrifos, chlorpyrifos metyl, buprofezin v citrusoch (citrón, pomaranč, mandarínka, grapefruit, limetka) pred a po poslednej zmene MRL.

Tabuľka č.1 Maximálne povolené množstvo rezíduí pesticídov chlorpyrifos, chlorpyrifos metyl a buprofezin (Nariadenie Európskeho parlamentu č. 396/2005)

	chlorpyrifos		**chlorpyrifos metyl**		**buprofezin**	
	MRL (mg/kg)	**MRL (mg/kg)**	**MRL (mg/kg)**	**MRL (mg/kg)**	**MRL (mg/kg)**	**MRL (mg/kg)**
platnosť	do 2020	**od 2020**	do 2020	**od 2020**	do 2019	**od 2019**
citrón	1.5	**0,01**	2	**0,01**	1	**0,01**
pomaranč	1.5	**0,01**	2	**0,01**	1	**0,01**
mandarínka	1.5	**0,01**	2	**0,01**	1	**0,01**
grapefruit	1.5	**0,01**	2	**0,01**	1	**0,01**
limetka	1.5	**0,01**	2	**0,01**	1	**0,01**

Reziduá pesticídov sa v laboratóriách Veterinárneho a potravinového ústavu v Bratislave (VPÚ BA) stanovujú multireziduálnou metódou (vyše 300 rezíduí pesticídov) a niekoľkými špeciálnymi metódami pre jednotlivé rezíduá pesticídov. Multireziduálna analýza pesticídov zahŕňa homogenizáciu vzorky, extrakciu a čistenie vzoriek pomocou metódy QuECHERs a následné chromatografické stanovenie. Zhomogenizovaná vzorka sa extrahuje a frakcionuje pomocou organického rozpúšťadla (acetonitril) a zmesi solí. Po prečistení extraktu pomocou disperznej SPE techniky sa čistý extrakt analyzuje plynovou chromatografiou s hmotnostne

spektrometrickou detekciou (GC/MS/MS) alebo kvapalinovou chromatografiou s hmotnostne spektrometrickou detekciou (LC/MS/MS).

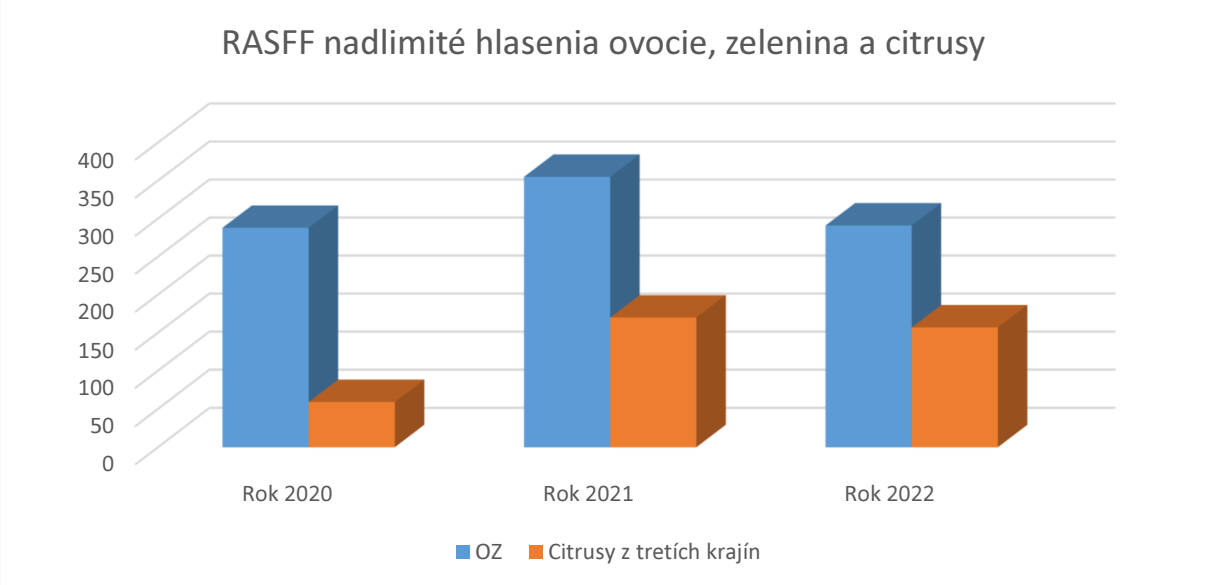
VÝSLEDKY A DISKUSIA

V laboratóriách VPÚ v BA sa v rokoch 2020 až 2022 multireziduálnou metódou analyzovalo vyše 150 úradne odobratých vzoriek citrusov (citróny, pomaranče, mandarínky, grapefruity, limetky). Vzorky pochádzali z rôznych krajín Európy aj mimo Európy. Po výraznom znížení maximálnych reziduálnych limitov sa zvýšili hlásenia nadlimitných nálezov v systéme RASFF, najmä pri vzorkách pôvodom z tretích krajín. V tabuľke č. 2 a na obrázku č. 1 je prehľad počtu vzoriek citrusov hlásených v RASFF v rokoch 2020 až 2022. Celkový počet hlásení nadlimitných nálezov v citrusoch z tretích krajín výrazne stúpol po znížení MRL, ktoré je platné v rámci EÚ. Kým v roku 2020 predstavovali nadlimitné hlásenia v RASFF vo vzorkách citrusov z tretích krajín 20%, v rokoch 2021 a 2022 stúpol počet nadlimitných hlásení v RASFF až na 50%.

Tabuľka č. 2 Počet nadlimitných hlásení v RASFF v ovocí a zelenine a počet nadlimitných hlásení v citrusoch z tretích krajín v rokoch 2020, 2021 a 2022

Rok 2020		Rok 2021		Rok 2022	
Ovocie, zelenina	Citrusy	Ovocie, zelenina	Citrusy	Ovocie, zelenina	Citrusy
288	59	355	170	291	157

Obrázok č. 1 Počet celkových nadlimitných hlásení v RASFF v ovocí a zelenine a počet nadlimitných hlásení v citrusoch pôvodom z tretích krajín v rokoch 2020, 2021 a 2022

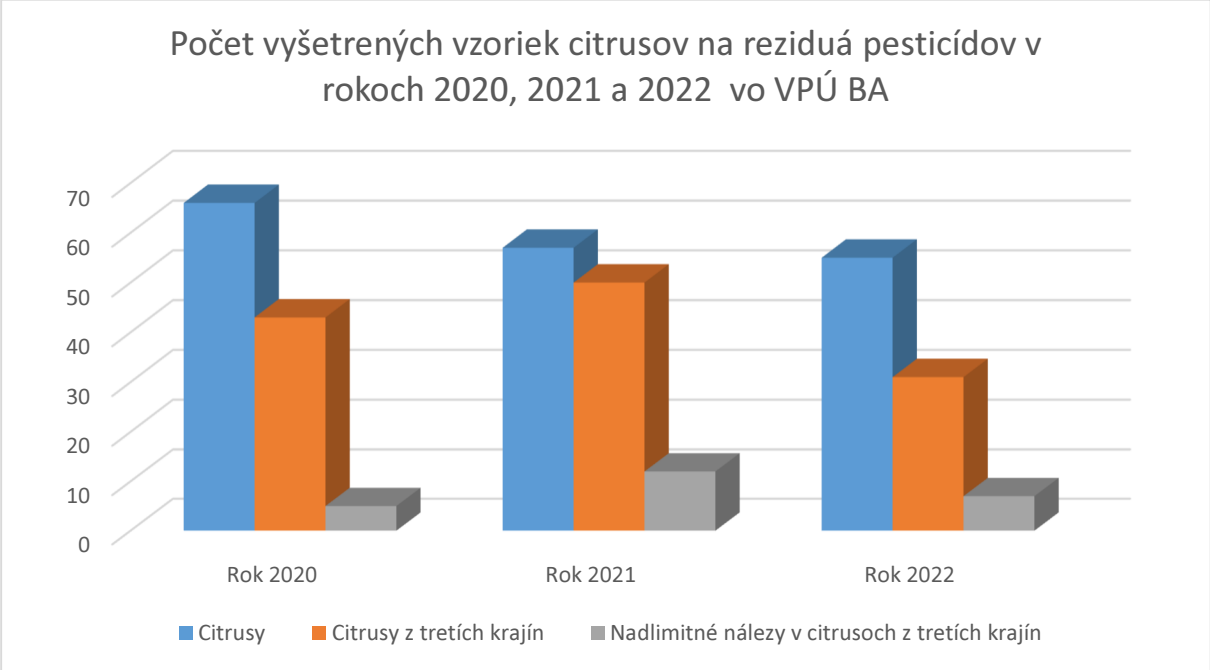


V tabuľke č. 3 a na obrázku č.2 je znázornený prehľad počtu vyšetrených vzoriek ovocia analyzovaných v laboratóriách VPÚ BA, počet vzoriek citrusov, počet vzoriek citrusov z tretích krajín a počet nadlimitných nálezov v citrusoch z tretích krajín. Niektoré vzorky citrusov mali aj viac nadlimitných nálezov rezíduí pesticídov.

Tabuľka č. 3 Počet vyšetrených vzoriek ovocia, počet vyšetrených vzoriek citrusov, citrusov z tretích krajín a nadlimitných nálezov v citrusoch z tretích krajín v rokoch 2020, 2021 a 2022 vo VPÚ BA

	Rok 2020	Rok 2021	Rok 2022
ovocie	180	169	191
citrusy	66	57	55
citrusy tretie krajiny	43	50	31
citrusy z tretích krajín - nadlimitné nálezy	5	12	7

Obrázok č. 2 Počet úradne vyšetrených vzoriek citrusov na rezíduá pesticídov, počet vyšetrených vzoriek citrusov z tretích krajín a počet nadlimitných vzoriek v citrusoch z tretích krajín v rokoch 2020, 2021 a 2022 vo VPÚ BA



ZÁVER

Výsledok analýzy (výsledné koncentrácie jednotlivých rezíduí pesticídov) sa porovnáva s legislatívne dovolenou maximálnou koncentráciou rezíduí pesticídov (MRL). Hodnoty MRL sa prehodnocujú a vzhľadom na zdravotné a environmentálne riziko dochádza k ich zmenám.

Dramatická zmena MRL v posledných rokoch pre viaceré pesticídy (chlorpyrifos, chlorpyrifos metyl, fenbutatin oxide, buprofenzin, prochloraz a ďalšie) znamenala vyšší podiel nadlimitných nálezov v citrusoch (hlásenia v systéme RASFF). V Európskej Únii sú MRL výrazne prísne alebo sú pesticídy na základe hodnotenia rôznych rizík zakázané. Táto skutočnosť spôsobuje, že najmä nálezy vzoriek pôvodom z tretích krajín sú nadlimitné, pretože môžu uvedené pesticídy vo svojej poľnohospodárskej praxi používať.

V laboratóriách Veterinárneho a potravinového ústavu v Bratislave sa v rokoch 2020 až 2022 multireziduálnou analýzou vyšetrilo na prítomnosť pesticídov 540 úradne odobratých vzoriek ovocia, z toho bolo vyše 150 vzoriek citrusov. Počet pozitívnych nálezov rezíduí pesticídov v citrusoch z tretích krajín sa zvýšil. Kým v roku 2020 predstavoval podiel nadlimitných nálezov vo vzorkách citrusov z tretích krajín 10%, v rokoch 2021 a 2022 stúpol počet nadlimitných nálezov na 20%, čo súvisí s výrazným znížením MRL. Niektoré vzorky citrusov dokonca obsahovali aj viac nadlimitných nálezov.

Kontrola potravín na prítomnosť rôznych kontaminantov, medzi ktoré patria aj pesticídy, je veľmi dôležitá. Zvýšená pozornosť je potrebná pre zakázané pesticídy v EÚ a zvlášť pre komodity z tretích krajín.

POĎAKOVANIE

Za spoluprácu ďakujeme všetkým pracovníkom ŠVPÚ.

POUŽITÁ LITERATÚRA

1. ANASTASSIADES, M., LEHOTAY, S.J., STAJNBAHER, D., SCHENCK, F.J. Fast and Easy Multiresidue Method Employing Acetonitrile Extraction/Partitioning and "Dispersive Solid-Phase Extraction" for the Determination of Pesticide Residues in Produce, *J AOAC International*, 2003, vol. 86, no 22, p. 412-431
2. Nariadenie Európskeho parlamentu a Rady (ES) č. 396/2005 z 23. februára 2005 o maximálnych hladinách rezíduí pesticídov v alebo na potravinách a krmivách rastlinného a živočíšneho pôvodu a o zmene a doplnení smernice Rady 91/414/EHS
3. Document No. SANTE/11312/2021
4. https://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database/mrls
5. RASFF Window - Search (europa.eu)

Kontaktná adresa: Pigošová Petronela, Laboratory of Contaminants, Veterinary and Food Institute in Bratislava, Botanická 15, 842 52 Bratislava, Slovak Republic; E-mail: pigosova@svuba.sk

PREVALENCIA REZISTENTNÝCH IZOLÁTOV *S. AUREUS* Z MLIEKA DOJNÍC SO SUBKLINICKOU FORMOU MASTITÍDY

THE PREVALENCE OF *S. AUREUS* RESISTANT ISOLATES FROM THE MILK OF DAIRY COWS WITH SUBCLINICAL MASTITIS

Pilipčinec Emil[1], Király Ján[1], Hajdučková Vanda[1], Gregová Gabriela[2]

[1]*Katedra mikrobiológie a imunológie,*

[2]*Katedra verejného veterinárskeho lekárstva a welfare zvierat, Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, Komenského 73, 041 81 Košice, Slovenská republika*

ABSTRACT

Staphylococcus aureus is the most common worldwide cause of subclinical mastitis. The main problems of subclinical mastitis are higher incidence, prolonged persistence, higher speed of spread in the herd and decreased production and quality of milk. *S. aureus* could be resistant to β-lactam antibiotics, while the long-term use of various antibiotics leads to an increased prevalence of multiresistant strains. *S. aureus* is one of the most common foodborne pathogen in the world, and milk represents a potential source of its spread. The aim of the work was to confirm the clinical strains of *S. aureus* isolated from bovine mastitis by the multiplex PCR method (mPCR) at the gene level, to determine the minimum inhibitory concentration (MIC) of antibiotics and to detect the genes of resistance to methicillin. From the total number (n=11) of morphologically and biochemically identified *S. aureus*, six isolates were confirmed by confirmatory mPCR. *S. aureus* isolates were mostly sensitive to all measured antibiotics. Two isolates were penicillins- and carboxypenicillins-resistant, and in one isolate was identified inducible MLSB type of resistance. No methicillin resistance genes (*mecA* and *mecC*) were confirmed by PCR. This result correlates with the results of MIC of antibiotics.

Key words: subclinical mastitis, *Staphylococcus aureus*, multiplex PCR, MIC

ÚVOD

Mastitída hovädzieho dobytka je závažné ochorenie, ktorého vznik spôsobuje viacero faktorov. Definovaná je ako zápal mliečnej žľazy a jednou z hlavných príčin jej vzniku je bakteriálna infekcia. Vyskytuje sa ako klinická alebo ako subklinická mastitída s rôzne závažným priebehom, ktorý určuje nielen povaha patogéna, ale aj stav imunity a celková kondícia jedinca. Priebeh subklinickej mastitídy je na rozdiel od klinickej mastitídy

asymptomatický. Ale aj napriek absencii klinických príznakov pri subklinickej mastitíde, dochádza v jej dôsledku k zníženej produkcii mlieka a jeho kvalite (PEDERSEN a kol., 2021). Hlavným problémom pri subklinickej forme mastitídy je jej vyšší výskyt, dlhší čas výskytu počas ktorého pretrváva a rýchlosť šírenia v chove dojníc (JAVED a kol., 2022). Bežne využívanou diagnostickou metódou na detekciu subklinickej formy mastitídy je test na stanovenie počtu somatických buniek v mlieku.

Najčastejším celosvetovým pôvodcom subklinickej mastitídy je *Staphylococcus aureus* (RYCHSHANOVA a kol., 2022). Počas bakteriálnej infekcie dochádza k upregulácií expresie faktorov virulencie, vedúcej k zvýšeniu odolnosti voči fagocytóze a upregulácií génov prostredníctvom, ktorých dochádza k deštrukcii hostiteľského tkaniva (ZECCONI a kol., 2006, PEDERSEN a kol., 2021) *S. aureus* je schopný obísť vrodenú a adaptívnu imunitu hostiteľa (ZAATOUT a kol., 2019), odolávať účinku β-laktámových antibiotík pričom dlhodobé používanie rôznych antibiotík vedie k zvýšenej prevalencii multirezistentných kmeňov odolných voči rôznym skupinám antimikrobiálnych látok. Z toho dôvodu je *S. aureus* jedným z najbežnejších potravinových patogénov na svete (RYCHSHANOVA a kol., 2022) a mlieko a mliečne výrobky predstavujú potenciálne riziko šírenia *S. aureus* prostredníctvom potravinového reťazca.

Meticilín rezistentný *S. aureus* (MRSA) bol pôvodne zistený ako infekcia získaná z nemocníc (HA-MRSA), neskôr aj v komunite ľudí (CA-MRSA) a nedávno aj u hospodárskych zvierat (LA-MRSA) (KHAZAIE a AHMADI, 2021). Baktérie nesúce gén *mecA* a jeho homológ *mecC* môžu kódovať modifikovaný proteín viažuci penicilín s nízkou afinitou, čím sa stávajú rezistentnými voči meticilínu a väčšine ostatných beta-laktámov. Oba gény sú prenášané na mobilných genetických elementoch (MGE) nazývaných stafylokoková chromozómová kazeta *mec* (SCC *mec*) (DEURENBERG a kol., 2007). Popísaných bolo niekoľko štrukturálnych variantov SCC *mec*, ktoré sa líšia v genetickom obsahu, ich veľkosti a štruktúrnej organizácii. V kmeňoch MRSA bolo klasifikovaných 12 hlavných typov SCC *mec* prvkov, z ktorých sú niektoré rozdelené do podtypov (WU a kol., 2015). Typizácia prvkov SCC *mec* je nevyhnutná z dôvodu, že v kombinácii s genotypom chromozómu *S. aureus* je typ SCC *mec* dôležitou charakteristikou pre definovanie klonov MRSA v epidemiologických štúdiách a pre pochopenie vývoja týchto klonov. Kmene obsahujúce rôzne prvky SCC *mec* sa líšia v odlišnej citlivosti voči antibiotikám čo je významné z pohľadu klinických dôsledkov. Divergentný homológ génu *mecA* popísaný ako *mecC*, bol objavený v rovnakom SCC *mec* prvku (SCC *mec* typ XI) v genóme kmeňa *S. aureus* LGA251, ktorý bol izolovaný pri mastitíde hovädzieho dobytka (GARCIA-ALVAREZ a kol., 2011).

Cieľom tejto štúdie bolo potvrdenie klinických izolátov *S. aureus* získaných z bovinných mastitíd metódou multiplex PCR (mPCR). U potvrdených kmeňov bola následne stanovená citlivosť voči vybraným antimikrobiálnym látkam za účelom zhodnotenia frekvencie výskytu multirezistentných kmeňov a detekcia génov zodpovedných za rezistenciu voči meticilínu.

MATERIÁL A METODIKA

Odber vzoriek, izolácia a identifikácia Staphylococcus aureus

Vzorky mlieka boli odobraté od dojníc z rôznych slovenských fariem so subklinickou formou mastitídy s pozitívnym NK-testom. Izolácia a identifikácia *S. aureus* bola vykonaná klasickými mikrobiologickými metódami a následne boli izoláty podrobené konfirmácii na molekulárnej úrovni pomocou mPCR. Na rodovú špecifikáciu boli použité priméry amplifikujúce génový úsek 16S rRNA špecifický pre rod *Staphylococcus* a druhovo špecifické priméry pre *S. aureus* detegujúce gény *eap* (extracelulárny adherentný proteín) a *nuc* (termostabilná nukleáza) (Tabuľka č. 1).

Tabuľka č. 1, Použité priméry na PCR analýzu

Gén	Primér	Sekvencia (5´→3´)	Produkt (bp)	Referencia
16S rRNA	16S rRNA_Fw	CTACAATGGACAATACAAAGGGC	141	Englerová a kol. 2021
	16S rRNA_Rev	TCACCGTAGCATGCTGATCT		
eap	EAP-CON1	TACTAACGAAGCATCTGCC	230	Hussain a kol. 2007
	EAP-CON2	TTAAATCGATATCACTAATACCTC		
nuc	nuc_Fw	ACCTGCGACATTAATTAAAGCG	103	Englerová a kol. 2021
	nuc_Rev	TGTTTCAGGTGTATCAACCAATAATAG		
mecA	mecA_Fw	TGGAAGTTAGATTGGGATCATAGC	154	Táto štúdia
	mecA_Rev	CGATGCCTATCTCATATGCTGTT		
mecC	mecC_Fw	GACGATGGATCTGGTACAGCA	94	Táto štúdia
	mecC_Rev	CATTCATGAATGGATAAACATCGTA		

Genomická DNA bola extrahovaná z kultivácie izolátov cez noc v modifikovanom bujóne *Brain heart infusion* (mBHI**,** HiMedia Laboratories, Mumbai, India) s 1 % glukózou

a 2 % NaCl pomocou izolačného kitu *High Pure PCR Template Preparation Kit* (Roche Molecular Systems, Inc.). PCR reakčná zmes obsahovala vo výslednom objeme 0,5 ng izolovanej DNA, 1x *DreamTaq Green PCR Master Mix* (ThermoFisher SCIENTIFIC, USA), 0,125 pmol (*16S rRNA*), 0,25 pmol (*eap*) a 0,5 pmol (*nuc*) každého priméru („forward, reverse“) a vodu. Reakcia PCR prebehla na termocykléri Mastercycler® nexus X2 (Eppendorf, Germany) pri optimalizovaných podmienkach (Tabuľka č. 2).

Tabuľka č. 2, Podmienky mPCR detegujúcej *16S rRNA*, *eap* a *nuc*

Proces	Teplota (°C)	Čas (Sekundy/minúty)	Počet cyklov
Počiatočná denaturácia	95	3 min.	1
Denaturácia	95	30 sek.	30
Annealing	55	30 sek.	
Extenzia	72	20 sek.	
Denaturácia	95	30 sek.	10
Annealing	61	30 sek.	
Extenzia	72	20 sek.	
Konečná extenzia	72	10 min.	1

Elektroforetická separácia amplifikovaných úsekov DNA prebehla v 2,5 % agarózovom géli s pridanou GoodView™ (Amplia, SR) netoxickou reagenciou na detekciu nukleových kyselín pomocou elektroforetickej aparatúry Wide Mini-Sub® Cell GT System (BIO RAD, USA) a zdroja napätia PowerPac™ Basic (BIO RAD, USA). Produkty PCR boli v géli po elektroforéze vizualizované pomocou UV svetla zariadenia Ultraviolet Transilluminator (Bio-Imaging Systems, Israel) a zaznamenané prostredníctvom Kodak Gel Logic 100 Digital Imaging System (Kodak, USA).

Testovanie citlivosti na antibiotiká

Izoláty *S. aureus* potvrdené metódou PCR boli analyzované na citlivosť na antibiotiká. Minimálne inhibičné koncentrácie (MIC) boli stanovené podľa CLSI VET01-S2 (2013) a EUCAST (2017), systémom Miditech (Bratislava, Slovensko) s interpretačným odčítaním MIC. Boli testované tieto antibiotiká: ampicilín (AMP), ampicilín + sulbaktám (SAM), oxacilín (OXA), cefoxitín (FOX), piperacilín+ tazobaktám (TZP), erytromycín (ERY), klindamycín (CLI), linezolid (LNZ), rifampicín (RIF), gentamicín (GEN), teikoplanín (TEC), vankomycín (VAN), trimetoprim (TMP), chloramfenikol (CHL), tigecyklín (TGC),

moxifloxacín (MFX), ciprofloxacín (CIP), tetracyklín (TET), trimetoprim + sulfónamid (COT), nitrofurantoín (NIT).

Detekcia génov zodpovedných za antibiotickú rezistenciu

Prítomnosť génov zodpovedných za antibiotickú rezistenciu bola sledovaná pomocou PCR použitím jednotlivých dvojíc primérov amplifikujúcich úseky génov *mecA* a *mecC* (Tabuľka č. 1). PCR reakčná zmes obsahovala vo výslednom objeme 0,5 ng izolovanej genomickej DNA, 1x *DreamTaq Green PCR Master Mix* (ThermoFisher SCIENTIFIC, USA), 0,5 pmol primérov („forward, reverse“) a vodu. Reakcia PCR prebehla pri optimalizovaných podmienkach (Tabuľka č. 3). Elektroforetická separácia amplifikovaných úsekov DNA a vizualizácia produktov v géli prebehla rovnako ako pri identifikácii *S. aureus* pomocou mPCR.

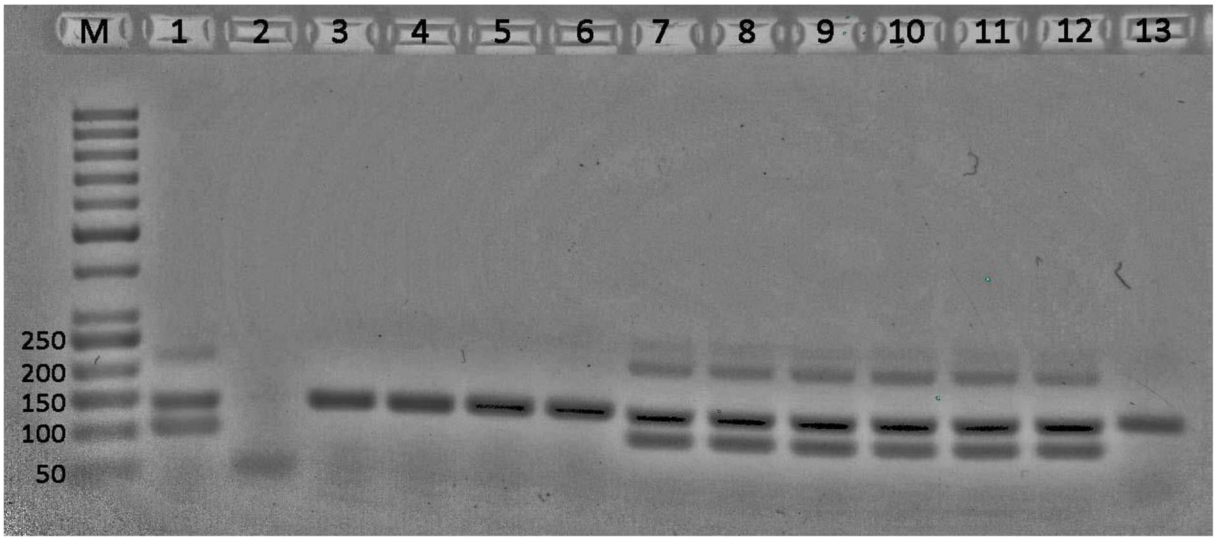
Tabuľka č. 3, Podmienky PCR detegujúcej *mecA* a *mecC*

Proces	Teplota (°C)	Čas (Sekundy/minúty)	Počet cyklov
Počiatočná denaturácia	95	3 min.	1
Denaturácia	95	30 sek.	35
Annealing	61	30 sek.	
Extenzia	72	15 sek.	
Konečná extenzia	72	10 min.	1

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Vo vzorkách mlieka získaných od dojníc (n=215) so subklinickou formou mastitídy boli klasickými mikrobiologickými metódami identifikované izoláty *S. aureus* (n=11), ktoré boli pre overenie správnosti stanovenia podrobené konfirmácii pomocou mPCR metódy, pri ktorej bola detegovaná prítomnosť špecifických stafylokokových génov *16S rRNA* (141 bp), *nuc* (103 bp) a *eap* (230 bp). Gén *16S rRNA* špecifický pre rod *Staphylococcus* bol pozitívne detegovaný u všetkých terénnych izolátov identifikovaných štandardnými mikrobiologickými postupmi. Prítomnosť druhovo špecifických génov pre *S. aureus nuc* a *eap* bola potvrdená u 6 izolátov (izoláty č. 7 až 12) (Obrázok č. 1).

Obrázok č. 1, Detekcia génov *16S rRNA*, *eap* a *nuc* u izolátov *S. aureus* pomocou mPCR



M – štandard GeneRuler 50 bp DNA ladder; 1 – kontrolný kmeň *S. aureus*;
2 – negatívna kontrola bez DNA; 3 až 13 – izoláty *S. aureus* pozitívne na *16S rRNA* (141 bp); 7 až 12 – izoláty pozitívne na *eap* (230 bp) a *nuc* (103 bp) gén

HUSSAIN a kolektív (2008) na základe štúdie vykonanej na vzorke 813 izolátov zahŕňajúcich *S. aureus* a iné druhy rodu *Staphylococcus* preukázali, že *eap* gén bol detegovaný u všetkých 597 izolátov *S. aureus* a zároveň nebol detegovaný u žiadneho z 216 iných stafylokokových izolátov zahŕňajúcich 47 rôznych druhov a poddruhov koaguláza negatívnych a iných koaguláza pozitívnych alebo koaguláza variabilných stafylokokov. Dokázali, že iné izoláty ako *S. aureus* neexprimujú homológy Eap a to na základe výsledkov získaných z transkripčných a proteínových analýz. Preto stanovili citlivosť a špecifickosť novo vyvinutej PCR zameranej na detekcii génu *eap* ako 100 %. Na molekulárnu detekciu *S. aureus* prostredníctvom amplifikácie časti génu *nuc* využili vo svojej práci aj GONZALEZ-DOMINGUEZ a kolektív (2020). Rovnako ako v našej štúdii použili špecifické priméry navrhnuté na identifikáciu segmentu v rámci sekvenčných homológií zdieľaných medzi *nuc* génom druhu *S. aureus*. Autori štúdie uvádzajú, že aj napriek vysokej špecificite súpravy Staph-API (92,49 %) diagnostikovať druhy *Staphylococcus*, nedosahuje identifikácia pomocou fenotypizácie stafylokokov získaných z klinických vzoriek udávanú špecificitu, čo môže byť jedným z vysvetlení nami získaných výsledkov, keď sme pomocou PCR metódy potvrdili *S. aureus* u 6 z 11 izolátov čo predstavuje 54,5 %. Podobné výsledky získali aj QOLBAINI a kolektív (2021), ktorý taktiež detegovali *nuc* gén u 49 (57 %) z 86 izolátov *S. aureus* identifikovaných klasickými mikrobiologickými metódami. Na vysvetlenie rozdielov medzi uvedenými spôsobmi identifikácie bude potrebné vykonať sekvenčnú analýzu izolátov, u ktorých neboli detegované gény *eap* a *nuc*.

U šiestich potvrdených izolátov *S. aureus* bola následne stanovená citlivosť voči antibiotikám zisťovaním MIC, pričom výsledky rezistencie sú uvedené v tabuľke č. 4.

Tabuľka č. 4, Výsledky MIC u izolátov *S. aureus* a hodnotenie rezistencie

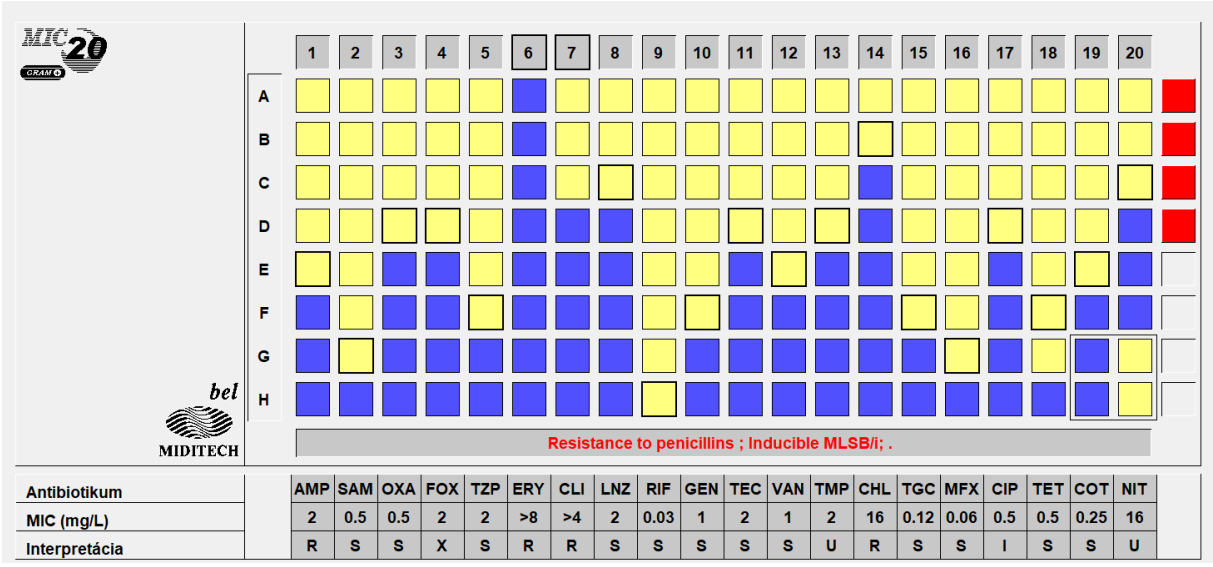
Vzorka	**7**		**8**		**9**		**10**		**11**		**12**	
ATB	MIC (mg/L)	Citlivosť	MIC (mg/L)	Citlivosť	MIC (mg/L)	Citlivosť	MIC (mg/L)	Citlivosť	MIC (mg/L)	Citlivosť	MIC (mg/L)	Citlivosť
AMP	0.25	S	0.25	S	0.25	S	2	R	0.25	S	>32	R
SAM	0.25	S	0.25	S	0.25	S	0.5	S	0.25	S	>32	R
OXA	0.25	S	0.25	S	0.25	S	0.5	S	0.25	S	0.25	S
FOX	2	S	2	S	2	S	2	S	2	S	2	S
TZP	0.5	S	0.5	S	0.5	S	2	S	0.5	S	0.5	S
ERY	0.25	S	0.25	S	0.25	S	>8	R	0.25	S	0.12	S
CU	0.12	S	0.12	S	0.12	S	>4	R	0.12	S	0.06	S
LNZ	4	S	4	S	4	S	2	S	4	S	2	S
RIF	0.03	S	0.03	S	0.03	S	0.03	S	0.03	S	0.03	S
GEN	0.5	S	0.5	S	1	S	1	S	0.5	S	0.5	S
TEC	1	S	2	S	2	S	2	S	1	S	1	S
VAN	1	S	2	S	1	S	1	S	1	S	1	S
TMP	2	S	4	S	4	S	2	S	1	S	1	S
CHL	8	S	8	S	8	S	16	R	8	S	8	S
TGC	0.12	S	0.06	S	0.06	S	0.12	S	0.06	S	0.06	S
MFX	0.12	S	0.06	S	0.06	S	0.06	S	0.03	S	0.03	S
CIP	0.5	I	0.25	I	0.5	I	0.5	I	0.25	I	0.25	I
TET	1	S	0.5	S	0.25	S	0.5	S	0.25	S	0.25	S
COT	0.25	S	0.25	S	0.25	S	0.25	S	0.25	S	0.25	S
NIT	16	S	32	S	32	S	16	S	16	S	16	S

S – citlivý; I – intermediárny; R – rezistentný

Izoláty *S. aureus* boli väčšinou citlivé na sledované antibiotiká. Dva izoláty boli rezistentné na penicilíny a karboxypenicilíny, z ktorých bol jeden fenotypovo identifikovaný ako indukovateľný typ MLSB rezistencie (Obrázok č. 2). Typ inducibilnej rezistencie MLSB (makrolid-linkozamid-streptogramín B) u *S. aureus* predstavuje nebezpečenstvo v dôsledku zlyhania liečby antibiotikami ako sú klindamycín a erytromycín, ktoré sú používané pri liečbe infekcií kože a mäkkých tkanív spôsobených stafylokokmi (UZUN a kol., 2014). Žiaden z potvrdených izolátov *S. aureus* izolovaných zo subklinickej formy mastitídy nevykazoval rezistenciu voči cefoxitínu a oxacilínu, čo je dôležité pre zdravie zvierat, pretože β-laktámové antibiotiká stále patria medzi najbežnejšie antimikrobiálne terapeutiká používané na liečbu

mastitídy a alternatívna liečba neβ-laktámovými antibiotikami je obmedzená (SCHNITT a TENHAGEN, 2020).

Obrázok č. 2, Výsledok MIC u izolátu *S. aureus* a analýza mechanizmov rezistencie pomocou systému MIDITECH



Antibiotikum	AMP	SAM	OXA	FOX	TZP	ERY	CLI	LNZ	RIF	GEN	TEC	VAN	TMP	CHL	TGC	MFX	CIP	TET	COT	NIT
MIC (mg/L)	2	0.5	0.5	2	2	>8	>4	2	0.03	1	2	1	2	16	0.12	0.06	0.5	0.5	0.25	16
Interpretácia	R	S	S	X	S	R	R	S	S	S	S	S	U	R	S	S	I	S	S	U

Väčšina z publikovaných štúdií zameraných na sledovanie citlivosti kmeňov *S. aureus* voči antibiotikám podáva výsledky získané iba prostredníctvom testovania fenotypovej rezistencie bez preukázania prítomnosti génov *mecA* a *mecC* zodpovedných za produkciu zmeneného proteínu viažuceho penicilín 2a (PBP2a), ktorý ma nižšiu afinitu k β-laktámovým antimikrobiálnym látkam ako normálny PBP. Ukázalo sa, že fenotypové testovanie vedie k falošne negatívnym, ale aj k falošne pozitívnym výsledkom (SCHNITT a TENHAGEN, 2020). Na potvrdenie získaných výsledkov citlivosti *S. aureus* voči antibiotikám stanovením MIC bola u potvrdených izolátov pomocou PCR zisťovaná prítomnosť génov *mecA* a *mecC* pričom u žiadneho nebola detegovaná ich prítomnosť čo koreluje s výsledkami MIC.

ZÁVER

Staphylococcus aureus je vo všeobecnosti radený medzi najčastejšie patogény zodpovedné za vznik mastitídy. Celková prevalencia *S. aureus* je variabilná a líši sa medzi jednotlivými chovmi a regiónmi. Z výsledkov izolácie a identifikácie z mlieka získaného od dojníc so subklinickou formou mastitídy možno konštatovať, že *S. aureus* nepatrí medzi najbežnejšie patogény mliečnej žľazy. Nepresnosti pri identifikácii *S. aureus* v klinických vzorkách založenej na klasických mikrobiologických postupoch poukazujú na potrebu zahrnúť do diagnostického postupu aj metódy detekcie druhovo špecifických génov *nuc* a *eap*. Celková

miera prevalencie MRSA v chovoch dojníc je nízka, ale stále existuje riziko jej zvyšovania sa. Sledovaním citlivosti na antibiotiká nebol zaznamenaný žiaden MRSA kmeň čo je pozitívnym faktom, keďže antibiotikami prvej voľby pri liečbe stafylokokových mastitíd sú beta-laktámy. Kontinuálne monitorovanie rezistencie na antibiotiká je nevyhnutné, pretože sa objavujú rezistentné kmene *S. aureus* (MLSB a penicilín rezistentné kmene), čo predstavuje problémom pri liečbe bovinnej mastitídy. Získané výsledky detekcie MRSA kmeňov boli potvrdené aj detekciou génov *mecA*, *mecC*, ktoré neboli prítomné v žiadnom izoláte *S. aureus*.

POĎAKOVANIE

Táto práca bola podporovaná projektmi KEGA 007UVLF-4/2021, KEGA 001UVLF-4/2022, APVV-16-0171.

POUŽITÁ LITERATÚRA

1. CLSI document VET01-S2 Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals. 1–168 (Publ. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, 2013).
2. DEURENBERG, R. H. et al. The molecular evolution of methicillin-resistant Staphylococcus aureus. *Clin Microbiol Infect,* 2007, 13**,** 222-35.
3. EUCAST guidelines for detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical and/or epidemiological importance. Version 2.0, 1–43 (2017).
4. GARCIA-ALVAREZ, L. et al. Meticillin-resistant Staphylococcus aureus with a novel mecA homologue in human and bovine populations in the UK and Denmark: a descriptive study. *Lancet Infect Dis,* 2011, 11**,** 595-603.
5. GONZALEZ-DOMINGUEZ, M. S. el al. Molecular Detection and Characterization of the mecA and nuc Genes From Staphylococcus Species (S. aureus, S. pseudintermedius, and S. schleiferi) Isolated From Dogs Suffering Superficial Pyoderma and Their Antimicrobial Resistance Profiles. *Front Vet Sci,* 2020, 7**,** 376.
6. HUSSAIN, M. et al. eap Gene as novel target for specific identification of Staphylococcus aureus. *J Clin Microbiol,* 2008, 46**,** 470-6.
7. JAVED, S. et al. Epidemiology and molecular characterization of Staphylococcus aureus causing bovine mastitis in water buffaloes from the Hazara division of Khyber Pakhtunkhwa, Pakistan. *PLoS One,* 2022, 17**,** e0268152.
8. KHAZAIE, F. & AHMADI, E. Bovine subclinical mastitis-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus, selective genotyping and antimicrobial susceptibility profile of the isolates in Kurdistan province of Iran. *Iran J Microbiol,* 2021, 13**,** 65-73.

9. PEDERSEN, R. R. et al. Biofilm Research in Bovine Mastitis. *Front Vet Sci,* 2021, 8, 656810.
10. QOLBAINI, E. N. et al. Identification and antimicrobial susceptibility of methicillin-resistant Staphylococcus aureus-associated subclinical mastitis isolated from dairy cows in Bogor, Indonesia. *Vet World,* 2021, 14**,** 1180-1184.
11. RYCHSHANOVA, R. et al. Antibiotic resistance and biofilm formation in Staphylococcus aureus isolated from dairy cows at the stage of subclinical mastitis in northern Kazakhstan. *Arch Anim Breed,* 2022, 65**,** 439-448.
12. SCHNITT, A. & TENHAGEN, B. A. Risk Factors for the Occurrence of Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus in Dairy Herds: An Update. *Foodborne Pathog Dis,* 2020, 17**,** 585-596.
13. UZUN, B. et al. [Macrolide-lincosamide-streptogramin B (MLSB) resistance phenotypes in clinical Staphylococcus isolates and investigation of telithromycin activity]. *Mikrobiyol Bul,* 2014, 48**,** 469-76.
14. WU, Z. et al. Novel Type XII Staphylococcal Cassette Chromosome mec Harboring a New Cassette Chromosome Recombinase, CcrC2. *Antimicrob Agents Chemother,* 2015, 59**,** 7597-601.
15. ZAATOUT, N. et al. Identification of staphylococci causing mastitis in dairy cattle from Algeria and characterization of Staphylococcus aureus. *J Appl Microbiol,* 2019, 127**,** 1305-1314.
16. ZECCONI, A. el al. Role of several Staphylococcus aureus virulence factors on the inflammatory response in bovine mammary gland. *Microb Pathog,* 2006, 40, 177-83.

Kontaktná adresa: Pilipčinec Emil, Department of microbiology and immunology, UVLF Košice, Komenského 73, 041 81 Košice, Slovak Republic; E-mail: emil.pilipcinec@.uvlf.sk

SILYBÍN VYKAZUJE CYTOTOXICKÉ, ANTIPROLIFERATÍVNE A PROTIZÁPALOVÉ ÚČINKY NA NÁDOROVÉ BUNKY, PRI ZACHOVANÍ ŽIVOTNOSTI A PROLIFERÁCIE ZDRAVÝCH INTESTINÁLNYCH BUNIEK

SILYBIN SHOWS CYTOTOXIC, ANTIPROLIFERATIVE, AND ANTI-INFLAMMATORY ACTIVITIES IN THE CANCER CELL LINE WHILE RETAINING VIABILITY AND PROLIFERATION IN NORMAL INTESTINAL CELLS

Ratvaj Marek[1], Faixová Dominika[2], Cingeľová Maruščáková Ivana[1], Hrčková Gabriela[3], Chomová Natália[1], Mudroňová Dagmar[1]

[1] Katedra mikrobiológie a imunológie, Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, Komenského 73, 041 81 Košice, Slovenská republika

[2]Katedra farmaceutickej technológie, farmakognózie a botaniky, Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, 041 81 Košice, Slovenská republika;

[3]Parazitologický ústav, Slovenská akadémia vied, Hlinkova 3, 040 01 Košice, Slovakia;

ABSTRACT

Silybin, a part of the silymarin complex, is a natural substance found in the milk thistle (*Silybum marianum*). While the silymarin complex has been studied extensively, and its anti-inflammatory and protective effect has been proven *in vitro* on various cell lines, there has been little research on intestinal cells with the comparison of healthy and cancerous cells. Our study aimed to determine the dose-dependent effect of silybin on porcine epithelial cell line-1 and on the human epithelial colorectal adenocarcinoma cell line. Analysis of the effect of increasing concentrations of silybin on cell viability and proliferation as well as relative gene expression of anti-inflammatory and pro-inflammatory cytokine was conducted. Silybin significantly stimulates the metabolic activity and growth of healthy cells and suppresses cancer cells' metabolic activity and proliferation. Moreover, it suppresses the expression of proinflammatory cytokine IL1- β in cancerous cells and stimulates the expression of anti-inflammatory cytokine TGF-β in healthy cells. Based on these results silybin has the potential as a supplement to traditional therapy in patients with colon cancer.

Keywords: silybin, intestine, gene expression, cancer

ÚVOD

Pestrec mariánsky (*Silybum marianum*) sa radí medzi jednu z najstarších využívaných liečivých rastlín; zmienku o použití tejto rastliny nájdeme aj v Starom Zákone. Na liečenie problémov s pečeňou bol používaný už v starovekom Grécku, ale aj vo východnej medicíne (Abenavoli et al., 2010). Extrakt z tejto rastliny – silymarín – WHO zaradila v 70. rokoch minulého storočia na zoznam liečiv s hepatoprotektívnym účinkom (Wesolowska et al., 2007). Hlavnou zložkou silymarinového komplexu je flavonoid silybín (Bijak, 2017).

Okrem hepatoprotektívneho účinku ma silymarínový komplex aj známy neuro-, nefro- a kardio- protektívny účinok dokázaný experimentálne u zvierat aj ľudí (Milić et al., 2013). Ďalším účinkom tohto komplexu je imunomodulácia, ktorá môže byť orientovaná na stimuláciu, ale aj supresiu imunitného systému v závislosti od koncentrácie podávaného silymarínu (Johnson et al., 2003).

V nasej práci sme sa zamerali na *in vitro* účinok silybínu na zdravé a nádorové črevné bunky pri rôznych koncentráciách tohto flavonoidu.

MATERIÁL A METODIKA

Izolácia silybínu a bunkové línie

Silybín bol extrahovaný na Ústave mikrobiológie Českej akadémie vied. 200mg silymarínu bolo suspendovaných v 10ml metanolu a následne bola odstránená nerozpustná zložka. Čistota silybínu bola určená pomocou HPLC PDA na 95%.

V experimente bola využitá dvojica bunkových kultúr. IPEC-1 línia reprezentovala zdravé črevné bunky a bola kultivovaná v médiu obsahujúcom Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12 (DMEM/F-12; Sigma-Aldrich, USA) s prídavkom 5% inaktivovaného fetálneho bovinného séra, 10 µg/ml inzulínu, 10 µg/ml transferínu, 10 ng/ml selénu (Lonza, Švajčiarsko), 5 ng/ml epidermálneho rastového faktora (BD Biosciences, USA) a 50 µg/ml gentamicínu (BioSera, Filipíny).

CaCo-2 línia reprezentovala nádorové bunky a bola kultivovaná v DMEM/F-12, 5% inaktivovaného fetálneho bovinného séra, 1% amfotericínu B (BioSera, Filipíny) a gentamicín (50 µg/ml; BioSera, Filipíny). Obe bunkové kultúry boli kultivované pri 37°C vo vlhkej atmosfére s 5% CO2.

Analýza metabolickej aktivity

Životnosť buniek bola meraná po expozícii silybínu pomocou MTS testu. Bunky nasadené na štandardné 96 jamkové platničky v hustote 3×10^4 buniek/jamka v 100 µl média. Po 24 hodinách bol na bunky aplikovaný silybín v rôznych koncentráciách (5, 10, 20, 40, a 80

µM) v médiu s objemom 100 µl. Po 4 hodinovej kultivácii bolo do každej jamky pridané MTS v objeme 20 µl a bola meraná absorbancia pri 490nm pomocou prístroja Synergy HT (Biotek, USA). Absorbancia kontrolnej skupiny bola stanovená ako 100% a výsledky sú vyjadrené ako percento z neošetrenej kontroly. Experiment bol prevedený dvakrát a každá vzorka bola v duplikáte.

Analýza bunkového cyklu

Obe bunkové línie boli nasadené na 24 jamkové platničky a po 24 hodinách bol na bunky aplikovaný silybín v stanovených koncentráciách. Po 4 hodinách boli bunky enzymaticky odadherované, premyté vo fosfátovom fyziologickom roztoku (FFR) a fixované 60% etanolom pri 4°C cez noc. Zafixované bunky boli premyté vo FFR a resuspendované vo farbiacom roztoku, ktorý obsahoval 25 mg/l propídium jodid and 100 mg/l ribonukleázy A (Sigma-Aldrich, USA) vo FFR. Následne boli bunky 1h inkubované pri 37°C v tme a analyzované na prietokovom cytometri BD FACS Canto (BD Biosciences, USA) s využitím BD FACS Diva software (BD Biosciences, USA). Výsledky boli vyhodnotené ako percento buniek v subG1, G0/G1, S a G2/M fázach cyklu. Experiment bol prevedený dvakrát.

Génová expresia

Bunky nasadené na 24 jamkové platničky boli po 24 hodinách ošetrené silybínom v stanovených koncentráciách a po 4 hodinách inkubácie bola získaná RNA z týchto buniek pomocou PureZOL RNA Isolation Reagent (Bio-Rad, USA) podľa pokynov výrobcu. Čistota a koncentrácia RNA bola stanovená pomocou spektrofotometra Nanodrop 8000 (Thermo Scientific, USA). RNA bola prepísaná do cDNA pomocou kitu QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen, Germany). Kvantitatívna PCR bola vykonaná na termocykleri iCycler CFX96 (BioRad, Hercules, CA, USA) a každá vzorka bola analyzovaná v triplikáte. Ako referenčný gén bol použitý GAPDH. V tejto práci uvádzame zmenu relatívnej génovej expresie pre IL1-β a TGF-β. Sekvencia primerov je uvedená v Tabuľke č. 1.

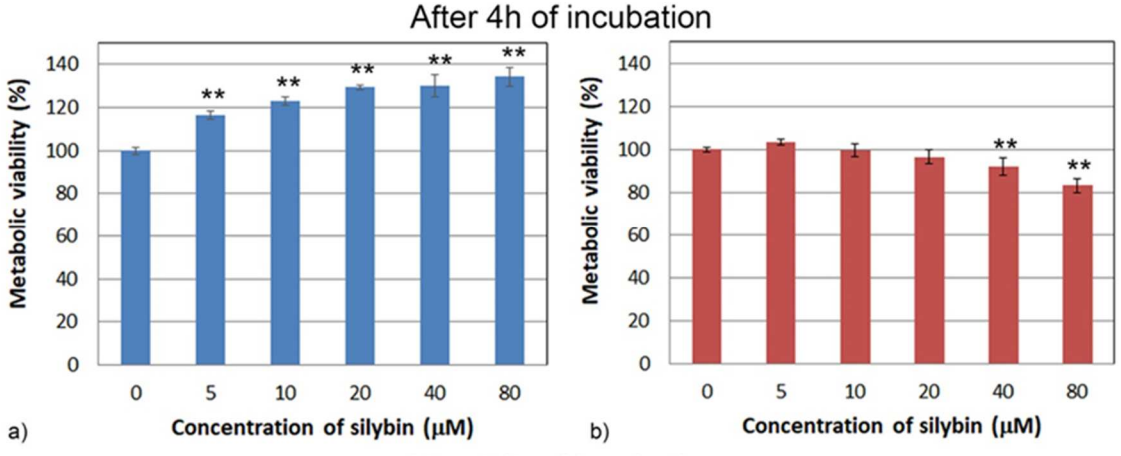
Tabuľka č. 1, Sekvencia primerov použitých pre qPCR

		Forward	Reverse
IPEC-1	**GAPDH**	CCTGCTTCACCACCTTCTTGA	CCCCAACGTGTCGGTTGT
	IL1 β	TGGATGGGCGGCTGATTTGAAG	CGAACCCGTGTTGCTGAAGGAG
	TGF-β	ACAACTCCGGTGACATCAAAGG	ACGTGGAGCTATACCAGAAATACAG
CACO-2	**GAPDH**	GACAAGCTTCCCGTTCTCAG	TCACCAGGGCTGCTTTTAAC
	IL1 β	TCTTTCAACACGCAGGACAG	TCCAGGGACAGGATATGGAG
	TGF-β	GCGGAAGTCAATGTACAGCTGCCGC	TGAACCGGCCTTTCCTGCTTCTCATG

VÝSLEDKY A DISKUSIA

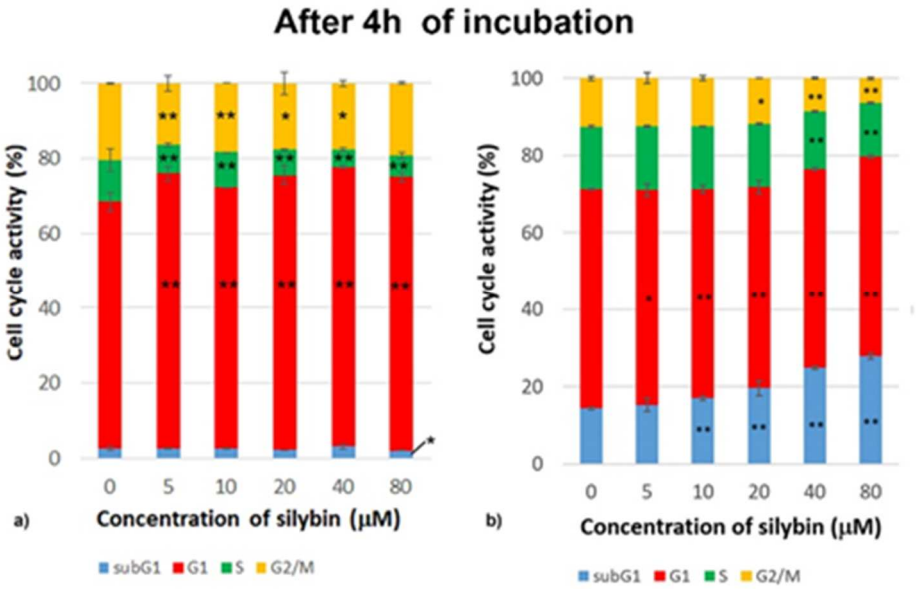
Životnosť buniek po vystavení silybínu sme hodnotili pomocou MTS testu. Po 4 hodinách inkubácie bola metabolická aktivita IPEC-1 buniek signifikantne zvýšená v porovnaní s kontrolou vo všetkých experimentálnych skupinách. Na druhej strane v CaCo-2 bunkovej línii sme pozorovali signifikantné zníženie metabolickej aktivity ale len pri dvoch najvyšších koncentráciách (Obrázok č. 1a, b). Tieto výsledky naznačujú pozitívny stimulačný efekt na zdravé bunky a zároveň supresívny vplyv na bunky nádorové, čo hodnotíme ako dobrý výsledok pre prípadnú aplikáciu silybínu postihnutému jedincovi. Zároveň je vidieť, že intenzita tohto účinku závisí od koncentrácie silybínu. Podobný stimulačný efekt na bunky osteoblastov a angiogenézu bol pozorovaný pri experimentoch, kde bol silybín začlenený do metalokomplexov (Rajalakshmi et al., 2018).

Obrázok č. 1, Metabolická aktivita (%) a) IPEC-1 a b) CaCo-2 ošetrených rôznymi koncentráciami silybínu. **- signifikantný rozdiel oproti kontrole neošetrených buniek, p < 0.01.



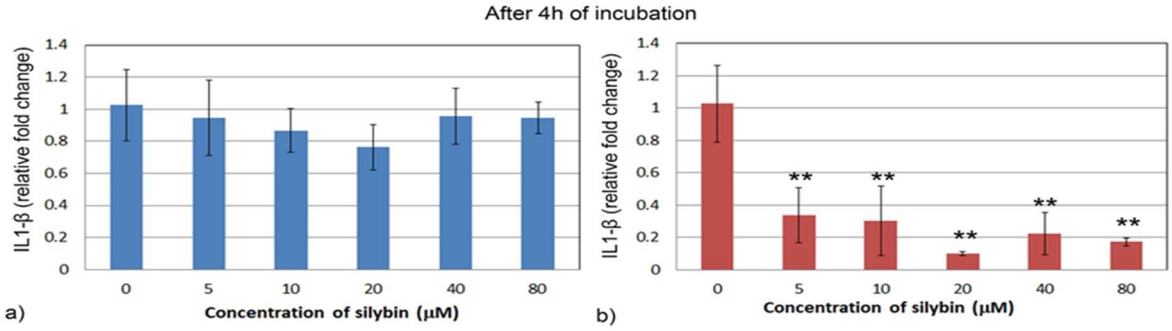
Po 4 hodinách inkubácie so silybínom bol signifikantne zvýšený počet IPEC-1 buniek v G1 fáze bunkového cyklu a zároveň znížený počet buniek v S fáze vo všetkých experimentálnych skupinách v porovnaní s kontrolou. Skupiny ošetrené silybínom v koncentrácii od 5 do 40 µM mali vyšší počet buniek v G2/M fáze v porovnaní s kontrolou. CaCo-2 bunky vykazovali zvýšenie počtu buniek v subG1 fáze, ktoré bolo závislé na koncentrácii. Počty buniek v G1 fáze boli signifikantne nižšie vo všetkých experimentálnych bunkách v porovnaní s kontrolou. Najvyššie koncentrácie silybínu viedli k poklesu počtu buniek v S fáze, inhibícii mitózy (G2/M fáza) a najvyššiemu posunu k subG1 fáze (Obrázok č. 2a, b). Vyššie koncentrácie silybínu sú účinnejšie v ničení nádorových buniek, čo koreluje s výsledkami prác s flavonoidmi, u ktorých boli dokázané protinádorové účinky, avšak aj pri nižších koncentráciách (Khater et al., 2019).

Obrázok č. 2, Analýza bunkového cyklu (%) a) IPEC-1 a b) CaCo-2 ošetrených rôznymi koncentráciami silybínu. * - signifikantný rozdiel oproti kontrole neošetrených buniek, *p < 0.05; **p < 0.01.



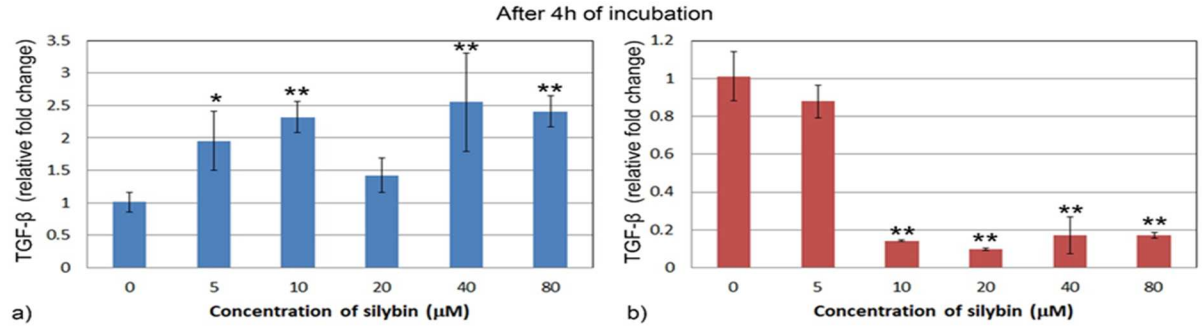
Relatívna génová expresia pre prozápalový cytokín IL1-β sa signifikantne nezmenila v IPEC-1 bunkách po kultivácii so silybínom, čo naznačuje, že silybín v zdravých bunkách nestimuluje zápalovú odpoveď. CaCo-2 bunky vykazovali zníženú expresiu vo všetkých experimentálnych skupinách, pričom najsignifikantnejší pokles bol pozorovaný v koncentráciách 20, 40 a 80µM (Obrázok č. 3a, b). Zápal je typickým sprievodným znakom nádorového bujnenia a tlmenie zápalu je nevyhnutné pri ochrane tkanív pacienta.

Obrázok č. 3, Relatívna génová expresia IL1-β (ΔΔCt) a) IPEC-1 a b) CaCo-2 ošetrených rôznymi koncentráciami silybínu. * - signifikantný rozdiel oproti kontrole neošetrených buniek, **p < 0.01.



Po 4 hodinovej kultivácii bola expresia protizápalového cytokínu TGF-β v IPEC-1 bunkách signifikantne zvýšená vo všetkých experimentálnych skupinách s výnimkou skupiny, ktorá bola ošetrená silybínom s koncentráciou 20 μM. Toto zvýšenie expresie môže byť dôvodom, prečo sme nedetegovali vyššiu expresiu IL1-β, keďže TGF-β pôsobí regulačne na jeho expresiu. Na druhej strane, v CaCo-2 bunkách bol pozorovaný signifikantný pokles expresie od koncentrácie 10 μM (Obrázok č. 4a, b), je teda vidieť, že pri podávaní silybínu je potrebné nájsť správnu koncentráciu, pomocou ktorej dosiahneme želaný efekt. Pokles expresie TGF-β bol pozorovaný aj pri iných experimentoch na poškodených pečeňových bunkách (Eraky et al., 2018), tak ako tomu bolo na nádorových bunkách v našom experimente.

Obrázok č. 4, Relatívna génová expresia TGF-β (ΔΔCt) a) IPEC-1 a b) CaCo-2 ošetrených rôznymi koncentráciami silybínu. * - signifikantný rozdiel oproti kontrole neošetrených buniek, *p < 0.05; **p < 0.01.



ZÁVER

V zdravých bunkách rastlinný extrakt silybín nevyvoláva narušenie bunkového cyklu ani metabolickej aktivity a v týchto bunkách tlmí cez expresiu protizápalových cytokínov zápalovú odpoveď a vykazuje tak cytoprotektívny účinok. Zároveň však narúša metabolizmus

a má antiproliferatívne účinky na nádorové bunky, v ktorých taktiež znižuje expresiu prozápalových cytokínov. Vďaka tomu sa javí ako vhodný doplnok liečby nádorov čreva.

POĎAKOVANIE

Práca vznikla vďaka podpore grantu IGA UVLF 12/2020 a VEGA 1/0554/21.

POUŽITÁ LITERATÚRA

1. ABENAVOLI, L., et al. Milk thistle in liver diseases: past, present, future. *Phytotherapy Research*, 2010, 24.10, p. 1423-1432. Dostupné na : doi.org/10.1002/ptr.3207
2. BIJAK, M. Silybin, a major bioactive component of milk thistle (Silybum marianum L. Gaernt.)—Chemistry, bioavailability, and metabolism. *Molecules*, 2017, vol. 22, no. 11, p. 1942. Dostupné na : doi.org/10.3390/molecules22111942
3. ERAKY, S. M., et al. Silymarin and caffeine combination ameliorates experimentally-induced hepatic fibrosis through down-regulation of LPAR1 expression. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2018, vol. 101, p. 49-57. dostupné na: doi.org/10.1016/j.biopha.2018.02.064
4. JOHNSON, V. J., et al. Physiological responses of a natural antioxidant flavonoid mixture, silymarin, in BALB/c mice. *Planta medica*, 2003, vol. 69, no. 1, p. 44-49. Dostupné na: doi.org/10.1055/s-2002-35663
5. KHATER, M., et al. Metal complexes of flavonoids: their synthesis, characterization and enhanced antioxidant and anticancer activities. *Future medicinal chemistry*, 2019, vol. 11, no. 21, p. 2845-2867. Dostupné na : doi.org/10.4155/fmc-2019-0237
6. MILIĆ, N., et al. New therapeutic potentials of milk thistle (Silybum marianum). *Natural product communications*, 2013, vol. 8, no. 12, p. 1801-1810.
7. RAJALAKSHMI, S., et al. Synthesis and characterization of silibinin/phenanthroline/neocuproine copper (II) complexes for augmenting bone tissue regeneration: an in vitro analysis. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 2018, vol. 23, p. 753-762. Dostupné na : doi.org/10.1007/s00775-018-1566-4
8. WESOŁOWSKA, O., et al. Influence of silybin on biophysical properties of phospholipid bilayers 1. *Acta pharmacologica sinica*, 2007, vol. 28, no.2, p. 296-306. Dostupné na : doi.org/10.1111/j.1745-7254.2007.00487.x

Kontaktná adresa: Ratvaj Marek, Department of Microbiology and Immunology, University of Veterinary Medicine and Pharmacy in Košice, Komenského 73, 041 81 Košice, Slovak Republic; E-mail: marek.ratvaj@student.uvlf.sk

ÚRADNÁ KONTROLA SUROVÉHO MLIEKA A MLIEČNYCH VÝROBKOV V KONTEXTE POŽIADAVIEK NA ZDRAVIE ZVIERAT A ZDRAVIE ĽUDÍ

OFFICIAL CONTROL OF RAW MILK AND MILK PRODUCTS IN THE CONTEXT OF ANIMAL HEALTH AND HUMAN HEALTH REQUIREMENTS

Regecová Ivana, Kožárová Ivona, Výrostková Jana

Katedra hygieny, technológie a zdravotnej bezpečnosti potravín, Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, Komenského 73, 041 81 Košice, Slovenská republika

ABSTRACT

The latest nutritional trends point to the increasing consumption of raw milk and dairy products. Many people agree with the opinion that raw milk is more beneficial to health than heat-treated milk; it is more natural and tastier. However, raw milk is a suitable environment for the growth and reproduction of microorganisms, which is due to its high content of water and nutrients, and it spoils easily. At the same time, the consumption of dairy products represents a significant component of the food pyramid in our population. In addition to the positive aspects of the consumption of dairy products, however, from the point of view of microbiological contamination, they are also a possible risk factor for the consumer. Therefore, it is very important for these commodities to comply with the legislative requirements regarding the production process, handling and their placing on the market, which are anchored in Regulation (EU) 2017/625 of the European Parliament and of the Council and at the same time in Commission Implementing Regulation (EU) 2019/627 .

Key words: control, milk, milk product, risk

ÚVOD

Základná definícia úradnej kontroly je uvedená v nariadení (EÚ) č. 2017/625. Pod pojmom „úradná kontrola“ sa rozumie akákoľvek forma kontrolnej činnosti, ktorú vykonávajú príslušné orgány, delegované orgány alebo fyzické osoby. Pri vykonávaní úradných kontrol a nastavení frekvencie kontrol sa berú do úvahy identifikované riziká súvisiace so zvieratami, krmivami alebo potravinami, podnikmi v oblasti krmív a potravín, s akýmkoľvek procesom, materiálom, látkou, činnosťou alebo operáciou, ktorá môže ovplyvniť krmivovú a potravinovú bezpečnosť, zdravie zvierat alebo starostlivosť o zvieratá, minulosť prevádzkovateľov a spoľahlivosť všetkých vlastných kontrol, ktoré sa už uskutočnili (Kožárova et al., 2022). Pri úradných kontrolách jednotlivých komodít je však potrebné zohľadniť aj špecifické požiadavky

potravín. V prípade surového mlieka a mliečnych výrobkov je systém kontroly celosvetovo dobre prepracovaný, čo sa týka legislatívy, inštitúcií, systému, vzorkovania, metód a využívania výsledkov. Tie slúžia na posúdenie zdravotnej bezchybnosti daných potravín. Mikrobiologická kvalita je jednou z hlavných vlastností, ktorá sa pravidelne preveruje (Tomáška, 2003).

SÚČASNÝ STAV RIEŠENEJ PROBLEMATIKY

Nariadenie Európskeho Parlamentu a Rady (EÚ) 2017/625 pojednáva o overení dodržiavania pravidiel spoločnej organizácii trhov s poľnohospodárskymi výrobkami ako sú mlieko a mliečne výrobky. Toto nariadenie sa nemá uplatňovať na overovanie dodržiavania nariadenia Európskeho parlamentu a Rady (EÚ) č. 1308/ 2013, ktorým sa upravuje spoločná organizácia trhov s poľnohospodárskymi výrobkami, okrem prípadov, keď kontroly vykonávané v súvislosti s obchodnými normami podľa nariadenia Európskeho parlamentu a Rady (EÚ) č. 1306/2013 poukazujú na možné prípady podvodných alebo klamlivých praktík. Komisia prostredníctvom vykonávacích aktov stanovuje pravidlá týkajúce sa jednotných praktických opatrení pre vykonávanie úradných kontrol pokiaľ ide o špecifické požiadavky na vykonávanie úradných kontrol a jednotnú minimálnu frekvenciu týchto úradných kontrol surového mlieka a mliečnych výrobkov, keď je potrebná minimálna úroveň úradných kontrol s cieľom reagovať na známe jednotné nebezpečenstvá a riziká, ktoré môžu predstavovať uvedené výrobky a produkty.

Povinné poplatky alebo platby pri úradných kontrolách

Príslušné orgány vyberajú poplatky alebo platby za úradné kontroly vykonané v súvislosti s činnosťami uvedenými v kapitole I a II prílohy IV nariadenia (EÚ) č. 2017/625 v platnom znení (poplatky alebo platby za úradné kontroly výroby mlieka a za úradné kontroly ich produkty na hraničných kontrolných staniciach alebo na kontrolných miestach, a to buď na úrovni nákladov vypočítaných v súlade s jednou zo stanovených metód výpočtu alebo ich kombináciou, resp. vo výške povinných poplatkov a platieb stanovených v prílohe IV tohto nariadenia.

Príslušné orgány vyberajú poplatky alebo platby, aby sa im vrátili náklady, ktoré im vzniknú v súvislosti:

- s úradnými kontrolami komodít, ktoré podliehajú úradným kontrolám na hraničných kontrolných staniciach,
- s úradnými kontrolami vykonávanými na žiadosť prevádzkovateľa,
- s úradnými kontrolami, ktoré neboli pôvodne plánované a ktoré sa ukázali ako potrebné na základe toho, že počas vykonávania úradných kontrol v súlade s týmto nariadením sa zistilo, že daný prevádzkovateľ nedodržiava pravidlá.

Členské štáty môžu v súvislosti s výkonom úradných kontrol a iných úradných činností pri výrobe mlieka a ich uvádzaní na trh objektívnym a nediskriminačným spôsobom znížiť výšku poplatkov alebo platieb, pričom zohľadnia: a) záujmy prevádzkovateľov s nízkou výrobnou kapacitou, b) tradičné metódy výroby, spracovania a distribúcie, c) potreby prevádzkovateľov v oblastiach s osobitnými geografickými obmedzeniami a d) záznamy prevádzkovateľa z minulosti, pokiaľ ide o dodržiavanie príslušných pravidiel podľa zistení úradných kontrol.

Odber vzoriek pri výkone úradných kontrol surového mlieka a mliečnych výrobkov

Úradné kontroly na úrovni prvovýroby sa vykonávajú pri dojení a skladovaní mlieka (surové kravské mlieko, surové ovčie mlieko, surové kozie mlieko) na farme. Taktiež pri priamom predaji a dodávaní malého množstva prvotných produktov živočíšneho pôvodu t.j. surové mlieko. Úradné kontroly vykonávané na overenie dodržiavania pravidiel v súvislosti s požiadavkami na bezpečnosť produktov živočíšneho pôvodu určených na ľudskú spotrebu zahŕňajú aj úradné kontroly vykonávané v súvislosti s výrobou surového mlieka, mledziva, mliečnych výrobkov a výrobkov na báze mledziva (chov, zdravotný stav zvierat, testovanie mlieka a mledziva na kritériá bezpečnosti /dodržiavanie limitov/, overenie pasterizácie, rozhodnutia).

Odber vzoriek potravín živočíšneho pôvodu u výrobcov, v miestach určenia a v maloobchodných predajniach sa v súlade s nariadením (EÚ) č. 2017/625 vykonáva na základe rizika a s vhodnou frekvenciou. Odber vzoriek potravín živočíšneho pôvodu u výrobcov sa vykonáva na ukazovatele kvality, zloženie, falšovanie, klamlivé označovanie, konkrétne u mlieka a mliečnych výrobkov sa stanovuje: sušina, tuk v sušine, množstvo tuku, voda, beztuková sušina, dôkaz prítomnosti cudzích tukov v masle, syroch, obsah ovčieho syra v bryndzi.

Laboratórna analýza potravín živočíšneho pôvodu pri úradných kontrolách podľa vykonávacieho nariadenia (ES) č. 2019/627 sa vykonáva aj vo vzorkách surového mlieka (kravské, kozie, ovčie), a to: celkový počet mikroorganizmov, počet somatických buniek, rezíduá antimikrobiálnych látok a kontaminantov (bazénové vzorky). Vzorky sa odoberajú z bazénovej vzorky surového mlieka u prvovýrobcov na farme a u drobných chovateľoch, ktorí sú zaregistrovaní na dodávanie surového mlieka na ďalšie spracovanie alebo na priamy predaj surového mlieka konečným spotrebiteľom podľa nariadenia vlády Slovenskej republiky č. 360/2011 Z. z.

Označovanie mlieka a mliečnych výrobkov

Úradna kontrola sa zameriava aj na označovanie mlieka a mliečnych výrobkov uvádzaných na trh podľa nariadenia (EÚ) č. 1169/2011 v platnom znení. Okrem požiadaviek nariadenia

(EÚ) č. 1169/2011 v platnom znení musí byť na etikete výrobkov určených pre maloobchod jasne uvedené:

a) slová „surové mlieko“, ak ide o surové mlieko určené na priamu ľudskú spotrebu,
b) slová „vyrobené so surovým mliekom“, ak ide o výrobky vyrobené so surovým mliekom, ktorého výrobný proces nezahŕňa žiadne tepelné ošetrenie ani žiadne fyzikálne alebo chemické ošetrenie.

Pri identifikačnom označení mliečnych výrobkov môže identifikačná značka namiesto vyznačenia schvaľovacieho čísla prevádzkarne obsahovať odkaz na to, kde je na priamom obale alebo na druhom obale schvaľovacie číslo prevádzkarne vyznačené. V prípade návratných fliaš je možné uvádzať len iniciály krajiny odoslania a schvaľovacie číslo prevádzkarne.

ZÁVER

V populácií sa ľahko šíria názory týkajúce sa mlieka a mliečnych výrobkov a jeho vplyvu na zdravie. V rámci propagácie ich konzumácie mlieka je preto potrebné, aby boli bezpečné a bezchybné a spĺňali požiadavky potravinového práva. Potravinové právo znamená zákony, iné právne predpisy a správne opatrenia upravujúce potraviny a bezpečnosť potravín na európskej alebo národnej úrovni zahrňujúc všetky stupne výroby, spracúvania a distribúcie potravín vrátane krmív vyrábaných pre zvieratá určené na produkciu potravín. Členské štáty EÚ majú povinnosť monitorovať a overovať dodržiavanie a presadzovanie požiadaviek potravinového práva organizovaním úradných kontrol.

POĎAKOVANIE

Práca bola vykonaná vďaka finančnej podpore z grantovej úlohy KEGA 015UVLF-4/2021.

POUŽITÁ LITERATÚRA

1. KOŽÁROVÁ, I. Úradná kontrola potravín a produktov živočíšneho pôvodu. Košice: Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, 2017. p. 138. ISBN: 978-80-8077-551-3
2. NARIADENIE EURÓPSKEHO PARLAMENTU A RADY (EÚ) č. 1169/2011 z 25. októbra 2011 o poskytovaní informácií o potravinách spotrebiteľom, ktorým sa menia a dopĺňajú nariadenia Európskeho parlamentu a Rady (ES) č. 1924/2006 a (ES) č. 1925/2006 a ktorým sa zrušuje smernica Komisie 87/250/EHS, smernica Rady 90/496/EHS, smernica Komisie 1999/10/ES, smernica Európskeho parlamentu a Rady

2000/13/ES, smernice Komisie 2002/67/ES a 2008/5/ES a nariadenie Komisie (ES) č. 608/2004.

3. NARIADENIE EURÓPSKEHO PARLAMENTU A RADY (EÚ) č. 1308/2013 zo 17. decembra 2013, ktorým sa vytvára spoločná organizácia trhov s poľnohospodárskymi výrobkami, a ktorým sa zrušujú nariadenia Rady (EHS) č. 922/72, (EHS) č. 234/79, (ES) č. 1037/2001 a (ES) č. 1234/2007.
4. NARIADENIE EURÓPSKEHO PARLAMENTU A RADY (EÚ) 2017/625 z 15. marca 2017 o úradných kontrolách a iných úradných činnostiach vykonávaných na zabezpečenie uplatňovania potravinového a krmivového práva a pravidiel pre zdravie zvierat a dobré životné podmienky zvierat, pre zdravie rastlín a pre prípravky na ochranu rastlín.
5. NARIADENIE VLÁDY SLOVENSKEJ REPUBLIKY č. 360/2011 Z. z., ktorým sa ustanovujú hygienické požiadavky na priamy predaj a dodávanie malého množstva prvotných produktov rastlinného a živočíšneho pôvodu a dodávanie mlieka a mliečnych výrobkov konečnému spotrebiteľovi a iným maloobchodným prevadzkárniam. Zbierka zákonov č. 360/2011, čiastka 116, 3064–3072.
6. TOMÁŠKA, M. Perspektívy merania mikrobiologickej kvality surového mlieka laserovou prietokovou cytometriou. In *Bulletin potravinárskeho výskumu* vol. 42, 2003, n. 1−2, p. 53−65.
7. VYKONÁVACIE NARIADENIE KOMISIE (EÚ) 2019/627 z 15. marca 2019, ktorým sa stanovujú jednotné praktické opatrenia na vykonávanie úradných kontrol produktov živočíšneho pôvodu určených na ľudskú spotrebu v súlade s nariadením Európskeho parlamentu a Rady (EÚ) 2017/625 a ktorým sa mení nariadenie Komisie (ES) č. 2074/2005, pokiaľ ide o úradné kontroly.

Kontaktná adresa: Regecová Ivana, Department of Food Hygiene, Technology and Safety, University of Veterinary Medicine and Pharmacy in Košice, Komenského 73, 041 81 Košice, Slovak Republic; E-mail: ivana.regecova@uvlf.sk

PRÍTOMNOSŤ KVASINIEK RODU *PICHIA* V PROCESE FERMENTÁCIE VÍNA

THE PRESENCE OF YEAST OF THE GENUS PICHIA IN THE PROCESS OF WINE FERMENTATION

Regecová Ivana, Semjon Boris, Výrostková Jana, Marcinčák Slavomír, Jevinová Pavlina, Pipová Monika

Katedra hygieny, technológie a zdravotnej bezpečnosti potravín, Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, Komenského 73, 041 81 Košice, Slovenská republika

ABSTRACT

This study focuses on the detection of yeast *Pichia* sp. in soil samples, grape leaves and berries and samples taken from fermenting must and young wine (the variety Tramín červený) during the fermentation process. In the examined samples, the number of yeasts and moulds (from 3.8 to 6.8 log cfu/g or ml). Species of *Pichia* genus were identified by MALDI-TOF MS and ITS-PCR-RFLP. The study confirmed the presence of the yeasts *Pichia kudriavzevii, Pichia kluyveri, Pichia fermentas*. The study confirmed the reduction of the species diversity of the *Pichia* genus during the must fermentation process and young wine of the variety Tramín červený.

Key words: ITS-PCR-RFLP, MALDI-TOF MS, must, *Pichia* sp., yeast

INTRODUCTION

Indigenous non-*Saccharomyces* yeasts are present in grape musts in greater numbers than *Saccharomyces cerevisiae*, the yeast that dominates wine fermentation when the ethanol content gets over 4%. That is why must fermentation is not naturally a single species process. Grapes contain diverse yeast species that will define the final fermented product (Belda et al., 2016). Currently, science is clarifying the role they perform, and several non-*Saccharomyces* yeasts are considered to have a positive role in the wine industry (Ciani et al., 2010; Jolly et al, 2014; Petruzzi t al., 2017). Different *Pichia* species that have been found in must fermentations and are considered to be wine-related are included in the non-*Saccharomyces* group: *P. fermentans, P. membranifaciens, P. occidentalis, P. terricola, P. manshurica, P. kudriavzevii,* and *P. kluyveri*. The frequency of isolation of *Pichia* species from grapes is lower than that of *S. cerevisiae* (28%) and other non-*Saccharomyces* such as *Hanseniaspora uvarum* (44%). The frequency varies from 0.12% for *P. occidentalis* up to 4.7% for *P. anomala*. Other reported *Pichia* species usually isolated from grapes are *P. manshurica* (2.81%), *P. menbranifaciens*

(0.98%), and *P. kudriavzevii* (0.85%) (Puig-Pujol et al., 2016). Those lower frequencies justify the lack of commercial strains compared to other species, making it difficult to make a proper selection.

MATERIAL AND METHODOLOGY

The examined samples were taken from the soil, berries, vine leaves and from Tramín červený must. Samples were taken from the Eastern Slovak wine-growing region, the Sobranecký region and in the wine-growing village of Orechová. Samples were taken in September 2021. The must sample with a sugar content of 21.5 °Brix was filled into a 100 liter stainless steel container. Subsequently, it was spontaneously fermented and samples were taken from the fermenting must on days 0., 2., 4., 6., 8. and after 4 weeks of fermentation for analysis of the presence of biogenic amines and microbiota of the fermenting must and young wine.

Determination of the number of yeasts

A stock suspension and further 10-fold dilutions were prepared from sterile 1 mL samples according to the instructions of the ISO standard 6887-1 (2017). From the prepared dilutions a microbiological culture examination of the samples was subsequently performed.

The quantitative determination was performed according to the ISO standard 21527-1 (2010). The first three decimal dilutions inoculated in a volume of 0.1 mL on the surface of Dichloran Rose-Bengal Chloramphenicol (DRBC) agar (Hi-Media, India) containing Peptone, Dextrose (Glucose), Potassium dihydrogen phosphate, Magnesium sulphate, Rose Bengal, Chloramphenicol, Dichloran, Agar, Final pH 5.6±0.2. The plates were then incubated at 25 °C for five (for yeast) or 8–10 days (for moulds). After incubation, only inoculated petri dishes containing a colony count of less than 150 were selected for quantification. Subsequently, five colonies from the group with the same phenotypic characteristics were isolated from the surface of the agar medium and used for further analysis.

Identification of yeasts and moulds

Yeasts and moulds species identification was first performed by MALDI-TOF mass spectrometry (MS) by comparison of the PMF of unknown organism with the PMFs in the database according to the standard Bruker Daltonics (2008) sample preparation protocol using formic acid and acetonitrile. The results were analysed by an Ultra-flex III instrument (Bruker, Billerica, Massachusetts, USA) using Flex Analysis software (version 3.0) and evaluated using BioTyper software (version 1.1) (Bruker, Billerica, MA, USA). After evaluation, species identification was performed using the following methods.

The total genomic DNA of the tested isolates was isolated by a modified method according to Regecova et al. (2019) using zirconium and glass beads, Proteinase K (Macherey-Nagel GmbH & Co., Germany), ultrasonic waves and the commercially available E.Z.N.A.® Fungal DNA Mini Kit (OMEGA bio-tek, USA). DNA purity and concentration were measured using a BioSpec spectrophotometer (SHIMADZU, Austria).

The rRNA region of the gene was amplified in a Thermal Cycler (Techne, Cambridge, UK). The primers used in the PCR reaction to amplify the ITS region (ITS1 and ITS4) were synthesized and used according to White et al. (1990). The PCR reaction proceeded as follows: initial denaturation at 95 °C/5 minutes followed by 30 cycles of denaturation at 95 °C for 1 minute; annealing at 53 °C/2 minutes and extension at 72 °C/2 minutes; final extension performed at 72 °C for 10 minutes. The obtained PCR products were digested by restriction endonucleases *Mse*I, *Hha*I, *Hae*III and *Hinf*I (New England BioLabs®inc., USA). PCR products and restriction fragments were visualized via UV translumination used by Mini Bis Pro® (DNR Bio-Imaging Systems Ltd., Israel). Products with concentrations less than 40 ng did not appear on the electropherogram. The sizes of the individual fragments were detected using the GelAnalyzer 19.1 program. (version 14.0.0.0; Oracle Corporation, California). The restriction profiles of the yeast reference strains (*Pichia kluyveri* ATCC 9768 ™, *Pichia fermentas* ATCC 204298™) were used to verify the correct yeast species whereby identification took place via the ITS-PCR-RFLP method.

Identification by ITS-PCR-RFLP using endonucleases *Mse*I, *Hha*I, *Hae*III and *Hinf*I was not sufficiently differentiated. Therefore, the identification of moulds were performed using the conventional PCR method according to White et al. (1990) and subsequent sequencing of the obtained PCR fragments was performed by a commercial company (SEQme s.r.o., Dobříš, Czech Republic). The obtained isolates were sent to the GenBank — EMBL database for comparison with the sequences available in the nucleotide database of the National Center for Biotechnology Information (NCBI) available at http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST (accessed on 10 April 2022).

RESULTS AND DISCUSSION

Quantification of yeasts were monitored during the microbiological examination of the samples soil, leaf, berries and must. The number of yeasts in each sample (soil, leaf, berries) ranged from 3.8 ± 0.1 to 5.3 ± 0.1 log cfu/g. Higher numbers of yeasts were found in the soil sample at 5.3 ± 0.1 log cfu/g followed by samples of vine leaves with a representation of 5.0 ± 0.1 log cfu/g. Samples were taken from the must before fermentation (day 0) and on days 2, 4, 6, 8 and after 4 weeks of fermentation. The number of yeasts and moulds in sample of must

ranged from 4.5 ± 0.1 to 6.9 ± 0.1 log cfu/ml. During the fermentation of the must, the numbers increased.

After quantitative microbiological culture examination of the samples, a more detailed detection of *Pichia* was performed. Initial identification was performed by MALDI-TOF mass spectrometry. This identification represented a rapid initial screening of the investigated mycobiota. As shown in Table 1, this method identified individual yeast species where the scores of the identified isolates ranged from 1.789 to 2.330. For some isolates, the score was below 1.700 indicating unreliable identification. As some results of yeast isolate identification were not reliable or not identified according to the obtained score, isolate identification was performed using the ITS-PCR-RFLP method.

Table 1, Identified *Pichia* species from examined soil samples, leaves, berries, must and new wine.

Species	MALDI TOF MS (score value)	ITS-PCR-RFLP
Pichia kluyveri	+ (1.870 - 2.016)	+
Pichia fermentas	+ (1.789 - 2.101)	+
Pichia kudriavzevii	+ (1.984 - 2.104)	+

For exactly species identification, ITS-PCR-RFLP was performed using endonucleases *Hae*III, *Hinf*I, *Mse*I, *Hha*I. The individual sizes of the PCR products and restriction fragments are listed in Table 2. Three species of *Pichia* were identified: *Pichia kluyveri, Pichia fermentas, Pichia kudriavzevii*.

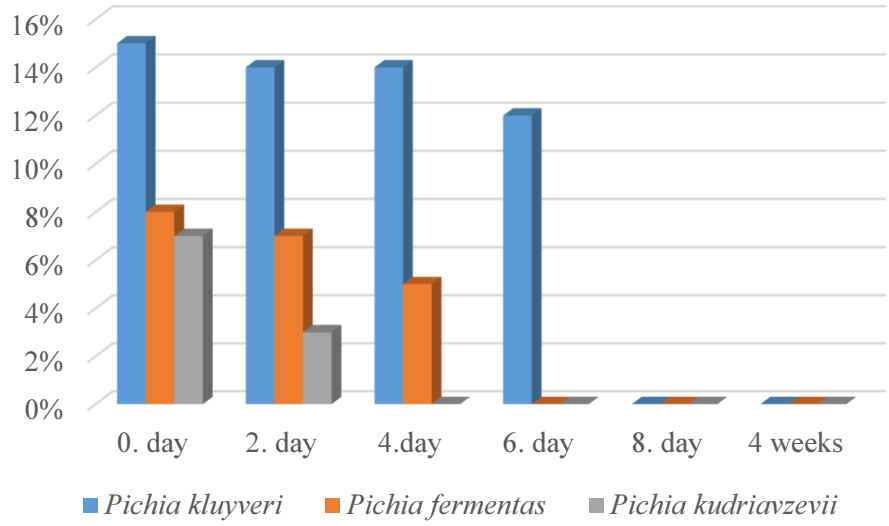
Table 2, PCR products and restriction patterns of *Pichia* sp. (bp)

Yeast species	PCR product	RFLP-ITS-PCR			
	bp	***Hae*III**	***Hinf*I**	***Mse*I**	***Hha*I**
Pichia kluyveri	470	375; 85	250;220	271;95;	141;98;69
Pichia fermentas	470	340;85	260;210	150; 120	170; 110; 80
Pichia kudriavzevii	470	361;71;31	198;137;135	466	185;158;69

Percentages of individual yeast species after prior identification were recalculated retrospectively based on phenotypic expression and colony growth on inoculated plates (Figure 1). In the soil and the berries, the most represented *Pichia kluyveri* 5%. In the leaf, it was *Pichia*

kudriavzevii (3%). *Pichia* yeasts were present in must samples up to day 6 of the fermentation process. *Pichia kluyveri* was predominant in all samples of must. The presence of yeasts of the genus *Pichia* was not confirmed in the young wine.

Figure 1, Percentages of individual *Pichia* species



The last *Pichia* sp. revision described 20 accepted species (Kurtzman et al., 2011); only a few of them are considered positive in winemaking. *Pichia kluyveri, Pichia fermentas* and *Pichia kudriavzevii* are among them. *P. kluyveri* is interested mainly due to its contribution to wine aroma, glycerol, ethanol yield, and killer factor (Vicente et al., 2021). *P. kudriavzevii*, the anamorph of *Candida krusei*, is widely distributed in natural substrates such us soil, fruits, and spontaneous fermentations (Ciani et al., 2020). It is an interesting tool for wine pH management, since it can significantly reduce malic acid (40%) during alcoholic fermentation of wine and increase the pH by around 0.3 units (Del Monaco et al., 2014; Del Monaco et al., 2016). Another use of this species is to reduce the ethanol content of wines (by around 30%) (Contreras et al., 2015; Ciani et al., 2020). *P. fermentans* has been described as a moderate ethanol producer, reaching values of around 5% (v/v) and producing huge quantities of polysaccharides (up to 278 mg/ml, around 40%) and ethyl acetate (up to 256 mg/ml, almost 6 times higher) compared to *S. cerevisiae* control (Domizio et al., 2017).

CONCLUSION

The study confirmed the presence of *Pichia* sp. in the Tramín červený variety, originally from the wine-growing region of Eastern Slovakia. *Pichia* sp. improves the quality parameters of wine, especially during early fermentation. Due to the potential of *Pichi*a as a genus, it is

appropriate to continue to investigate its impact on wine production and to create available new commercial strains in winemaking in near future.

ACKNOWLEDGMENT

This work was supported by the Science Grant Agency of the Ministry of Education, Science, Research and Sport of the Slovak Republic and Slovak Academy of Sciences under the project VEGA 1/0156/21.

REFERENCES

1. BELDA, I., et al. Unraveling the enzymatic basis of wine "flavorome": a phylo-functional study of wine related yeast species. In *Frontiers in Microbiology*, 2016, vol. 7: p. 12.
2. BRUKER DALTONICS, MALDI Biotyper 2.0. (2008). Software for microorganism identification and classification user manual. United Kingdom.
3. CIANI, M., et al. Footprint of nonconventional yeasts and their contribution in alcoholic fermentations. In *Biotechnological progress and beverage consumption*. Academic Press, 2020. p. 435-465.
4. CIANI, Maurizio, et al. Controlled mixed culture fermentation: a new perspective on the use of non-*Saccharomyces* yeasts in winemaking. *FEMS yeast research*, 2010, 10.2: 123-133..
5. CONTRERAS, A., et al. The application of non-*Saccharomyces* yeast in fermentations with limited aeration as a strategy for the production of wine with reduced alcohol content. *International journal of food microbiology*, 2015, 205: 7-15.
6. DEL MONACO, Silvana Maria, et al. Selection and characterization of a Patagonian *Pichia kudriavzevii* for wine deacidification. *Journal of applied microbiology*, 2014, 117.2: 451-464.
7. DEL MÓNACO, Silvana M.; RODRIGUEZ, Maria E.; LOPES, Christian A. *Pichia kudriavzevii* as a representative yeast of North Patagonian winemaking terroir. *International journal of food microbiology*, 2016, 230: 31-39.
8. DOMIZIO, P., et al. Cell wall polysaccharides released during the alcoholic fermentation by *Schizosaccharomyces* pombe and *S. japonicus*: Quantification and characterization. *Food Microbiology*, 2017, 61: 136-149.
9. ISO 6887-1: 2017. Microbiology of the food chain - Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination - Part 1: General rules for the preparation of the initial suspension and decimal dilutions.

10. ISO 21527: 2010 Microbiology of food and animal feeding stuffs. Horizontal method for the enumeration of yeasts and moulds.
11. JOLLY, Neil P.; VARELA, Cristian; PRETORIUS, Isak S. Not your ordinary yeast: non-*Saccharomyces* yeasts in wine production uncovered. *FEMS yeast research*, 2014, 14.2: 215-237.
12. PETRUZZI, Leonardo, et al. Microbial resources and enological significance: Opportunities and benefits. *Frontiers in microbiology*, 2017, 8: 995.
13. PUIG-PUJOL, Anna, et al. Yeast biodiversity from *Vitis vinifera L., subsp. sylvestris* (Gmelin) Hegi to face up the oenological consequences of climate change. In: *BIO Web of Conferences*. EDP Sciences, 2016. p. 02026.
14. REGECOVÁ, Ivana, et al. Detection of microbiota in the vineyards of the tokaj wine region. *Potravinarstvo*, 2019, 13.1.
15. VICENTE, Javier, et al. High potential of Pichia kluyveri and other Pichia species in wine technology. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22.3: 1196.
16. WHITE, Thomas J., et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR protocols: a guide to methods and applications*, 1990, 18.1: 315-322

Contact adress: Regecová Ivana, DVM., PhD., Department of Hygiene, Technology and Food Safety, University of Veterinary Medicine and Pharmacy in Košice, Komenského 73, 041 81 Košice, Slovak Republic; E-mail: ivana.regecova@uvlf.sk

HODNOTENIE ANTIOXIDAČNEJ AKTIVITY A OXIDAČNEJ STABILITY SYROV GOUDA

EVALUATION OF THE ANTIOXIDANT ACTIVITY AND OXIDATIVE STABILITY OF GOUDA CHEESES

Reitznerová Anna, Semjon Boris, Lýdia Mesarčová, Makiš Andrej, Smetanková Annamária, Marcinčák Slavomír

Katedra hygieny, technológie a zdravotnej bezpečnosti potravín

Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, Komenského 73, 041 81 Košice, Slovenská republika

ABSTRACT

The aim of this work was to evaluate the effect of ripening time of Gouda cheese on antioxidant activity using a modified spectrophotometric method based on the ability of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging by antioxidants naturally present in the cheese and the oxidative stability of the cheese based on the amount of malondialdehyde (MDA), as the main lipid oxidation product. The analysis showed sufficient antioxidant activity of Gouda cheeses at different stages of maturity ($p < 0,001$) and the effect of maturation time on oxidative stability ($p < 0,001$).

Key words: chesse, malondialdehyde, antioxidant, storage

ÚVOD

Syr Gouda je celosvetovo známy a obľúbený syr holandského typu s charakteristickými vlastnosťami (chuť, farba, konzistencia a štruktúra), ktoré sú ovplyvnené dobou zrenia syra (Michelson, 2012). Dobra zrenia sa pohybuje od 1 do 20 mesiacov (Jo et al., 2018). Väčšina syrov Gouda zreje 1 až 6 mesiacov, kým mladá Gouda (zrejúca 1 až 2 mesiace) je jemná, elastická a svetložltá, stará Gouda (zrejúca 8 mesiacov) je drobivá, tuhšia a tmavožltá (Teubner, 2003).

Z výživového hľadiska je syr bohatým zdrojom základných živín, ako sú bielkoviny (4 - 40 %), vitamíny, minerálne látky a tiež mastné kyseliny s krátkym reťazcom, ktoré sú dôležité ako súčasť zdravej výživy. Syrové bielkoviny sú takmer 100% stráviteľné, pretože vo fáze zrenia syra sa kazeín postupne rozkladá na veľké množstvo peptidov rozpustných vo vode a voľných aminokyselín pomocou proteáz a peptidáz z mlieka, syridla a sekundárnej mikrobiálnej flóry (López-Expósito, 2012). Medzi týmito peptidmi bolo zistených množstvo

bioaktívnych peptidov, ktoré sa môžu vyznačovať hypertenznou, antioxidačnou, antimikrobiálnou a imunomodulačnou aktivitou (Tidona et al., 2009). Časť antioxidačných peptidov pochádza zo samotného mlieka, kde sa uvoľňujú pri miernom tepelnom opracovaní, ale väčšina vzniká práve pri výrobe syra formovaním pri hydrolýze a počas dozrievania. Antioxidačné peptidy sú odvodené od kazeínov v dôsledku pôsobenia peptidáz uvoľnených zo štartovacích aj neštartovacích kultúr. Okrem kazeínov vykazujú antioxidačnú aktivitu aj srvátkové proteíny a ich proteolytické produkty (Barac et al., 2016).

Cieľom experimentu bolo hodnotiť antioxidačnú aktivitu a oxidačnú stabilitu syrov Gouda zakúpených v rôznom stupni zrelosti.

MATERIÁL A METODIKA

V experimente boli analyzované vzorky syra Gouda. Vzorky syra (6 ks) sa líšili stupňom zrelosti, ktorá bola 2, 3, 5, 8 a 15 -mesačná. Jednotlivé vzorky syra boli vyšetrené za účelom zistenia antioxidačnej aktivity a oxidačnej stability v závislosti od doby zrenia syra. Antioxidačná aktivita bola meraná modifikovanou spektrofotometrickou metódou podľa Brand-Williams et al. (1995), ktorá je založená na schopnosti vychytávania 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radikálu antioxidantami. Oxidačná stabilita ako miera oxidácie tukov bola vyjadrená ako množstvo malóndialdehydu (MDA), ktoré reaguje s 2-tiobarbiturovou kyselinou za vzniku farebných zmien, ktoré boli merané spektrofotometricky pri vlnovej dĺžke 532 nm (Marcinčák et al., 2006).

Štatistická analýza bola vykonaná v štatistickom programe Graph Pad Prism 9.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Výsledky boli vyjadrené ako priemery a smerodajná odchýlka (SD) troch meraní. Pre štatistické vyhodnotenie dosiahnutých výsledkov bola použitá štatistická metóda jednocestnej analýzy rozptylov hodnôt a Tukeyho test pre viacnásobné porovnávanie priemerov. Za štatisticky významnú hladinu významnosti bola zvolená hodnota $p < 0,05$.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Proteolýza spôsobuje zmeny v proteínovom profile syra a má vplyv na antioxidačné vlastnosti syra. Pričom vo vode rozpustná bielkovinová frakcia má trikrát vyššiu antioxidačnú kapacitu ako vo vode nerozpustná frakcia (Barac et al., 2016). Princípom testu antioxidačnej aktivity je založený na vychytávaní ·DPPH radikálu (Sharma, Bhat, 2009). Použitie ·DPPH poskytuje jednoduchý a rýchly spôsob hodnotenia antiradikálovej aktivity antioxidantov (Brand-Williams et al., 1995).

Úroveň antioxidačnej aktivity vzoriek syrov Gouda v rôznom stupni zrelosti zobrazuje tabuľka 1. Percento inhibície radikálu ·DPPH sa pohybovalo v rozmedzí 9,08 – 17,81%. Najvyššia antioxidačná aktivita bola nameraná v mladom syre s dobou zrenia 2 mesiace. Vo vzorkách syrov s dlhšou dobou zrenia (3 – 8 mesiacov) sa percento inhibície radikálu ·DPPH ustálilo a až pri 15 mesiacoch zrenia bol pozorovaní pokles ($p < 0,001$).

Tabuľka 3, Úroveň antioxidačnej aktivity syrov Gouda v rôznom stupni zrelosti, vyjadrená ako percento inhibície radikálu ·DPPH

Doba zrenia	*% DPPH*
2 mesiace	$17,81 \pm 0,72^{a}$
3 mesiace	$11,10 \pm 0,69^{b}$
5 mesiacov	$10,75 \pm 0,40^{b}$
8 mesiacov	$11,45 \pm 0,99^{b}$
15 mesiacov	$9,08 \pm 0,70^{c}$
p - hodnota	$< 0,001$

V tabuľke 2 sú uvedené hodnoty MDA ako hlavného oxidačného produktu lipidov syrov Gouda v rôznom stupni zrelosti. Hodnota MDA v syre bola najnižšia ($0,228 \pm 0,01$ mg·kg^{-1}) vo vzorke syra s krátkou dobou zrenia, kedy úroveň antioxidačnej aktivity bola najvyššia ($17,81 \pm 0,72\%$). Množstvo MDA so stupňom zrelosti (v 3, 5 a 8 mesiaci) koreluje s priebehom zmien antioxidačnej aktivity syru Gouda. Priemerná hodnota MDA vo vzorkách syra od 3 do 15 mesiaca zrelosti bola $0,337 \pm 0,04$ mg·kg^{-1}. Oxidácia lipidov je dôležitým problémom kvality spracovaných mliečnych výrobkov, najmä počas skladovania, ktorá môže spôsobovať zmenu vzhľadu, textúry, vône ako aj zdraviu škodlivých látok (Kristen a Skibsted, 1999). McSweeney a Sousa (2000) uvádzajú vo svojej prehľadovej práci, že oxidácia lipidov v syroch sa nevyskytuje vo významnej miere, pravdepodobne z dôvodu ich nízkeho redoxného potenciálu a prítomnosti prírodných antioxidantov, napr. vitamínu E alebo α-tokoferolu, najrozšírenejšieho lipofilného mliečneho antioxidantu (Erickson et al., 1964). Naše výsledky poukazujú, že vo vzorkách syra Gouda v rôznom stupni zrelosti taktiež nedochádza k lipidovej oxidácií vo veľkej miere, podobne ako aj v iných druhov syra (Ioannidou et al., 2022; Delgado et al., 2009; Collins et al., 2003).

Tabuľka 4, Oxidačná stabilita syrov Gouda v rôznom stupni zrelosti, vyjadrená ako množstvo mg MDA na kg vzorky

Doba zrenia	*MDA [mg·kg^{-1}]*
2 mesiace	0,228 ± 0,01^{b}
3 mesiace	0,338 ± 0,01^{a}
5 mesiacov	0,334 ± 0,01^{a}
8 mesiacov	0,340 ± 0,07^{a}
15 mesiacov	0,338 ± 0,05^{a}
p - hodnota	< 0,001

ZÁVER

Gouda je polotvrdý syr s typickými vlastnosti, ktoré sú ovplyvnené stupňom zrelosti. Počas zrenia sa vytvárajú peptidy s antioxidačnými vlastnosťami, čo umožňuje uchovávať tento syr dlhodobo pri správnych podmienkach skladovania. Analýza jednotlivých vzoriek syra Gouda o rôznej zrelosti preukázala, že ich antioxidačná aktivita a oxidačná stabilita je vyrovnaná .

POUŽITÁ LITERATÚRA

1. Barac, M., Pesic, M., Zilic , S., Smiljanic, M., Stanojevic, S., Despotovic, S., Vucic, T., Kostic, A. Protein profiles and total antioxidant capacity od water-soluble and water-insoluble fractions of white brined goat cheese at different stages of ripening. In *International Journal of Food Science & Technology*. eISSN 1365-2621, 2016, vol. 51, no. 5, p. 1140-1149.
2. Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E. and Berset, C.L.W.T. (1995) Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. LWT-Food Science and Technology, 28, 25-30.
3. Collins, Y.F., McSweeney, P.L.H. & Wilkinson, M.G. (2003). Lipolysis and free fatty acid catyabolism in cheese: a review of current knowledge. International Dairy Journal, 13, 841–866
4. Delgado, F. J., González-Crespo, J., Ladero, L., Cava, R., Ramírez, R. Free fatty acids and oxidative changes of a Spanish soft cheese (PDO 'Torta del Casar') during ripening. International Journal of Food Science and Technology. 2009.44, 1721-1728.
5. Erickson, D.R., Dunkley, W.L. & Smith, L.M. (1964). Tocopherol distribution in milk fractions and its relation to antioxidant activity. Journal of Food Science, 29, 269–275.

6. Ioannidou, M.D.; Maggira, M.; Samouris, G. Physicochemical Characteristics, Fatty Acids Profile and Lipid Oxidation during Ripening of Graviera Cheese Produced with Raw and Pasteurized Milk. Foods 2022, 11, 2138.
7. Jo, Y., Benoist, D. M., Ameerally, A., Drake, M. A. Sensory and chemical properties of Gouda chesse. American Dairy Science Association, 2018. 101, 1967-1989.
8. Kristensen, D. & Skibsted, LH. (1999). Comparison of three methods based on electron spin resonance spectrometry for evaluation of oxidative stability of processed cheese. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 47, 3099–3104.
9. López-Expósito, I., Amigo, L., Recio, I. A mini-review on health and nutritional aspects of cheese with a focus on bioactive peptides. *Dairy Sci. & Technol.* **92**, 419–438 (2012).
10. Marcinčák, S. Sokol, J., Turek P., Popelka, P., Nagy, J.: Stanovenie malóndialdehydu v bravčovom mäse s použitím extrakcie na tuhej fáze a HPLC. In *Chemické listy*. ISSN 1213-7103, 2006, vol. 100, p. 528-532.
11. McSweeney, P.L.H. & Sousa, M.J. (2000). Biochemical pathways for the production of flavour compounds in cheeses during ripening: a review. Le Lait, 80, 293–324.
12. Michelson, P. *Syr, najlepšie remeselne vyrábané syry sveta, chuť, tradícia a terroir*. Bratislava: Svojka & Co., s.r.o., 2012. 304 s. ISBN 978-80-8107-528-5.
13. Sharma, O. P., Bhat T. K. DPPH antioxidant assay revisited. In *Food Chemistry*.ISSN 1873-7072, 2009, vol. 113, no. 4, p. 1202-1205.
14. Sharma, O. P., Bhat, T. K. DPPH antioxidant assay revisited. Food Chemistry, 113, 4, 2009, 1202-1205.
15. Teubner, Ch. Syry, veľká encyklopédia. 1. vyd. Bratislava: Trio publishing, 2003. 253 s. ISBN 80-968705-1-3.
16. Tidona F, Criscione A, Guastella AM, Zuccaro A, Bordonaro S, Marletta D (2009) Bioactive peptides in dairy products. Ital J Anim Sci 8:315–340.

Kontaktná adresa: MVDr. Anna Reitznerová, PhD., Katedra hygieny, technológie a zdravotnej bezpečnosti potravín, Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, Komenského 73, 041 81 Košice, Slovenská republika, E-mail: anna.reitznerova@uvlf.sk

ANALÝZA BAKTÉRIÍ MLIEČNEHO KVASENIA IZOLOVANÝCH ZO SRVÁTKY

ANALYSIS OF LACTIC ACID BACTERIA IZOLATED FROM WHEY

Rešková Zuzana, Koreňová Janka, Andrezál Michal

Odbor mikrobiológie, molekulárnej biológie a biotechnológií, Výskumný ústav potravinársky, Priemyselná 4, 824 75 Bratislava, Slovenská republika

ABSTRACT

In addition to beneficial effects on human health, fermented milk products also bring pleasure when consuming them in the form of a new taste or smell. The organoleptic properties of these products are related to the presence of lactic acid bacteria (LAB) and their proteolytic system, which supplies cells with essential amino acids during their growth in milk. Cells can metabolize amino acids into various aromatic substances. We followed up on previous experiments in which we obtained 194 lactic acid bacteria isolates from whey to isolate strains suitable for starter cultures. By sequencing the 16S rDNA gene, we assigned 56 isolates to several species of lactobacilli. In the case of four isolates, we monitored their proteolytic activity using microbiological and molecular-biological methods. By whole-genome sequencing, we confirmed the presence of genes encoding proteases involved in the hydrolysis of milk proteins. The presence of cell envelope proteinases, which degrade milk proteins into oligopeptides, is characteristic of strains in starter cultures. We identified a gene for such a serine peptidase in *Lentilactobacillus parabuchneri* and *Lacticaseibacillus casei* strains. These strains, after further analysis, could be suitable as starter cultures for the preparation of traditional Slovak fermented products such as sheep lump cheese.

ÚVOD

Baktérie mliečneho kvasenia (BMK) zohrávajú dôležitú úlohu vo výrobe fermentovaných mliečnych výrobkov. Pri fermentácii mlieka sa pôsobením proteolytických enzýmov podieľajú na produkcii aróma-aktívnych látok ako sú aldehydy, estery alebo alkoholy (Shi a kol., 2023). Proteolytický systém BMK pozostáva z troch hlavných zložiek: proteinázy bunkového obalu, peptidové transportéry a vnútrobunkové peptidázy. Pre prípravu štartovacích kultúr sú vhodné kmene laktobacilov, ktoré pomocou proteináz Prt degradujú kazeín na oligopeptidy (Savijoki a kol., 2006). Cieľom našej práce bolo hľadať a izolovať kmene rodu *Lactobacillus* na prípravu prídavnej kultúry pre výrobu ovčieho hrudkového syra s tradičnými organoleptickými vlastnosťami.

MATERIÁL A METODIKA

Na **kultiváciu LAB** sme použili dostupné selektívne médium MRS agar (*Lactobacillus* Agar according to De Man, Rogosa and Sharpe) pri 37 °C počas 72 h za anaeróbnych podmienok.

Proteázovú aktivitu LAB sme pozorovali na mliečnom agare.

Na **izoláciu genomickej DNA** sme použili súpravu Bacterial Genomic DNA isolation kit (Canvax) postupom podľa priloženého návodu.

Na **16S rDNA sekvenovanie** sme použili produkty s PCR amplifikácie z DNA izolátov s primérmi 27F a 1062R s výslednou koncentráciou 250 nM a 1U KAPA Taq HotStart polymerázy (Roche), v reakčných podmienkach: 95 °C 3 min; 35 cyklov (95 °C 30 s; 54 °C 30 s, 72 °C 1 min), 72 °C 7 min.

Detekciu proteázových génov sme uskutočnili pomocou PCR reakcií s primérmi (tab. 1) s výslednou koncentráciou 300 nM a 1U KAPA Taq HotStart polymerázy (Roche), v reakčných podmienkach: 95 °C 2 min; 35 cyklov (95 °C 30 s; 55 °C alebo 60 °C 30 s, 72 °C 1 min), 72 °C 7 min (Čaplová a kol., 2018).

Tabuľka č. 1, Priméry použité na detekciu proteázových génov

Cieľový gén	Primér	Sekvencia 5'-3'	Anelačná teplota
prtP	AF	TTA YCC CAG CAA YTG GCG GC	60 °C
	AR	GCC TGA K CTT TCT TCG TCA ACG	
	BF	GTC TTG CCR CCA TCA GYA CT	60 °C
	BR	CTA TGA CCC TAA GAC CGG GAT TGC	
bcaT	AF	CCA ACW GGT GAM AAA ACS GCA GC	55 °C
	AR	AGA ATC TWT GCM ACT CCW GTT GG	
	BF	TGG AAA GAY GGS GCW TGG	55 °C
	BR	GCT GAM CCM ACT TCT TCA AT	
pepX	AF	CAY GGB TTA AAY GAC TGG AA	55 °C
	AR	GTG RSC YTT RGT AAT CA	
	BF	AAY GAT TAY TTT CTS GCS CG	55 °C
	BR	AGC CAM ARR TTC ATC ATY TC	
pepN	AF	GTA TTC CAT CAT GTT RGC	60 °C
	AR	GCY TTT GCC TTT GGT GA	

Celogenómové sekvenovanie DNA izolátov sme uskutočnili na platforme Miseq (Illumina). V získaných celogenómových sekvenciách sme detegovali proteázové gény pomocou bakteriálneho bioinformatického centra PATRIC (https://www.bv-brc.org) a pomocou databáz „Basic Local Alignment Search Tool“ - BLAST (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) a InterPro (Paysan-Lafosse a kol., 2022).

VÝSLEDKY A DISKUSIA

V predchádzajúcej práci sme získali zo vzoriek srvátky 56 izolátov LAB, z ktorých sme sekvenovaním úseku 16S rDNA identifikovali druhy: *Lactobacillus helveticus, L. delbruckii, L. delbruckii subsp. lactis, L. gasseri, Lacticaseibacillus casei/paracasei, Levilactobacillus brevis, L. parabuchneri, Lactiplantibacillus plantarum, Limosilactobacillus fermentum, Lentilactobaclilus diolivorans* a *L. parabuchneri.* Proteolytický aparát LAB sme detegovali v štyroch izolátoch P5, P21, P22 a P23 pomocou kultivácie na mliečnom agare, PCR detekciou proteázových génov a celogenómovým sekvenovaním. Na mliečnom agare sme pozorovali najväčšiu proteolytickú aktivitu u izolátov *Levilactobacillus brevis* (P5) a *Lacticaseibacillus casei* (P23). Proteázové gény sme pomocou PCR detegovali u všetkých štyroch izolátov v rôznom zastúpení (tab. 2). Pre štartovacie kultúry sú dôležité gény kódujúce sekretované proteinázy *prt* (Liu a kol., 2010). V druhoch *Lentilactobacillus parabuchneri* (P21, P22) a *Lacticaseibacillus casei* (P23) sme detegovali gén *prtP*. Celogenómovým sekvenovaním sme potvrdili prítomnosť S8 serínovej proteázy so signálnou sekrečnou sekvenciou v izolátoch P21, P22 a P23. Nami získané výsledky smerujú k príprave špecifických štartovacích kultúr na výrobu slovenských fermentovaných výrobkov s tradičnými organoleptickými vlastnosťami.

Tabuľka č. 2, Detekcia proteázových génov v izolátoch LAB

Izolát / Cieľový gén		P5 *L. brevis*	P21 *L. parabuchneri*	P22 *L. parabuchneri*	P23 *L casei*
prtP	A	-	+	-	-
	B	-	+	+	+
bcaT	A	-	-	-	-
	B	-	+	+	+
pepX	A	+	-	-	-
	B	-	-	-	+
pepN	A	+	-	-	-

ZÁVER

Pri výbere vhodných kandidátov na prípravu štartovacích kultúr treba analyzovať okrem vhodnej proteolytickej aktivity aj iné parametre, ako je acidifikačná aktivita, vysoká tolerancia soli, schopnosť produkcie exopolysacharidov a lipolytická aktivita. Preto je potrebné charakterizovať dané parametre vybraným kmeňom *Lentilactobacillus parabuchneri* (P21, P22) a *Lacticaseibacillus casei* (P23).

POĎAKOVANIE

Táto publikácia vznikla vďaka podpore projektu APVV-20-0001 Štartovacie a prídavné kultúry na výrobu slovenskej bryndze s tradičnými organoleptickými vlastnosťami.

POUŽITÁ LITERATÚRA

1. ČAPLOVÁ, Z., *et al.*, Detection of genes prtP, pepN, pepX and bcaT involved in formation of aroma-active compounds in lactic acid bacteria from ewes‘ cheese. *J Food Nutr Res,* 2018, 57, p. 195–200, ISSN 1336-8672.
2. PAYSAN-LAFOSSE *et al*., InterPro in 2022. *Nucleic Acids Research*, Nov 2022, (doi: 10.1093/nar/gkac993).
3. LIU, M. *et al.* The proteolytic system of lactic acid bacteria revisited: a genomic comparison. *BMC Genomics*. 2010, 11(1), p.36. doi: 10.1186/1471-2164-11-36.
4. SAVIJOKI, K, *et al.*, Proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2006, 71(4), p. 394-406. doi: 10.1007/s00253-006-0427-1.
5. SHI, Z. *et al.*, Comparison of changes in fermented milk quality due to differences in the proteolytic system between Lactobacillus helveticus R0052 and Lactococcus lactis subsp. lactis JCM5805, Food Bioscience, 2023, vol. 51, Dostupné na internete: < https://doi.org/10.1016/j.fbio.2022.102271>. ISSN 2212-4292.

Kontaktná adresa: Rešková Zuzana, Department of microbiology, molecular biology and biotechnology, Food Research Institute, National agriculture and food centre, Priemyselná 4, 824 75, Bratislava, Slovak Republic; E-mail: zuzana.reskova@nppc.sk

VÝZNAM HYGIENY PROSTREDIA PRI ZÍSKAVANÍ MLIEKA

THE IMPORTANCE OF ENVIRONMENTAL HYGIENE IN PRIMARY MILK PRODUCTION

Sasáková Naďa, Takáčová Daniela, KachničJán, Hromada Rudolf

Katedra verejného veterinárskeho lekárstva a farmácie, Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, Komenského 73, 041 81 Košice, SR

ABSTRACT

The aim of the study was to evaluate the importance of disinfection and compliance with the principles of environmental hygiene during milk collection. A high level of environmental hygiene in the primary production of milk significantly reduces microbial contamination of the environment, which is directly related to the reduction of the risk of infectious diseases, which results in a negative impact on milk quality. The work points to the results of a microbiological examination of the hygiene of teat handpieces using the swab method. The results indicate an increased number of the monitored indicator bacteria, suggesting a possible risk of transmission of infectious diseases within the milking process in case of noncompliance with hygiene measures. The usage of suitable disinfectants in the process of milking in the sufficient quantity and concentration is a basic prerequisite for the quality of obtaining milk as well as its further processing. Assessing air quality by the microbiological examination in the process of milk obtaining, the high numbers of observed microorganisms were found. For this reason, it is necessary to focus on increasing attention within assurance of hygiene in the process of obtaining milk in the milking parlour.

Key words: obtaining milk, air quality, water quality, disinfection

ÚVOD

Sanitačný program pri získavaní mlieka je súčasťou HACCP a predstavuje súbor činností ako je čistenie, dezinfekcia, dezinsekcia, deratizácia. Správnym vykonávaním sanitačných prác sa zabezpečia optimálne podmienky pre produkciu kvalitného a zdravotne bezpečného mlieka. Kvalitu prostredia v prvovýrobe mlieka môže ovplyvniť množstvo faktorov ako sú pravidelnosť a kvalita sanitačných prác, hygiena prostredia, ako aj kvalita používanej pitnej vody (Dudriková a kol., 2014). Mikrobiologické nebezpečenstvo v prvovýrobe mlieka môže predstavovať okrem kontaminovanej vody aj nedostatočné čistenie

a oplach technologických zariadení, celkový zdravotný stav stáda, pohyb zvierat, osobná hygiena pracovníkov a mnohé iné (Barbano a kol., 2017; Hillman a kol.,2017)).

Vysoký počet mikroorganizmov v priestoroch chovu dojníc má negatívne účinky na zdravie zvierat a na kvalitu vyprodukovaného mlieka a výskyt mastitíd (Enger a kol., 2017). Z tohto dôvodu sa zvyšujú nároky na dezinfekciu v prvovýrobe mlieka. Vhodným dezinfekčným procesom sa odstraňujú nežiaduce a hygienicky problematické patogénne mikroorganizmy. Na dezinfekciu treba používať len vhodné dezinfekčné prípravky, ktoré sú certifikované a schválené. Dezinfekčné prípravky je potrebné používať v správnej koncentrácii, expozičnej dobe a pred samotnou dezinfekciou je nevyhnutné dôsledné mechanické čistenie (Barbano a kol., 2017). Pri nedostatočnom a nedôslednom dodržaní sanitácie dochádza činnosťou mikroorganizmov k formovaniu biofilmov. Práve čistením dosiahneme odstránenie biofilmov, ktoré sú tvorené zmesou tuku a bielkovín. Biofilmy usadené na technologických zariadeniach, stenách a podlahách sú dobrým podkladom pre prežívanie nežiaducich baktérií. Biofilmy sa usádzajú v potrubiach, záhyboch a ťažko dostupných miestach. Proces tvorby biofilmov pozostáva z 3 fáz: adhézia, kolonizácia a uvoľnenie mikrobiálnych buniek. Hlavným rizikom tvorby biofilmov je, že poskytujú mikroorganizmom vyskytujúcim sa v takomto prostredí ochranu pred škodlivými faktormi prostredia ako je napr. účinok sanitačných prostriedkov. Mikroorganizmy vyskytujúce sa v mlieku so schopnosťou tvoriť biofilmy a predstavujú zdravotné riziko pre človeka patria napr. *Listeria monocytogenes, Staphylococcus aureus, Bacillus cereus* (Friedlander a kol. 2019). Preto pred samotnou dezinfekciou je nevyhnutným krokom zabezpečenie odstránenia nečistôt z plôch vhodným výberom čistiacich prostriedkov a detergentov s použitím horúcej vody pod tlakom, kedy sa dá dosiahnuť účinnosť odstránenia mikroorganizmov až do 80%. Zároveň sa zníži spotreba dezinfekčného prípravku v procese dezinfekcie (Moretro a kol., 2017).

Po aplikácií dezinfekčných prostriedkov je dôležitý dôkladný oplach čistou pitnou vodou. Tak sa odstránia aj posledné zvyšky rezíduí po dezinfekčnom prípravku na technologickom zariadení a v celom priestore, kde bola dezinfekcia vykonaná. Kontrola účinnosti dezinfekcie použitého dezinfekčného prostriedku mikrobiologickými stermi je jedinou objektívnou metódou, ktorou sa môžeme dozvedieť o efektívnosti vykonanej dezinfekcie. Získame tak vedomosti o vhodnosti použitia dezinfekčného prípravku, o dostatočnej použitej koncentrácii, expozičnej dobe, oplachu a pod. (Smith a kol., 2007).

Čistenie a dezinfekcia v mliekarenskom priemysle prebieha v mnohých na seba nadväzujúcich krokoch, ktoré začínajú odstránením hrubých nečistôt z priestoru ako aj z technologických zariadení. Nasleduje oplach studenou pitnou vodou a čistenie priestoru a technologických zariadení pomocou čistiacich prostriedkov. Dôležité je odstránenie zvyškov

čistiacich prostriedkov a nečistôt pomocou oplachu studenou pitnou vodou. Následne sa použije dezinfekčný prostriedok podľa návodu uvedeného na obale a potom nasleduje dôkladný oplach vodou pred začatím výrobného procesu.

MATERIÁL A METODIKA

Hygienické podmienky dojenia boli sledované na farme s chovom dojníc, ktorá je moderná a plne automatizovaná. Prevádzka má vybudovaný potrubný systém odvádzania mlieka až do tankov. Dezinfekcia v poľnohospodárskom podniku bola vykonávaná pravidelne pred každým začiatkom dojenia a po ukončení dojenia. Dezinfekciu vykonáva školený personál pomocou vhodných dezinfekčných prostriedkov. Tým sa zaručuje získavanie kvalitného a hlavne zdravotne bezpečného mlieka. Všetky dezinfekčné prostriedky, ktoré sa používajú, boli schválené Ministerstvom zdravotníctva SR.

Kontrola hygieny dojenia bola hodnotená mikrobiologickými stermi z ceckových násadcov v procese dojenia. Správnym vykonávaním procesov dezinfekcie v procese dojenia sa zabezpečuje zníženie počtu mikroorganizmov, čím sa zníži riziko prenosu baktérií z jedného vemena na druhé, a tak sa dosiahne primeraná úroveň hygieny prostredia.

V rámci analýz bola hodnotená účinnosť používaných dezinfekčných prostriedkov. Na dezinfekciu ceckových násadcov v dojacom zariadení sa používal dezinfekčný prípravok Jodonal M. Kontrola hygieny ceckových násadcov sa vykonávala odobratím mikrobiologických sterov z plochy 10 cm^2. Odber sterov sa vykonal pred dojením, počas dojenia a na konci dojacieho procesu. Na základe výsledkov vyšetrených sterov sa zhodnotila úroveň hygieny v ceckových násadcoch.

Prvý ster bol odobratý z násadca po dezinfekcii ešte pred začatím dojacieho procesu. Nasledujúcich päť sterov sa odobralo po každom ďalšom dojení nasledujúcej dojnice. Pred každým dojením boli vemená dojníc očistené jednorazovými utierkami navlhčenými v dezinfekčnom prípravku Jodonal M s koncentráciou 2 % - 4 % aktívneho jódu.

Jednotlivé stery boli odoberané v tomto poradí: 1. ster – pred dojením; 2. ster – po prvej krave; 3. ster – po druhej krave; 4. ster – po tretej krave; 5. ster – po štvrtej krave; 6. ster – po piatej krave; 7. ster – po poslednej krave

Na získanie steru z ceckového násadca bol použitý sterilný tampón. Po odobratí sterov sa tampóny so vzorkami vložili do skúmaviek, ktoré boli naplnené 10 ml sterilným fyziologickým roztokom. V laboratóriu bola naočkovaná vzorka v objeme 0,1 ml na platne s tuhou živnou pôdou podľa zvolených sledovaných skupín mikroorganizmov. Po ukončení kultivácie sa vyhodnotil kvantitatívny nárast kolónií.

Na stanovenie celkového počtu mikroorganizmov bol použitý mäsopeptónový agar (MPA). Kultivácia sa vykonala pri teplote 37 °C počas 24 hodín. Na stanovenie počtu koliformných mikroorganizmov bol použitý Endoagar (EA), pričom kultivácia bola vykonaná za 24 hodín a pri teplote 37 °C. Sabouradov agar (SA) sa použil pri stanovení počtu mikroskopických vláknitých húb, pričom kultivácia bola vykonaná pri 22 °C za 3 až 5 dní.

Bioluminiscenčná metóda (dôkaz prítomnosti ATP v bunke) bola vykonaná použitím prístroja BioTrace. Táto metóda je odporúčaná ako doplnková metóda na stanovenie efektívneho účinku dezinfekcie a na kontrolu dodržiavania hygienických postupov. Metóda je považovaná za jednoduchú a rýchlu, pretože výsledok je dosiahnutý za menej ako 10 minút.

Mikrobiologickou kontrolou vzduchu sa zisťuje úroveň hygieny prostredia. Prítomnosť mikroorganizmov, najmä indikátorových koliformných baktérií a plesní poukazuje na zvýšené riziko vzniku a šírenia infekčných ochorení.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Výsledky testov sú uvedené v Tabuľke č. 1. Vyšetrenia preukázali prítomnosť mikroorganizmov rastúcich pri 37°C, koliformných baktérií, *E. coli* a v malom počte sa zistila prítomnosť mikromycét a kvasiniek. Tieto mikroorganizmy sa vplyvom nedostatočnej hygieny počas dojenia prenášajú na vemená ostatným dojníc, čím sa zvyšuje riziko vzniku ochorenia vemien a zhoršuje sa kvalita nadojeného mlieka. Z tohto dôvodu je potrebné dbať na pravidelné vykonávanie dezinfekcie ceckových násadcoch počas celého procesu dojenia.

Výsledky testov poukazujú na nárast počtu mikroorganizmov v ceckových násadcoch, ktorý sa zvyšoval zostupne od nadojenia prvej dojnice až po poslednú podojenú dojnicu. Výsledky mikrobiologických rozborov boli podporené aj výsledkami ATP rozborov.

Vyšetrením vzduchu v priestore dojárne bola preukázaná prítomnosť celkového počtu mikroorganizmov, koliformných baktérií a mikromycét. Zistené baktérie indikujú prítomnosť aj iných nežiaducich baktérií, ktoré môžu negatívne ovplyvniť produkciu kvalitného mlieka, zdravie zamestnancov a zvierat.

Kontaminácii vzduchu sa dá predísť vybudovaním ventilačného systému, ktorý zabráni prúdeniu kontaminovaného vzduchu do čistého priestoru. Ďalším spôsobom je regulácia teploty, dodržiavanie sanitačných postupov v dojárni a dodržiavanie osobnej hygieny zamestnancov.

Tabuľka č. 1, Výsledky mikrobiologických sterov z ceckových násadcov

Odber	Vzorka	ATP (RLU)	CPM	KB	*E. coli*	Kvasinky	Mikromycéty
			(KTJ/10cm^2)				
JAR	1.	49	$1{,}5.10^2$	0	0	0	0
	2.	5 643	$1{,}7.10^2$	$2{,}1.10^2$	$1{,}0.10^1$	0	0
	3.	7 842	$2{,}5.10^2$	$2{,}8.10^2$	$1{,}3.10^1$	$1{,}0.10^1$	0
	4.	9 853	NP	$5{,}4.10^2$	$1{,}5.10^1$	$1{,}3.10^1$	0
	5.	12 567	NP	NP	$1{,}8.10^1$	$1{,}7.10^2$	0
	6.	29 984	NP	NP	$1{,}9.10^1$	$1{,}9.10^2$	0
	7.	195 812	NP	NP	NP	NP	0
LETO	1.	3	$0{,}2.10^2$	0	0	0	0
	2.	53	$0{,}5.10^2$	$1{,}3.10^2$	0	0	0
	3.	125	$1{,}3.10^2$	$1{,}6.10^2$	0	0	1
	4.	256	$1{,}5.10^2$	$2{,}3.10^2$	0	1.10^1	1
	5.	310	$1{,}8.10^2$	$2{,}5.10^2$	0	$1{,}5.10^2$	3
	6.	350	$1{,}9.10^2$	NP	0	$1{,}8.10^2$	3
	7.	289 451	NP	NP	$1{,}3.10^1$	$5{,}3.10^2$	5
JESEŇ	1.	12	1.10^1	0	0	0	0
	2.	35	$1{,}2.10^2$	0	0	0	0
	3.	73	$1{,}5.10^2$	0	0	0	0
	4.	158	$2{,}9.10^2$	0	0	$1{,}3.10^1$	0
	5.	161	$4{,}0.10^2$	$1{,}4.10^2$	0	$1{,}6.10^2$	1
	6.	202	$4{,}3.10^2$	$1{,}9.10^2$	0	$1{,}9.10^2$	1
	7.	175 302	NP	NP	$2{,}2.10^1$	$8{,}7.10^2$	2
ZIMA	1.	2	$0{,}3.10^1$	1.10^1	0	0	0
	2.	15	$1{,}2.10^1$	$1{,}4.10^1$	0	0	0
	3.	22	$2{,}1.10^1$	$1{,}5.10^1$	0	0	0
	4.	69	$3{,}7.10^1$	$4{,}6.10^1$	0	0	0
	5.	180	$5{,}9.10^1$	$5{,}9.10^1$	0	0	0
	6.	194	$9{,}5.10^1$	NP	0	0	0
	7.	155 601	NP	NP	0	$1{,}1.10^1$	1

ZÁVER

Získané výsledky práce poukazujú na dôležitosť a pravidelnosť vykonávania procesov čistenia a dezinfekcie v prvovýrobe mlieka začínajúc získavaním mlieka dojením. Dôsledným vykonávaním sanitačných postupov pri spracovaní a výrobe produktov živočíšneho pôvodu sa znižuje riziko výskytu nebezpečných potravín a ochorení z nich. Výsledkom dodržiavania zásad správnej výrobne praxe je produkcia kvalitných a bezpečných mliečnych produktov.

POĎAKOVANIE

Práca bola podporovaná projektom MŠ SR KEGA č. 001UVLF-4/2020.

POUŽITÁ LITERATÚRA

1. BARBANO, D. – MELILILI, C. *Milk fatty acid compositttion to support management of feeding, health and reproduction in Dairy cows.* 2017. vo. 13. no.9. p. 23-25.
2. DUDRIKOVÁ, E. a kol. *Technológia potravín, bezpečnosť a kvalita mlieka a mliečnych výrobkov pre magistrov.* Košice: UVLF, 2014. 250 – 270 s. ISBN 978-80-8077-447-9.
3. ENGER, BD. – FOX, LK. – GAY, JM. – JOHNSON, KA. Reduction of teat skin mastitis pathogen loads: differences between strains, dips, and contact times. *J Dairy Sci.* (2015) 98:1354–61. doi: 10.3168/jds.2014-8622
4. FRIEDLANDER, A. – NIR, S. – RECHES, M. – SHEMESH, M. Preventing Biofilm Formation by Dairy-Associated Bacteria Using Peptide-Coated Surfaces. Front Microbiol. 2019 Jun 26;10:1405. doi: 10.3389/fmicb.2019.01405. PMID: 31297098; PMCID: PMC6608603.
5. HILLMAN, E. et. al. Effects of milking stall dimensions on behavior of dairy cows during milking in different milking parlor types. *In Journal Dairy Science.* 2017. vol. 25. no 17. p. 16-20.
6. MORETRO, T. – LANGSRUD, S. Residential bacteria on surfaces in the food ndustry and their implications for food safety and quality. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 2017, 16, 1022–1041. 10.1111/1541-4337.12283
7. SMITH, R.M, et. al. A community outbreak of campylobacter jejuni infection from a chlorinated public water supply. *In epidemiology and infectiont.* 2007. ISSN 0950-2688, vol 135 no.7, p.51-58.

Kontaktná adresa: Sasáková Naďa, Department of Public Veterinary Medicine and Animal Welfare, University of Veterinary Medicine and Pharmacy in Košice, Komenského 73, 041 81 Košice, Slovak Republic; E-mail: nada.sasakova@uvlf.sk

BIOGÉNNE AMÍNY VO VÍNE

BIOGENIC AMINES IN WINE

Semjon Boris[1], Očenáš Peter[2], Marcinčák Slavomír[1]

[1]Department of Food Hygiene, Technology and Safety, University of Veterinary Medicine and Pharmacy in Košice, Komenského 73, 041 81 Košice, Slovak Republic

[2]Department of Chemistry, Biochemistry and Biophysics, University of Veterinary Medicine and Pharmacy in Košice, Komenského 73, 041 81 Košice, Slovak Republic

ABSTRACT

Biogenic amines presented in wine are important in human health, especially from the consumer's point of view. They belong to the important factors in the safety of wine production. They are compounds , which are metabolised in vivo, however, they may cause injurious effects in susceptible individuals. An increased amount of histamine may elicit a regulatory mechanism in a healthy person that is able to control its toxic effects, but in susceptible individuals even a small amount of histamine may overload this system. Adjusting the conditions of the technological process of wine production and environmental factors seems to be a suitable way to reduce their concentration. Systematic research into the formation of histamine and other biogenic amines in produced wines using modern statistical methods is essential. Application of multiple factor analysis to the data obtained in the studies based on a large datased may help to understand the relationship to the formation and reduction of biogenic amines in wine.

Key words: wine, biogenic amines, histamine, statistics

INTRODUCTION

Biogenic amines (BA) are low molecular weight organic bases, can be formed in fermented food and beverages by bacterial metabolism via the activity of specific amino acid decarboxylases or as a spontaneous chemical reaction (Beneduce et al., 2010). Their presence has been reported to be related with climatic and geological factors of the wineproducing regions as well as to vinification practices (Cecchini and Morassut, 2010). BAs can be generated at different stages of the wine production. Some of them are formed in the vineyard and are normal constituents of grapes with amounts varying with variety, soil type and composition, fertilization and climatic conditions during growth and degree of maturation (Restuccia et al., 2018). BAs are formed mainly in fermentation process by the yeasts and lactic acid bacteria involved in the malolactic (Košmerl, Šućur and, Prosen, 2013). BAs can be also formed by the

yeasts during the alcoholic fermentation, as well as by the action of bacteria involved in the malolactic fermentation. Amines production is complex and multifatorial phenomenon. In particular, there is not a general consensus yet on which fermentation supports mostly the accumulation of BAs in wine (Restuccia et al., 2018). During winemaking it is important to consider all factors beginning from viticulture practices, alcoholic and malolactic fermentation and physiochemical composition of wine, as well as, aging and storage of wine (Košmerl, Šućur and, Prosen, 2013). It was reported that the quantities of biogenic amines found in many wines are not alarming, especially with regard to those of toxicological interest (histamine and tyramine). For individuals in specific physiological conditions, e.g. histamine intolerance, taking class of drugs that inhibit monoamine oxidase enzymes, the risk of creating toxic reactions is related to the composition of the whole meal, not only the consumption of wine. It would be desirable to establish a regulatory system, as already existing for sulphites, allowing to read a label with the claim specifying their absence (e.g., histamine free) in order to enhance the safety and quality of wines (Martuscelli and Mastrocola, 2018), respectively, its additional value. The undesirable toxicological effects of BAs are headache, respiratory distress, heart palpitation, hypotension, hypertension, nausea (EFSA, 2011).

MATERIAL AND METHODS

Samples

The samples used in this work were obtained from Wine producer from East Slovak wine region. The samples were: Silvaner Green (SG), Traminer (TR), Riesling (R), Blue Frank (BF) and Cabernet Sauvignon (CS).

Determination of biogenic amines in wine using ultra-high performance liquid chromatography with fluorescence detector

To analyze biogenic amines (histamine and tyramine) the Thermo Scientific UHPLC system (Dionex UltiMate 3000 RS) coupled with a fluorescence detector (FLD) was used. A YMC-Triart PFP column (150 × 3.0 mm, 1,9 µm) was used to separate biogenic amines in wine samples at a flow rate of 0.4 mL/min. Mobile phase consisted of (A) acetonitrile and (B) 0.1 mol/L ammonium acetate and isocratic elution 55% (A):45% (B) was applied. The column temperature was maintained at 25 ± 0,5 °C. A 5 µL sample was injected into UHPLC. The excitation and emission wavelength were set at 320 nm and 523 nm in the FLD detector, respectively. Identification of biogenic amines was carried out by comparing their retention time with their corresponding standard. The quantitation of biogenic amines in wine samples was performed by the standard curve generated by peak area ratio over the concentration of each biogenic amine.

RESULTS AND DISCUSSION

In wine the total BAs concentration can range from a few mg/L to about 50 mg/L (Lehtonen, 1996) and it could be considered as an indicator of wine authenticity (Herbert et al., 2005) in addition to other chemical compounds such as polyphenols (Galgano et al., 2011). Actually, a legislation dealing with limits for BAs contents in wines is still lacking and regulatory limits have not yet been established. However, upper limits for histamine content in wine (2–10mg/L) are recommended in some European countries (Manetta et al., 2016). Table no. 1 show the results of determination of histamine content in wine samples.

Table no 1. The results of histamine content determination in wine samples (avg values)

Samples | Parameter	SG	TR	R	FM	CS
Histamín (µg/mL=mg/L)	< LOQ	= 0,5244	< LOQ	< LOQ	1,0260

Note: Silvaner Green (SG), Traminer (TR), Riesling (R), Blue Frank (BF) and Cabernet Sauvignon (CS).

The presented results show the preliminary results of histamine content in wine samples, which were produced by the project partner. The samples were then analysed during production process for histamine content and will be included in the project report. In order to clarify the relationships, including the positive and negative correlation factors involved in the formation of biogenic amines in the production and maturation of wine, the use of multiple factor analysis as one of the modern statistical methods is very appropriate and will be used in the final report.

ACKNOWLEDGMENT

This work was supported by the Scientific Grant Agency of the Ministry of Education, Science, Research and Sport of the Slovak Republic and the Slovak Academy of Sciences under project VEGA 1/0156/21.

REFERENCES

1. Beneduce, L. et al. 2010. Biogenic amine in wines. Ann Microbiol. 60, 573–578.
2. Cecchini, F., Morassut, M. 2010. Effect of grap storage time on biogenic amines contentin must. Food Chem. 123, 263–268.
3. Restuccia, D. et al. 2018. Accumulation of Biogenic Amines in Wine: Role of Alcoholic and Malolactic Fermentation. Fermentation. 4, 1–18
4. Manetta, et al. 2016. Evaluation of biogenic amines in wine: Determination by an improved HPLC-PDA method. Food Control. 62, 351–356.

5. Košmerl, T, Šućur, S., Prosen, H. 2013. Biogenic amines in red wine: The impact of technological processing of grape and wine. Acta Agric. Slov. 101, 249–261.
6. Martuscelli, M., Mastrocola, D. 2018. Chapter Biogenic Amines: A Claim for Wines. 10 s.
7. EFSA Panel on Biological Hazard. 2011. Scientific opinion on risk based control of biogenic amine formation in fermented foods. EFSA Journal, 9, 1–93.
8. Lehtonen, P. 1996. Determination of amines and amino acids in wine. A review. Am. J. Enol. Viticult. 47, 127–133.
9. Herbert, P. et al. 2005. Free amino acids and biogenic amines in wines and musts from the Alentejo region. Evolution of amines during alcoholic fermentation and relationship with variety, sub-region and vintage. J. Food Eng. 66, 315–322.
10. Galgano, F. et al. 2011. Authentication of Italian red wines on the basis of the polyphenols and biogenic amines. Eur. Food Res. Technol. 232, 889–897.

Contact address: Semjon Boris, DVM, PhD., Department of Food Hygiene, Technology and Safety,, University of Veterinary Medicine and Pharmacy in Košice, Komenského 73, 041 81 Košice, Slovak Republic; E-mail: boris.semjon@uvlf.sk

ZMENY TEXTURÁLNYCH PARAMETROV VZORIEK PARENÍC POČAS SKLADOVANIA

CHANGES IN THE TEXTURAL PARAMETERS OF THE PARENICA CHEESE SAMPLES DURING STORAGE

Semjon Boris[1], Benešová Lucia[2], Jakabová Silvia[3], Golian Jozef[3]

[1] *Department of Food Hygiene, Technology and Safety, University of Veterinary Medicine and Pharmacy in Košice, Komenského 73, 041 81 Košice, Slovak Republic*

[2] *The AgroBioTech Research Centre, Slovak University of Agriculture in Nitra, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovenská republika*

[3] *Institute of Food Sciences, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Slovak University of Agriculture in Nitra, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovak Republic*

ABSTRACT

The aim of this work was to assess the textural properties of experimental parboiled sausage samples during storage under vacuum and non-vacuum conditions. Slovenská parenica cheese is registered in the Register of Protected Designations of Origin and Protected Geographical Indications. Nevertheless, in the commercial network, the consumer is most often confronted with parenica made from pure pasteurised cow's milk. The following textural parameters of the samples were monitored: maximum bite force, hardness and stickiness. The maximum bite force required to develop by the texturometer for the parenica samples was different between the varieties of unsmoked and smoked parenica, and this difference was statistically significant ($p < 0.001$) during this experiment. On the other hand, there was no statistical difference due to the effect of storage ($p > 0.05$) on maximum bite force values. In the hardness of the experimental sausage samples, the smoked sausage samples were significantly harder in the groups before storage and after storage without vacuum packing ($p < 0.001$).

Keywords: parenica cheese, texture, quality, storage, vacuum packaging.

INTRODUCTION

Commission Regulation (EC) No 656/2008 of 10 July 2008 entered “Slovenská parenica” in the Register of protected designations of origin and protected geographical indications. Slovenská parenica is a steamed, lightly smoked cheese rolled into two 'S' shaped, interconnected rolls of cheese ribbon, 6-8 cm in diameter and 5-8 cm high. The rolls are tied with cheese thread or chain. The cheese ribbon is 2-3 mm thick, 5-8 cm wide and 4-6 m long

before it is rolled up. 'Slovenská parenica' has a delicate taste and smell of sheep's milk and smoking. The characteristic feature is the distinctive softened texture of the cheese (Official Journal of the European Union C 249/26).

The parenica cheese was originally made in the shepherd's kitchens of sheep farmers, where the temperature and space conditions were created for this purpose and where there was room for smoking and storage. As shepherds learned to build more enclosed and spacious dwellings - huts - the production of sausages was transferred to shepherd's huts. The original shepherd's method of production has been preserved in some households to this day. The milked fresh sheep's milk or a mixture of sheep's and cow's milk with a minimum of 50 % sheep's milk is curdled at a temperature of 29-32 °C. The milk is curdled approximately half an hour after the rennet has been added. The curd is stirred with a harp stirrer and cut with a cheese knife to produce a grain size of 0,5 to 1 cm. The crumbled curd is allowed to set and then shaped by hand into a lump. The lump is lifted out of the whey using a cheese cloth and allowed to drain. The curd is collected in a wooden basin or in a double-bottomed stainless-steel container. The weight of the lump of sheep after removal from the curd is between 3 and 5 kg. After draining and hardening (4 to 10 hours), the lump is placed on a wooden or stainless steel shelf to ferment. The cottage cheese is cured for about 24 hours at a temperature of 20-23 °C so that the pH of the cheese reaches a value of about 5,3.

Properly fermented lump cheese is then cutted into smaller pieces and weighed about half kilogram to make one piece of parenica cheese. The weighed cheese is placed in a wooden gelette with warm water (60-70 °C) and begins to be spread on the inside of the gelette using a wooden spatula until a fine cheese dough is formed. The processed cheese dough is taken in the hands and by pressing it gets rid of unnecessary amount of water, it is stretched and folded several times. Pulling out and folding is repeated several times. A ribbon is pulled out of the cheese dough prepared in this way, which is shaped with the edge of the hand on a wooden board to a length of 4-6 m, a width of approx. 6 cm and a thickness of 2-3 mm. The pulled out ribbon is placed in the prepared cold saturated salt solution. After pulling out, the rest of the saline solution is wiped off, the ribbon is folded on the board in the medium and rolled from the two opposite ends into a full "S" shape. It is tied with cheese threads or a chain and placed on a wooden board. After drying, they are placed in a smoker and smoked for approx. 2 hours with hardwood smoke (Official Journal of the European Union C 249/26).

In terms of physico-chemical composition, 'Slovenská parenica' should contain at least 53 % dry matter, at least 50 % fat in dry matter and a maximum NaCl content of 3 %. Slovenská parenica has a characteristic smell of sheep's milk and a smoky aroma obtained by smoking with hardwood smoke. The taste should be mild, pleasantly salty and cheesy after sheep's milk.

The consistency is elastic, with a softened texture, with threads forming when torn. The colour should be yellow on the outside, yellow to brown after smoking, white to buttery yellow inside (Official Journal of the European Union C 249/26). At present, consumers do not come across a product labelled 'Slovenská parenica' in the commercial network. Industrial production offers vacuum-packed parenices on the market, but those produced on salami farms are usually packed in bags. However, it is possible to find parenices made from pasteurised cow's milk in unsmoked and smoked varieties in the commercial network.

The aim of this work was to assess the textural properties of experimental parboiled sausage samples during storage under vacuum and non-vacuum conditions.

MATERIAL AND METHODS

Samples

To study the sensory profile and quality of parenica cheese were evaluated following sample groups: PU (unsmoked parenica cheese made from pasteurized cow's milk); PS (lightly smoked parenica cheese made from pasteurized cow's milk).

A total of 72 experimental parenica cheese samples were evaluated in this study. On the initial day of manufacture were from each group (PU, PS) randomly selected samples and divided into the following groups: the first group consisted of initial samples (n = 18) which were analyzed before storage period (BS); the second group contained samples (n = 18) that were placed in plastic bags to prevent desiccation but exposed to normal atmosphere conditions and stored for 14 days at the temperature of 4 ±2 °C (samples after storage – AS).

Determination of textural parameters of cheese samples

Textural profile analysis was performed using the TA-XT Plus Texture Analyzer (Stable Micro System, Surrey, United Kingdom) using modified methods according to Šnirc et al. (2017). The tested sausage samples were cut to 25 x 25 x 25 mm. Measurements were performed using Stable Micro Systems Type (version 9.0) software. We installed a three-inch compression plate on the measuring sensor of the instrument (25 kg). Prior to analysis, we calibrated the instrument using a five kilogram weight. For the measurement of hardness and stickiness, we used a cylindrical probe whose probe penetration depth was set to 10 mm with a data acquisition rate of 400 pps. Measurement of maximum bite force was performed on experimental parietal samples by installing a Volodkevich jaw probe. All measurements of textural parameters were carried out on cured experimentally fabricated samples at (20 ± 2 °C). The obtained textural profiles were used to evaluate the instrumental parameters of maximum bite force (N), hardness (g) and stickiness (g).

Statistical evaluation

The results of the measurements were evaluated using R - statistics software (R Core Team, 2017). In the statistical evaluation of the experimental sausage samples, we used the effect of the technological step of cold smoking (variety) and the influence of storage time without vacuum packing, and also with the use of vacuum packing (storage) as the main factors. For their storage evaluation, we used the two-way analysis of variance (Two-Way ANOVA) method and the Shidak's test to determine the differences between varieties at the significance level of $p < 0.05$.

RESULTS AND DISCUSSION

The results of the measurement of the textural parameters of parenica cheese samples are presented in Table 1 and Table 2. The maximum bite force required to be exerted by the texturometer on the parenica cheese samples was different between the unsmoked and smoked parenica varieties, and this difference was statistically significant ($p < 0.001$) during this experiment. On the other hand, there was no statistical difference due to the effect of storage ($p > 0.05$) on maximum bite force values. In the hardness of the experimental parenica samples, the smoked parenica samples were significantly harder in the groups before storage and after storage without vacuum packing ($p < 0.001$). As shown in Table 1, the most pronounced differences in sample hardness during storage were in the smoked parenica samples. The stickiness of the unsmoked parenica samples increased during storage in both the non-vacuum packed and vacuum packed samples, with stickiness being higher in the vacuum packed samples. In contrast, the stickiness of the unsmoked variety samples in the non-vacuum packed group was higher both before storage and after vacuum storage. No statistically significant effect of smoking or storage was found in the parboiled sausage samples in the stickiness parameter ($p > 0.05$).

The smoking process itself is based on the gradual deposition of components such as phenolic derivatives, carbonyls, organic acids and their esters, lactones, pyrazines, pyrroles and furan derivatives on the surface of the food with their subsequent migration to the interior of the food (Ozcan et al., 2011). Although more than 300 constituents in smoke have been identified, only a very small number make their way into products in which they contribute to desirable sensory properties, coloration, texture, and flavor. It is quite well established that smoking at high temperatures has a significant effect on the texture of food through denaturation of proteins, thereby producing a drier texture. Flavour ranges from very light to strong smoky flavours are accompanied by colours ranging from golden yellow to dark brown (Perez Elortondo, Albisu and Barcina, 2002).

Table 1, The results of instrumental measurements of textural variables of unsmoked and smoked parenica cheese samples before and after storage

Variable	Cheese variety	PS	NB	VB
		mean ± SD		
Maximum bite force	P_N	3,03 ± 0,57^{a1}	3,20 ± 0,42^{ab1}	3,77 ± 0,44^{b1}
	P_U	4,70 ± 1,13^{a2}	4,40 ± 0,84^{a2}	4,49 ± 0,77^{a2}
Hardness	P_N	292,85 ± 131,47^{a1}	269,96 ± 37,77^{a1}	295,48 ± 27,74^{a1}
	P_U	625,06 ± 167,08^{a2}	375,37 ± 143,18^{b2}	296,43 ± 77,74^{b1}
Stickiness	P_N	-67,62 ± 43,57^{a1}	-73,15 ± 25,26^{a1}	-87,59 ± 22,05^{a1}
	P_U	-64,00 ± 16,47^{a1}	-79,46 ± 47,92^{a1}	-74,87 ± 14,51^{a1}

PN - samples of experimentally produced unsmoked sausages; PU - samples of experimentally produced samples of smoked sausages; PS - samples before storage; NP - samples stored for 14 days, not packed in vacuum conditions; VP - samples stored for 14 days, packed in vacuum conditions; Means in individual parameters that share the same superscript (a - c) in rows (Tukey's test, $p < 0.05$) and the same superscript (1, 2) in columns (Shidak's test, $p < 0.05$) are not statistically significantly different.

Table 2, The statistical results of instrumental measurements of textural variables of Two Way ANOVA method

Variable	Cheese variety	Two Way ANOVA method		
		Variable	Effect of Variety	Effect of Storage
Maximum bite force Hardness	P_N	*p* value	$p < 0{,}001$	$p > 0{,}05$
	P_U	*F* value	$F(1, 102) = 70{,}74$	$F(2, 102) = 2{,}00$
		SS	38,63	1,09
		MS	38,63	2,18
Hardness	P_N	*p* value	$p < 0{,}001$	$p < 0{,}001$
	P_U	*F* value	$F(1, 102) = 46{,}83$	$F(2, 102) = 22{,}33$
		SS	577061,7	275154,4
		MS	577061,7	550308,8
Stickiness	P_N	*p* value	$p > 0{,}05$	$p > 0{,}05$
	P_U	*F* value	$F(1, 102) = 0{,}31$	$F(2, 102) = 2{,}31$
		SS	301,47	2233,3
		MS	301,47	4466,61

PN - samples of experimentally produced unsmoked sausages; PU - samples of experimentally produced samples of smoked sausages; SS - sum of squares; MS - mean of squares.

There are well-known types of cheese that are preferred for their special organoleptic characteristics, such as Applewood cheese, Gruyere as well as Gouda, Cheddar, Lancashire, Stilton, Brie, Rauchkase and Scamorza (Ozcan et al., 2011), including those that involve the textural characteristics of the cheeses. In general, smoking a high-protein food infuses the food with flavor components that provide flavor and color to the food, as well as play bacteriostatic

and antioxidant roles (Amran and Abbas, 2011). Cheese has been an indispensable dairy product in human nutrition for centuries, and can be consumed both fresh and aged (Ozcan et al., 2011).

REFERENCES

1. Official Journal of the European Union C 249/26 of 24.10.2007; Publication of an application for registration pursuant to Article 6(2) of Council Regulation (EC) No 510/2006 on the protection of geographical indications and designations of origin for agricultural products and foodstuffs (2007/C 249/13); "SLOVENSKÁ PARENICA" EC No SK/PGI/005/0485/19.07.2005.
2. AMRAN, A. M. – ABBAS, A. A. Microbiological Changes and Determination of Some Chemical Characteristics for Local Yemeni Cheese. In *Jordan Journal of Biological Sciences*. ISSN 1995-6673, 2011, vol. 4, no. 2, p. 93-100.
3. OZCAN, T. et al. The formation of polycyclic hydrocarbons during smoking process of cheese. In *Mljekarstvo*. ISSN 1846-4025, 2011, vol. 61, no. 3, p. 193-198.
4. ŠNIRC, M. et al. Application of principal component analysis method for characterization chemical, technological, and textural parameters of farmed and pastured red deer. In *International Journal of Food Properties.* ISSN 1094-2912, 2017, vol. 20, no. 4, p. 754-761.

CONCLUSION

The obtained results of this experiment showed that the storage of the curd and the smoking process can affect its textural properties of parenica cheese. Incorrect temperature during smoking can moreover cause changes in the consistency, texture and structure of the cheese.

Contact address: Semjon Boris, DVM, PhD., Department of Food Hygiene, Technology and Safety, University of Veterinary Medicine and Pharmacy in Košice, Komenského 73, 041 81 Košice, Slovak Republic; E-mail: boris.semjon@uvlf.sk

VPLYV NIEKTORÝCH TOXICKÝCH RASTLÍN NA KVALITU MLIEKA

THE INFLUENCE OF SOME TOXIC PLANTS ON MILK QUALITY

Takáčová Daniela, Nagyová Alena, Sasáková Naďa, Packová Anna*

Katedra verejného veterinárskeho lekárstva a welfare zvierat, Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, Komenského 73, 041 81 Košice, Slovenská republika

**Katedra medicínsko-technických odborov, Fakulta zdravotníckych odborov PU, Partizánska 1, 080 01 Prešov, Slovenská republika*

ABSTRACT

Milk and milk products are a complex food for humans and one of the key factors in a variety of health effects. When cattle and other milk-producing animals whose milk is consumed are raised properly, the milk has a pleasant aroma, smell, and taste. When animals change pasture, load a new haystack, or feed with newly brought feed mixtures where poisonous plants may be present, the sudden onset of poisoning symptoms is typical, usually in several individuals in the herd. Given the importance of public health and food safety, determining the distribution of xenobiotic, particularly natural plant toxicants, in milk and other animal products is critical. The study looks at some plant toxins that can be found in milk and have an impact on the health of humans and lactating animals.

Key words: animals, milk, plants, poisoning, toxins

ÚVOD

Do krmív, potravín či vody sa môžu dostať látky rôzneho pôvodu, a to buď ako nežiadúce kontaminanty alebo ako súčasť potravy či krmiva (Dorne a Fink-Gremmels 2013). Do organizmu zvierat alebo ľudí sa tak môžu dostať látky, ktoré sa vyznačujú toxickým potenciálom a označujeme ich ako cudzorodé látky – xenobiotiká. Do potravy, vody či do krmiva sa dostávajú prostredníctvom znečisteného ovzdušia, kontaminovanej vody, pôdy, v dôsledku aplikácie agrochémie, konzumácie toxických rastlín, ale aj pri výrobe, skladovaní, spracovávaní či balení potravín. Legislatíva Európskej únie [Nariadenie Rady (EHS) č. 315/93] definuje kontaminanty ako látky, ktoré neboli zámerne pridané do potraviny a ktoré sú v potravine prítomné ako dôsledok produkcie (vrátane operácií uskutočnených v rámci pestovania a zberu plodín, chovu dobytka a veterinárneho lekárstva), výroby, spracovania, úpravy, ošetrenia, zabalenia, obalu, dopravy a skladovania alebo ako dôsledok kontaminácie

životného prostredia. Cudzie predmety ako napr. časti hmyzu, živočíšna srsť, atď., nespadajú pod túto definíciu kontaminantov.

V porovnaní s inými toxikózami sú otravy spôsobené rastlinami pomerne zriedkavé, ale ak sa vyskytnú, spôsobujú narušenie zdravotného stavu a úhyn, väčšinou vždy väčšieho počtu zvierat a s tým sú spojené ekonomické straty. Riziko pre ľudské zdravie, ktoré predstavuje výskyt rastlinných toxických látok v mlieku, vďaka súčasným praktikám hromadnej manipulácie s mliekom, a intenzívnym praktikám manažmentu, ktoré eliminujú príležitosti pre dojné zvieratá spásať jedovaté rastliny, je minimálne. Potrebné je však zamerať sa na zistenie potenciálneho rizika, pretože u hospodárskych zvierat môže dôjsť k intoxikáciám na pastve, v dôsledku konzumácie kontaminovaného sena jedovatými rastlinami, alebo kontamináciou jadrových krmív jedovatými semenami. Ako najčastejšie prenášané xenobiotiká do mlieka sa uvádzajú alkaloidy.

Rastliny, ktoré najčastejšie vyvolávajú toxikózy hospodárskych zvierat

K otravám môže dochádzať aj pri maštaľnom, aj pri pasienkovom chove zvierat. Častejšie sa vyskytujú pri maštaľnom chove, keďže miešané, posečkované alebo prichutené krmivo neumožňuje zvieratám využiť ich selekčnú schopnosť. Pri pastve sa častejšie vyskytnú otravy na začiatku pastevnej sezóny a najmä staršie zvieratá vedia selektovať rastliny s výrazným pachom a chuťou (Tabuľka 1).

Väčšinou buriny, ktoré sa môžu nachádzať medzi krmovinami, predstavujú pre hospodárske zvieratá nebezpečenstvo. Pri uplatňovaní správnych agrotechnických metód a starostlivosti o kultúrne porasty sa výskyt burín môže sporadicky zvýšiť, najmä tam, kde sa predtým nevyskytovali, čo má za následok, že sa takémuto výskytu nepripisuje dostatočný záujem.

Ak nebol prijatý žiadny toxín alebo len jeho malé množstvo, toto množstvo nebolo dostatočné na vyvolanie klinických príznakov. Preto je dôležité dôkladné pochopenie typov toxínov prítomných v rastline ako aj klinický prejav po expozícii (Nelson a Balick, 2020).

Tabuľka 5 Výskyt jedovatých rastlín

Miesta výskytu	Rastliny (*botan.*)	Rastliny
Lúky a pastviny	*Colchicum autumnale*	Jesienka obyčajná
	Tanacetum vulgare	Jastrabina lekárska
	Fabacea	Rôzne druhy lupín
Polia	*Amaranthus retroflexus*	Láskavec ohnutý
	Conium maculatum	Bolehlav škvrnitý
	Datura stramonium	Durman obyčajný
	Chaerophyllum temulum	Horčica roľná
Krovinaté miesta	*Atropa belladonna*	Ľuľkovec zlomocný
	Oxalis acetosella	Kyslička obyčajná
Burinaté pozemky	*Hyoscyamus niger*	Blen čierny
	Conium maculatum	Bolehlav škvrnitý
Zelené krmivo	*Chelidonium majus*	Lastovičník väčší
	Fagopyrum vulgare	Pohánka obyčajná
	Cyanus segetum	Nevädza poľná
Seno	*Colchicum autumnale*	Jesienka obyčajná
	Papaver rhoeas	Mak vlčí
	Datura stramonium	Durman obyčajný
	Equisetum	Prasličky
	Quercus	Listy duba
Slama	*Equisetum arvense*	Praslička roľná
	Papaver rhoeas	Mak vlčí

Zdroj: Frantová a, Ofúkaný 1990

Jedovaté látky v rastlinách

V rastlinách sa jedovaté látky môžu vyskytovať v jej častiach (kvety, hľuzy, listy, koreň, a pod), ale aj v celej rastline. Množstvo látok, ktoré majú schopnosť vyvolať otravu, však nemusí byť v rastlinách rovnaké, čo sa odvíja v závislosti od poveternostných podmienok, od času ich zberu, uchovávania, miesta výskytu a pod. Najčastejšie sa vyskytujúce látky s toxickým účinkom v rastlinách rozdeľujeme medzi alkaloidy, glykozidy, saponíny, silice, živice, horčiny a toxalbumíny (Tabuľka 2).

Tabuľka 6 Látky s toxickým účinkom v rastlinách

Jedovaté látky	Výskyt v rastlinách
Alkaloidy	jesienka obyčajná, durman obyčajný, starček Jakubov, mak siaty, praslička močiarna, krušpán vždyzelený a i.
Glykozidy	mandľa obyčajná, hlaváčik jarný, konvalinka voňavá, náprstník červený a i.
Saponíny	brečtan popínavý, zlatobyľ obyčajný, kúkoľ poľný, prvosienka jarná
Silice	palina pravá, pohánka jedlá, rozmarín lekársky, šafran siaty, tuja západná a i.
Živice	konopa siata, vlkovec obyčajný a i.
Horčiny	zemolez obyčajný, rododendron chlpatý a i.
Toxalbumíny	ricín obyčajný, agát biely

Zdroj: Frantová a, Ofúkaný 1990

Rastlinné toxické látky v mlieku

Vylučovanie alebo eliminácia prirodzených toxínov mliekom u zvierat a ľudí počas laktácie sa nepovažuje za hlavnú cestu vylučovania. Rýchlosť eliminácie toxínov mliekom závisí od koncentrácie toxínu v krvi, schopnosti xenobiotika difundovať cez bunkové membrány, jeho afinity k určitým zložkám v mlieku, množstva, ktoré sa má eliminovať, a účinnosti z hlavných ciest detoxikácie a vylučovania (pečeň, moč, stolica atď.) na elimináciu toxínu .

Pretože mlieko je komplexná emulzia lipidov suspendovaných vo vodnom roztoku bielkovín, považuje sa za vedľajšiu cestu vylučovania toxických látok. Avšak v závislosti od koncentrácie toxínu v krvi, schopnosti xenobiotika prechádzať cez bunkovú membránu, jeho afinity k určitým zložkám v mlieku, účinnosti hlavných detoxikačných a exkrečných ciest (pečeň, moč, stolica atď.), lipofility, zásaditosti toxínu a typu rastlinného toxínu a jeho metabolitov, niektoré toxické látky môžu byť tiež vylučované do mlieka (Panter and James 1990). Mlieko môže obsahovať zmes prakticky akéhokoľvek toxínu alebo zlúčeniny, ktorá je rozpustná vo vode. Toxíny môžu byť viazané na krvné proteíny, v roztoku cirkulujúcich lipidoch alebo voľne cirkulujúcich v plazme, pričom všetky môžu prechádzať cez bunkové membrány mliečnej žľazy. Toxické látky v mlieku sa do mlieka vo všeobecnosti dostávajú jednoduchou difúziou. Pretože mlieko je kyslejšie (približne pH 6,5) ako plazma, zásadité zlúčeniny, ako sú rastlinné alkaloidy, sa môžu koncentrovať v mlieku. Kyslé zlúčeniny sú zvyčajne v nižších koncentráciách v mlieku ako v plazme (Klaassen, 1975). Najčastejší problém, pri výskyte otráv z prijatých rastlín, spočíva v chronickej opakovanej expozícii

pri požití jedovatých rastlín, a potenciálne nebezpečenstvo pre tie zvieratá, ktoré konzumujú mlieko.

Niektoré jedovaté látky sa ľahko vylučujú do mlieka. Patria sem tie, ktoré sú vysoko rozpustné v tukoch, ktoré sú koncentrované v lipidovej časti mlieka. Tieto lipofilné xenobiotiká majú dlhé biologické polčasy a často sa detegujú v mlieku v najvyšších koncentráciách aj po najdlhšiu dobu (Mathews, 1980).

Otrava, ktorá sa môže vyskytnúť u cicajúcich mláďat a u konzumentov mlieka, môže byť závažnejšia ako u samotných laktujúcich zvierat, z dôvodu koncentrácie toxínu v mlieku. U mláďat môže chýbať schopnosť efektívne metabolizovať a eliminovať xenobiotiká.

Do surového mlieka z krmiva môže prechádzať aj toxín tremetol, ktorý pochádza z rastlín *Eupatorium ageratoides* (konopáč), *Eupatorium urticae folium a Haplopappus heterophyllus*. Toxicita tremetolu sa stráca sušením a vplyvom účinku vysokých teplôt, bežné pasterizačné teploty ho však neovplyvňujú. V dostatočne usušenom sene sa nenachádza. Riziko však nastáva po konzumácii väčšieho množstva týchto rastlín dojnicami (Bagínová 2011). Laktujúce zvieratá sa môžu otráviť tremetolom vylučovaným do mlieka zvierat, ktoré prijmú niektorú z rastlín. U potomstva sa symptómy pozorujú skôr, než sa prejavia u laktujúceho rodiča. Laktujúce zvieratá sú menej náchylné na otravu kvôli ich schopnosti eliminovať tento toxín cez mlieko.

Zdrojom pyrolizidíniových alkaloidov (PA) sú starčekovité (Senecio sp.), ale aj napríklad liečivé rastliny ako podbeľ (*Tussilago farfara*), či kostihoj (*Symphytum officinale*). Na Slovensku je najväčší výskyt starčeka obyčajného a starčeka jakubovho. Úžitkové zvieratá nespásajú čisté alkaloidy, ale kultúry s obsahom alkaloidov. Mladé rastliny dobytok skrmuje bez problémov, pričom ku koncu vegetačného obdobia už dobytok starčeky nespása. Môže to byť spôsobené zmenou chuti rastliny, keďže ku koncu vegetácie sa v nej začínajú kumulovať alkaloidy vo forme voľnej bázy, ktoré majú horkú chuť (Fodran, undated). Najvnímavejšie na PA sú kone a najmenej vnímavé sú kozy. Jednoduchý pyrolizidíniový alkaloid bol zistený v kravskom mlieku po tom, čo kravy požili jarabinu obyčajnú (*Senecio jacobaea*), ktorá obsahuje osem štrukturálne príbuzných PA. Teľatá, ktoré od týchto kráv dostali mlieko, neprejavovali žiadne príznaky, ale u kráv sa stav zhoršil; pri nekropsii pečeň vykazovala rozsiahle mikroskopické lézie typické pre toxikózu PA (Dickinson et al., 1976).

Medzi nebezpečné fytotoxíny, skôr uvádzané ako príčiny otráv v zahraničí, ktoré sa vylučujú mliekom, patria: indolizidínové alkaloidy (Zhang et al. 2020), ktoré spôsobujú ochorenie z ukladania oligosacharidov; piperidínové alkaloidy (Green et al. 2012), ktoré vyvolávajú akútne otravy alebo malformácie; pyrolizidínové alkaloidy (Knutse et al. 2017), ktoré spôsobujú hepatálne lézie; chinolizidínové alkaloidy (Schrenk et al. 2019), ktoré sa

uvádzajú ako príčina výskytu skeletálnych defektov; glukozinoláty (Connolly et al. 2021), ktoré spôsobujú zmeny v štítnej žľaze; tremetol (Voss 2001) spôsobuje triašku u zvierat; monofluoracetát sodný (Eason, 2002), môže spôsobiť smrť mláďat po požití mledziva od kôz, ak počas gravidity požili *Amorimia septentrionalis* (Pessoa and Silva, 2018).

ZÁVER

Prípady otráv hospodárskych zvierat na Slovensku sú zriedkavé, ale nevylučujú možnosť ich výskytu. Väčšina jedovatých látok z rastlín sa vylučuje aj mliekom, okrem atropínu a kodeínu. Aj keď je potenciálne riziko výskytu toxických látok z rastlín v mlieku minimálne pre bezpečnosť ľudí, najmä vďaka postupom a intenzívnemu systému riadenia, riziko ohrozujúce humánnu populáciu, by sa malo vyhodnotiť. Faktory, ktoré treba vziať do úvahy, sú laktácia, dostupnosť toxických rastlín pre laktujúce zvieratá, kumulačný účinok pri prijímaní nízkych hladín rastlinných toxických látok v mlieku v prípade, že hospodárske zvieratá môžu mať prístup k toxickým rastlinám.

POUŽITÁ LITERATÚRA

1. BAGÍNOVÁ, J. 2011: Riziká konzumácie surového mlieka. Bakalárska práca. Masarykova univerzita, Lekárska fakulta Brno. s. 39-40
2. CONOLLY, E. L. et al. 2021: Glucosinolates from Cruciferous Vegetables and Their Potential Role in Chronic Disease: Investigating the Preclinical and Clinical Evidence. *Front. Pharmacol*. 12. https://doi.org/10.3389/fphar.2021.767975
3. DICKINSON, JO, COOKE, MP, KING, RR, and MOHAMED, PA. 1976. Milk transfer of pyrolizidine alkaloids in cattle. *J. Am. Vet. Med. Assoc*. 169: 1 192.
4. DORNE JL, FINK-GREMMELS J. 2013: Human and animal health risk assessments of chemicals in the food chain: comparative aspects and future perspectives. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2013 Aug 1;270(3):187-95.
5. EASON, CH. 2002. Sodium monofluoracetate (1080) risk assessment and risk communication. *Toxicology* 181-182:523-30. doi: 10.1016/s0300-483x(02)00474-2
6. KNUTSE, H. K. et al. 2017: Risks for human health related to the presence of pyrrolizidine alkaloids in honey, tea, herbal infusions and food supplements. *EFSA Journal* 15(7). https://doi.org/10.2903/j.efsa.2017.4908
7. FODRAN, P. (rok neuvedený): Stanovenie a identifikácia starčekových alkaloidov. Stanovisko o stanovení a identifikácii starčekových alkaloidov v podmienkach SR. [online] Dostupné na [04. 17. 2023]

file:///C:/Users/daniela.takacova/Downloads/stanovenie_a_identifikacia_starcekovych_alkaloidov.pdf

8. FRANTOVÁ, E., OFÚKANÝ, L. 1990: Jedovaté rastliny. Obzor Bratislava, ISBN 80-215-0061-1, s.80
9. GREEN, B. T., LEE, S. T., PANTER, K. E., BROWN, D. R. 2012: Piperidine alkaloids: Human and food animal teratogens. *Food and Chemical Toxicology* 50(6):2049-2055
10. KLAASSEN. C. D. 1975. Absorption, distribution and excretion of toxicants. In: L. F. Casarett and J. Doull (Ed.) Toxicology, the Basic Science of Poisons. p 42. Macmillan Publ. Co., New York.
11. MATHEWS, H. B. 1980: Elimination of toxicants and their metabolites. In: E. Hodgson and F. E. Guthrie (Ed.) Introduction to Biochemical Toxicology. pp 175-176. Elsevier North Holland Inc., New York. Mattocks, A. R. 1968. Toxicity of pyrrolizidine alkaloids. Nature 217:723
12. NARIADENIE RADY (EHS) č. 315/93 z 8. februára 1993, ktorým sa stanovujú postupy spoločenstva u kontaminujúcich látok v potravinách v platnom znení. Úradný vestník EU. 1993 Feb 13;36(L37):204-6.
13. NELSON, L. S., BALICK, M. J. 2020: Handbook of Poisonous and Injurious Plants. Springer; ISBN 978-1-4939-8924-9, 336 p.
14. PANTER K.E. and JAMES L.F. 1990: Natural plant toxicants in milk: a review. *J. Anim. Sci.* 68(3):892-904.
15. PESSOA, D.A.N., Silva, L.C.A. 2018: Evaluation of resistance to natural poisoning by Amorimia septentrionalis in goats which had received sodium monofluoroacetate degrading bacteria. *Pesquisa Veterinaria Brasileira* 38(10):1913-1917
16. SCHRENK, D. et al. 2019: Scientific opinion on the risks for animal and human health related to the presence of quinolizidine alkaloids in feed and food, in particular in lupins and lupin-derived products. *EFSA Journal* 17(11) doi: 10.2903/j.efsa.2019.5860
17. VOSS, J. L. 2001: Guide to poisonous plants. [online], dostupné na internete: https://csuvth.colostate.edu /poisonous_plants/Plants/Details/128 [cit 2023-03-4]
18. ZHANG J., MORRIS-NATSCHKE, S.L., DIMA, SHANG, X., YANG, CH., LIU, Y. 2020: Biologically active inolizidine alkaloids. *Med Res Rev* 41(2):928-960

Kontaktná adresa: Takáčová Daniela, Department of Public Veterinary Medicine and Animal Welfare, University of Veterinary Medicine and Pharmacy in Košice, Komenského 73, 041 81 Košice, Slovak Republic; E-mail: daniela.takacova@uvlf.sk

SENZORICKÁ PŘIJATELNOST BEZLEPKOVÝCH CHLEBŮ S PŘÍDAVKEM VLÁKNINY

SENSORY ACCEPTABILITY OF GLUTEN-FREE BREAD FORTIFIED WITH FIBER

Tauferová Alexandra, Czerniková Aneta, Tremlová Bohuslava

Ústav hygieny a technologie potravin rostlinného původu, Veterinární univerzita Brno, Palackého tř. 1946/1, 612 42 Brno, Česká republika

ABSTRACT

In recent years, there has been a growing interest in gluten-free products for various reasons. Gluten-free bakery products are often prepared on the basis of starches and, compared to classic baked goods containing gluten, they usually have a low proportion of fiber, which is disadvantageous for the consumer from a nutritional point of view. The aim of this work was to evaluate the effect of fiber addition on the sensory quality of gluten-free bread. To determine the optimal addition of fiber, different types of fiber were evaluated, as well as different proportions of individual types of fiber and their impact on the quantitatively evaluated descriptors and the hedonic acceptability of the samples. Our results showed that both the type and percentage of fiber have a statistically significant effect on the sensory quality and consumer acceptance of gluten-free bread samples. Each type of fiber affected the experimental samples of gluten-free bread in a characteristic way. For that reason, it seems appropriate to use the synergistic effect of the combination of individual fibers within one recipe. A significant effect of the addition of individual types of fiber on increasing the sensory quality and acceptability of gluten-free breads was demonstrated. Adding the optimal amount of fiber within the ranges recommended in this work is therefore an advantageous option for both the consumer and the producer.

Key words: flaxseed, psyllium, apple fiber, chia seeds, hedonic analysis

ÚVOD

V posledních letech se setkáváme s rostoucím zájmem o bezlepkové výrobky, ať už z důvodu zvýšeného počtu diagnostikovaných případů celiakie, alergie na lepek, neceliakální lepkové senzitivity, tak i dobrovolného vyloučení či omezení lepku ve stravě (Puerta et al. 2020). Důvodem pro vyloučení mohou být rovněž benefity vyplývající pro konzumenty trpící

dalšími autoimunitními onemocněními, např. diabetem I. typu, lupénkou či revmatoidní artritidou (Gaesser, Angadi 2012).

Bezlepkové pekařské výrobky jsou často připravovány na bázi škrobů a ve srovnání s klasickým pečivem s obsahem lepku mají obvykle nízký podíl vlákniny, což je z nutričního hlediska pro konzumenta nevýhodné (Mir et al. 2021; Scherf, 2019; Gaesser, Angadi 2012). Cílený přídavek vlákniny v různé formě může vést v první řadě ke zvýšení nutriční hodnoty bezlepkového pekařského výrobku (Saboo et al. 2022). Následně však může vést také ke zlepšení senzorické jakosti, jelikož vláknina může pozitivně ovlivnit senzorické deskriptory, jako je chuť, barva i textura. Ukazuje se také, že vláknina má výrazný pozitivní vliv v oblasti prevence cukrovky, střevních onemocnění i optimalizace krevního tlaku (Saboo et al. 2022; Arslan et al. 2019). Doporučený denní příjem se pohybuje mezi 22 a 30 g vlákniny (Snetselaar et al. 2021). Pekařské výrobky představují významný zdroj vlákniny v západní stravě. V případě zaměření se na bezlepkové pekařské výrobky bez vědomého doplnění z jiných zdrojů však konzumenti mohou přijímat vlákniny nedostatek. V současné době je v tržní síti dostupná řada různých druhů vlákniny, které jsou již využívané, případně potenciálně využitelné při výrobě pekařských výrobků. V případě bezlepkových pekařských výrobků se však pořád setkáváme spíše s nízkou mírou jejich využití (Pappová, 2020; Jirsová, 2019). Cílem této práce bylo sledovat vliv přídavku vlákniny na senzorickou jakost bezlepkového chleba. Pro určení optimálního přídavku vlákniny byly hodnoceny jak různé druhy vlákniny, tak i různé podíly jednotlivých druhů vlákniny a jejich dopad na kvantitativně hodnocené deskriptory i hedonickou přijatelnost vzorků.

MATERIÁL A METODIKA

Bylo připraveno celkem 16 vzorků bezlepkových chlebů s přídavkem jednotlivých druhů vláknin v různých poměrech a kontrolní vzorek bez jakéhokoli přídavku vlákniny. Všechny použité suroviny byly předem zakoupeny v místních prodejnách zdravé výživy, případně v lokálních supermarketech v Brně.

Tabulka č. 1, Označení vzorků podle druhu a podílu použité vlákniny

Druh vlákniny	Označení vzorků			
Lněné semínko	L10	L15	L20	L30
Chia semínko	CH2	CH5	CH10	CH15
Psyllium	P2	P5	P7_5	P10
Jablečná vláknina	J2	J5	J7_5	J10

*Číslo u označení vzorku představuje podíl použité vlákniny v procentech vzhledem k hmotnosti mlýnských obilních výrobků.

Příprava vzorků proběhla v technologické učebně Ústavu hygieny a technologie potravin rostlinného původu Veterinární univerzity Brno. Jednotlivé druhy vlákniny byly den před pečením vždy nabobtnány v individuálních poměrech vody vybraných podle dostupných studií.

Kontrolní vzorek byl připraven podle následující receptury:

- 150 g rýžové mouky polohrubé
- 80 g kukuřičné mouka polohrubé
- 70 g pohankové mouky hladké
- 6 g guarové gumy
- 4 g kmínu
- 10 g soli
- 7 g droždí
- 3 g cukru
- 300 ml vlažné vody

Nejdříve byla v kynárně při teplotě 40 °C a vlhkosti cca 68 % provedena aktivace droždí. Poté byla připravena sypká směs, která se skládala z rýžové, kukuřičné a pohankové mouky, dále pak z guarové gumy, soli a kmínu. Po čase potřebném na aktivaci byla k droždí přidána sypká směs. Po důsledném promíchání bylo těsto ponecháno v kynárně 90 min. Poté bylo přemístěno do silikonových forem k dokynutí dalších 30 min. Pečení probíhalo při zapékací teplotě 220 °C 20 min, následně dalších 20 min při teplotě 180 °C. Poté byly chleby při téže teplotě dopékány bez formy dalších 20-30 min. Experimentální vzorky byly připraveny podle stejné receptury a postupu, se zakomponováním předem nabobtnané vlákniny ve stanoveném procentuálním podílu. Senzorická analýza proběhla následující den po upečení, a to až po důkladném zchlazení vzorků.

Obrázek č. 1, Kontrolní vzorek bez přídavku vlákniny



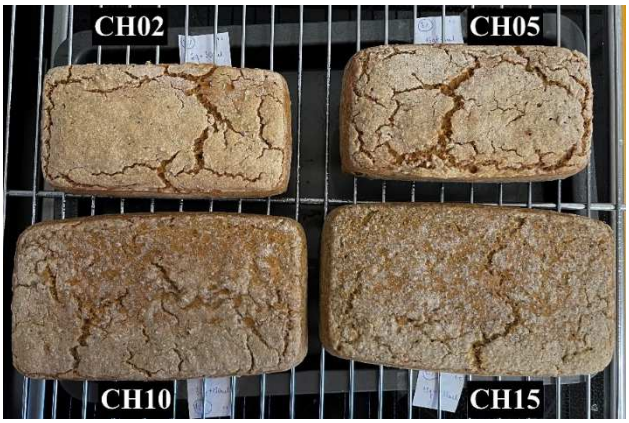
Obrázek č. 4, Experimentální vzorky s přídavkem psyllia



Obrázek č. 2, Experimentální vzorky s přídavkem lněného semínka



Obrázek č. 3, Experimentální vzorky s přídavkem chia semínek



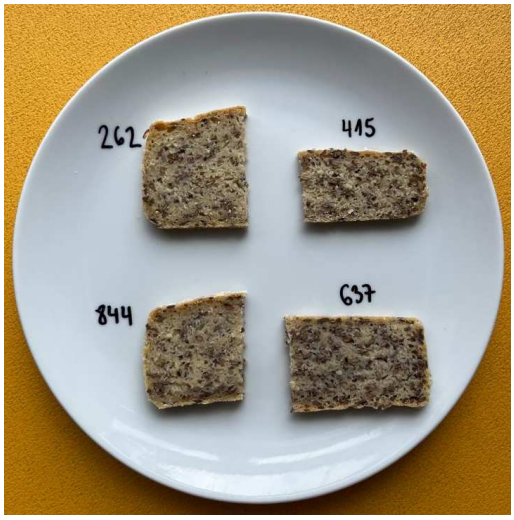
Obrázek č. 5, Experimentální vzorky s přídavkem jablečné vlákniny



Senzorická analýza byla provedena panelem školených hodnotitelů (n = 19, průměrný věk = 30,1 let) z řad studentů a akademických pracovníků Veterinární univerzity Brno.

Hodnotitelé měli pro účely analýzy k dispozici polovinu krajíce o tloušťce přibližně 1,5 cm označeného číselným kódem (Obr. 6). Jako neutralizátor byla použita neperlivá voda. Nejdříve proběhla kvantitativní deskriptivní analýza a následně i hedonická analýza; hodnocení proběhlo pomocí kategorových ordinálních stupnic s popsanými extrémními hodnotami, kde 9 odpovídala nejvyšší intenzitě/příjemnosti v daném deskriptoru. Výsledky byly vyhodnoceny pomocí statistického softvéru R verze 3.3.3 (The R Foundation for Statistical Computing, Rakousko), použitou metodou byla analýza základních komponent.

Obrázek č. 6, Sada experimentálních vzorků označených kódy pro účely senzorické analýzy

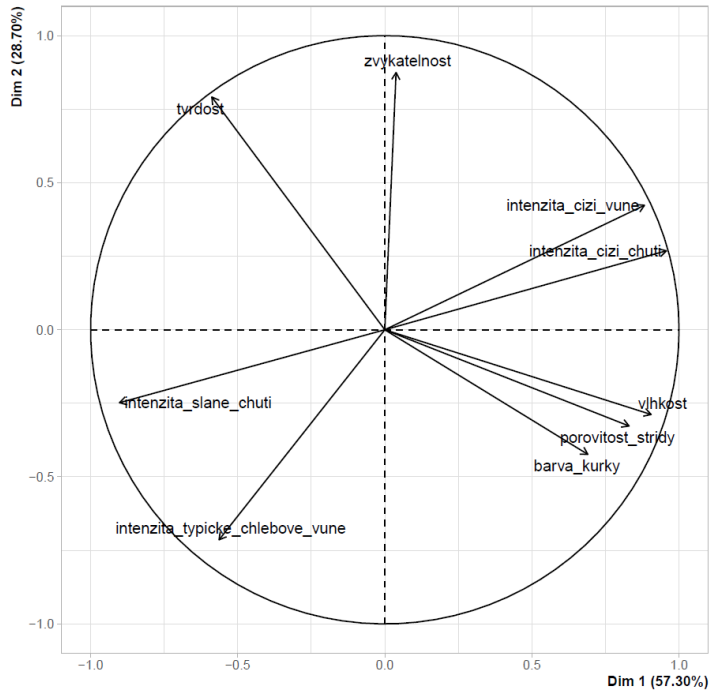


VÝSLEDKY A DISKUSE

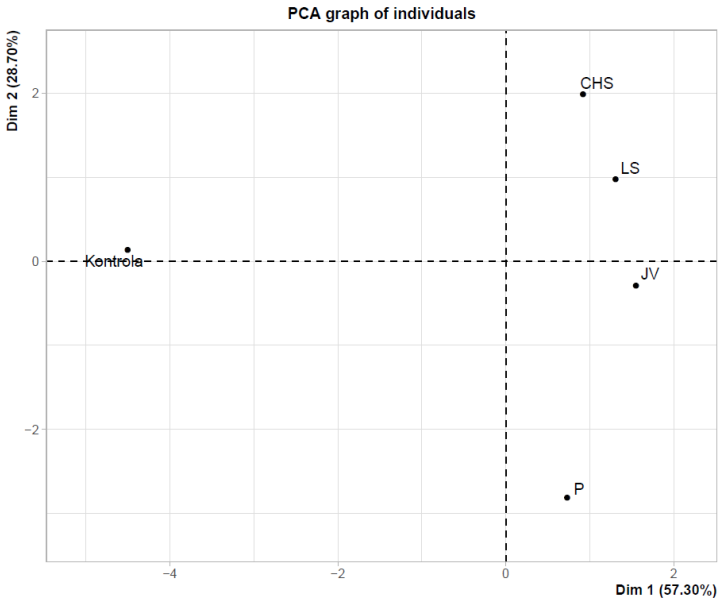
Výsledky kvantitativní deskriptivní analýzy skupin vzorků podle druhu vlákniny jsou zobrazeny na obrázcích č. 7 a č. 8. Graf výsledků analýzy základních komponent zaměřené na

skupiny vzorků podle druhu vlákniny vysvětluje 86 % variability, přičemž první komponenta vysvětluje 57,3 % a druhá 28,7 % variability.

Obrázek č. 7, Výsledky kvantitativní deskriptivní analýzy skupin vzorků podle druhu vlákniny – Graf proměnných



Obrázek č. 8, Výsledky kvantitativní deskriptivní analýzy skupin vzorků podle druhu vlákniny – Mapa vzorků



Z mapy vzorků je zřejmé, že všechny experimentální vzorky se výrazně lišily od kontrolního vzorku, který se vyznačoval statisticky významně ($p < 0.05$) nižšími hodnotami

barvy kůrky, pórovitosti střídy, vlhkosti, intenzity cizí vůně a intenzity cizí chutě. Přídavek jablečné vlákniny statisticky významně zvyšoval pórovitost střídy a intenzitu barvy kůrky. Tento výrazný vliv na barvu výrobku je díky charakteristické hnědo-oranžové barvě jablečné vlákniny (Salinas et al. 2021). Přídavek lněného semínka vedl ke statisticky významnému zvýšení senzoricky vnímané vlhkosti a intenzity cizí vůně. Tyto vzorky se rovněž vyznačovaly statisticky významně nižší intenzitou slané chutě a barvou kůrky se blížily kontrolnímu vzorku. Kromě prokázaných pozitivních vlivů na senzorickou jakost zvyšují lněná semena nutriční hodnotu výrobku mimo jiné svým vysoký obsahem omega-3 mastných kyselin a antioxidantů (Preisner et al. 2014; Aglaee 2011). Přídavek chia semínek statisticky významně ovlivnil vůni vzorků – intenzita typické chlebové vůně byla potlačena a hodnotitelé intenzivně vnímali cizí vůni. Chia semínka jsou z nutričního hlediska mimo jiné cenné i svým vysokým obsahem kyseliny linolenové (Grancieri et al. 2022). Přídavek psyllia podobně jako přídavek jablečné vlákniny statisticky významně zvyšoval intenzitu barvy chlebů, stejně tak i vlhkost, a naopak vedl ke statisticky významně nižší senzoricky vnímané tvrdosti. Vysoké podíly psyllia v těstě vedly kromě vyšší vlhkosti také k nižší pórovitosti a výraznějšímu lesku chlebové střídy. Podobný efekt popsal také Filipčev et al. (2021), který navíc uvádí pozitivní vliv psyllia na údržnost chleba a Bilgic a Sensoy (2023) zdůrazňují vysoký podíl cenných bioaktivních sloučenin.

Výsledky hedonické analýzy jednotlivých vzorků jsou obsahem Tabulky č. 2.

Z Tabulky č. 2 je vidět, že mezi jednotlivými vzorky bylo nalezeno několik statisticky významných rozdílů. Jako nejvíce přijatelný byl vyhodnocen vzorek s přídavkem 10 % lněného semínka, následovaný vzorkem s přídavkem 2% psyllia. Příjemnost vzhledu byla nejlépe hodnocena u vzorku s přídavkem 7,5 % jablečné vlákniny, a to z důvodu intenzivnější barvy. Nejvíce statisticky významných rozdílů bylo zaznamenáno právě v rámci deskriptoru příjemnost vzhledu. Hodnotitelé naopak nezaznamenali žádné statisticky významné rozdíly v příjemnosti vůně. Nejhůře hodnoceným vzorkem byl vzorek s 10% přídavkem psyllia. Nicméně všechny experimentální vzorky bez ohledu na druh a podíl vlákniny dosáhly celkové hodnocení vyšší než hodnota 5, která představuje neutrální hodnocení. Studie Aldughpassi et al. (2021) se zabývala vlivem přídavku psyllia do výrobku typu arabský chléb. Uvádí pozitivní vliv nízkého procenta (3 a 5 %) psyllia na vláčnost, barvu i chuť chlebů. To potvrzují i naše výsledky hodnocení bezlepkových chlebů. Důležitost optimálního množství vlákniny v receptuře dokumentuje také Feili et al. (2014), který uvádí, že vyšší přídavky vlákniny obecně je konzumenty vnímáno negativně, naopak nižší procento bylo konzumenty plně akceptováno.

Tabulka č. 2, Výsledky hedonické analýzy experimentálních vzorků bezlepkových chlebů

	prijemnost_vune	prijemnost_vzhledu	prijemnost_chuti	prijemnost_textury	celkove_hodnoceni
P10	5.384	3.404	4.379	3.885	3.99
J10	5.609	6.216	5.108	5.759	5.265
L30	5.742	4.91	5.807	5.191	5.195
P75	6.154	5.096	5.61	5.424	5.605
CH10	5.612	4.551	6.343	5.34	5.677
CH15	6.041	5.122	5.771	5.911	6.249
CH02	5.755	7.122	6.343	5.197	5.677
CH05	5.47	5.408	6.057	6.625	6.534
L20	5.964	5.799	6.362	6.414	5.973
K	6.553	5.64	6.25	5.7	6.277
J02	5.966	6.43	5.822	6.616	6.336
L15	6.408	6.133	6.14	6.636	5.862
J75	6.037	7.144	6.179	6.188	5.908
P05	5.846	6.173	6.072	6.731	6.605
J05	5.751	6.93	6.608	6.474	6.693
L10	5.964	5.688	6.473	7.302	7.195
P02	6.154	6.557	6.764	6.962	6.913

*Uvedené hodnoty představují průměrné hodnocení v rámci hedonických deskriptorů. Statisticky významně vyšší hodnoty jsou zvýrazněny modrou barvou; statisticky významně nižší hodnoty jsou zvýrazněny růžovou barvou.

ZÁVER

Naše výsledky prokázaly, že jak druh, tak i procentuální podíl vlákniny mají statisticky významný vliv na senzorickou jakost a přijímání vzorků bezlepkových chlebů konzumenty. Každý druh vlákniny kromě toho ovlivňoval experimentální vzorky bezlepkového chleba specifickým způsobem. Z toho důvodu se jeví jako vhodné využít synergického působení kombinace jednotlivých vláknin v rámci jedné receptury, což bude obsahem další navazující studie. Dalším důvodem pro navazující výzkum a zařazení kombinace vláknin do bezlepkových chlebů může být také fakt, že konzumace pekařských výrobků fortifikovaných různými druhy

vlákniny výrazně zlepšuje inzulínovou senzitivitu (Ranaivo et al., 2022). Přídavek i jednotlivých druhů vlákniny má však nesporně významný vliv na zlepšení senzorické jakosti a přijatelnosti bezlepkových chlebů a je tudíž jak pro konzumenta, tak i pro výrobce výhodnou variantou.

POUŽITÁ LITERATURA

1. AGLAEE, J. *Is Flax Seed Still Healthy After Cooking?* [online], 2011. [cit. 2023.03.25]. Dostupné z internetu: <https://healthfully.com/isflax-seed-still-healthy-after-cooking-5712404.html>.
2. ALDUGHPASSI, A. et al. Effect of psyllium fiber addition on the quality of Arabic flatbread (Pita) produced in a commercial bakery. In *Annals of Agricultural Sciences*, ISSN 0570-1783, 2021, vol. 66, no. 2, pp. 115–120.
3. ARSLAN, M. et al. Complimenting gluten free bakery products with dietary fiber: Opportunities and constraints. In *Trends in Food Science & Technology*, ISSN 0924-2244, 2019, vol. 83, pp. 194–202.
4. BILGIC, H. and SENSOY, I. Effect of psyllium and cellulose fiber addition on the structure and the starch digestibility of bread and crackers. In *Food Structure*, ISSN: 2213-3291, 2023, vol. 35, pp. 100302.
5. FEILI, R. et al. Physical and sensory analysis of high fiber bread incorporated with jackfruit rind flour. In *Food Science and Technology*, 2014, vol. 1, pp. 30–36.
6. FILIPČEV, B. et al. Psyllium as an improver in gluten-free breads: Effect on volume, crumb texture, moisture binding and staling kinetics. In *LWT*, ISSN: 0023-6438, 2021, vol. 151, pp. 112156.
7. GAESSER, G.A. and ANGADI, S.S. Gluten-free diet: imprudent dietary advice for the general population? In *Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics*, 2012, vol. 112, no. 9, pp.1330-1333.
8. GRANCIERI, M. et al. Digested protein from chia seed (Salvia hispanica L) prevents obesity and associated inflammation of adipose tissue in mice fed a high-fat diet. In *PharmaNutrition*, ISSN: 2213-4344, 2022, vol. 21, pp. 100298.
9. JIRSOVÁ, E. *Senzorická jakost bezlepkového pečiva*. Brno, 2019. Bakalářská práce. Veterinární univerzita Brno, Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Ústav hygieny a technologie potravin rostlinného původu. Ing. Alexandra Tauferová, Ph.D.
10. MIR, S. A. et al. Influence of hydrocolloids on dough handling and technological properties of gluten-free breads. In *Trends in Food Science & Technology*, ISSN: 0924-2244, 2016, vol. 51, pp. 49–57.

11. PAPPOVÁ, B. *Nutriční hodnota směsí bezlepkových mouk v tržní siti*. Brno, 2020. Bakalářská práce. Veterinární univerzita Brno, Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Ústav hygieny a technologie potravin rostlinného původu. Ing. Alexandra Tauferová, Ph.D.
12. PREISNER, M. et al. Flax Fiber. In *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology* [online], 2014. [cit. 2023.03.25]. Dostupné na internetu: <https://doi.org./10.1002/0471238961.0612012401110914.a01.pub2>.
13. PUERTA, P. et al. Oral processing and dynamics of texture perception in commercial gluten-free breads. In *Food Research International*, 2020, vol. 134, p. 109233.
14. RANAIVO, H. et al. Increasing the diversity of dietary fibers in a daily-consumed bread modifies gut microbiota and metabolic profile in subjects at cardiometabolic risk. In *Gut Microbes*, 2022, vol. 14, no. 1, p. 2044722.
15. SABOO, B. et al. Role and importance of high fiber in diabetes management in India. In *Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews*, ISSN 1871-4021, 2022. vol. 16, no. 5, pp. 102480.
16. SALINAS, D. E. et al. Viscoelastic properties and compensation study of apple juice enriched with apple fiber. In *LWT*, ISSN 0023-6438, 2021, vol. 151, pp. 111971.
17. SCHERF, K. A. Immunoreactive cereal proteins in wheat allergy, non-celiac gluten/wheat sensitivity (NCGS) and celiac disease. In *Current Opinion in Food Science*, 2019, vol. 25, pp. 35–41.
18. SNETSELAAR, L. G. et al. *Dietary Guidelines for Americans, 2020–2025: Understanding the Scientific Process, Guidelines, and Key Recommendations*, 9th Edition. [online]. 2021. [cit. 2023-03-22]. DOI: https://doi.org/10.1097/NT.0000000000000512.

Kontaktní adresa: Tauferová Alexandra, Department of Plant Origin Food Sciences, University of Veterinary Sciences Brno, Palackého tř. 1946/1, 612 42 Brno, Czech Republic; E-mail: tauferovaa@vfu.cz

VPLYV SPÔSOBU SPRACOVANIA KÁVY NA OBSAH ŤAŽKÝCH KOVOV

EFFECT OF PROCESSING METHOD ON HEAVY METAL CONTENT

Várady Matúš[a], Boržíková Jana[b], Popelka Peter[a]

[a]*Katedra hygieny, technológie a zdravotnej bezpečnosti potravín, Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie, Komenského 73, 041 81 Košice, Slovenská republika*

[b]*Štátny veterinárny a potravinový ústav v Dolnom Kubíne - Veterinárny a potravinový ústav v Košiciach, Hlinkova 1, 043 65 Košice, Slovenská republika*

ABSTRACT

The aim of this study was to determine the effect of the processing method (natural, washed, honey, anaerobic fermentation, carbonic maceration) on the content of heavy metals in green and roasted specialty coffee beans from different countries of origin. Coffee roasting had a significant effect ($p < 0.001$) on the content of Hg, Al, Ni, Cd and Pb. The highest content of Cd was in green Ethiopian coffee and was higher than reported in the literature. The highest Pb content was analyzed in Rwanda roasted coffee, but its values are the same as described in most studies. Geographical origin of coffee had a significant effect ($p < 0.001$) on the content of Hg, Al, Ni, Cd, Pb and Cr, but the values of other heavy metals in coffee remain within the recommended limits. The importance of monitoring heavy metals should be part of the entry controls for green coffees entering the market, even though further processing of the coffee, such as roasting, significantly reduces their amounts. Drinking high-quality and healthy coffee should be a goal for the future.

Keywords: specialty coffee, heavy metals, coffee processing, green coffee, roasted coffee

ÚVOD

Pre svoje senzorické vlastnosti a stimulačný účinok kofeínu je káva jedným z najobľúbenejších nápojov na svete. S konzumáciou kávy sú spojené potenciálne zdravotné výhody, ktoré sa pripisujú hlavne prítomnosti polyfenolov a ich antioxidačnej aktivite (Vegro a de Almeida 2020).

Z pohľadu kvality sa kávy rozdeľujú na výberové a komoditné. Komoditnou kávou sa rozumie komerčná káva, ktorá je zmesou káv rôznych pôvodov, rôznych zberov či ročníkov a často aj rôznych typov praženia. Výberová káva má presne daný rodný list, je známe kedy a kde bola pestovaná, ako a kým bola spracovaná. Výberová káva obsahuje mnohé zdraviu prospešné látky, ale pri nesprávnom spracovaní a následnej manipulácii, alebo zlej kvalite

vstupnej suroviny je možná aj tvorba potenciálne škodlivých látok. Prítomnosť potenciálne škodlivých látok v káve súvisí aj s geografickým regiónom jej pôvodu. Najväčšími producentmi kávy sú krajiny zo strednej a južnej Ameriky, Afriky a juhovýchodnej Ázie (Reis a kol. 2015). Vzhľadom ku menej striktným právnym predpisom, environmentálnej záťaži v týchto krajinách a používaniu prostriedkov na ochranu kávovníkov, potenciálny problém predstavuje predovšetkým kontaminácia kávy ťažkými kovmi. Z ťažkých kovov najväčší problém predstavujú olovo, chróm, kadmium, nikel, meď a arzén (Pigozzi a kol. 2018). Nedávna štúdia poukazuje na kávy zo strednej Ameriky nadmerne kontaminované kadmiom (Várady a kol. 2021).

Predpokladali sme, že spracovanie a praženie kávy môže výrazne ovplyvniť množstvo ťažkých kovov v kávových zrnách, preto naším cieľom bolo zistiť vplyv rôzneho spracovania kávy na obsah ťažkých kovov (meď, olovo, chróm, kadmium, nikel, hliník a ortuť) v zelenej a praženej káve z rôznych geografických regiónov.

MATERIÁL A METODIKA

Vzorky zŕn 100 % *Coffea Arabica* boli získané z Nikaraguy, Guatemaly, Etiópie, Kene, Peru a Burundi, pričom kávy z jednej krajiny pochádzali vždy z rovnakej farmy, ale boli spracované rôznymi pozberovými metódami (naturálna, premývaná, medová, anaeróbna fermentácia, karbonická macerácia). Kávové zrná boli pražené na vzorkovej pražičke Ikawa (Ikawa Ltd, Londýn, Spojené kráľovstvo) pri finálnej teplote 204 °C počas 5 min. Vzorky kávy sme jemne pomleli a homogenizovali, odvážili (0,3 g) a preniesli do teflónových kadičiek (Merck KGaA, Darmstadt, Nemecko) na mineralizáciu. Pridali sme 5 mililitrov 65 % kyseliny dusičnej a 1 ml peroxidu vodíka. Teflónové kadičky sme uzavreli a mineralizovali 45 minút. Roztoky vzoriek sa potom kvantitatívne preniesli do 25 ml odmerných baniek a pridala sa deionizovaná voda, aby sa objem na analýzu zvýšil na 25 ml. Vzorky boli štiepené v mikrovlnnom zariadení Berghof MWS-2 (Berghof Automation GmbH, Eningen unter Achalm, Nemecko) počas 45 minút pri teplotách v rozmedzí od 100 do 190 °C.

Ťažké kovy (meď, olovo, chróm, kadmium, nikel, hliník a ortuť) boli identifikované pomocou viacprvkovej techniky hmotnostnej spektrometrie s indukčne viazanou plazmou (Agilent ICP-MS 7900, Santa Clara, CA, USA). Podmienky ICP-MS boli: RF výkon, 1370 W; RF prispôsobenie, 1,58 V; prietok plazmového plynu (Ar), 15 l/min; hĺbka odberu vzoriek, 7,9 mm; prietok nosného plynu (Ar), 1,22 l/min; čerpadlo rozprašovača, 0,1 ot./s; a teplota rozprašovacej komory 2 °C.

Ortuť bola analyzovaná atómovou absorpčnou spektrometriou s použitím jednoúčelového atómového absorpčného spektrometra AMA-254 (Altec, Praha, Česká republika).

Údaje sme analyzovali pomocou GraphPad Prism 8.3.0 (538) 2019 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA) s použitím dvojcestnej analýzy variancie (ANOVA). Model zahŕňal geografický pôvod kávy, typ kávy (zelená, pražená) a ich interakciu (pôvod × typ). Rozdiely medzi zelenou a praženou kávou a medzi jednotlivými kávami z rôznych geografických regiónov boli významné pri $p < 0,05$.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Kávovníky absorbujú a dlhodobo uchovávajú ťažké kovy a ich obsah je zvyčajne oveľa vyšší vo vegetatívnych zložkách ako v zrnách (Hecimovic a kol. 2011). Napriek tomu je hodnotenie obsahu ťažkých kovov v káve veľmi dôležité, pretože existujú významné rozdiely medzi rôznymi geografickými regiónmi. Výskyt ťažkých kovov v potravinách môže byť ovplyvnený viacerými faktormi, ako je pH pôdy, kapacita výmeny katiónov, obsah organickej hmoty, textúra pôdy a interakcie medzi prvkami (Jung 2008).

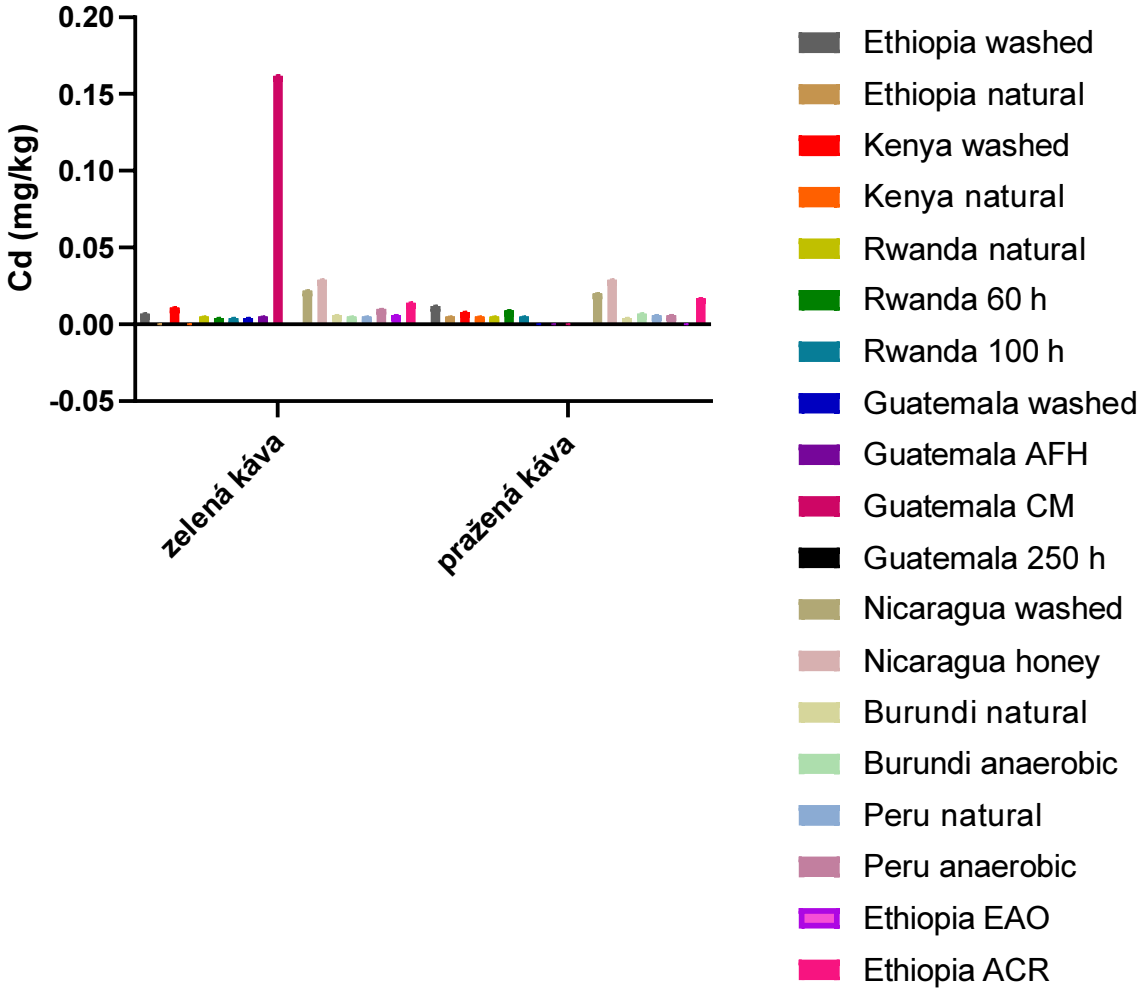
Štúdie, ktoré sa zaoberajú obsahom ťažkých kovov v zelenej káve sú limitované, ale ich výsledky sú väčšinou v súlade s našimi výsledkami (Jeszka-Skowron, Stanisz, De Peña 2016, Şemen a kol. 2017, Endaye a kol. 2020). Zistilo sa, že obsah niektorých ťažkých kovov v zelených kávach sa po upražení mení v závislosti od stupňa praženia, ale ich koncentrácie zostávajú v rámci odporúčaných limitov (Adler, Nędzarek, Tórz 2019). V našom experimente, malo praženie kávy významný vplyv ($p < 0.001$) na obsah Hg, Al, Ni, Cd a Pb. Kadmium bolo najvyššie v zelených Etiópskych kávach (obrázok č. 1).

Obsah kadmia bol vyšší v porovnaní s inými štúdiami (Jeszka-Skowron, Stanisz, De Peña 2016, Şemen a kol. 2017, Endaye a kol. 2020, Adler, Nędzarek, Tórz 2019, Winiarska-Mieczan a kol. 2023). Všeobecne sa však obsah Cd stanovuje v káve len zriedka v porovnaní s inými ťažkými kovmi, pretože obsah je relatívne nízky, čo bolo potvrdené aj pri ostatných vzorkách káv v našom pokuse. Dôvod významného rozdielu ($p < 0,001$) medzi obsahom Cd v Etiópskej káve a ostatnými kávami zostáva neznámy.

Je zrejmé, že obsah ťažkých kovov vrátane Cd je v prírode 55-krát vyšší v Južnej Amerike ako v Severnej Amerike, pričom hlavnými zdrojmi znečistenia sú zvetrávanie hornín, hnojivá, pesticídy, ťažba a priemyselná výroba (Zhou a kol. 2020). Kadmium je napriek tomu kontaminant, ktorý sa môže hromadiť v životnom prostredí s dobrou koreláciou medzi pôdou a rastlinami (Genchi a kol. 2020). Avšak odhadovaný príjem Cd z kávových nápojov je relatívne nízky (Magri a kol. 2021). Je zaujímavé, že niektoré štúdie podporujú používanie odpadovej

kávovej usadeniny ako účinného a ekonomického adsorbenta na odstraňovanie kadmia, olova a pravdepodobne aj iných druhov kovov z priemyselnej aj pitnej vody (Lavecchia a kol. 2016, Patterer a kol. 2017).

Obrázok č. 1, Obsah kadmia vo výberovej káve z rôznych geografických regiónov

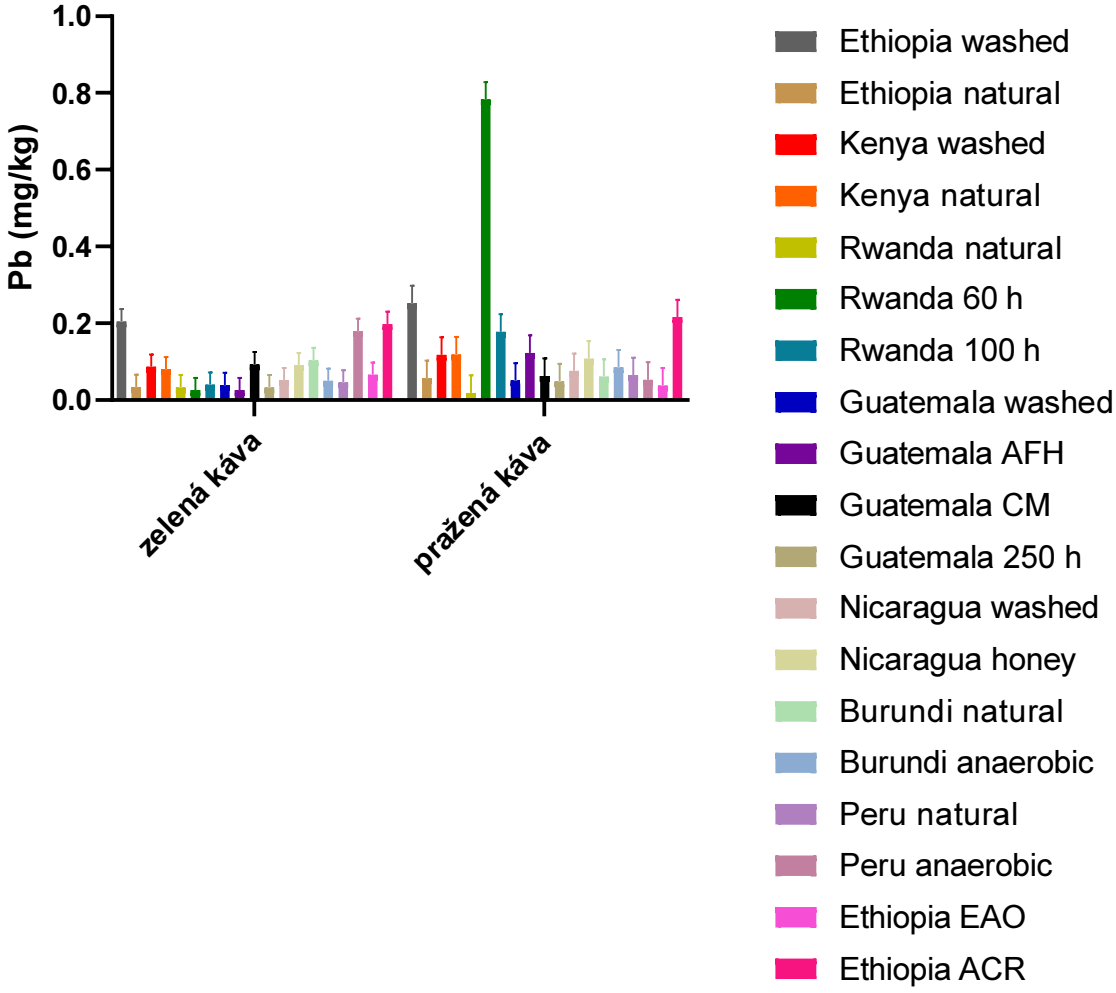


Najvyšší obsah Pb v našej štúdii bol nameraný v praženej káve z Rwandy (obrázok č. 2). Jeho hodnoty sú však podobné ako popisujú iné štúdie (Jeszka-Skowron, Stanisz, De Peña 2016, Şemen a kol. 2017, Winiarska-Mieczan a kol. 2023). Geografický región mal významný vplyv aj na obsah Hg, Al, Ni, Cd , Pb a Cr ($p < 0.001$), avšak hodnoty ťažkých kovov v kávach boli v rámci odporúčaných limitov (Adler, Nędzarek, Tórz 2019).

Hodnotenie obsahu ťažkých kovov pri spracovaní kávy z pohľadu jej kvality a bezpečnosti by malo byť významnou súčasťou analýzy výberovej kávy. Všetky nové informácie týkajúce sa vplyvu rôzneho spracovania kávy by mali viesť k výberu kvalitnej kávy

a zároveň by mali upriamiť pozornosť na dôležitosť geografického regiónu pestovania kávy pre konzumenta.

Obrázok č. 2, Obsah olova vo výberovej káve z rôznych geografických regiónov



ZÁVER

Výsledky našej štúdie vedú k záveru, že geografický pôvod káv, spracovanie a praženie malo významný vplyv na obsah ťažkých kovov vo vybraných kávach. Keďže farmári používajú na hodnotenie kvality výberovej kávy iba senzorické analýzy, je veľmi dôležité kontrolovať aj prítomnosť ťažkých kovov v kávach, ktoré prichádzajú na náš trh. Ťažké kovy sa môžu vyskytovať aj vo výberových kávach, napriek tomu, že sú správne spracované a jemne pražené.

POĎAKOVANIE

Táto práca bola podporená vedeckou grantovou agentúrou Ministerstva školstva, vedy, výskumu a športu SR a Slovenskej akadémie vied (VEGA č. 1/0073/22).

POUŽITÁ LITERATÚRA

1. Adler, G. – Nedzarek, A. – Tórz, A. Concentrations of selected metals (Na, K, Ca, Mg, Fe, Cu, Zn, Al, Ni, Pb, Cd) in coffee. In *Zdravstveno Varstvo*. ISSN 1854-2476, 2019, vol. 58, p. 187-193.
2. Endaye, M et al. Combining multi-element analysis with statistical modelling for tracing the origin of green coffee beans from Amhara region, Ethiopia. In *Biological Trace Element Research.* ISSN 1559-0720, 2020, vol. 195, p. 669-678.
3. Genchi, G. et al. The effects of cadmium toxicity. In *International Journal of Environmental Research and Public Health*. ISSN 1660-4601, 2020, vol. 17, p. 3782.
4. Hecimovic, I. et al. Comparative study of polyphenols and caffeine in different coffee varieties affected by the degree of roasting. In *Food Chemistry*. ISSN 0308-8146, 2011, vol. 129, 991-1000.
5. Jeszka-Skowron, M. – Stanisz, E. – De Peňa, M. P. Relationship between antioxidant capacity, chlorogenic acids and elemental composition of green coffee. In *LWT– Food Science and Technology.* ISSN 0023-6438, 2016, vol. 73, p. 243-250.
6. Lavecchia, R. et al. Lead removal from water by adsorption on spent coffee grounds. In *Chemical Engineering Transactions*. ISSN 2283-9216, 2016, vol. 47, p. 295-300.
7. Magri, E. et al. Cadmium and lead concentrations in yerba mate leaves from agroforestry and plantation systems: An international survey in South America. In *Journal of Food Composition and Analysis,* ISSN 1096-0481, 2021, vol. 96, p. 103702.
8. Jung, M.C. Heavy Metal Concentrations in Soils and Factors Affecting Metal Uptake by Plants in the Vicinity of a Korean Cu-W Mine. In *Sensors*. ISSN 1424-8220, vol. 8(4), p. 2413-2423
9. Patterer, S. et al. Cadmium removal from aqueous solution by adsorption on spent coffee grounds. In *Chemical Engineering Transactions*. ISSN 2283-9216, 2017, vol. 60, p. 157-162.
10. Pigozzi, M.T. – Passos, F.R. – Mendes, F.Q. Quality of Commercial Coffees: Heavy Metal and Ash Contents. In *Journal of Food Quality*. ISSN 17454557, 2018, vol. 2018, Article ID 5908463.

11. Reis, A.R. et al. Antioxidant metabolism in coffee (Coffea arabica L.) plants in response to nitrogen supply. In *Theoretical and Experimental Plant Physiology.* ISSN 21970025, 2015, vol. 27, p. 203-213.
12. Şemen, S. et al. Elemental composition of green coffee and its contribution to dietary intake. In *Food Chemistry*. ISSN 2590-1575, 2017, vol. 215, p. 92-100.
13. Várady, M. et al. Heavy-metal contents and the impact of roasting on polyphenols, caffeine, and acrylamide in specialty coffee beans. In *Foods*. ISSN 2304-8158, 2021, vol. 10, no. 6, art. no. 1310, p. 1-14.
14. Vegro, C.L.R. – de Almeida, L.F. Chapter 1 - Global coffee market: Socio-economic and cultural dynamics. In *Coffee Consumption and Industry Strategies in Brazil*. ISBN 978-0-12-814721-4, 2020, p. 3-19.
15. Winiarska-Mieczan, A. et al. Cadmium and Lead Concentration in Drinking Instant Coffee, Instant Coffee Drinks and Coffee Substitutes: Safety and Health Risk Assessment. In *Biological Trace Element Research.* 201, 2023, p. 425-434.
16. Zhou, Q. et al. Total concentrations and sources of heavy metal pollution in global river and lake water bodies from 1972 to 2017. In *Global Ecology and Conservation*. ISSN 2351-9894, 2020, vol. 22, p. e00925

Kontaktná adresa: Várady Matúš, Katedra hygieny, technológie a zdravotnej bezpečnosti potravín, Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie, Komenského 73, 041 81 Košice, Slovenská republika. E-mail: varadymatus@gmail.com

HODNOTENIE HYGIENICKÉHO REŽIMU V SYRÁRNI

ASSESSMENT OF THE HYGIENE REGIME IN CHEESE PRODUCTION

Vargová Mária[1], Zigo František[2], Sasáková Naďa[1], Veszelits Laktičová Katarína[1], Farkašová Zuzana[2], Lacková Zuzana[2]

[1]Katedra verejného veterinárskeho lekárstva a welfare zvierat, Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, Komenského 73, 041 81 Košice; [1]Katedra výživy a chovu zvierat, Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, Komenského 73, Košice

ABSTRACT

The current demands for the production of high-quality and safe food are in the forefront of interest not only of the professional, but also of the consumer public, with an impact on the economy of agricultural production in primary production, but also in the processing company. The health safety of food is the main goal of current food production. Based on the results, it is possible to talk about the good disinfecting effect of disinfectant Hypofoam in 2% concentration in the evaluated premisses. The obtained results point to a satisfactory hygienic level of the evaluated surfaces except results of swabs taken from the pre-pressing tub, where were observed 2,2x10^1 CFU/10cm^2 of total count of bacteria after disinfection and results of swabs from pre-pressing tub and floor with 0,2x10^1 and 0,3x10^1 CFU/10cm^2 of coliform bacteria after disinfection. Hygiene and sanitation in the food industry has a great influence on the quality and durability of food products. This is primarily about maintaining hygiene and cleanliness of production facilities and premises; personal hygiene; hygiene of work tools, warehouses, etc. Observance of general principles of hygiene is one of the basic requirements, valid for every worker in the food industry, regardless of whether he works in food production, in food distribution or in communal catering facilities, as non-observance of hygiene principles can lead to contamination of food and subsequently to danger of public health.

Keywords: hygiene regime, microbiological control, Hypofoam, cheese production

ÚVOD

Bezpečnosť potravín je prioritnou otázkou pre vlády, priemysel, akademickú obec aj spotrebiteľov. Nedostatky v oblasti bezpečnosti potravín súvisia najmä s biologickou, chemickou alebo fyzikálnou kontamináciou (HUDECOVÁ a kol., 2011). POTOKOVÁ (2005) zdôrazňuje predovšetkým otázku mikrobiálnej bezpečnosti potravín. Poukazuje na fakt, že hoci

počet alimentárnych ochorení v posledných rokoch nadobúda klesajúcu tendenciu, napriek tomu je tento počet stále vysoký, čo svedčí o nedodržiavaní hygienických štandardov.

Hygienický režim v mliekarenských prevádzkach vyžaduje nevyhnutné prispôsobenie a úzku nadväznosť na výrobné postupy a technológie, čo zabezpečí zdravotnú neškodnosť produkcie potravín živočíšneho pôvodu a tým rozhodujúcim spôsobom zníži hygienické riziko výroby. Rozsah tohto rizika závisí od niekoľkých faktorov, z ktorých najväčší význam má mikrobiálna kontaminácia vstupných surovín, prídavných ako aj pomocných látok a následná sekundárna kontaminácia všetkých surovín a látok, ktorá vzniká v priebehu ich opracovania a spracovania (STEINHAUSER, 1995).

Dezinfekcia je súbor opatrení zameraných na odstránenie technologicky nežiadúcich a patogénnych mikroorganizmov. Dôsledné vykonanie dezinfekcie bráni vzniku a šíreniu infekčných ochorení (MELICHERČÍKOVÁ, 2007). Pomocou klasickej mikrobiologickej sterovej metódy možno stanoviť druh a počet patogénnych, prípadne podmienečne patogénnych mikroorganizmov (ŠTEFKOVIČOVÁ, 2005).

MATERIÁL A METÓDY

Odber mikrobiologických sterov bol vykonaný v prevádzke pred dezinfekciou a po dezinfekcii pomocou sterilných tampónov z plochy 10 cm^2 do 10 ml sterilného fyziologického roztoku. Následne bola suspenzia naočkovaná na živné agary v množstve 0,1 ml. Platne boli inkubované v termostate, po inkubácii sa vyhodnotili narastené kolónie. Na stanovenie celkových počtov mikroorganizmov (CPM) a koliformných baktérií (KB) bol použitý postup podľa platných ISO noriem. Mäsopeptonový agar (MPA) bol použitý pre stanovenie celkového počtu mikroorganizmov, počas 24 hodinovej kultivácie pri 37 ºC. Na stanovenie koliformných mikroorganizmov bol použitý Endo agar (EA) počas 24 hodinovej kultivácie pri 37 ºC. Jednotlivé druhy mikroorganizmov sú vyjadrené v KTJ (kolónie tvoriace jednotky).

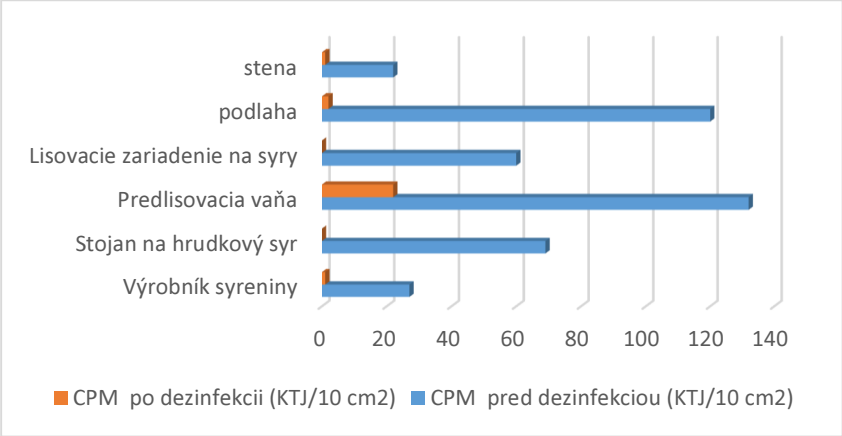
Dezinfekčný prípravok Hypofoam, použitý v 2 % koncentrácii s časovou expozíciou 15 minút, bez zahrievania, aplikovaný postrekom. Hypofoam predstavuje penový čistiaci prostriedok s obsahom chlóru pre dennú sanitáciu v mliekarenskom priemysle. Prípravok ďalej obsahuje hydroxid sodný, chlórnan sodný, sekvestračné látky a tenzidy. Vďaka kombinácii s povrchovo aktívnymi látkami vykazuje výbornú stabilitu peny a tým aj vynikajúcu dezinfekčnú účinnosť. Dobre penetruje aj do silných organických, najmä tukových a bielkovinových nečistôt a usadenín, uvoľňuje ich z povrchov a rozpúšťa ich. Výborne sa osvedčuje pri odstraňovaní tukov, krvi a ostatných organických nečistôt v prevádzkach na spracovanie mäsa a hydiny, na bitúnkoch, v konzervárňach a mliekarňach.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Správna výrobná prax a správna hygienická prax, ako aj vysoká osobná hygiena a zdravotný stav zamestnancov už pri získavaní surového mlieka na farme a ďalej pri jeho spracovaní, môžu napomôcť k zvýšenej bezpečnosti tejto komodity a následne aj produktov. Keďže bezpečné potraviny súvisia s mikrobiologickou čistotou potravinárskych surovín, technologických zariadení, priestorov v rámci výroby i konečných výrobkov, veľký dôraz je kladený na celý komplex zabezpečenia kvality, vrátane hygieny výroby (LOPAŠOVSKÝ a kol., 2006).

V grafe č. 1 sú uvedené priemerné hodnoty CPM na sledovaných povrchoch pred dezinfekciou a po dezinfekcii. Na základe nami získaných výsledkov, pomocou mikrobiologickej kontroly účinnosti dezinfekcie, môžeme konštatovať, že použitý dezinfekčný prostriedok bol dostatočne účinný a zabezpečil požadovanú hygienickú úroveň na sledovaných povrchoch okrem predlisovacej vani, kde po dezinfekcii bolo prítomných 2,2x10^{1} KTJ/10cm^{2}.

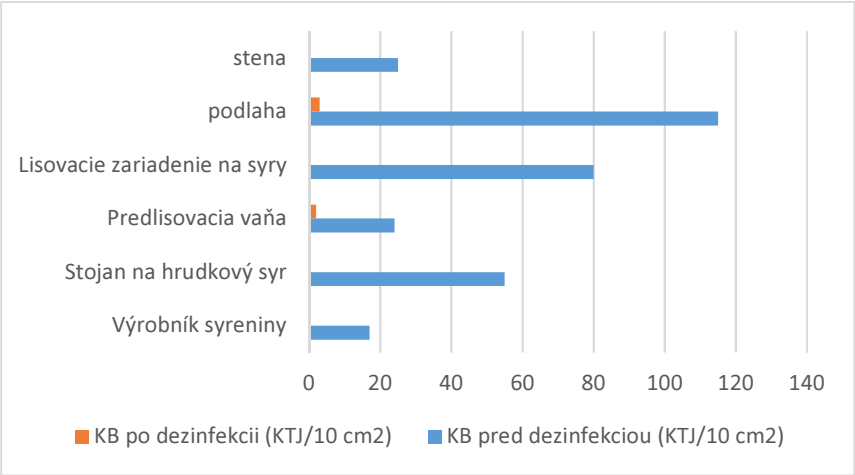
Graf č. 1: Priemerné hodnoty CPM na sledovaných povrchoch pred a po dezinfekcii



V grafe č. 2 sú uvedené priemerné hodnoty KB na sledovaných povrchoch pred dezinfekciou a po dezinfekcii. Na základe výsledkov môžeme hodnotiť dezinfekciu ako dostatočne účinnú na sledovaných povrchoch okrem predlisovacej vani a podlahy, kde po dezinfekcii bolo prítomných 0,2x10^{1} KTJ/10cm^{2} a 0,3x10^{1} KTJ/10cm^{2} koliformných baktérii. Vyšší počet sledovaných mikroorganizmov po dezinfekcii súvisí s nedostatočnou mechanickou očistou ako aj s materiálom vyšetrovaného povrchu. KOREŇOVÁ (2010) uvádza, že prítomnosť kontaminujúcej alebo patogénnej mikroflóry v prostredí potravinárskych prevádzok je závažným zdrojom následnej kontaminácie potravinárskych produktov. Najefektívnejším nástrojom na elimináciu nežiadúcej mikroflóry je správna dezinfekcia a mechanické čistenie výrobného prostredia a zariadení. Mechanická očista patrí medzi významné faktory

ovplyvňujúce účinnosť dezinfekcie, keďže dochádza k poklesu počtu mikroorganizmov až o 90-99 % (VARGOVÁ a kol., 2022).

Graf č. 2: Priemerné hodnoty KB na sledovaných povrchoch pred a po dezinfekcii



ZÁVER

K zabezpečeniu vysokej úrovne hygieny potravinárskej prevádzky je potrebná pravidelná kontrola hygieny v každej fáze výrobného procesu, vrátene kontroly personálnej hygieny. Na základe zistených výsledkov môžeme konštatovať, že dezinfekčný prípravok Hypofoam dosiahol požadovanú devitalizačnú účinnosť v sledovanej prevádzke, avšak jeho účinnosť na predlisovacej vani a podlahe nebola dostatočná z pohľadu prítomnosti CPM a KB po dezinfekcii. Táto skutočnosť poukazuje na nedostatočnú mechanickú očistu a nutnosť opätovného prevedenia dezinfekcie v súvislosti s možnou kontamináciou hotového produktu prostredníctvom kontaminovaných plôch.

POĎAKOVANIE

Táto práca bola podporená grantovou úlohou KEGA č. 009UVLF-4/2021, projektom VEGA 1-0162-23 a projektom SAIA 2022-05-15-001.

POUŽITÁ LITERATÚRA

1. HUDECOVÁ, D., ŠIMKOVIČ, M. *Mikrobiológia*. Bratislava: Nakladateľstvo STU, 2011. 200 s. ISBN 978-80-227-3600-8.
2. ISO Standard 18593:2004 - Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal methods for sampling techniques from surfaces using contact plates and swabs.
3. ISO Standard 4832:2006 - Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method or the enumeration of coliforms.

4. KOREŇOVÁ, J. *Hodnotenie účinnosti sanitačných prostriedkov na devitalizáciu a odstraňovanie bakteriálneho biofilmu*. Bezpečnosť a kontrola potravín – Zborník prác z medzinárodnej vedeckej konferencie. Nitra: Slovenská poľnohospodárska univerzita, 2010. s. 33 – 38. ISBN 978-80-552-0350-8.
5. LOPAŠOVSKÝ, Ľ., POPELKA, P. *Využitie moderných metód pri monitorovaní hygieny prostredia bitúnku*. Zborník prác z medzinárodnej vedeckej konferencie „ Bezpečnosť a kontrola potravín“. Nitra, 2006. 70 s. ISBN 80-8069-682-0.
6. MELICHERČÍKOVÁ, V. Sterilizace a dezinfekce ve zdravotníctví. Praha, Grada Publishing, 2007. 45-70 s. ISBN 80-7169-442-8.
7. POTOKOVÁ, K. *Ktoré problémy z hľadiska bezpečnosti potravín rezonujú dnes najviac?* Poľnohospodár, 2005. roč. 49, č. 19.
8. STEINHAUSER, L. a kol. *Hygiena a technológia mäsa*. Brno, Spektrum, 1995. s. 109-120, ISBN 80- 900260-4-4.
9. ŠTEFKOVIČOVÁ, M. a kol. *Dezinfekcia a sterilizácia, teória a prax II*, Žilina, 2007. s. 88-90, ISBN 978-80-968243-3-0.
10. VARGOVÁ, M., VESZELITS LAKTIČOVÁ, K., SASÁKOVÁ, N., GREGOVÁ, G., HROMADA, R., SZABÓOVÁ, T. *Hygiena zdravotníckych a farmaceutických zariadení.* Košice, Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, 2022. 193 s. ISBN 978–80–8077–754–8.

Kontaktná adresa: MVDr. Mária Vargová, PhD., Department of Public Veterinary Medicine and Animal Welfare, University of veterinary medicine and pharmacy in Košice, Komenského 73, 04181 Košice, Slovak republic; E-mail: Maria.Vargova@uvlf.sk

VÝSKYT MASTITÍDNYCH PATOGÉNOV V OBDOBÍ ZASÚŠANIA DOJNÍC

OCCURRENCE OF MASTITIS PATHOGENS AT DRY OFF PERIOD IN DAIRY COWS

Vršková Martina[1], Tvarožková Kristína[2], Tančin Vladimír[1, 2], Uhrinčať Michal[1], Mačuhová Lucia[1], Holko Ivan[3]

[1]Odbor systémov chovu, šľachtenia a kvality produktov, VÚŽV Nitra, Národné poľnohospodárske a potravinárske centrum, Hlohovecká 2, 951 41 Lužianky

[2]Ústav chovu zvierat, Fakulta agrobiológie a potravinových zdrojov, Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra

[3]VETSERVIS, s.r.o., Kalvária 3, 949 01 Nitra

ABSTRACT

The aim of the work was to study value somatic cell count and the occurrence of mastitis pathogens before calving by the dairy cows. The Holstein cows suspicious on subclinical mastitis (positive California Mastitis Test) were sampled at quarter level under practical farm with high level of milk yield (11,278 kg). The cows were treated with antibiotics (Cefquinomum) before drying. In total 245 samples before drying and 173 samples after calving from the same dairy cows were collected. The samples were cultured on blood agar (MkB Test as, Rosina, SR). MALDI-TOF MS (Bruker Daltonics, Germany) was used to identify mastitis pathogens. We found the highest representation of the number of somatic cells in the category up to 200x10^3 cells per ml (from 54.84% to 69.35% within individual quarters). Bacteriologically positive (BP) samples from dairy cows before drying were found in 35% of the milk samples. The most frequent pathogens in BP milk samples were coagulase-negative staphylococci (CNS) (77.38%). The most common CNS was *Staphylococcus (S.) xylosus* (32.14%). *S. aureus* was detected in 5.95% of BP samples.

Key words: dairy cows, mastitis, pathogens

ÚVOD

Nariadenie európskeho parlamentu a rady (ES) č. 853/2004 o hygiene potravín živočíšneho pôvodu udáva hraničnú hodnotu počtu somatických buniek (PSB) v 1 ml mlieka ≤ 400 000. Mliekarne posudzujú PSB v triede kvality Q ≤ 300 000 a I. triede kvality do ≤ 400 000 v 1 ml bazénovej vzorky. Tento parameter sa kontroluje pravidelne minimálne dvakrát

mesačne a zo zistených hodnôt sa vypočítavajú geometrické priemery, ktoré sú podkladom na stanovenie ceny surového kravského mlieka.

Mastitídy majú spôsobujú vysoké ekonomické straty, najmä v súvislosti s nepriaznivým vplyvom mastitíd na výšku produkcie mlieka u dojníc a jeho predajnosť, prípadne až pozastavenie dodávky mlieka, liečbu a vyraďovanie kráv (Huijps et al., 2008). Najčastejšie sa v chove dojníc vyskytujú subklinické mastitídy, kde nie sú vizuálne zmeny zdravotného stavu na dojnici ani v mlieku tak zjavné. Pri posudzovaní zdravia stáda dojníc môžeme hodnoty PSB do 200 000 v 1 ml mlieka v bazénovej vzorke charakterizovať ako veľmi dobré až uspokojivé, ale už PSB nad 300 000 signalizuje narušené zdravie stáda (Berry et al., 2006).

Väčšina chovov praktizuje kontrolu úžitkovosti a má tak k dispozícii údaje nielen o výške nádoja a PSB aspoň raz mesačne, ale aj o základných i minoritných zložkách mlieka a môžu posúdiť individuálne metabolický stav zvieraťa.

Legislatíva o používaní antibiotík v prevencii chorôb je v oblasti živočíšnej výroby, vrátane liečby antibiotikami v období zasúšania, čoraz viac obmedzovaná (Kuipers et al., 2016, Piddock, 2016). Cieľom je eliminovať paušálne používanie intramamárnych antibiotík pri zasúšaní a aplikovať ich až po bakteriologickom skríningu s antibiogramom v rámci jednotlivých štvrtiek (Lopes et al., 2019)|. Na bakteriologicky čisté mlieko využiť v čase zasúšania iba mechanické zátky bez liečiv (Higgins et al., 2017, Scherpenzeel et al., 2017).

Cieľom práce bolo zistiť počet somatických buniek u dojníc pred zasušením aj s identifikáciou mastitídnych patogénov.

MATERIÁL A METODIKA

Vzorky sme odoberali na farme v Trenčianskom regióne od júna do novembra 2021, spolu 418 vzoriek. Ide o farmu mliekového dobytka holštajnského plemena s priemernou úžitkovosťou za laktáciu v roku 2021 11 278 l mlieka (n=300 ks dojníc).

Vzorky mlieka sme odoberali od dojníc pred zasušením na základe pozitívneho NK testu na úrovni štvrtiek vemena. Pri pozitívnom výsledku NK testu sme cecok najmä jeho hrot vydezinfikovali 70 % alkoholom a následne oddojili prvé streky do nádoby s čiernym dnom. Z každej pozitívnej štvrtky vemena sme odobrali vzorku mlieka pre bakteriologickú kultiváciu a taktiež vzorku na stanovenie počtu somatických buniek (240 vzoriek mlieka). Vzorky mlieka sme previezli do laboratória na stanovenie počtu somatických buniek a vzorky mlieka pre stanovenie prítomnosti patogénov boli zmrazené až do bakteriologickej analýzy.

Počet somatických buniek sme stanovili na prístroji Somacount 150 (Bentley Instruments, Inc., Chaska, Minnesota, USA). Dojnice sme zaradili do kategórií PSB nasledovne: zdravé do < $200x10^3$ buniek /ml mlieka, 200-$400x10^3$ buniek /ml mlieka a

mastitídne zvieratá > $400x10^3$ buniek /ml mlieka. Uvedená farma paušálne používa intramamárne antibiotiká s účinnou látkou *Cefquinomum*.

Vzorky mlieka pre zistenie prítomnosti a identifikáciu patogénov sme kultivovali na krvnom agare (5 % defibrinovanej ovčej krvi, MkB Test a.s., Rosina, SR) pri teplote 37 °C v aeróbnych podmienkach po dobu 24 – 48 hodín. Narastené kolónie boli rozlíšené na základe morfológie, typu hemolýzy, Gramovho farbenia, eskulin testu, katalázového testu (3 % H_2O_2, Merck, Darmstadt, Germany) a aj cytochrom C oxidáza (Bactident Oxidase, Merck), pričom S. aureus bol predbežne potvrdený pomocou clumbing faktor testu (DiaMondiaL Staph Plus Kit, Germany) (Wente et al., 2016). Na definitívnu identifikáciu baktérií bol použitý prístroj MALDI-TOF MS (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) (Tvarožková et al., 2019).

Vzorka mlieka boli klasifikovaná ako pozitívna pre všetky patogény okrem kontagióznych (*S. aureus, Streptococcus (Str.) agalactiae*), ak bola zaznamenaná prítomnosť aspoň päť kolóniu tvoriacich jednotiek (KTJ/ml) a pre kontagiózne patogény bola vzorka označená ako pozitívna, ak bola identifikovaná minimálne jedna kolóniu tvoriaca jednotka. Vzorka bola klasifikovaná ako kontaminovaná, ak bolo zistených tri a viac druhov patogénov, pričom ani jeden z nich nebol kontagióznym druhom. Pre matematické vyhodnotenie zastúpenia jednotlivých vzoriek a patogénov bol použitý program MS Excel (Office 365).

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Podľa súčasných vedeckých poznatkov je rozsah 20 000 – 100 000 somatických buniek v 1 ml považovaný za fyziologický a nemal by byť prekročený. S nárastom celkového PSB dochádza k nárastu obranných buniek (polymorfných neutrofilných granulocytov, makrofágov, lymfocytov, epiteliálnych buniek). Prvé výsledky ukazujú, že pri zvýšenom PSB sa u akútnych mastitíd zvyšujú polymorfné neutrofilné granulocyty až na 95% a u chronických sa zvyšujú makrofágy (Bradley a Green, 2005). Organizácia FAO v rámci produkcie bezpečných mliečnych potravín odporučila oveľa prísnejšie parametre hygienickej kvality surového kravského mlieka: CPM do 5000 v 1 ml, PSB max. 150 000.

Obdobie sucha je pravdepodobne obdobím, počas ktorého je mliečna žľaza najcitlivejšia na intramamárnu infekciu. Počas involučnej fázy je žľaza plná mlieka, a preto je dosť náchylná na infekciu. Z tohto dôvodu je technika zasúšania a paušálne používanie antibiotík nevyhnutné na prevenciu infekcií v počiatočnom období zasúšania. Niekoľko štúdií ukázalo, že nižšia produkcia mlieka pri zasušení je spojená s menším počtom infekcií v ranom období zasušenia (Schukken et al., 2011).

Obdobie státia na sucho je pre dojnicu veľmi dôležitým obdobím. Dojnici poskytuje možnosť starať sa o rast teľaťa bez produkcie mlieka a umožňuje regeneráciu epitelového

tkaniva mliečnej žľazy pred ďalšou laktáciou. Bez obdobia státia na sucho sa produkcia mlieka za deň zníži, pričom problém s prechodom nezmizne. Dojnice s krátkym obdobím státia na sucho (10 až 40 dní) produkovali v nasledujúcej laktácii výrazne menej mlieka ako kravy s obdobím trvajúcim 40 až 60 dní (Watters et al. 2008).

Nové infekcie vzniknuté v tomto období u kráv neliečených antibiotikami pri zasušení sa pohybujú od 3,8 do 35,1 % štvrtiek s priemerom okolo 10 % (Robert et al. 2006). Zistili sme najvyššie zastúpenie počtu somatických buniek v kategórii do 200x10^3 buniek v ml (od 54,84% až 69,35% v rámci jednotlivých štvrtiek, tab. 1).

Tabuľka č. 1 Frekvencia distribúcie PSB vo vzorkách mlieka z jednotlivých štvrtiek vemena dojníc pred zasušením

	počet vzoriek	frekvencia distribúcie (PSB v 103 buniek/ml) v % zo štvrtiek		
štvrťka	n	< 200	200 - 400	> 400
t				
ľavá zadná	60	63,33	13,33	23,33
ľavá predná	61	62,30	11,48	26,23
pravá predná	62	69,35	12,90	17,74
pravá zadná	62	54,84	19,35	25,81

V súčasnosti u prežúvavcov dominujú „environmentálne“ mastitídy spôsobené patogénnymi baktériami, ktoré ľahko prežívajú v prostredí, najmä koaguláza-negatívne stafylokoky. Na druhom mieste sú infekčné mastitídy spôsobené baktériami *Streptococcus agalactiae* a *Staphylococcus aureus*, ktoré sa šírili z dojnice na dojnicu pri dojení, pomocou dojacieho stroja a boli z veľkej časti eliminované preventívnymi opatreniami.

Zistili sme bakteriologicky pozitívne (BP) vzorky od dojníc pred zasušením v 35 % vzoriek mlieka. Najčastejšími patogénmi vo vzorkách BP mlieka boli koaguláza-negatívne stafylokoky (CNS) (77,38 %). Najčastejším CNS bol *Staphylococcus (S.) xylosuss* (32,14 %, tab.2). *S. aureus* sme zistili v 5,95 % vzoriek BP.

Tabuľka č. 2 Zastúpenie identifikovaných patogénov vo vzorkách mlieka

Patogény	Výskyt pri zasušení (%)
S. aureus	5,95
S. xylosus	32,14
S. chromogenes	29,76
S. epidermidis	7,14
S. haemolyticus	5,95
Str. uberis	4,76
Corynebacterium amycolatum	3,57
Serratia ureilytica	3,57
S. arlettae	2,38
Enterococcus faecalis	1,19
Str. lutetiensis	1,19
Citobacter koseri	1,19
Serratia rubidae	1,19
Escherichia coli	-
Str. sciuri	-

Selektívne ošetrenie ceckov u zasušených dojníc má oproti metóde zasúšania bez antibiotík výhodu, že znižuje nerozvážne používanie antibiotík, zabraňuje bakteriálnej rezistencii, zabezpečuje lepšiu kvalitu mlieka a väčšiu bezpečnosť potravín. Antibiotiká by sa mali používať len na štvrťky so subklinickou mastitídou, pričom mikrobiologická kultivácia na konci laktácie sa vykonáva na úrovni štvrtiek mliečnej žľazy (Lopes et al., 2019). Keďže prevalencia subklinickej mastitídy v stáde, mliekova úžitkovosť kráv a poradie laktácie pred zasušením ovplyvňujú odhad faktorov, ktoré by sa mohli vziať do úvahy pri výbere hraničných hodnôt PSB, napríklad pri zavádzaní selektívneho zasúšania jednotlivých dojníc na farme (Lipkens et al., 2019). Krattley-Roodenburg et al., (2021) odporučili aplikovať antibiotickú liečbu u kráv s vysokým PSB s predchádzajúcimi zdravotnými problémami vemena. Ustajnenie suchostojacich kráv sa javí ako významný faktor ovplyvňujúci PSB, ale vyžaduje si ďalšie štúdium.

ZÁVER

Pre chovateľov dojníc je najväčším problémom rýchla identifikácia „problémových kráv“ a určenie patogénov, ktoré spôsobujú zápaly mliečnych žliaz. Cielená liečba na úrovni štvrtiek vemena s určenou citlivosťou antibiotík na jednotlivé druhy mastitídnych patogénov vyskytujúcich sa v chove, môže pomôcť k zníženiu používania antibiotík v živočíšnej výrobe a predísť vzniku rezistentných kmeňov mikroorganizmov.

POĎAKOVANIE

Tento článok bol vytvorený realizáciou projektu APVV-18-0121 a Operačného programu NUKLEUS číslo 313011V387.

POUŽITÁ LITERATÚRA

1. BERRY D.P., O´BRIEN B., O´CALLAGHAN E.J., O´SULLIVAN K.O., MEANEY W.J.: Temporal trends in bulk tank static cell count and total bacterial count in Irish dairy herds during the past decade. In *J. Dairy Sci*., 2006, 89: 4083-4093
2. BRADLEY A.J., GREEN M.J.: Use and interpretation of static cell count data in dairy cows. In *Practice*, 2005, 27: 310-315.
3. HIGGINS H. M., GOLDING S. E., MOUNCEY J., NANJIANI I., COOK A. J. C.: Understanding veterinarians' prescribing decisions on antibiotic dry cow therapy. In *J Dairy Sci* 2017, 100(4):2909–16. https://doi.org/365 10.3168/jds.2016-11923
4. HUIJPS K., LAM T.J.G.M., HOGEVEEN H. Costs of mastitis: facts and perception. In *J. Dairy Sci*., 2008, 75: p. 113-120.
5. KRATTLEY-ROODENBURG B, HUYBENS L.J, NIELEN M, VAN WERVEN T.: Dry period management and new high somatic cell count during the dry period in Dutch dairy herds under selective dry cow therapy. In *J Dairy Sci*. 2021 Jun;104(6):6975-6984. doi: 10.3168/jds.2020-19133.
6. KUIPERS A, KOOPS W.J, WEMMENHOVE H.: Antibiotic use in dairy herds in the Netherlands from 2005 to 2012. In *J Dairy Sci* 2016; 99(2): 1632–48. https://doi.org/10.3168/jds.2014-8428
7. LIPKENS Z, PIEPERS S, DE VISSCHER A, DE VLIEGHER S.: Evaluation of test-day milk somatic cell count information to predict intramammary infection with major pathogens in dairy cattle at drying off. In *J Dairy Sci*. 2019 May;102(5):4309-4321. doi: 10.3168/jds.2018-15642.
8. LOPES, L. O., LIMA, A. M. C.: Rational Decision On the Use of Antibiotics During the Dry Period in Dairy Cows, doi: https://doi.org/10.1101/667873

9. PIDDOCK L.J.V.: Reflecting on the final report of the O'Neill Review on Antimicrobial Resistance. In *The Lancet Infectious Diseases*. 2016. p. 767–8. https://doi.org/10.1016/S1473-3099(16)30127-X
10. Regulation (EC) No 853/2004 lays down specific rules on the hygiene of food of animal origin for food business operators.
11. SCHERPENZEEL C.G.M., HOGEVEEN H., MAAS L., LAM T.J.G.M.: Economic optimization of selective dry cow treatment. J Dairy Sci [Internet]. In *American Dairy Science Association*; 2017 Feb https://doi.org/370 10.3168/jds.2017-13076
12. WATTERS RD, GUENTHER JN, BRICKNER AE, RASTANI RR, CRUMP PM, CLARK PW, GRUMMER RR. Effects of dry period length on milk production and health of dairy cattle. In *J Dairy Sci*. 2008 Jul;91(7):2595-603.

Kontaktná adresa: Martina Vršková, Odbor systémov chovu, šľachtenia a kvality produktov, VÚŽV Nitra, Národné poľnohospodárske a potravinárske centrum, Hlohovecká 2, 951 41 Lužianky; E-mail: martina.vrskova@nppc.sk

DETEKCIA BAKTÉRIÍ RODU PSEUDOMONAS V SUROVOM KRAVSKOM MLIEKU

DETECTION OF PSEUDOMONAS BACTERIA IN RAW COW'S MILK

Výrostková Jana, Kováčová Mariana, Regecová Ivana, Dudriková Eva, Zahumenská Jana, Hanzelová Zuzana, Gregová Gabriela

Katedra hygieny, technológie a zdravotnej bezpečnosti potravín, Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, Komenského 73, 041 81 Košice, Slovenská republika

ABSTRACT

In samples of raw cow's milk, we focused on detecting the presence of Pseudomonas bacteria, which are an indicator of the hygienic quality of milk and, with their presence, contribute to the development of inflammation of the mammary gland.

The experimental part of the work was carried out in practical conditions on four production farms (PH1, PH2, PH3 and PH4) located in the Slovak Republic in the Abov, Spiš and Zemplín regions. The collection of milk samples was in the period of autumn 2020/ winter 2020/ spring 2021/ summer 2021. A total of 320 individual samples of raw cow's milk were subjected to detailed analysis of quality parameters and microbiological analysis of milk.

A total of 73 isolates of *Pseudomonas* spp. were confirmed by species identification using the PCR method. Identified as follows: *P. putida* (34.25%); *P. fragi* (13.70%); *P. lundenses* (9.59%) and *Pseudomonas* spp. (42.47%).

Key words: milk, *Pseudomonas*; psychrotrophic microorganisms

ÚVOD

Zástupcovia rodu *Pseudomonas* patria medzi Gram-negatívne, aeróbne tyčinky s veľkosťou 0,5 - 1,0 x 1,5 - 5,0 µm. Netvoria spóry, pohyb vykonávajú pomocou jedného alebo viacerých bičíkov, ktoré sú polárne umiestnené. Väčšina zástupcov je oxidáza a kataláza pozitívnych s výnimkou *Pseudomonas oryzihabitans* a *Pseudomonas luteola*. Sú významné z potravinárskeho hľadiska, keďže mnohí zástupcovia prežívajú a rastú pri teplote prostredia okolo 4 °C. Ich negatívny vplyv na kvalitu potravín spočíva v produkcii termostabilných lipolytických a proteolytických enzýmov, vplyvom ktorých dochádza k degradácii tukov a bielkovín s následným kazením potravín (Pilipčinec a kol., 2018).

K hlavým zástupcom spôsobujúcim zápal mliečnej žľazy patrí oportúnny patogén *Pseudomonas aeruginosa,* ktorý okrem mastitídy (klinickej, subklinickej, chronickej) je schopný vyvolať infekciu v ktoromkoľvek tkanive alebo orgáne (Kelly a Wilson, 2016). *Pseudomonas fluorescens* patrí medzi G-negatívne baktérie v tvare tyčiniek, ktoré obývajú pôdu, rastliny a vodné povrchy. *Pseudomonas fluorescens* predstavuje najčastejší druh *Pseudomonas* spp., ktorý spôsobuje kazenie mlieka. Zahŕňa skupinu bežných nepatogénnych saprofytov, vylučuje rozpustný zelenkavý fluorescenčný pigment nazývaný fluoresceín, najmä v podmienkach nízkej dostupnosti železa (Geneshan a Kumar 2005). Kmene *Pseudomonas putida* sú často rezistentné voči viacerým liečivám a klinické izoláty *Pseudomonas putida* sa považujú za environmentálny rezervoár determinantov rezistencie (Molina a kol., 2016). V mliekarenskom priemysle negatívne ovplyvňuje organoleptické vlastnosti mlieka. Môže spôsobiť nepríjemný zápach alebo chuť v pasterizovanom mlieku a iných mliečnych výrobkoch (Whitfield a kol., 2000).

Vo vzorkách surového kravského mlieka sme sa zamerali na stanovenie prítomnosti baktérii rodu *Pseudomonas*, ktoré sú ukazovateľom hygienickej kvality mlieka a môžu sa svojou prítomnosťou spolupodieľať na vzniku zápalu mliečnej žľazy.

MATERIÁL A METODIKA

Zo štyroch produkčných hospodárstiev (PH1 – PH4) bolo odobraných n = 320 vzoriek surového kravského mlieka počas obdobia (jeseň 2020 až leto 2021). Kultivačným mikrobiologickým vyšetrením vzoriek sme získali spolu 151 izolátov.

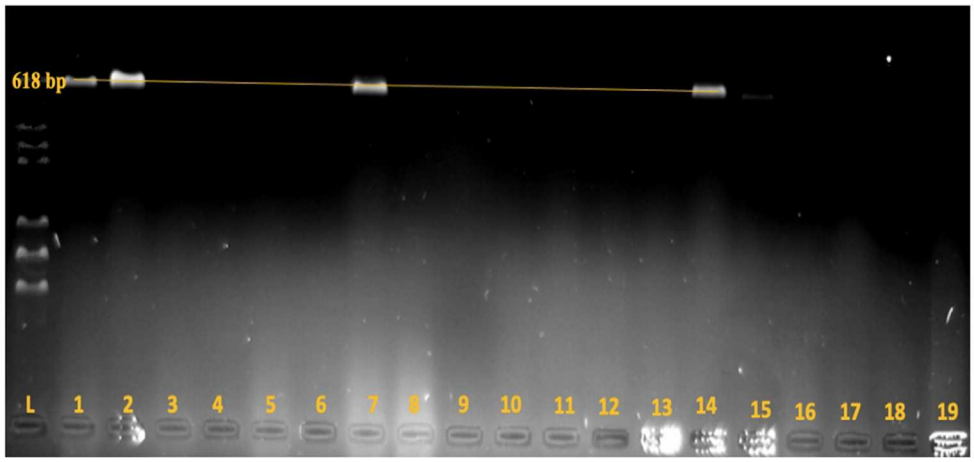
Na identifikáciu rodu *Pseudomonas* ako aj jednotlivých druhov bola použitá metóda PCR podľa Yamamoto a Harayama, 1995; Spilker a kol., 2004; He a kol., 2009; Bedeltavana a kol., 2010; Lurthu a Reetha a kol., 2020.

Ako pozitívna kontrola sa pre PCR boli použité nasledovné referenčné kmene: *Pseudomonas aeruginosa* CCM 1960T, *Pseudomonas fluorescens* CCM 4795, *Pseudomonas fragi* CCM 1974T, *Pseudomonas putida* CCM 7156T, *Pseudomonas lundensis* CCM 3503T (Česká zbierka mikroorganizmov, Brno, Česká republika).

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Prítomnosť 16S rDNA génu, ktorý je typický pre rod *Pseudomonas* spp. bolo pomocou metódy PCR potvrdených 73 izolátov vybranej skupiny mikroorganizmov *Pseudomonas* spp. (Obrázok č. 1).

Obrázok č. 1, Detekcia 16S rDNA génu (618 bp) špecifického pre *Pseudomonas* spp. u izolátov pochádzajúcich zo SKM

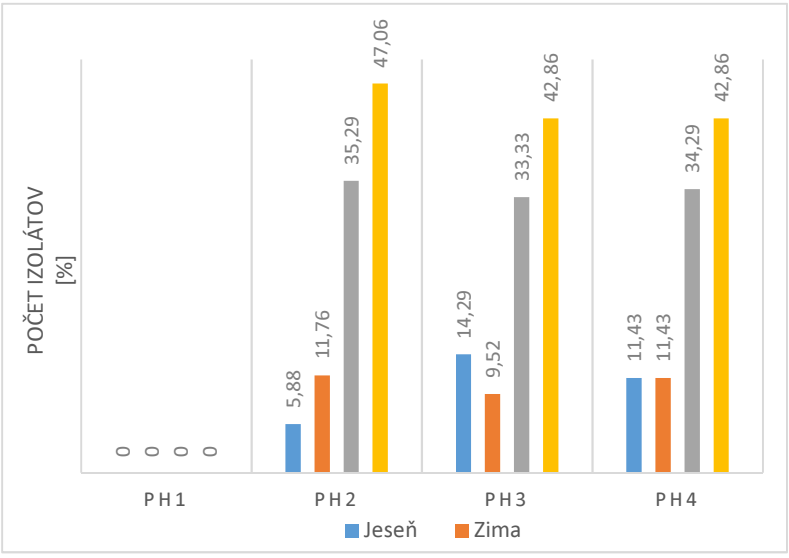


SKM- surové kravské mlieko - štandarda; dráhy: 1 - pozitívna kontrola *Pseudomonas* spp. (CCM); 2, 7, 14 - pozitívne rodovo potvrdené izoláty *Pseudomonas* spp.

Individuálne vzorky mlieka odoberaného z produkčného hospodárstva 1 boli negatívne na stanovenie prítomnosti vybranej skupiny mikroorganizmov *Pseudomonas* spp. počas celého experimentálneho obdobia (0 %). Vo vzorkách mlieka odoberaného z PH2 sme detegovali prítomnosť (23,29 %; 17 izolátov) skupiny *Pseudomonas* spp. V PH3 sme zistili prítomnosť (28,77 %; 21 izolátov) skupiny *Pseudomonas* spp.

Najväčší záchyt mikroorganizmov skupiny *Pseudomonas* spp. sme detegovali v PH4 (47,95 %; 35 izolátov). Zastúpenie izolátov *Pseudomonas* spp. v jednotlivých produkčných hospodárstvach je znázornené v Grafe č. 1.

Graf č. 1, Sezónne zastúpenie kmeňov skupiny *Pseudomonas* spp.

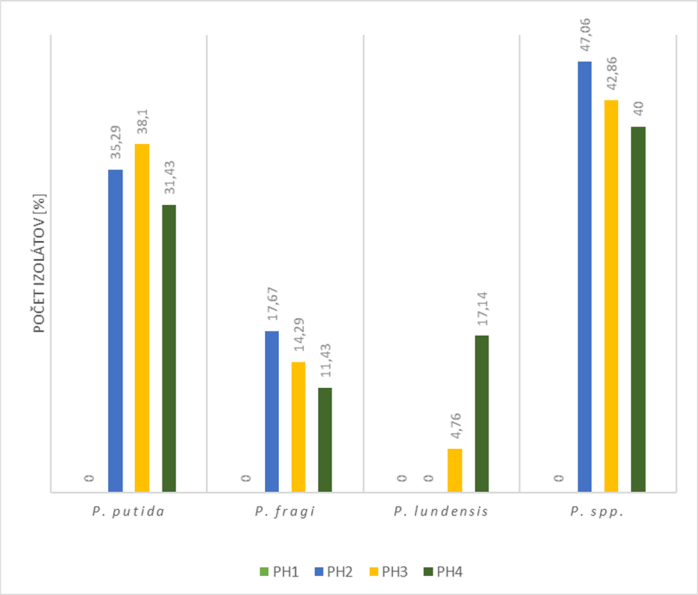


Druhovú identifikáciu izolovaných a potvrdených kmeňov *Pseudomonas* spp. sme vykonali taktiež použitím PCR metódy. Na základe druhovej identifikácie sme určili nasledovné tri druhy vybraných mikroorganizmov skupiny Pseudomonas.

Z celkovo potvrdených 73 kmeňov bolo druhovo identifikovaných: *Pseudomonas putida* (34,25 %; 25 izolátov); *Pseudomonas fragi* (13,70 %; 10 izolátov); *Pseudomonas lundenses* (9,59 %; 7 izolátov). Druhovo nepotvrdený zostalo (42,47 %; 31 izolátov) *Pseudomonas* spp. (Graf č. 9).

Prítomnosť druhov *Pseudomonas aeruginosa* a *Pseudomonas fluorescens* sme nezaznamenali v žiadnej z odobraných vzoriek surového kravského mlieka (0 %).

Graf č. 2, Zastúpenie jednotlivých druhov rodu Pseudomonas vo všetkých 4 produkčných hospodárstvach PH 1 – PH4.



Trieda Gamaproteobaktérií, najmä rod *Pseudomonas*, tvoria významnú časť mikrobioty surového mlieka. Fluorescenčné aj nefluorescenčné pseudomonády sa považujú za hlavnú príčinu kazenia mlieka a iných mliečnych produktov. Navyše rod *Pseudomonas*, iné gamaproteobaktérie, ako je *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Stenotrophomonas*, *Hafnia*, *Rahnella* a *Serratia* boli často detegované v surovom mlieku v štúdiách iných autorov (Vithanage a kol., 2016). Medzi najčastejšie izolované druhy *Pseudomonas* spp. v mlieku a mliečnych výrobkoch patrí: *P. fluorescens*, *P. fragi* a *P. lundensis* (Meng, a kol., 2017).

Tieto informácie o druhovej prevalencií zástupcov rodu *Pseudomonas* potvrdzujú taktiež výsledky našej práce kde sme vyizolovali celkovo (n = 73) izolátov *Pseudomona* spp., ktoré boli druhovo zastúpené nasledovne: *Pseudomonas putida* (34,25 %) *Pseudomonas fragi* (13,70 %); *Pseudomonas lundenses* (9,59 %).

Na základe Sekvenácie PCR Meng et al. (2017), vo svojej práci stanovili, že 42,7 % (n = 61) izolátov pochádzajúcich zo vzoriek mlieka tvoril *P. fluorescens*, dominantný druh *Pseudomonas*. Marchand a kol. (2009) označili, že najčastejšie sa vyskytujúci druh izolovaný z mlieka *P. fragi* a *Pseudomonas lundensis*. Caldera a kol. (2016) detegovali v surovom mlieku tieto druhy *Pseudomonas*: *P. fragi*, *P. gessardii*, P. *proteolytica*, *P. brenneri*, *P. rhodesiae* a *P. peli*.

Svojím zložením vytvára mlieko vhodnú živnú pôdu, ktorá ľahko podlieha mikrobiálnej kontaminácii. Počet psychrotrofných mikroorganizmov predstavuje menej ako 10 % z celkovej mikrobioty v mlieku získanom za hygienických podmienok. Baktérie rodu *Pseudomonas* spp. sa svojou prítomnosťou spolupodieľajú na znížení hygienyckých vlastností mlieka.

ZÁVER

Hoci *Pseudomonas* spp. patria medzi ubiquitárne baktérie, ktoré sú častokrát izolované zo surového mlieka, naše zistenia naznačujú, že druhové zastúpenie baktérii rodu *Pseudomonas* spp. prítomných v mlieku sa v jednotlivých štúdiách značne líšia. Tieto rozdiely môžu vyplývať z regionálnych a environmentálnych rozdielov. Je dôležité sa zamerať na každé produkčné hospodárstvo jednotlivo z dôvodu rozdielnych manažérskych postupov zavedených na úrovni farmy.

POĎAKOVANIE

Táto práca bola podporená projektom KEGA 001 UVLF-4/2022.

POUŽITÁ LITERATÚRA

1. BEDELTAVANA, A., et al. Phenotypic characterizationand PCR-ribotyping of *Pseudomonas fluorescens* isolates, in tracking contamination routes in the production line of pasteurized milk. In *Iranian Journal of Veterinary Research,* ISSN: 17281997, 2010, 11, 3.32: p. 222-232.
2. CALDERA, L. et al. Identification, enzymatic spoilage characterization and proteolytic activity quantification of *Pseudomonas* spp. isolated from different foods, In *Food Microbiology*, 2016, 54, ISSN 0740-0020, p. 142-153.
3. GENESHAN, G., KUMAR, A. *Pseudomonas fluorescens*, a potential bacterial antagonist to control plant diseases. In *Journal of Plant Interactions*. 2005, ISSN 1742-9145, 3, p. 123-134.

4. HE, H. et al. Molecular Analysis of Spoilage-Related Bacteria in Pasteurized Milk during Refrigeration by PCR and Denaturing Gradient Gel Electrophoresis. In *Journal of Food Protection*. ISSN 1944-9097, 2009, vol. 73, p. 572-577
5. KELLY, E. J., WILSON, J. D. *Pseudomonas aeruginosa* mastitis in two goats associated with an essential oil–based teat dip. In *Jurnal of veterinary diagnostic investigation*. 2016, ISSN 1943-4936, 28, p. 760 -762.
6. LURTHU, R., T., R. et al. PCR Based Detection of *Pseudomonas aeruginosa* in Mastitic Cow Milk. In *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences.* 2022 ISSN: 2319-7706 9, 2.
7. MARCHAND, Sophie, et al. Seasonal influence on heat-resistant proteolytic capacity of *Pseudomonas lundensis* and *Pseudomonas fragi*, predominant milk spoilers isolated from Belgian raw milk samples. In *Environmental Microbiology*, 2009, 11.2: 467-482.
8. MENG, L. et al. Antibiotic Resistance Patterns of *Pseudomonas* spp. Isolated From Raw Milk Revealed by Whole Genome Sequencing. In *Front Microbiol.* 2020, 3;11:1005. p. 1-10.
9. MOLINA, Lázaro, et al. Survival of *Pseudomonas putida* KT2440 in soil and in the rhizosphere of plants under greenhouse and environmental conditions. In *Soil Biology and Biochemistry*, 2000, 32.3: p. 315-321.
10. PILIPČINEC, E. et al. *Špeciálna bakteriológia G-negatívne baktérie.* Košice UVLF, 2018. p. 384.
11. SPILKER, Theodore, et al. PCR-based assay for differentiation of *Pseudomonas aeruginosa* from other *Pseudomonas* species recovered from cystic fibrosis patients. In *Journal of clinical microbiology*, 2004, 42.5: 2074-2079.
12. WHITFIELD, F. B. et al., Role of *Yersinia intermedia* and *Pseudomonas putida* in the development of a fruity off-flavour in pasteurized milk. In *Journal of Dairy Research*. ISSN 1469-7629, 2000, vol. 67, p. 561-569.
13. YAMAMOTO A HARAYAMA PHADUNGATH, C. Casein micelle structure: a concise review. In *Songklanakarin Journal of Science and Technology*. ISSN 0125-3395, 2005, vol. 27, p. 201-212.

Kontaktná adresa: Výrostková Jana, Department of Food Hygiene and Technology, University of Veterinary Medicine and Pharmacy in Košice, Komenského 73, 041 81 Košice, Slovak Republic; E-mail: jana.vyrostkova@uvlf.sk

VÝVOJ KŘEHKOSTI A HMOTNOSTNÍCH ZTRÁT GRILOVÁNÍM V PRŮBĚHU ZRÁNÍ MASA BÝKŮ A KRAV PLEMENE GALLOWAY

DEVELOPMENT OF TENDERNESS AND GRILLING WEIGHT LOSS DURING MEAT MATURATION OF GALLOWAY BULLS AND COWS

Zábrodská Blanka, Vepřková Eva

Agrovýzkum Rapotín s.r.o., Výzkumníků 267, 78813, Rapotín, Česká republika

ABSTRACT

Today's consumers are health-conscious and demand high-quality food products, which has resulted in an increasing consumer demand for high-quality meat. The quality of meat and the process of its maturation are therefore currently being given increased attention. The aim of this study was to monitor the differences in tenderness and grilling weight loss between the meat of Galloway cows and bulls during four weeks of maturation. There were use 19 animals for the research, of which ten were bulls and nine were cows. Individual meat samples were matured in a vacuum at 2 °C. During maturation, pH (Testo602-pH2-CONRAD probe), weight loss and tenderness of grilled meat samples were evaluated once a week using a TA.XT. texturometer plus Stable Micor Systems ™ (Warner-Bratzler knife). The meat of Galloway bulls was significantly more tender than the meat of cows ($p \leq 0.01$). It was found that during meat maturation there is a statistically highly significant ($p \leq 0.01$) increase in weight loss by grilling in both bulls and cows. During meat maturation, an increase in meat tenderness was detected in bull‘s meat ($p \leq 0.01$), while in cow‘s meat this increase in tenderness was less pronounced ($p \leq 0.05$). It can therefore be concluded that three weeks is the most suitable time for the meat to mature for optimum tenderness of the meat of cows and bulls of the Galloway breed.

Key words: Galloway, meat, maturation, tenderness, grilling weight loss

ÚVOD

Rostoucí spotřebitelská poptávka po mase vysoké kvality zapříčinila, že je kvalitě masa a procesu jeho zrání v současnosti věnována velká pozornost. Dnešní spotřebitelé jsou zaměřeni na zdraví a požadují vysoce kvalitní potravinářské produkty. Vyžadují libové, vysoce křehké a šťavnaté maso s nízkým obsahem tuku (minimální obsah tuku potřebný k zachování šťavnatosti a chuti) a stálou kvalitu. Kvalitu hovězího masa hodnotí spotřebitelé především na základě jeho senzorických vlastností, a to na základě barvy, vůně, křehkosti (Boleman et al., 1997, Brewer a Novakofski, 2008), šťavnatosti (Lopp a Weber, 2005) a chuti. Téměř 95 % spotřebitelů

rozlišuje kvalitu hovězího masa na základě jeho křehkosti, což z něj činí hlavní charakteristiku konzumace hovězího masa následovanou chutí a šťavnatostí (Bolemana et al., 1997, Lopp a Weber, 2005, Nowak, 2005).

Výsledná kvalita hovězího masa je ovlivněna velkým množstvím parametrů, kdy na kvalitu hovězího masa má významný vliv plemeno zvířete - nejkvalitnější je maso z masného, popř. kombinovaného plemene (Campo et al., 2000, Sañudo et al., 2004, Brown et al, 2016). Purchas a Barton (1976) a Koohmaraie *et al.* (1995) uvádí, že existuje několik plemen (Jersey, Pinzgauer, South Devon a Piemontese), která produkují křehčí maso než jiná plemena. Kvalita masa je také ovlivněna pohlavím zvíře (Pipek et al., 2003, Jeleníková et al., 2008, Zhang et al., 2010) a jeho stářím - optimální je u skotu 18 – 24 měsíců, tzn. „mladý býk“, „jalovice“ (Campo et al., 2000, Sañudo et al., 2004) a druhem masa (hovězí přední, roštěná atd.).

Hanzelková et. al. (2011) provedli studii za účelem stanovení vlivu produkčních faktorů (plemeno, pohlaví) na texturní vlastnosti hovězího masa. Maso bylo získáno z plemen Galloway, Simmental, Charolais, Český strakatý skot a jejich kříženců. Byly zjištěny rozdíly v křehkosti masa mezi jednotlivými plemeny. U masa českého strakatého skotu a Galloway byla zjištěna vyšší křehkost oproti masu Simmentalů, Charolais a křížencům. Maso býků bylo výrazně ($p \leq 0{,}001$) méně křehké než maso jalovic. Dalším z významných parametrů je průběh procesu zrání masa. Během doby od porážky zvířete do konzumace masa musí proběhnout přirozený chemický proces zrání. Posmrtné zrání hovězího masa je totiž nezbytným a běžným procesem pro zlepšení atributů kvality masa tzn. zvýšení křehkosti a zlepšení a zintenzivnění chuti (Ouali, 1990).

Po porážce se maso musí zchladit co nejrychleji, avšak z důvodů zachování vysoké kvality masa (křehkost, šťavnatost) ne příliš rychle. Příliš rychlé zchlazení by způsobilo tuhost a uvolňování vody tzv. cold shortening (Locker a Hagyard, 1963). Po smrti zvířete (během posmrtného ztuhnutí) se ve svalové tkáni odbourávají energetické sloučeniny (glykogen a ATP) a vzniká kyselina mléčná, která přispívá k vyšší trvanlivosti (snižuje se hodnota pH) a lepší chuti. Ke zchlazení musí dojít až po proběhnutí tohoto procesu (tzn. po dosažení konečné hodnoty pH 5,4 – 5,8). Zchlazení masa na příslušnou teplotu (u různých druhů masa na + 3 až + 7 °C) se provádí v případě hovězího masa do 36 h (Nowak, 2005, Dashdorj et al., 2016, Jůzl a Müllerová, 2017).

Při následujícím vlastním procesu zrání masa se mění se struktura svalové a později i pojivové tkáně, probíhá proteolýza klíčových myofibrilárních proteinů, která je hlavním důvodem pro zlepšení křehkosti masa (Koohmaraie, 1994) a vytvářejí se aromatické látky (Resconi, 2013). Zrání probíhá u masa různých druhů zvířat různou rychlostí. U telecího masa je nezbytný proces zrání minimálně týden a u hovězího masa dva týdny. Při průmyslovém

zpracování masa mohou být výjimečně hned po porážce aplikovány různé postupy zkřehčování (elektrostimulace nebo masírování), které pak dobu zrání podstatně zkracují (Duran a Ardic, 2014). V případě zmrazení masa už potřebné biochemické procesy téměř neprobíhají. Dobu zrání však nelze příliš prodlužovat, protože látky vzniklé během zrání podléhají dalším reakcím, dosažené aroma se začne zhoršovat, hrozí rozkladné procesy (hluboká autolýza) a žluknutí (Koohmaraie, 1994).

Proces známý jako mokré nebo vakuové zrání se rozšířil s rozvojem vakuového balení (Dashdorj et al., 2016). Vakuové balení se používá k ochraně masa před zkažením a vysycháním při skladování pro zrání v chladícím prostředí. Mokré zrání však může být úspěšné pouze s nízkými zbytkovými tlaky a regulací teploty při -1 až 2 °C. Mokré zrání je nejdominantnější metodou balení v současném masném průmyslu díky souvisejícím výhodám, pokud jde o ekonomické (výrazné snížení hmotnosti produktu, ztráta odřezků), výrobní (méně potřebného prostoru, přizpůsobitelné automatizaci, efektivní tok produktů) a mikrobiálních faktory (prodloužená údržnost, vynikající chuťové vlastnosti) (Kim et al., 2018). Většina chuťových vlastností masa se se stárnutím za mokra zlepšuje (Dashdorj et al., 2016).

Cílem této studie bylo především sledování rozdílů v křehkosti, ale také v hmotnostních ztrátách grilováním mezi masem krav a býků plemene Galloway v průběhu čtyř týdnů zrání.

MATERIÁL A METODIKA

Za účelem získání vzorků pro analýzu senzorických parametrů masa krav a býků plemene Galloway bylo poraženo 19 zvířat, z toho deset býků a devět krav (Fotografie 1). Zvířata pocházela z provozu VÚCHS Rapotín. Krávy byly chovány semiintenzivním způsobem, v létě pastevně, v zimě ve stáji. Býci byli chováni intenzivním způsobem ve stájovém systému chovu. Průměrný věk býků byl 31 měsíců a průměrná hmotnost 544 kg. Průměrný věk krav byl 92 měsíců a průměrná hmotnost 563 kg. Porážka proběhla na jatkách v Poličce. V tomto provozu probíhalo také chlazení a odběr vzorků masa. Jako vzorky byly použity vždy plátky vysokého roštěnce *M. Longissimus dorsi.* Zrání probíhalo ve vakuu v lednici při konstantní teplotě 2 °C, přičemž každý plátek masa o výšce 2,5 cm byl vakuově zabalen zvlášť. Intervaly zrání byly stanoveny na 7, 14, 21 a 28 dní od porážky. Průměrné hodnoty sušiny (%), bílkovin (%) a tuku (%) masa býků a krav jsou uvedeny v tabulce 1.

Fotografie 1: Galloway - krávy



Tabulka 1: Průměrné hodnoty sušiny (%), bílkovin (%) a tuku (%) masa býků a krav plemene Galloway

Galloway	Sušina %	Bílkoviny %	Tuk %
Býci	26,36 ± 1,18	22,31 ± 0,72	2,41 ± 1,23
Krávy	26,49 ± 1,47	22,53 ± 0,57	2,07 ± 1,06

Před grilováním bylo měřeno pH, měření probíhalo v řezné ploše svalu sondou Testo602-pH2, CONRAQD. Vzorky byly grilovány bez přidaného tuku na oboustranném grilu při vyhřátí grilovacích ploten na teplotu 180°C. Doba grilování vzorku byla 5 minut. Hmotnostní ztráta tepelnou úpravou grilováním byla stanovena vážením vzorků před grilováním a po grilování a následném 5 min okapání. Procentuální hmotnostní ztráta byla spočítána = ((hmotnost masa za syrova – hmotnost po grilování a následném okapání)/hmotnost masa za syrova) x 100. Po odkapání byl plátek nakrájen na cca 5 hranolků o síle 1,5 cm, Střižná síla v kg nutná k přestřižení hranolku masa pro zjištění křehkosti byla měřena pomocí deseti řezů nožem Warner-Bratzler ve tvaru obráceného písmena V na texturometru TA.XT. plus Stable Micro System ™. (Fotografie 2). Rychlost sondy při řezání vzorku byla 3,33 mm.sec^{-s}. U každého vzorku bylo provedeno 10 stanovení střižné síly. Z těchto deseti stanovení byla vypočítána průměrná hodnota.

Fotografie 2: TA.XT texturometr



Pro statistické výpočty byl využit software pro datovou analýzu Microsoft Excel, verze 2016, metoda Studentův T-test.

VÝSLEDKY A DISKUSE

Hodnoty pH, hmotnostní ztráty grilováním (%) a střižné síly (kg) vysokých roštěnců býků (Fotografie 3) a krav plemene Galloway v prvním týdnu mokrého zrání jsou uvedeny v tabulce 2. Variační koeficient pro střižnou sílu masa býků činil 35,11, pro střižnou sílu masa krav činil 31,97. Mezi pH, hmotnostní ztrátou (%) ani střižnou silou (kg) resp. křehkostí masa nebyl mezi masem býků a krav plemene Galloway v prvním týdnu zrání zjištěn statisticky významný rozdíl ($p \geq 0,05$). Hodnoty pH v prvním týdnu zrání se shodují s výsledky Dufka *et. al.* (2018), kteří u vysokého roštěnce kříženců býků plemene Galloway naměřili průměrné pH v prvním týdnu po porážce 5,66 a s prací Huidobra et al. (2003), kteří naměřili u devíti jalovic a osmi býků kříženců plemen Limousin Charolais, Brown Swiss a Avileña-Negra Ibérica pH v prvním týdnu po porážce pH 5,5.

Fotografie 3: Maso býka plemene Galloway v prvním týdnu zrání



Tabulka 2: Hodnoty pH, hmotnostní ztráty (%) a střižné síly (kg) masa býků a krav plemene Galloway v prvním týdnu mokrého zrání

1. týden zrání	pH		Hmotnostní ztráta grilováním (%)		Střižná síla (kg)	
	Býci	Krávy	Býci	Krávy	Býci	Krávy
Průměr	5,6	5,7	28	27	6,28	6,32
SD	0,57	0,35	9,54	5,24	2,33	3,11
MAX	6,4	6,2	53	35	9,33	10,14
MIN	4,3	5,0	20	19	2,85	3,22
MEDIAN	5,7	5,7	25	27	6,51	6,63

Hodnoty pH, hmotnostní ztráty grilováním (%) a střižné síly (kg) vysokých roštěnců býků a krav plemene Galloway v druhém týdnu mokrého zrání jsou uvedeny v tabulce 3. Variační koeficient pro střižnou sílu masa býků činí 43,16, pro střižnou sílu masa krav činí 46,33. Mezi pH, hmotnostní ztrátou (%) ani střižnou silou (kg) resp. křehkostí masa nebyl mezi

masem býků a krav plemene Galloway v druhém týdnu zrání zjištěn statisticky významný rozdíl ($p \geq 0,05$).

Tabulka 3: Hodnoty pH, hmotnostní ztráty (%) a střižné síly (kg) býků a krav plemene Galloway ve druhém týdnu mokrého zrání

2. týden zrání	pH		Hmotnostní ztráta grilováním (%)		Střižná síla (kg)	
	Býci	Krávy	Býci	Krávy	Býci	Krávy
Průměr	5,6	5,6	29	31	4,31	5,05
SD	0,50	0,36	6,48	3,95	1,40	1,61
MAX	6,4	6,2	37	36	7,33	7,58
MIN	4,5	5,0	17	23	2,90	3,27
MEDIAN	5,6	5,5	30	33	3,96	4,42

Hodnoty pH, hmotnostní ztráty grilováním (%) a střižné síly (kg) vysokých roštěnců býků a krav plemene Galloway ve třetím týdnu mokrého zrání jsou uvedeny v tabulce 4. Variační koeficient pro střižnou sílu masa býků činí 37,31, pro střižnou sílu masa krav činí 32,65. Mezi pH a hmotnostní ztrátou (%) nebyl mezi masem býků a krav plemene Galloway ve třetím týdnu zrání zjištěn statisticky významný rozdíl ($p \geq 0,05$). Mezi střižnou silou (kg) resp. křehkostí masa byl mezi masem býků a krav plemene Galloway ve třetím týdnu zrání zjištěn statisticky vysoce významný rozdíl ($p \leq 0,01$).

Tabulka 4: Hodnoty pH, hmotnostní ztráty (%) a střižné síly (kg) býků a krav plemene Galloway ve třetím týdnu mokrého zrání

3. týden zrání	pH		Hmotnostní ztráta grilováním (%)		Střižná síla (kg)	
	Býci	Krávy	Býci	Krávy	Býci	Krávy
Průměr	5,6	5,5	35	34	2,48	4,78
SD	0,77	0,39	4,15	8,48	1,26	1,98
MAX	6,1	5,9	41	55	4,18	6,63
MIN	4,6	4,8	31	26	0,78	2,33
MEDIAN	5,8	5,6	34	32	2,20	4,55

Hodnoty pH, hmotnostní ztráty grilováním (%) a střižné síly (kg) vysokých roštěnců býků (Fotografie 4) a krav plemene Galloway ve čtvrtém týdnu mokrého zrání jsou uvedeny

v tabulce 5. Variační koeficient pro střižnou sílu masa býků činí 43,21, pro střižnou sílu masa krav činí 47,72. Mezi pH a hmotnostní ztrátou (%) nebyl mezi masem býků a krav plemene Galloway ve čtvrtém týdnu zrání zjištěn statisticky významný rozdíl ($p \geq 0,05$). Mezi střižnou silou (kg) resp. křehkostí masa byl mezi masem býků a krav plemene Galloway ve čtvrtém týdnu zrání zjištěn statisticky vysoce významný rozdíl ($p \leq 0,01$).

Tabulka 5: Hodnoty pH, hmotnostní ztráty (%) a střižné síly (kg) býků a krav plemene Galloway ve čtvrtém týdnu mokrého zrání

4. týden zrání	pH		Hmotnostní ztráta grilováním (%)		Střižná síla (kg)	
	Býci	Krávy	Býci	Krávy	Býci	Krávy
Průměr	5,7	5,6	37	36	2,02	4,68
SD	0,24	0,04	7,29	4,58	1,59	2,11
MAX	6,1	5,7	39	42	3,82	5,63
MIN	5,4	5,6	18	26	0,50	1,83
MEDIAN	5,7	5,6	34	32	1,37	4,12

Fotografie č. 4: Maso býka plemene Galloway ve čtvrtém týdnu zrání



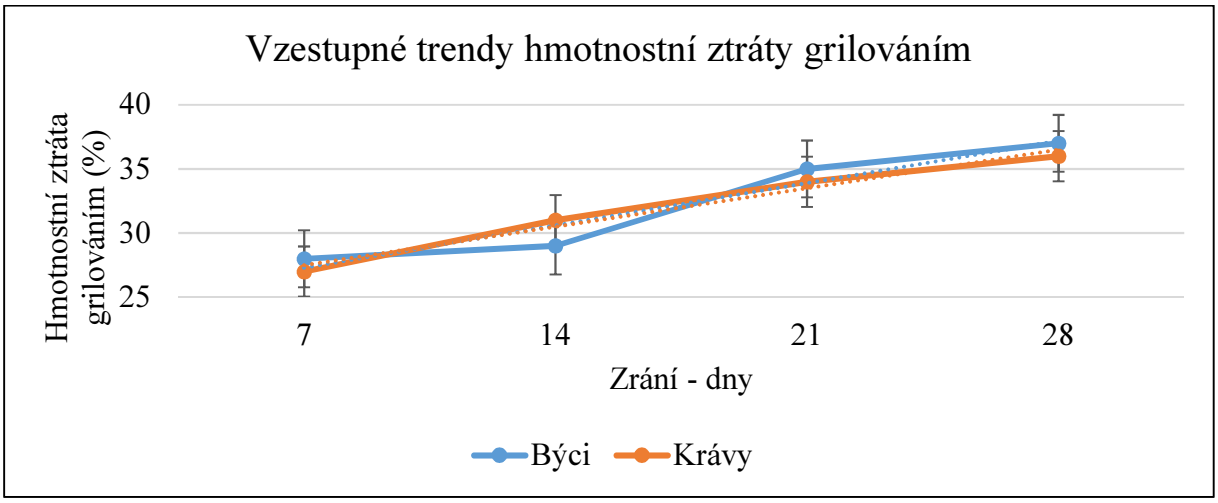
Mezi pH a hmotnostní ztrátou grilováním (%) nebyl mezi masem býků a krav plemene Galloway zjištěn statisticky významný rozdíl ($p \geq 0,05$). Mezi střižnou silou (kg) resp. křehkostí masa byl mezi masem býků a krav plemene Galloway zjištěn statisticky vysoce významný rozdíl ($p \leq 0,01$), maso býků bylo oproti masu krav podstatně křehčí.

U hodnot pH býků a krav plemene Galloway byl zjištěn standardní vývoj změn pH v průběhu zrání masa. V prvním týdnu mokrého zrání byly zjištěny průměrné hodnoty pH masa krav a býků plemene Galloway 5,7, ve druhém týdnu zrání 5,6, ve třetím týdnu mokrého zrání 5,6 a ve čtvrtém týdnu zrání 5,7. Za celé období zrání byla naměřena průměrná hodnota pH u býků a krav 5,61, což je hodnota nižší oproti naměřené průměrné hodnotě pH v práci Dufka et al. (2015), kteří zjistili průměrnou hodnotu pH masa v průběhu čtyř týdnů suchého zrání u plemen Charolais, Limousine a Hereford 5,76.

Průměrná hmotnostní ztráta grilováním masa býků a krav plemene Galloway v prvním týdnu zrání byla 28 %, ve druhém týdnu zrání potom 30 %, ve třetím týdnu zrání 35 % a ve čtvrtém týdnu zrání 37 %. U hmotnostních ztrát grilováním podobných výsledků, s výjimkou posledního týdne zrání masa, dosáhli Dufek *et al.* (2018), kteří hodnotili hmotnostní ztráty grilováním v průběhu čtyř týdnů zrání vysokého roštěnce u kříženců býků plemene Galloway. V průběhu zrání zjistili průměrné hmotnostní ztráty grilováním 30,3 % tři dny po porážce, 32,24 % po dvou týdnech zrání, 33,36 % po třech týdnech zrání a 33,06 % po čtyřech týdnech zrání (max. 43,55 %). Podobných výsledků dosáhli také Hanzelková et al. (2011), kteří studovali zrání masa 72 zvířat (34 býků, 38 jalovic) plemen Galloway, Simmental, Charolais, Český strakatý skot a jejich kříženců. Po porážce zjistili průměrnou hmotnostní ztrátu grilováním 25,3 %, po dvou týdnech zrání 32,2 % a po čtyřech týdnech zrání 32,2 % a po šesti týdnech zrání 34,0 %.

Bylo zjištěno, že v průběhu zrání dochází ke statisticky vysoce významnému ($p \leq 0,01$) nárůstu hmotnostních ztrát grilováním u býků i krav plemene Galloway (Graf 1), což potvrzují výsledky Dufka *et al.* (2018), kteří také zjistili, že u hmotnostních ztrát grilováním masa býků kříženců Galloway v průběhu zrání dochází ke statisticky průkaznému zvyšování ($p \leq 0,01$).

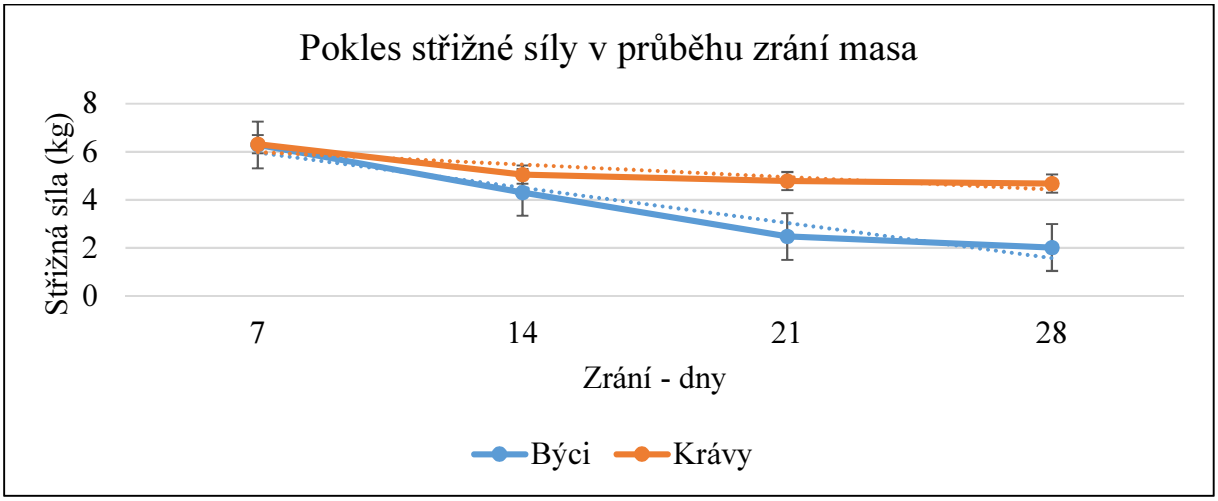
Graf 1. Vzestupné trendy hmotnostní ztráty grilováním (%) v průběhu čtyř týdnů zrání masa býků a krav plemene Galloway



Průměrná hodnota střižné síly vyjadřující křehkost masa u vysokého roštěnce býků a krav plemene Galloway činila v prvním týdnu zrání 6,30 kg, ve druhém týdnu zrání 4,68 kg, ve třetím týdnu zrání potom 3,63 kg a ve čtvrtém týdnu zrání masa 3,35 kg. Průměrná hodnota střižné síly u vysokého roštěnce býků Galloway činila 3,72 kg. Tatum (2006) srovnával kvalitu jatečně upravených těl a charakteristik křehkosti hovězího masa pro několik nejrozšířenějších plemen skotu v produkčních systémech USA. Uvádí, že průměrná střižná síla u býků plemene Aberdeen Angus je 4,0 kg, u plemene Hereford činí 4,1 kg, u Red Angus 4,1 kg, u plemene Charolais 4,3 kg, u plemene Gelbvieh 4,5 kg, u Limusine činí 4,3 kg a u plemene Simental 4,3 kg. Lze tedy konstatovat, že křehkost masa býků plemene Galloway poražených v rámci této studie byla nadprůměrná. Celkově byla zjištěna nižší průměrná střižná síla, resp. vyšší křehkost masa býků Galloway v průběhu mokrého zrání oproti práci Dufka et al. (2015), kteří hodnotili střižnou sílu, resp. křehkost masa (9,26 kg) býků plemen Charolais, Limousine a Hereford v průběhu čtyř týdnů suchého zrání. Průměrná hodnota střižné síly vysokého roštěnce byla u krav vyšší, a to 5,21 kg. Celková průměrná hodnota střižné síly u masa zvířat plemene Galloway činila 4,47 kg. Výsledky se shodují s prací Friedericha et al. (2015), kteří u *Musculus longissimus dorsi* 48 volů plemene Galloway naměřili průměrnou střižnou sílu 4,56 kg. Střižná síla masa Gallowayských krav a býků se také shodovala s průměrnou hodnotou pro hovězí maso naměřenou Dikemanem *et al.* (2005), která činí 4,61 kg (min 3,75 kg), oproti Cainovi *et al.* (2003), kteří uvádí průměrnou hodnotu 7,74 kg, Dufkovi *et al.* (2018), kteří naměřili průměrnou střižnou sílu kříženců Galloway 7,35 kg či Dujkové *et al*. (2016), což potvrzuje nadprůměrnou křehkost masa těchto zvířat. Zvyšující se křehkost masa v průběhu zrání, resp. pokles střižné síly u vysokého roštěnce býků plemene Galloway v průběhu zrání (Graf 2) byl statisticky

vysoce významný ($p \leq 0,01$), což potvrzují práce Dufka et al. (2015) a především Dufka *et al.* (2018), kteří dospěli u kříženců býků plemene Galloway ke stejným závěrům. U masa krav byl tento vzestup křehkosti oproti býkům nižší ($p \leq 0,05$), avšak stále významný (Graf 2).

Graf 2: Pokles střižné síly (%) v průběhu čtyř týdnů zrání masa býků a krav plemene Galloway



V průběhu čtyř týdnů zrání masa došlo ke snížení střižné síly, resp. zvýšení křehkosti masa u býků o 31 % po dvou týdnech zrání, o 60 % po třech týdnech zrání a o 68 % po čtyřech týdnech zrání. U krav došlo ke snížení střižné síly, resp. zvýšení křehkosti masa o 20 % po dvou týdnech zrání, 24,5 % po třech týdnech zrání a o 26 % po čtyřech týdnech zrání. Lze tedy konstatovat, že pokles střižné síly, resp. zvýšení křehkosti masa je podstatně výraznější u býků.

ZÁVĚR

Dnešní spotřebitelé jsou zaměřeni na zdraví a požadují vysoce kvalitní potravinářské produkty, což zapříčinilo rostoucí spotřebitelskou poptávku po vysoce kvalitním mase. Kvalitě masa a procesu jeho zrání je tedy v současnosti věnována zvýšená pozornost. V průběhu čtyř týdnů zrání masa býků a krav plemene Galloway bylo zjištěno, že maso býků je oproti masu krav výrazně křehčí ($p \leq 0,01$), avšak hodnoty pH a hmotnostní ztráta grilováním (%) jsou u masa býků a krav shodné ($p \geq 0,05$). V průběhu zrání masa bylo zjištěno, že dochází ke statisticky vysoce významnému ($p \leq 0,01$) nárůstu hmotnostních ztrát grilováním u býků i krav a u masa býků byl zjištěn velmi výrazný vzestup křehkosti ($p \leq 0,01$), u masa krav byl tento vzestup křehkosti nižší ($p \leq 0,05$). Lze tedy konstatovat, že maso býků plemene Galloway je po procesu zrání masa oproti masu krav podstatně křehčí. Pro optimální křehkost masa krav i býků plemene Galloway je nejvhodnější doba zrání masa tři týdny.

PODĚKOVÁNÍ

Výsledek vznikl za podpory Ministerstva zemědělství, institucionální podpora MZE-RO1223.

POUŽITÁ LITERATURA

1. BOLEMAN, S. J. - BOLEMAN, S. L. - MILLER, R. K. - TAYLOR, J. F. - CROSS, H. R. – WHEELER, T. L. - KOOHMARAIE, M. - SHACKELFORD, S. D. - MILLER, M. F. - WEST, R. L. - JOHNSON, D. D. - SAVELL, J. W. Consumer evaluation of beef of known categories of tenderness. Journal of Animal Science. ISSN 0021-8812, 1997, vol. 75, no 6, p. 1521-1524.
2. BOWN, M. D. - MUIR, P. D. - THOMSON, B. C. Dairy and beef breed effects on beef yield, beef quality and profitability: a review. New Zealand Journal of Agricultural Research. ISSN 00288233, 2016, vol. 59, no. 2, p. 174-184.
3. BREWER, S. - NOVAKOFSKI, J. Consumer sensory evaluations of aging effects on beef quality. Journal of Food Science. ISSN 1750-3841, 2008, vol. 73, no. 1, p. 78-82.
4. CAINE, W. R. - LAALHUS, J. - BEST, D. R. - RDUGAN, M. E. - JEREMIAH, L. E. Relationship of texture profile analysis and Warner-Bratzler shear force with sensory characteristics of beef rib steaks. Meat Science. ISSN 0309-1740, 2003, vol. 64, no. 4, p. 333-339.
5. CAMPO, M. M. – SANTOLARIA, P. – SAÑUDO, C.- LEPETIT, J. – OLLETA, J. L.- PANEA, B. – ALBERTÍ, P. Assessment of breed type and ageing time effects on beef meat quality using two different texture devices. Meat Science. ISSN 0309-1740, 2000, vol. 55, no. 4, p. 371-378.
6. DASHDORJ, D. – TRIPATHI, V. K. – CHO, S. – KIM, Y. – HWANG, I. Dry aging of beef; Review. Journal of Animal Science and Technology. ISSN 2672-0191, 2016, vol. 58, no 20.
7. DIKEMAN, M. E. - POLLAK, E. J. - ZHANG, Z. - MOSER, D. W. - GILL, C. A. - DRESSLER, E. A. Phenotypic ranges and relationships among carcass and meat palatability traits for fourteen cattle breeds, and heritabilities and expected progeny differences for Warner-Bratzler shear force in three beef cattle breeds. Journal of Animal Science. ISSN 0021-8812, 2005, vol. 83, no. 10, p. 2461–2467.
8. DUFEK, A. - VESELÝ, A. - VACÁTKO, E. - LÁTAL, O. Meat quality in two slaughter-age groups of Wagyu-sired bulls from an extensive. Výzkum v chovu skotu. ISSN 0139-7265, 2018, vol. 60, no. 2, p. 13-23.

9. DUFEK, A. - NAVRÁTIL, L. - VACÁTKO, E. - HULOVÁ, I. Zhodnocení křehkosti grilovaného hovězího masa v průběhu suchého zrání u býků tří plemen. Výzkum v chovu skotu. ISSN 0139-7265, 2015, vol. 57, no. 3, p. 2-11.
10. DUJKOVÁ, R. - DUFEK, A. – NAVRÁTIL, L. Křehkost grilovaného, soleného a vyzrálého masa u pěti druhů zvířat. Výzkum v chovu skotu. ISSN 0139-7265, 2016, vol. 58, no. 2, p. 2-8.
11. DURAN, A. – ARDIC, M. Meat tenderness. International Journal of Multidisciplinary Thought. ISSN 2156-6992, 2014, vol. 4, no. 3, p. 259–263.
12. FRIEDRICH, M. S. – SCHIFFER, K. J. – RETZ, S. – STEHLING, C. – SEUß-BAUM, I. – HENSEL, O. The Effect of On-Farm Slaughter via Gunshot and Conventional Slaughter on Sensory and Objective Measures of Beef Quality Parameters. Journal of Food Research. ISSN 1927-0887, 2015, vol. 4, no. 2, p. 1439-1446.
13. HANZELKOVÁ, Š. - SIMEONOVOVÁ, J. – HAMPEL, D. – DUFEK, A. – ŠUBRT, J. The effect of breed, sex and aging time on tenderness of beef meat. Acta Veterinaria Brno. ISSN 0001-7213, 2011, vol. 80, p. 191–196.
14. HUIDOBRO, F. R. - MIGUEL, E. - ONEGA, E. - BLÁZQUEZ B. Changes in meat quality characteristics of bovine meat during the first 6 days post mortem. Meat Science. ISSN 0309-1740, 2003, vol. 65, no. 4, p. 1439-1446.
15. JELENÍKOVÁ, J. – PIPEK, P. – STARUCH, L. The influence of ante mortm treatment relationship between pH and tenderness of beef. Meat Science. ISSN 0309-1740, 2008, vol. 80, p. 870–874.
16. JŮZL, M. – MÜLLEROVÁ, M. Hovězí maso - nedílná součást našeho jídelníčku. Výživa a potraviny. ISSN 1211-846X, 2017, vol. 4, p. 100-104.
17. KIM, Y. H. B. – MEYERS, B. – KIM, H. W. – LICEAGA, A. M. – LEMENAGER, R. P. Effects of stepwise dry/wet-aging and freezing on meat quality of beef loins. Meat Science. ISSN 0309-1740, 2017, vol. 123, p. 57-63.
18. KOOHMARAIE, M. – WHEELER, T. L. – SHACKELFORD, S. D. Beef tenderness: regulation and prediction. Meat Animal Research Center. 1995, vol. 9, p. 1-25.
19. KOOHMARAIE, M. Muscle proteinases and meat aging. Meat Science. ISSN 0309-1740, 1994, vol. 36, no. 1–2, p. 93-104.
20. LOCKER, R. H. - HAGYARD, C. J. A cold shortening effect in beef muscles. Journal of the Science of Food and Agriculture. ISSN 0022-5142, 1963, vol. 14, no. 11, p. 787-793.
21. LOOP, A. - WEBER, H. Untersuchungen zur Optimierung der Zartheit von Rindfleisch. Fleischwirtschaft. ISSN 0015-363X, 2005, vol. 85, no. 3, p. 111-116.

22. NOWAK, D. Enzymes in tenderization of meat - The system of calpains and other systems - a review. Polish Journal of Food and Nutrition Sciences. ISSN 1230-0322, 2011, vol. 61, no 4, p. 231-237.
23. OUALI, A. Meat tenderization: possible causes and mechanisms. a review. Journal of Muscle Foods. ISSN 10460756, 1990, vol. 1, no. 2, p. 129-165.
24. PIPEK, P. – HABERL, A. – JELENÍKOVÁ, J. Influence of slaughterhouse handling on the quality of beef carcasses. Journal of Animal Science. ISSN 0021-8812, 2003, vol. 9, p. 371–378.
25. PURCHAS, R.W. - BARTON, R.A. The tenderness of meat of several breeds of cattle raised under New Zealand pastoral conditions. New Zealand Journal of Agricultural Research. ISSN 1175-8775, 2012, vol. 19, no. 4, p. 421-428.
26. RESCONI, V. C. – ESCUDERO, A. – CAMPO, M. M. The development of aromas in ruminant meat. Molecules. ISSN 1420-3049, 2013, vol. 18, no. 6, p. 6748-6781.
27. SAÑUDO, C. – SMACIE, E. – LOLLETA, J. – VILLARROEL, M. – PANEA, B. – ALBERTÍ P. The effects of slaughter weight, breed type and ageing time on beef meat quality using two different texture devices. Meat Science. ISSN 0309-1740, 2004, vol. 66, no. 4, p. 925-932.
28. TATUM, J. D. (2006): Pre-harvest cattle management practices for enhancing beef tenderness. Executive summary. [On-line]. National Cattlemen's Beef Asociation. [Citováno dne 31.01.2023]. Dostupné z: https://www.agrireseau.net/bovinsboucherie/documents/PreHarvest%20Cattle%20Management%20Practices%20for%20Enhancing%20Beef%20Tenderness.pdf
29. TERJUNG, N. – WITTE, F. – HEINZ, V. The dry aged beef paradox: Why dry aging is sometimes not better than wet aging. Meat Science. ISSN 1873-4138, 2021, vol. 172, no 4.
30. ZHANG, Y. Y. – ZAN, L. S. – WANG, H. B. – XIN, Y. P. – ADOLIGBE, C. M. – UJAN, J. A. Effect of sex on meat quality characteristics of Qinchuan cattle. African Journal of Biotechnology. ISSN: 1684-5315, 2010, vol. 9, no. 28.

Kontaktní adresa: Mgr. Zábrodská Blanka, Ph.D., Agrovýzkum Rapotín s.r.o., Výzkumníků 267, Rapotín, 788 13 Rapotín, Česká republika; E-mail: blanka.zabrodska@vuchs.cz

KONTROLA KVALITY RASTLINNÝCH OLEJOV PROSTREDNÍCTVOM VYBRANÝCH UKAZOVATEĽOV

QUALITY CONTROL OF VEGETABLE OILS THROUGH SELECTED INDICATORS

Zahumenská Jana[1], Ondrašovičová Silvia[2], Gubová Mariana[3], Kováčová Mariana[1]

[1]Katedra hygieny, technológie a zdravotnej bezpečnosti potravín, [2]Katedra biológie a fyziológie, Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, Komenského 73, 041 81 Košice, Slovenská republika

[3]Veterinárny a potravinový ústav Košice, Hlinková 1, 043 65

ABSTRACT

The aim of the work was to evaluate the quality of vegetable oils commonly available in the commercial network. To assess the quality and stability of vegetable oils, we analyzed samples of vegetable oils (n=10) commonly available in commercial networks.

From the physicochemical parameters, we determined the peroxide value (STN EN ISO 3960), the acidity number by titration method (STN ISO 660), the presence of insoluble impurities (STN EN ISO 663) and the amount of water and volatile substances gravimetrically (STN EN ISO 662) using accredited methods. The limits set for refined sunflower, rapeseed and olive oils were not exceeded. During sale and storage, no significant oxidative changes of vegetable oils occurred.

Microbiological examination did not demonstrate the presence of coliform bacteria in any of the ten oil samples (<1x101 KTJ/g).

Key words: vegetable oils, quality, acidity number, peroxide number

ÚVOD

Rastlinné oleje sa získavajú zo semien lisovaním (za vysokého tlaku) a extrakciou (Odstrčil, J., Odstrčilová, M., 2006). Zo semien, ktoré majú nízky obsah oleja sa získava olej priamou extrakciou rozpúšťadlom. Zo semien a plodov s vyšším obsahom oleja sa získava olej dvojnásobným lisovaním, častejšie predlisovaním a potom nasleduje extrakcia (Pelikán, M., Sáková, L., 2001).

Tuky a oleje ľahko podliehajú oxidácii, čo sa prejaví nežiaducimi zmenami. Finálne výrobky aj po výrobe sú vystavené ďalším podmienkam pri skladovaní, preprave a predaji. Tieto vplyvy sa môžu prejaviť zhoršením ich kvalitatívnych parametrov čísla kyslosti a

peroxidového čísla, ako ukazovateľov kazenia tukov a olejov (Sekretár, Schmidt, 2002). Sekretár, Schmidt (2002) uvádzajú, že oxidácia tukov a olejov je ovplyvnená mnohými faktormi (kyslíkom, iónmi ťažkých kovov, svetlom, obsahom farbív, žiarením, peroxidmi, voľnými radikálmi, teplom, enzýmom lipoxygenázou). Oxidácia začína reakciou niektorých aktívnych foriem kyslíka s tukom obsahujúcim polynenasýtené mastné kyseliny. Rozklad tukov ovplyvňuje senzorické vlastnosti ale aj obsah cenných látok. Peroxidové číslo tukov a olejov je optimálne do 10 mmol $O_2.kg^{-1}$ (rafinované oleje) a 20 mmol $O_2.kg^{-1}$ pre panenské oleje.

V názve tukov a olejov možno uvádzať aj označenie „panenský tuk“ alebo „panenský olej”, ak ide o jednodruhové tuky a oleje, ktoré sú získané mechanickými alebo fyzikálnymi technologickými postupmi zo semien, plodov alebo jadier plodov olejnatých rastlín bez špeciálnych rafinačných postupov okrem oleja získaného extrakciou rozpúšťadlami alebo preesterifikáciou. V názve tekutého emulgovaného tuku (pokrmového tuku) možno uvádzať aj slovo „rastlinný“, ak obsahuje najviac 2 hm. % tuku živočíšneho pôvodu z celkového množstva tuku (Vyhláška MP a RV č. 424/2012).

Tabuľka č. 1, Fyzikálne požiadavky a chemické požiadavky na oleje (tuky) a ich zmesi

Druh oleja (tuku)	Číslo kyslosti Najviac (mg KOH/g)	Peroxidové číslo najviac (mmol O/kg)	Množstvo vody a prchavých látok pri 105 °C (%)	Množstvo nerozpustných nečistôt (%)	Množstvo mydiel (%)
Rafinované oleje (tuky)	0,6	10	Najviac 0,2	Najviac 0,05	Najviac 0,005
Panenské oleje (tuky)	4	15	Najviac 0,2	Najviac 0,05	Negatívne
Panenský palmový tuk	10	15	Najviac 0,2	Najviac 0,05	negatívne

Zdroj:Vyhláška MP SR č. 424/2012 Z. z.; upravená

MATERIÁL A METODIKA

Na posúdenie kvality a stability rastlinných olejov sme analyzovali vzorky rastlinných olejov (n=10) bežne dostupných v obchodných sieťach (repkový, slnečnicový, olivový olej). Vzorky boli podrobené fyzikálno-chemickému vyšetreniu na Veterinárnom a potravinovom ústave v Košiciach. Z fyzikálnochemických veličín sme stanovili akreditovanými metódami peroxidové číslo (STN EN ISO 3960), číslo kyslosti (STN ISO 660), prítomnosť nerozpustných nečistôt (STN EN ISO 663) a množstvo vody a prchavých látok (STN EN ISO 662).

Mikrobiologické vyšetrenie (koliformné baktérie, mikroskopicky vláknité huby) sme uskutočnili na UVLF v Košiciach.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Mikrobiologickým vyšetrením (STN ISO 4832, STN ISO 21527-2) nebola preukázaná prítomnosť koliformných baktérií v žiadnej z desiatich vzoriek olejov ($<1x10^1$ KTJ/g). Rovnako nebola potvrdená prítomnosť mikroskopicky vláknitých húb nad ich stanovený limit ($<1x10^2$ KTJ/g).

Číslo kyslosti je dané množstvom KOH (mg) potrebného na neutralizáciu voľných mastných kyselín v 1 g tuku. Voľné mastné kyseliny vznikajú sekundárnym enzymatickým štiepením triacylglycerolov, ktorých množstvo býva vyššie v tukoch z nevhodne skladovaných a manipulovaných surovín (Koman et al., 1989)

Hodnota čísla kyslosti u rafinovaného repkového oleja (vzorka č. 4) bola najvyššia spomedzi všetkých vzoriek (1,20) avšak žiadna zo vzoriek nemala prekročený limit. Najnižšia hodnota čísla kyslosti bola stanovená u vzorky č. 2 (slnečnicový olej) a vzorky č. 3 (0,05 mg KOH.g-1) a maximálna hodnota u vzorky č. 5 - repkový olej (1,20 mg $KOH.g^{-1}$).

Nepotvrdili sa nám výsledky Marečka a kol. (2010), že najvyššie hodnoty boli stanovené pri olivových olejov. Žiadne výsledky neprekročili hodnoty poukazujúce na zmeny olejov.

Najvyššia hodnota **peroxidového čísla** bola u vzorky č. 7 (3,6 mmol/kg) a č. 8 (3,9 mmol/kg). V oboch prípadoch išlo o slnečnicový olej nerafinovaný pôvodom zo Slovenska a z Ukrajiny. Výsledky však poukázali, že v žiadnej vzorke nedošlo k rozkladným procesom. Vyššie hodnoty u olivových olejov (vzorka č. 9, 10) súvisia s ich spôsobom spracovania, lisovaním za studena. Repkový olej je viac ako dvakrát stabilnejší ako slnečnicový olej, čo znamená, že zostáva dlhšie čerstvý a zachováva si vysokú kvalitu (Krzymanski, 2009).

Peroxidové číslo je ukazovateľom oxidácie tukov a olejov. Vyššie hodnoty boli stanovené aj v olivových olejoch (>3,3 mmol/kg). Peroxidové číslo je rozdielne pre jednotlivé druhy olivových olejov v závislosti od spôsobu spracovania. Čím nižšia je hodnota peroxidov v oleji, tým vyšší je podiel prirodzených antioxidantov. Vyšší pomer peroxidov naopak značí, že už prebieha proces žltnutia oleja, a že došlo k degradácii základných prospešných zložiek oleja, najmä vitamínu E, A a D. Oxidácia zhoršuje vlastnosti oleja, pridáva nežiadúce vône a chute.

Nerozpustné nečistoty sú jedným z ďalších dôležitých parametrov, ktoré určujú kvalitu oleja. Sú to látky, ktoré zostávajú v oleji v dôsledku neúplných procesov alebo zlej výroby. Sú to najmä látky ako piesok, zemina, oxidované mastné kyseliny, dusíkaté látky, minerálne látky

a uhľohydráty. Ak je stanovený limit prekročený, olej sa považuje za neštandardný (Eurolab.com, 2023). V tabuľke č. 2 sú uvedené výsledky fyzikálnochemických analýz vyšetrovaných vzoriek.

Tabuľka č. 2, Výsledky akreditovaných skúšok analýzy vybraných vzoriek olejov

Vzorka		Peroxidové číslo [mmol/kg]	Číslo kyslosti [gKOH/g]	Nerozpustné nečistoty [%]	Množstvo vody a prchavých látok [%]
1	**Výsledky**	**1,5**	**0,06**	**0,04**	**0,04**
	Limit max.	10	0,6	0,05	0,2
	U(k=2)	4	3	9	5
2	**Výsledky**	**0,4**	**0,05**	**0,02**	**0,02**
	Limit max.	10	0,6	0,05	0,2
	U(k=2)	4	3	9	5
3	**Výsledky**	**1,5**	**0,05**	**0,01**	**0,07**
	Limit max.	10	0,6	0,05	0,2
	U(k=2)	4	3	9	5
4	**Výsledky**	**3,0**	**0,14**	**0,00**	**0,04**
	Limit max.	10	0,6	0,05	0,2
	U(k=2)	4	3	9	5
5	**Výsledky**	**1,7**	**1,20**	**0,01**	**0,04**
	Limit max.	15	4	0,05	0,2
	U(k=2)	4	3	9	5
6	**Výsledky**	**1,2**	**0,84**	**0,01**	**0,09**
	Limit max.	15	4	0,05	0,2
	U(k=2)	4	3	9	5
7	**Výsledky**	**3,6**	**1,02**	**0,001**	**0,04**
	Limit max.	15	4,0	0,05	0,2
	U(k=2)	4	3	9	5
8	**Výsledky**	**3,9**	**1,1**	**0,001**	**0,04**
	Limit max.	15	4,0	0,05	0,2
	U(k=2)	4	3	9	5
	Výsledky	**3,3**	**0,16**	**0,01**	**0,05**

9	Limit max.	15	4,0	0,05	0,2
	U(k=2)	4	3	9	5
	Výsledky	**3,5**	**0,18**	**0,03**	**0,08**
10	Limit max.	20	2,0	0,05	0,2
	U(k=2)	4	3	9	5
MIN.		0,4	0,05	0,001	0,02
MAX.		3,9	1,20	0,04	0,09
SD		1,16	0,46	0,009	0,02

U(k=2) – rozšírená kombinovaná neistota s faktorom pokrytia 2
1 - slnečnicový olej, UA (1,5 l); 2 - slnečnicový olej, SR (1 l);3 - slnečnicový olej, SR, (1 l); 4 - slnečnicový olej rafinovaný, UA (2 l); 5 - repkový olej 100 % panenský lisovaný za studena, SR (1 l); 6 - slnečnicový panenský olej 100 % lisovaný za studena; 7 - slnečnicový olej nerafinovaný, SR (1 l); 8 - slnečnicový olej nerafinovaný, UA (1 l); 9 - olivový olej, ES (1 l); 10 - panenský olivový olej, ES (0,7 l)

Zdroj: vlastná tabuľka

ZÁVER

Cieľom práce bolo zhodnotiť kvalitu rastlinných olejov bežne dostupných v obchodnej sieti z pohľadu základných chemických ukazovateľov. Počas predaja a skladovania nenastali žiadne výrazné oxidačné zmeny rastlinných olejov. Limity stanovené pre rafinované slnečnicové, repkové oleje a olivové oleje neboli prekročené, čo svedčí o kvalite technologického spracovania a stálosti oleja počas prepravy, skladovania a predaja.

POUŽITÁ LITERATÚRA

1. Eurolab, 2023. Nerozpustné nečistoty. Rozhodnutie. „TS EN ISO 663 Živočíšne a rastlinné tuky a oleje – Stanovenie obsahu nerozpustných nečistôt“. Online [2023.004.05] Dostupné na internete: https://www.laboratuvar.com/sk/gida-analizleri/kimyasal-analizler/cozun-meyen -safsizliklar-tayini
2. KOMAN, V., HOJEROVÁ, J., SCHMIDT, Š. 1989. Chémia a technológia tukov I. Bratislava: SVŠT, 1989, s. 150. ISBN 80-227-0108-4.
3. KRZYMAŃSKI, J. 2009. „Chemické zloženie repkového oleja v porovnaní s inými rastlinnými olejmi”, v: „Repkový olej – nová surovina, nová pravda” Krzymański J. (red.), vyd. PSPO, Warszawa, 2009, s.47-56.
4. ODSTRČIL, J., ODSTRČILOVÁ, M. (2006) *Chemie potravin*. Národní centrum ošetřovatelství a nelékařských zdravotnických oborů. Brno, 164 s., ISBN 80-7013-435-6.

5. PELIKÁN, M., SÁKOVÁ, L. 2001. Jakost a spracování rostlinných produktu, 1. vyd., České Budejovice, 223 s., ISBN 80-7040-502-3.
6. SEKRETÁR. S., SCHMIDT, Š. 2002. Antioxidačná ochrana jedlých tukov a olejov. Zborník referátových a posterových príspevkov z konferencie „Výživa- potraviny-legislatíva“, 17- 19.júna 2002 v Detve, Bratislava, 2002, s. 229-232.
7. VYHLÁŠKA Ministerstva pôdohospodárstva a rozvoja vidieka Slovenskej republiky č. 424 Z. z. zo 14. decembra 2012, ktorou sa ustanovujú požiadavky na jedlé rastlinné tuky a jedlé rastlinné oleje a výrobky z nich.

Kontaktná adresa: Zahumenská Jana, Department of Food Hygiene and Technology, University of Veterinary Medicine and Pharmacy in Košice, Komenského 73, 041 81 Košice, Slovak Republic; E-mail: jana.zahumenska@uvlf.sk

MORFOLOGICKÁ CHARAKTERISTIKA SOMATICKÝCH BUNIEK V KRAVSKOM MLIEKU

MORPHOLOGICAL CHARACTERISTICS OF SOMATIC CELLS IN COW'S MILK

Zahumenská Jana[1], Dudriková Eva[1], Kováčová Mariana[1], Zigo František[2], Paulsen Peter[3], Ondrašovičová Silvia[4]

[1]Katedra hygieny, technológie a zdravotnej bezpečnosti potravín, [2]Katedra výživy a chovu zvierat, [3]Institute of Food Safety, Food Technology and Veterinary Public Health University of Veterinary Medicine Vienna, [4]Katedra biológie a fyziológie, Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, Komenského 73, 041 81 Košice, Slovenská republika

ABSTRACT

The work is focused on the examination of milk samples and the determination of the number of somatic cells through the fluorescence microscopic technique and the subsequent analysis of these cells. From the point of view of the size, type of cells and health status of the animals. Samples (n=320) were taken during four seasons on two production farms (A, B).

The results showed that the size of the somatic cells is not decisive for the occurrence of mastitis, as the differences were small. Statistical significance (p=0.001) was demonstrated between the results in the number of somatic cells for the spring and summer periods. Also in autumn and winter between the number of PSB and cell size (p=0.03).

Key words: numbers of somatic cells, size, mastitis, seasonality

ÚVOD

Mlieko obsahuje viaceré druhy a rozličné počty buniek, ktoré sú veľmi dôležitým kritériom zdravotného stavu vemena a ukazovateľom technologickej, ale aj hygienicko–zdravotnej kvality mlieka (Frančáková, 2005). V mlieku sa nachádzajú bunky samotného vemena (epitelové bunky cisterien, bunky sekrečného epitelu, mliekovodných ciest a bunky z kože vemena) a tiež bunky pochádzajúce z krvného obehu dojnice (leukocyty – monocyty, granulocyty, erytrocyty a lymfocyty).

Somatické bunky obsahujú 75 % leukocytov, t. j. neutrofily, lymfocyty, erytrocyty 25 % epitelových buniek. Somatické bunky sú väčšinou bunky imunitného systému (80 % u neinfikovaných štvrtiek, 99 % u štvrtiek so zápalom mliečnej žľazy). Počet somatických buniek

(PSB) je často používaný na rozlišovanie medzi nakazenými a neinfikovaných štvrťkami. Je všeobecná zhoda medzi zdravotným stavom a zápalovou reakciou na infekciu k nameranému zvýšeniu PSB (Schukken et al., 2003; Sarikaya and Bruckmaier, 2006).

Všetky rozvinuté krajiny používajú počet somatických buniek mlieka ako marker na sledovanie prevalencie mastitídy v stádach dojníc. Spomedzi všetkých rôznych skríningových testov na kvalitu mlieka je práve počet somatických buniek v mlieku najefektívnejšou metódou na detekciu subklinickej formy mastitídy (Alhussein and Dang, 2018). Podľa nariadenia európskeho parlamentu a rady č.853/2004 z 29. apríla 2004, sa ustanovujú osobitné hygienické predpisy pre potraviny živočíšneho pôvodu.

MATERIÁL A METODIKA

Vzorky surového kravského mlieka sme získavali na dvoch produkčných hospodárstvach (Farma A, Farma B) v oblasti Zemplína a Spiša v chovoch s počtom dojníc 150. Chovy boli uzavreté v maštali, chované na hlbokej podstielke.

Vzorky (n = 320) boli odoberané počas štyroch ročných období (40 vzoriek mlieka/1x mesačne) vždy počas ranného dojenia. Vzorky boli ihneď po odbere uskladnené v chladničke a analyzované pomocou mliečneho analyzátora (Lactoscan SCC) na báze fluorescenčnej mikroskopie.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Na základe stanovených cieľov práce sme z celkového počtu 320 vzoriek analyzovali vzorky surového kravského mlieka od dojníc, ktoré boli veterinárne evidované ako úplne zdravé. Z celkového počtu vzoriek bola potvrdená mastitída u 36 % (A = 41 %, B = 32 %). Najvyšší obsah PSB bol analyzovaný v lete u vzorky č. 16 ($1406x10^3$), čím prekročil stanovené limity o 351 % (najviac 400 000 PSB/ml).

Tabuľka č. 1, Štatistické výsledky analýzy merania PSB za obdobie jar a leto

JAR			LETO		
FARMA A	**Počet buniek ($x10^3$)**	**Veľkosť buniek (µm)**	**FARMA B**	**Počet buniek ($x10^3$)**	**Veľkosť buniek (µm)**
min	2	6,34	**min**	4	6
max	1406	10,98	**max**	1936	11,93
Σ	1898,625	8,962	**Σ**	301,031	9,619
SD	395,553	1,851	**SD**	448,825	1,00
TTEST	p=0,003		**TTEST**	p=0,002	

Tabuľka č. 2, Štatistické výsledky analýzy merania PSB za obdobie jeseň a zima

JESEŇ			ZIMA		
FARMA	**Počet buniek**	**Veľkosť**	**FARMA**	**Počet buniek**	**Veľkosť**
min	8	6,63	**min**	6	6,12
max	5441	10,72	**max**	2975	11,05
Σ	639,681	9,383	**Σ**	508,590	8,254
SD	849,763	0,844	**SD**	689,876	2,751
TTEST	p=0,03		**TTEST**	p=0,0004	

Na Farme A bolo potvrdených za obdobie jar 13 vzoriek s klinickou mastitídou (32 %), v troch vzorkách boli prítomné a potvrdené kvasinky (7,5 %). Subklinická mastitída bola potvrdená u štyroch vzoriek (10 %).

Na Farme B vykazovalo klinickú mastitídu päť vzoriek (12,5 %) a tri vzorky so subklinickou mastitídou (7,5 %). V žiadnej vzorke neboli prítomné kvasinky.

Pri komparácii vzoriek odobratých v období jar a leto boli hodnoty PSB vyššie v letnom období (Farma A). V zimnom období bol vyšší PSB na Farme A, na Farme B sa hodnoty PSB začali zvyšovať na konci jesene a zvyšovanie pretrvalo i v zime.

Tiež sme výsledkami potvrdili, že veľkosť somatických buniek vyšetrených v zdravom mlieku sa neodlišuje od somatických buniek v mastitídnom mlieku (6 - 11,93 µm). T. z., že veľkosť somatických buniek nie je rozhodujúca pri zdravotnom stave.

Z výsledkov vyplynulo, že veľkosť somatických buniek nie je rozhodujúca pri výskyte mastitíd, pretože rozdiely boli nepatrné. Bola preukázaná štatistická významnosť (p=0,001) medzi výsledkami v počtoch somatických buniek za jarné a letné obdobie. Taktiež v jeseni a v zime medzi počtom PSB a veľkosťou buniek (p=0,03).

Sharma et al. (2011) uvádzajú, že počet somatických buniek je všeobecne najnižší v zime a najvyšší v letnom období. Tvrdia, že odchýlky v PSB v závislosti od ročného obdobia sú minimálne alebo žiadne. Počas leta počet baktérií narastá hlavne vďaka priaznivým teplotám a vlhkosti prostredia (Harmon, 1994). Najvyššiu hodnotu sme zaznamenali v lete, čo uvádzajú aj autori Drotárová (2015) a Čabák (2019). Existujú rôzne závery, či ročné obdobie ovplyvňuje PSB. Autori ako Vansconcelos a kol. (1997).

ZÁVER

Výsledky nám potvrdili vyšší výskyt mastitíd v letnom období, čo pripisujeme klimatickým podmienkam, nevhodnej podstielke, nedostatočnej zoohygiene, ale aj nevhodnej kŕmnej dávke z kvalitatívneho a kvantitatívneho hľadiska, nakoľko nedostatočná výživa má za

následok zvýšenie počtu somatických buniek v mlieku. Vyšší výskyt mastitíd mohol spôsobiť aj nedostatok tekutín, mikroprvkov a vitamínov, ktoré ovplyvňujú zdravotný stav dojnice, znižujú odolnosť voči infekčným agensom a ovplyvňujú metabolizmus (alkalóza, acidóza). Taktiež i v dôsledku nešetrnej manipulácie s dojacím zariadením môžu vznikať poranenia, vďaka ktorým sa tvorí vhodné prostredie na prenos patogénnych zárodkov.

Naše výsledky práce potvrdili, že na produkciu a kvalitu mlieka významne vplývajú už spomínané vonkajšie a vnútorné faktory.

Výsledky nám potvrdili, že veľkosť somatických buniek v zdravom mlieku sa neodlišuje od somatických buniek nachádzajúcich sa v mastitídnom mlieku. Z našich výsledkov vyplynulo, že veľkosť somatických buniek nie je rozhodujúca pri výskyte mastitíd, pretože rozdiely vo veľkosti buniek boli nepatrné.

POĎAKOVANIE

Práca bola podporená projektom VEGA č. 1/0162/23 (Zníženie používania antibiotík v programoch kontroly mastitíd dojníc) a projektom SAIA č. 2022-05-15-001 (Vplyv patogénov mliečnej žľazy na produkciu a stupeň oxidačného stresu u dojníc).

POUŽITÁ LITERATÚRA

1. ALHUSSIEN, M., DANG A, 2018. Milk somatic cells, factors influencing their release, future prospects, and practical utility in dairy animals: An overview [online]. Dostupné na: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5993762/
2. ČABÁK, A. 2019. Vplyv vybraných faktorov na produkciu a zloženie mlieka dojníc počas celej laktácie na školskom hospodárstve v Trnave. Diplomová práca Nitra: SPU, s. 60.
3. DROTÁROVÁ, S. 2015. Hodnotenie kvality mlieka a zdravia vemena dojníc na vybratom podniku. Diplomová práca, Nitra: SPU, s. 50.
4. FRANČÁKOVÁ et al. 2005. Hodnotenie poľnohospodárskych produktov. ES SPU Nitra, 2005. s. 178. ISBN 80-8069-471-0.
5. HARMON, R. J. Physiology of Mastitis and Factors Affecting Somatic Cell Counts. In Journal Dairy Science, roč. 77, 1994, č. 7
6. KRASZEWSKI, J.: Informácia o účinnosti prípravku Somatic firmy „Biofaktor“ Sp. Z o.o., u kráv produkujúcich mlieko na obmedzenie počtu somatických buniek. Hodnotiaca správa, 2007.

7. NARIADENIE (ES) č. 853/2004 Európskeho parlamentu a Rady z 29. apríla 2004, ktorým sa ustanovujú osobitné hygienické predpisy pre potraviny živočíšneho pôvodu. [online]. 2004 [cit. 2006-02-07]. Štátna veterinárna a potravinová správa SR.
8. RIEKERINK, R. G. M. O. – BARKEMA, H. W. – STRYHN, H. The effect of season on somatic cell count and the incidence of clinical mastitis. In Journal of Dairy Science, ISSN 0022-0302, 2007, vol. 90, no. 4, s. 1704-1715.
9. SARIKAYA, H.- BRUCKMAIER, R. M. 2006. Importance of the sampled milk fraction for the prediction of total quarter somatic cell count. In Journal of Diary Science, roč. 89, 2006, č. 11, s. 4246- 4250.
10. SHARMA, N., SINGH, N. K., & BHADWAL, M. S. (2011). Relationship of somatic cell count and mastitis: An overview. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, *24*(3), 429-438.
11. SCHUKKEN YH, WILSON DJ, WELCOME F, GARRISON-TIKOFSKY L, GONZALEZ RN. 2003. Monitoring udder health and milk quality using somatic cell counts. Vet Res. 2003 Sep-Oct;34(5):579-96. doi: 10.1051/vetres:2003028. PMID: 14556696.
12. ZAJÁC, P. 2006. Optimalizácia referenčnej metódy stanovenia počtu somatických buniek v surovom kravskom mlieku. Dizertačná práca. Nitra: Slovenská poľnohospodárska univerzita, 2006. 226 s.

Kontaktná adresa: MVDr. Zahumenská Jana PhD., Department of Food Hygiene and Technology, University of Veterinary Medicine and Pharmacy in Košice, Komenského 73, 041 81 Košice, Slovak Republic; E-mail: jana.zahumenska@uvlf.sk

PRÍRUČKY SPRÁVNEJ HYGIENICKEJ PRAXE PRE MLIEKARENSKÝ SEKTOR V SLOVENSKEJ REPUBLIKE

GUIDES OF GOOD HYGIENIC PRACTICE FOR THE DAIRY SECTOR IN THE SLOVAK REPUBLIC

Zajác Peter, Čapla Jozef

Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre, Fakulta biotechnológie a potravinárstva, Ústav potravinárstva, Katedra hygieny a bezpečnosti potravín, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovenská republika

ABSTRACT

Regulation (EC) No 852/2004 of the European Parliament and of the Council on the hygiene of foodstuffs states that "the guides to good practice are a valuable instrument to aid food business operators at all levels of the food chain with compliance with food hygiene rules and with the application of the HACCP principles. The Member States shall forward to the Commission national guides complying with the requirements of this regulation. The Commission set up and run a registration system for such guides and make it available to all Member States. In Slovakia there are several guides to good practice for dairy sector registered in European Commission.

Key words: good hygienic practice, milk, dairy product

ÚVOD

Jedným zo základných cieľov potravinového práva, ako je ustanovené v Nariadení (ES) č. 178/2002 Európskeho parlamentu a Rady z 28. januára 2002, ktorým sa ustanovujú všeobecné zásady a požiadavky potravinového práva, zriaďuje Európsky úrad pre bezpečnosť potravín a stanovujú postupy v záležitostiach bezpečnosti potravín je snaha o vysokú úroveň ochrany ľudského života a zdravia. Jedným z nástrojov, ako uvedený cieľ dosiahnuť je implementovať správnu hygienickú prax a trvalé postupy založené na zásadách HACCP. Nariadenie (ES) č. 852/2004 z 29. apríla 2004 o hygiene potravín v platnom znení ustanovuje, že požiadavky na HACCP musia poskytovať dostatočnú flexibilitu vo všetkých situáciách. Príručky správnej praxe sú cenným nástrojom, ktorý má pomôcť prevádzkovateľom potravinárskych podnikov na všetkých úrovniach potravinového reťazca s dodržiavaním s predpisov o hygiene potravín a s uplatňovaním zásad HACCP. Príručky sa môžu aplikovať najmä tam, kde výroba prebieha v súlade s postupmi, ktoré sú dobre známe, zaužívané. V súlade

s nariadením Európskeho parlamentu a Rady (ES) č. 852/2004 o hygiene potravín členské štáty podporujú vypracovanie vnútroštátnych príručiek správnej hygienickej praxe a na uplatňovanie zásad HACCP. Príručky správnej hygienickej praxe vypracúvajú a šíria združenia potravinárskych podnikov. Vypracované príručky sú posudzované orgánmi úradnej kontroly v rámci svojej pôsobnosti a po zapracovaní ich pripomienok ministerstvo notifikuje príručky na Európsku komisiu, ktorá uverejňuje zoznam národných príručiek na svojej stránke **(EU, 2023)**. Zoznam národných príručiek Správnej hygienickej praxe vedie aj Ministerstvo pôdohospodárstva a rozvoja vidieka SR na svojej stránke **(MPRV SR, 2023)**. Slovenská republika má aktuálne zaregistrované tri príručky **(Zajác, Čapla a Golian, 2017a; Zajác, Čapla a Golian, 2017b; CVOSvT, 2008)**; štvrtá je vo fáze vydania **(Zajác et al., 2023)**.

ODPORÚČANIA PRE PRÍRUČKY SPRÁVNEJ HYGIENICKEJ PRAXE

1. Vnútroštátne príručky a príručky spoločenstva majú obsahovať usmernenia správnej hygienickej praxe na kontrolu nebezpečenstiev v prvovýrobe a súvisiacich operáciách.

2. Príručky správnej hygienickej praxe majú zahŕňať vhodné informácie o nebezpečenstvách, ktoré môžu vznikať v prvovýrobe a súvisiacich operáciách a opatrenia na kontrolu nebezpečenstiev vrátane príslušných opatrení ustanovených v právnych predpisoch spoločenstva a vo vnútroštátnych právnych predpisoch alebo vo vnútroštátnych programoch a v programoch spoločenstva. Príklady týchto nebezpečenstiev a opatrení môžu zahŕňať:

a) kontrolu kontaminácie, akou sú mykotoxíny, ťažké kovy a rádioaktívne materiály;

b) používanie vody, organického odpadu a hnojív;

c) správne a vhodné používanie prípravkov na ochranu rastlín a biocídov a ich vysledovateľnosť;

d) správne a vhodné používanie veterinárnych liekov a doplnkových látok do krmív a ich vysledovateľnosť;

e) príprava, skladovanie, používanie a vysledovateľnosť krmiva;

f) náležitá likvidácia mŕtvych zvierat, odpadu a podstielky;

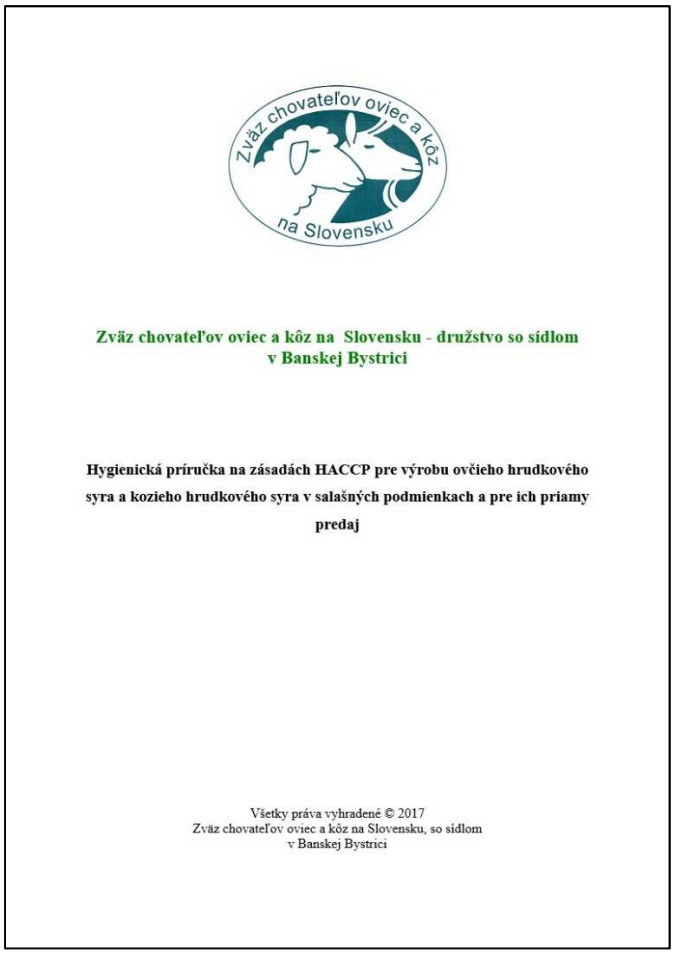
g) ochranné opatrenia na zabránenie zavlečeniu nákazlivých ochorení prenosných prostredníctvom potravín na ľudí a akúkoľvek povinnosť informovať príslušný orgán;

h) postupy, praktiky a metódy na zabezpečenie toho, aby sa potraviny vyrábali, manipulovalo sa s nimi, balili sa, skladovali a prepravovali sa za vhodných hygienických podmienok vrátane účinného čistenia a kontroly škodcov;

i) opatrenia, ktoré sa týkajú čistoty zvierat na zabitie a produkčných zvierat;

j) opatrenia, ktoré sa týkajú vedenia záznamov.

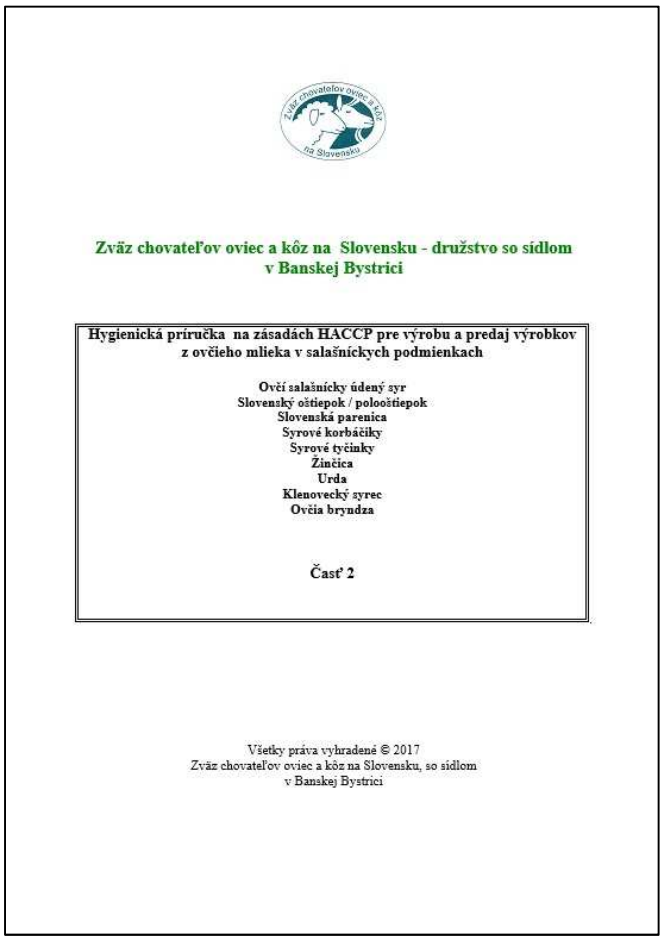
HYGIENICKÁ PRÍRUČKA NA ZÁSADÁCH HACCP PRE VÝROBU OVČIEHO HRUDKOVÉHO SYRA A KOZIEHO HRUDKOVÉHO SYRA V SALAŠNÝCH PODMIENKACH A PRE ICH PRIAMY PREDAJ



Hygienickú príručka obsahuje opísané špecifické požiadavky na výrobu ovčieho hrudkového syra a kozieho hrudkového syra salašníckym spôsobom. Príručka v rámci systému HACCP obsahuje hodnotenia rizika pre technologické procesy ako dojenie, manipulácia s mliekom, tepelné ošetrenie mlieka, výroba syru až po predaj. Na vypracovaní Hygienickej príručky pre výrobu ovčieho a kozieho hrudkového syra v salašných podmienkach sa podieľali: Zväz chovateľov oviec a kôz na Slovensku – družstvo, Štátny veterinárny a potravinový ústav a Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre, Fakulta biotechnológie a potravinárstva, Katedra hygieny a bezpečnosti potravín. Rok vydania: 2017. V rámci tejto hygienickej príručky sú uvedené zdravotné požiadavky na ovce a kozy, ovčie a kozie mlieko, požiadavky na zamestnancov, zdravotný stav osôb, osobná hygiena pred dojením, osobná hygiena pred výrobou a manipuláciou s mliekom, syreninou alebo syrom, požiadavky na kolibu a priestory v nej – založené na všeobecných ustanoveniach pre prvovýrobu a súvisiacich činnostiach, požiadavky na zdroj pitnej vody, hygiena v stacionárnej kolibe vybavenej elektrickým prúdom (salaš sa obyčajne nachádza bližšie k dedine), hygienické podmienky stacionárnej koliby v horskej oblasti, hygienické podmienky v mobilnej kolibe na salaši v horskej oblasti, hygiena prostredia, hygiena pracovných pomôcok, náradia, náčinia a zariadenia, sanitácia, kontrola škodcov a hlodavcov, vedľajšie živočíšne produkty a odvodené produkty, fyziológia spúšťania mlieka, dojenie, ručné dojenie, strojové dojenie, technické parametre dojacej súpravy, výroba ovčieho a kozieho hrudkového syra, spracovanie mlieka na hrudku, fermentácia (kysnutie) hrudkového syra, zrenie hrudkového syra, označenie, uchovávanie, expedícia a transport, vedľajšie produkty výroby ovčieho hrudkového syra a kozieho hrudkového syra, sanitačný

program, základné definície k sanitácii, zodpovednosť zamestnancov za sanitáciu, technické zabezpečenie sanitácie, frekvencia čistenia, frekvencia dezinfekcie, postupy čistenia a dezinfekcie, informatívne vývesky, plán HACCP, vysvetlenie základných pojmov, opis výrobku - ovčí a kozí hrudkový syr vyrobený na salaši, organoleptické vlastnosti produktu, jeho zloženie, fyzikálne a chemické požiadavky, mikrobiologické požiadavky, prúdový diagram – výroba hrudkového syra, analýza nebezpečenstva, metodika na hodnotenie rizika, hodnotenie rizika pre technologické procesy, určenie kritických kontrolných bodov (CCP), výsledný formulár plánu HACCP – výroba ovčieho / kozieho hrudkového syra, formuláre na vedenie záznamov, záznam o sanitácii, záznam o dojení, záznam o uchovávaní mlieka v chladiacom tanku, záznam o výrobe syra, záznam o kysnutí syra, záznam o zrení syra, záznam o uchovávaní syra v chladničke, záznam o expedícii **(Zajác, Čapla a Golian, 2017a)**.

HYGIENICKÁ PRÍRUČKA NA ZÁSADÁCH HACCP PRE VÝROBU A PREDAJ VÝROBKOV Z OVČIEHO MLIEKA V SALAŠNÍCKYCH PODMIENKACH


Zväz chovateľov oviec a kôz na Slovensku - družstvo so sídlom v Banskej Bystrici

Hygienická príručka na zásadách HACCP pre výrobu a predaj výrobkov z ovčieho mlieka v salašníckych podmienkach

Ovčí salašnícky údený syr
Slovenský oštiepok / polooštiepok
Slovenská parenica
Syrové korbáčiky
Syrové tyčinky
Žinčica
Urda
Klenovecký syrec
Ovčia bryndza

Časť 2

Všetky práva vyhradené © 2017
Zväz chovateľov oviec a kôz na Slovensku, so sídlom v Banskej Bystrici

V tejto príručke sú spracované požiadavky na výrobu viacerých tradičných výrobkov ako sú. slovenský oštiepok / polooštiepok, slovenská parenica, syrové korbáčiky, syrové tyčinky, žinčica, urda, Klenovecký syrec, ovčia bryndza a ovčí salašnícky údený syr. Hygienická príručka č. 2 je pokračovaním Hygienickej príručky č. 1 z februára 2017. Je vypracovaná pre potreby spracovateľov ovčieho mlieka, výrobu výrobkov z ovčieho mlieka a uvádzanie výrobkov na trh v salašníckych podmienkach. Táto príručka je založená na zásadách systému zabezpečenia kontroly hygieny potravín HACCP. Príručku je možné používať bez nutnosti vykonania zmien. Príručka obsahuje zaužívané technologické postupy výroby, opis konkrétneho výrobku, prúdový diagram výrobku, analýzu nebezpečenstiev a pracovné formuláre pre vedenie nevyhnutných záznamov. Príručka bola vytvorená tak, aby znížila byrokratickú evidenciu prevádzkovateľa potravinárskeho podniku v salašníckych

podmienkach. Prevádzkovatelia si nemusia vypracovať vlastný plán HACCP, ale môžu použiť túto príručku. Používanie tejto príručky je dobrovoľné, je na rozhodnutí prevádzkovateľa, či bude používať túto príručku, alebo sa rozhodne vypracovať vlastný plán HACCP. Táto hygienická príručka obsahuje viaceré požiadavky, ktoré sa týkajú uvádzania na trh výrobkov zo surového ovčieho mlieka na salaši, požiadavky na vybavenie salašov technologickými pomôckami. Obsahuje opisy výrobkov a technologické postupy výroby tradičných výrobkov vrátane ich špecifikácií, prúdové diagramy výroby, metodiku hodnotenia rizika, hodnotenie rizika vyplývajúceho z osobnej hygieny, suroviny, obalov, technologických krokov a procesov, rozhodovaciu schému určenia CCP, plán kontroly kritických kontrolných bodov a kontrolných bodov, riadenie nezhodného výrobku, formuláre na vedenie záznamov, záznam o výrobe, záznam o uchovávaní a skladovaní výrobkov, záznam o expedícii **(Zajác, Čapla a Golian, 2017b)**.

PRÍRUČKA SPRÁVNEJ HYGIENICKEJ PRAXE PRE FARMOVÉ A REMESELNÉ SPRACOVANIE MLIEA



Táto hygienická príručka je určená pre prevádzkovateľov, ktorými sú napr. fyzické osoby podnikatelia, živnostníci, samostatne hospodáriaci roľníci, spoločnosti s.r.o., družstvá, združenia a pod., ktoré sa zaoberajú farmovým a remeselným spracovaním mlieka. Hygienická príručka je dokumentom, ktorý má pomôcť prevádzkovateľom s dodržiavaním aktuálnych požiadaviek týkajúcich sa hygieny potravín a s uplatňovaním zásad HACCP.

Príručka bola vytvorená v súlade s §258a Výnosu Ministerstva pôdohospodárstva Slovenskej republiky a Ministerstva zdravotníctva Slovenskej republiky z 12. apríla 2006 č. 28167/2007-OL ktorým sa vydáva hlava Potravinového kódexu Slovenskej republiky upravujúca všeobecné požiadavky na konštrukciu, usporiadanie a vybavenie potravinárskych prevádzkarní a niektoré osobitné požiadavky na výrobu a predaj tradičných potravín a na priame dodávanie malého množstva

potravín. Taktiež v súlade Nariadením Európskeho Parlamentu a Rady (ES) č. 852/2004 o hygiene potravín, s Kapitolou III a článkami 7 a 8 o vypracovaní, šírení a použití príručiek a vnútroštátnych príručiek. Členské štáty podporujú vypracovanie vnútroštátnych príručiek správnej hygienickej praxe a na uplatňovanie zásad HACCP. Prevádzkovatelia sa pritom môžu sami rozhodnúť, či schválenú verziu hygienickej príručky budú používať, resp. si vypracujú vlastnú dokumentáciu správnej výrobnej/hygienickej praxe vrátane systému HACCP.

Vytvorenie vlastného systému správnej výrobnej/hygienickej praxe, vrátane systému HACCP je pre prevádzkovateľov odborne náročné. Z tohto dôvodu vznikla táto hygienická príručka. Cieľom príručky je zrozumiteľne a prehľadne opísať povinnosti prevádzkovateľov a zamestnancov, ktoré vyplývajú z legislatívy Európskej únie a Slovenskej republiky. Táto príručka obsahuje hygienické zásady, ktoré sa majú uplatňovať v prevádzkach.

Táto hygienická príručka je určená pre prevádzky, ktoré sa zaoberajú farmovým a remeselným spracovaním mlieka za účelom výroby nasledovných výrobkov:

- Mlieko,
- Plnotučné mlieko,
- Kravský hrudkový syr (formovaný, údený),
- Oštiepok (parený, údený),
- Syrové nite a korbáčik (údené),
- Smotana,
- Maslo,
- Tvaroh tučný hrudkový,
- Zákvas, acidofilné mlieko,
- Jogurt.

Prevádzkovatelia a zodpovední vedúci pracovníci si musia prečítať celú hygienickú príručku a podľa nej začať uplatňovať hygienické zásady. Prevádzkovatelia pri každodenných pracovných povinnostiach využívajú záznamovú časť tejto príručky (pracovné formuláre). Ambíciou tejto príručky je odbúrať byrokratickú záťaž prevádzkovateľov. Táto príručka nahrádza dokumentáciu správnej výrobnej/hygienickej praxe. Prevádzkovatelia si nemusia vytvárať vlastnú dokumentáciu správnej výrobnej/hygienickej praxe, môžu si však vytvoriť vlastný sanitačný program podľa odporúčaní uvedených v tejto príručke.

Prúdové diagramy systému HACCP sú zjednodušené, a pri ich tvorbe sme vychádzali z procesného princípu. Prúdové diagramy sú vytvorené pre proces dojenia mlieka, nákupu a príjmu surovín, ich skladovanie, výrobu mliečnych výrobkov a ich skladovanie, predaj a prepravu.

Aplikovanie systému HACCP, ktorý bol pôvodne určený len pre potravinárske prevádzky je v prevádzkach, v ktorých sa realizuje farmové a remeselné spracovanie mlieka náročné a ťažko realizovateľné. Na kritické miesta je možné poukázať zjednodušenou analýzou nebezpečenstiev a vymenovaním rizík, ktoré sa budú riadiť výsledným plánom HACCP s uvedením kritických kontrolných bodov.

Tepelnú úpravu mlieka považujeme za kritický kontrolný bod. Vo výslednom formulári systému HACCP sú uvedené postupy monitorovania a spôsob vedenia záznamov, ak je záznamy z pohľadu vykonávanej činnosti potrebné a opodstatnené viesť.

Dôležitú úlohu zohráva odbornosť pracovníkov, ich zdravotný stav, pravidelné školenie v oblasti správnej výrobnej praxe, technológie výroby mliečnych výrobkov, hygieny potravín a HACCP, dodržiavanie osobnej hygieny, prevádzkovej hygieny.

Túto hygienickú príručku v platnej verzii je možné uplatňovať celoplošne na území Slovenskej republiky bez nutnosti vypracovania ďalších vlastných dokumentov **(Zajác et al., 2023)**.

ZÁVER

Na záver možno povedať, že prevádzkovatelia malých podnikov v mliekarenskom sektore na Slovensku môžu mať veľký úžitok z hygienických príručiek správnej praxe, pretože obsahujú sumár požiadaviek vyplývajúcich z aktuálnych právnych predpisov, ktoré musia aplikovať vo svojich prevádzkach pri výrobe mliečnych výrobkov. Príručky obsahujú bližší popis jednotlivých požiadaviek a pomáhajú s ich uplatňovaním. Dodržiavaním hygienických zásad a technologických postupov je možné dosiahnuť požadovanú kvalitu výrobkov, ich bezpečnosť a ochranu verejného zdravia. Úspešná aplikácia hygienických príručiek v praxi je možná len v súčinnosti so zväzmi, ktoré by mali zabezpečovať pravidelné školenia a doplnkové informácie k hygienickým príručkám na svojich webových stránkach. Pri tvorbe hygienických príručiek je dobré vytvoriť multidisciplinárny tím odborníkov z hygieny potravín, technológie výroby potravín, praxe a úradnej kontroly potravín, ktorí svojimi poznatkami dokážu vytvoriť ucelený dokument, ktorý pomôže praxi.

POĎAKOVANIE

Táto práca bola podporená Slovenskou agentúrou pre výskum a vývoj v rámci grantu zmluva č. APVV-19-0180.

POUŽITÁ LITERATÚRA

1. CVOSvT, 2008. *Hygienická príručka na zásadách HACCP pre spracovanie ovčieho*

mlieka a výrobu tradičných výrobkov z ovčieho mlieka v podmienkach salaša - Spracovanie mlieka, Výroba ovčieho hrudkového syra pre bryndziarne, Výroba tradičných špecialít a to –„Ovčí hrudkový syr – salašnícky“, „Ovčí salašnícky údený syr”, „Žinčica“, Predaj tradičných špecialít. Cech výrobcov ovčieho syra v Turci, Slovensko.

2. EC. European Commission. National Guides to Good Hygiene Practice for Food and Feed. 2023. Dostupné online: https://webgate.ec.europa.eu/dyna2/hygienelegislation/.
3. MPRV SR, Ministerstvo pôdohospodárstva a rozvoja vidieka SR. Zoznam národných príručiek Správnej hygienickej praxe. 2023. Dostupné online: https://www.mpsr.sk/zoznam-narodnych-priruciek-spravnej-hygienickej-praxe-pre-potraviny/537-111-537-13854/.
4. ZAJÁC, P. – ČAPLA, J. – GOLIAN, J. *Hygienická príručka na zásadách HACCP pre výrobu a predaj výrobkov z ovčieho mlieka v salašníckych podmienkach. Ovčí salašnícky údený syr. Slovenský oštiepok / polooštiepok. Slovenská parenica. Syrové korbáčiky. Syrové tyčinky. Žinčica. Urda. Klenovecký syrec. Ovčia bryndza*. ZCHOK : Banská Bystrica, Slovakia, 2017b, 61 s. ISBN 978-80-972102-3-6
5. ZAJÁC, P. – ČAPLA, J. – GOLIAN, J. *Hygienická príručka na zásadách HACCP pre výrobu ovčieho hrudkového syra a kozieho hrudkového syra v salašných podmienkach a pre ich priamy predaj*, ZCHOK : Banská Bystrica, Slovakia, 2017a, 70 s. ISBN 978-80-972102-2-9
6. ZAJÁC, P. – ČAPLA, J. – POKORNÝ, F. – CSEREI, P. – JUHAŠČÍKOVÁ, N. *Príručka správnej hygienickej praxe pre farmové spracovanie mlieka*. 2023, HACCP Consulting, 124 s. (príručka je vo fáze vydania, aktuálne nemá pridelené ISBN číslo)

Kontaktná adresa: Zajác Peter, Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre, Fakulta biotechnológie a potravinárstva, Ústav potravinárstva, Katedra hygieny a bezpečnosti potravín, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovenská republika; E-mail: peter.zajac@uniag.sk

MODERNIZÁCIA VÝROBY SYROV V CHORVÁTSKU POMOCOU LIEČIVÝCH A AROMATICKÝCH BYLÍN - PRÍKLAD PROJEKTU *CEKOM 3LJ* EURÓPSKEHO FONDU REGIONÁLNEHO ROZVOJA

UPGRADING THE CHEESE PRODUCTION IN CROATIA BY USING MEDICINAL AND AROMATIC HERBS – AN EXAMPLE OF THE EUROPEAN REGIONAL DEVELOPMENT FUND PROJECT *CEKOM 3LJ*

Zdolec Nevijo [1], Kiš Marta [1], Kavain Ivana [2], Batinić Josip [2], Franičević Marijana [2], Čaušević Sead [3]

[1]Department of Hygiene, Technology and Food Safety, Faculty of Veterinary Medicine, University of Zagreb, Heinzelova 55, 10 000 Zagreb, Croatia

[2]CEKOM 3LJ, Ugljane 115c, 21240 Trilj, Croatia

[3] EKO SIR PUĐA d.o.o. Livno, Golinjevo bb, 80101 Livno, Bosnia and Herzegovina

ABSTRACT

In the last three years, the Center of Competence 3LJ project, supported by the European Regional Development Fund, was implemented in Croatia to improve cheese production by introducing new innovative solutions. The project aimed to study the effects of the Dalmatian herbs basil (*Ocimum basilicum* L.), sage (*Salvia officinalis* L.), lavender (*Lavandula officinalis* L.), immortelle (*Helichrysum italicum* (Roth) G. Don) and savory (*Satureja montana* L.) in cheese production in terms of taste, quality, safety and health properties of the new products. Laboratory tests showed a high antimicrobial potential of herbal extracts against pathogens that can compromise the microbiological safety of cheese. In addition, in vitro experiments showed that cold sterilized dried herbs and their extracts have no negative effects on the growth of the commercial dairy starter culture *Lactobacillus helveticus/Lactobacillus lactis*. Finally, hard cheeses with different concentrations of dried herbs (0.5, 1.0, 1.5, and 2%) were prepared and sensory evaluated. The cheese with the lowest concentrations of lavender and basil showed the most favorable sensory characteristics.

Key words: hard cheese, herbal extracts, dried aromatic herbs, safety, quality

INTRODUCTION

The CEKOM 3LJ project, financed by the European Regional Development Fund, creates a common space for the scientific and industrial sectors, combining their knowledge and

experience and bringing together universities and institutes with the business community, especially small and medium-sized enterprises. CEKOM 3LJ expects research and development programs leading to increased application of research results of scientific institutions, such as creation of new products and services, improvement of the market position of the economy by increasing the added value of existing products and services, transfer of human resources and creation of new companies and businesses. The main activities and expected results of the project were the development of 15 new innovative products in the fields of pharmaceuticals, nutrition and functional foods based on medicinal and aromatic herbs, including five new cheese varieties.

Medicinal plants include those plant species that contain one or more active ingredients that have medicinal properties and can be used for therapy or the synthesis of pharmacological preparations. Aromatic plants are those species that contain in one or more of their parts a substance with a particular odour or taste. Such plants are mostly used in food production as spices, in the cosmetics industry, for the production of fragrances, etc. On the territory of the Republic of Croatia there are more than 500 plants whose medicinal properties can be used, and about 160 to 170 species are autochthonous (Šilješ et al., 1992).

In this work, five aromatic herbs from Dalmatian region, Croatia, were used: basil (*Ocimum basilicum* L.), sage (*Salvia officinalis* L.), lavender (*Lavandula officinalis* L.), immortelle (*Helichrysum italicum* (Roth) G. Don) and savory (*Satureja montana* L.). In addition, rosemary (*Rosemarinus officinalis* L.) was tested in some laboratory experiments. This article summarizes the results of the study of the antimicrobial properties of herbal extracts, the effect of irradiated dried herbs on the growth of milk starters, and the quality parameters of new cheeses produced with selected dried herbs.

ANTIMICROBIAL PROPERTIES OF HERBAL EXTRACTS

In the first phase of the project, the antimicrobial potential of alcoholic and oil extracts from seasonal medicinal and aromatic plants from Dalmatia - basil, sage, lavender, rosemary and immortelle - was tested in the two seasons of 2020 and 2021 (Klanac, 2021; Zdolec et al., 2021). During the first study, antimicrobial potential was evaluated by disk diffusion test against pathogenic bacteria important for food safety: *Salmonella* Infantis, ermA+ *Staphylococcus haemolyticus*, ermC+ *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus aureus*, *Yersinia enterocolitica*, *Listeria innocua*, *Listeria welshimeri*, *Listeria ivanovii*, and *Listeria monocytogenes*. Oil extracts caused no growth inhibition, while alcohol extracts showed an effect on nine of 14 strains tested. Staphylococci and *Y. enterocolitica* were the most sensitive, being inhibited by all extracts. Rosemary extract inhibited the broadest spectrum, i.e., seven

indicator bacteria, and lavender the least, i.e., three of them. The immortelle extract showed the strongest inhibitory activity in the form of the broadest inhibition zones against ermA+ *Staphylococcus haemolyticus*, ermC+ *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus aureus*. After three months of storage, the antimicrobial activity of sage, rosemary and immortelle extracts was maintained, although attenuated. During the 2021. season, the susceptibility of vancomycin-resistant enterococci was additionally tested, including vanB+ *Enterococcus faecalis*, vanA+ *Enterococcus faecium*, and VR *Enterococcus faecium*. All five extracts inhibited the growth of vanB+ *E. faecalis*, while the remaining two VRE strains were inhibited by sage, rosemary, and immortelle extracts. Furthermore, the effect of herbal extracts was tested against dairy-related bacterial strains and is shown in Table 1.

Table 1. Zone of inhibition (mm) of dairy-related lactic acid bacteria challenged with Dalmatian herbal extracts

	Basil	**Sage**	**Lavander**	**Rosemary**	**Immortelle**
Lactiplantibacillus plantarum S3	8mm	16mm	8mm	0	12mm
Lactococcus lactis M1	8mm	8mm	0	0	12mm
Enterococcus faecium	8mm	0	0	0	10mm
Lactococcus lactis	8mm	8mm	0	8mm	10mm
Lactiplantibacillus plantarum	10mm	7mm	7mm	8mm	10mm
Leuconostoc mesenteroides	10mm	10mm	10mm	10mm	10mm
Leuconostoc mesenteroides	10mm	10mm	10mm	10mm	10mm

EFFECT OF DRIED HERBS AND EXTRACTS ON DAIRY STARTERS

The microbiological quality of the dried herbs to be used for cheese production was tested. Total viable count, aerobic sporogenic bacteria count, and mold count ranged from 4.0-4.7 log CFU/g, 3.0-4.17 log CFU/g, and 2.0-3.0 log CFU/g, respectively. To avoid microbiological interactions in the raw material (milk), the dried herbs were irradiated at the Co-60 panoramic irradiation source (8 kGy, P = 5.23 Gy/s). In the study by Kiš et al. (2022.), the effect of cold-sterilized sage, immortelle, rosemary and their extracts - against commercial cheese starter culture *Lactobacillus helveticus/Lactobacillus lactis* in pasteurized milk was evaluated. Herbal extracts were prepared according to the Soxhlet protocol, filtered and evaporated under rotary vacuum. Different concentrations of sterilized herbs and extracts (0.25, 0.5, and 1% v/w) were added to pasteurized milk inoculated with a starter (3 log CFU/ mL) and incubated at 30 ºC for

24 hours. *Lactobacillus helveticus/Lactobacillus lactis* reached a count of 7.4 log CFU/mL in pasteurized milk at 30 ºC/24h. When dried herbs were used, the growth of milk cultures was not affected, regardless of the concentrations used. The higher the concentration of sage and immortelle extracts, the lower the number of starter cultures, which was, however, within the growth rate of the control sample. These preliminary results showed that dried sage, immortelle and rosemary and their extracts did not negatively affect the targeted starter culture *Lactobacillus helveticus/Lactobacillus lactis*, which is important for their use in pilot cheese production.

USE OF DRIED HERBS IN CHEESE PRODUCTION

The production of hard cheese *Dalmatinski sir* (Puđa Ltd.) with dried herbs basil (*Ocimum basilicum* L.), sage (*Salvia officinalis* L.), lavender (*Lavandula officinalis* L.), immortelle (*Helichrysum italicum* (Roth) G. Don) and savory (*Satureja montana* L.) was started in June/July 2022. The concentration of herbs added was 0.5, 1.0, 1.5 and 2.0% and cheese was ripened for two months. Sensorial evaluation was performed by five panelists according to the 20-point system, the characteristics of the cheese were evaluated: external appearance, color, consistency, cut, taste and smell.

Table 2. Average scores of sensorial properties of hard cheese with dried Dalmatian herbs

Herbs	Concentration (%)			
	0.5	1.0	1.5	2.0
basil (*Ocimum basilicum* L.)	17.55	14.50	11.95	11.20
sage (*Salvia officinalis* L.)	15.25	14.25	13.15	12.20
lavender (*Lavandula officinalis* L.)	17.00	16.85	15.55	13.90
immortelle (*Helichrysum italicum* (Roth) G. Don)	12.60	/	9.85	/
savory (*Satureja montana* L.)	16.45	13.80	12.70	10.80

Maximum score (20 points): external appearance 2 points, color 1 point, consistency 2 points, cut 3 points, taste 10 points, smell 2 points.

In general, the higher the concentration of added herbs in the cheese, the poorer the sensory quality. The cheese with the lowest concentrations of lavender and basil (0.5%) showed the

most favorable sensory characteristics. Based on these preliminary results, cheese production should be standardized with even lower concentrations of Dalmatian herbs of 0.05, 0.10 and 0.25%.

CONCLUSION

The use of medicinal and aromatic plants in Dalmatia, Croatia holds some potential for the development of new autochthonous cheeses. The antimicrobial properties of the plants used in this study may also contribute to the hygienic correctness of the product. The sensory characteristics are determined by the preparation method and the application of the plants in the cheese, and the intensity of aromas and flavors must be optimized in acceptable concentrations for the product to be recognized on the market.

REFERENCES

1. Kiš, M., Klanac, L., Ninčević Runjić, T., Čobanov, D., Vukadin, M., Zdolec, N. (2022) Antibacterial effect of dried aromatic herbs and their extracts on cheese starter culture in vitro - preliminary results. In: *Book of abstracts, FEMS Conference on Microbiology in association with Serbian Society of Microbiology*, Belgrade, 30 June – 2 July, p. 759.
2. Klanac, L. (2021) The effect of Dalmatian aromatic herbs extracts on pathogenic bacteria from food of animal origin. Master thesis, University of Zagreb, Faculty of veterinary medicine.
3. Šilješ, I., Grozdanić, Đ., Grgesina, I. (1992) Poznavanje, uzgoj i prerada ljekovitog bilja, Zagreb, Školska knjiga.
4. Zdolec, N., Klanac, L., Kiš, M., Dobranić, V. (2021) Inhibition of foodborne resistant and pathogenic bacteria by Dalmatian aromatic herbs extract. In: Brkljača Bottegaro, N., Lukač, M., Zdolec, N., Vrbanac, Z. (eds.) *Book of Abstract - 9th International Congress Veterinary Science and Profession*, Zagreb, 9 October, p. 49.

Contact address: Zdolec Nevijo, Department of Hygiene, Technology and Food Safety, Faculty of Veterinary Medicine, University of Zagreb, Heinzelova 55, 10 000 Zagreb, Croatia; E-mail: nzdolec@vef.hr

VYUŽITIE RÝCHLYCH FARMOVÝCH TESTOV NA DETEKCIU MASTITÍD DOJNÍC

USE OF RAPID FARM TEST TO DETECTION MASTITIS IN DAIRY COWS

Zigo František[1], Lacková Zuzana[1], Farkašová Zuzana[1], Arvaiová Juliana[1], Mária Vargová[2], Šimon Halás[1], Silvia Ondrašovičová[3], Kathrine H. Bak[4], Peter Paulsen[4]

[1]Katedra výživy a chovu zvierat, Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, Komenského 73, Košice; [2] Katedra verejného veterinárskeho lekárstva a welfare zvierat, Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, Komenského 73, Košice; [3] Katedra fyziológie a biológie, Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, Komenského 73, Košice; [4] Institute of Food Safety, Food Technology and Veterinary Public Health, University of Veterinary Medicine Vienna, Veterinaerplatz 1, Vienna 1210, Austria

ABSTRACT

Mastitis is an inflammation of the mammary gland which has a particularly importance in ruminants. The purpose of this study was to evaluate and compare two tests for cultivation of udder pathogens: classical laboratory cultivation on Columbia agar with 5% sheep blood versus Micromast rapid plates. The results allowed assessing the incidence of mastitis and the prevalence of the pathogens. During the study have been investigated 172 lactating cows in a dairy farm localized in the east of Slovakia. Subsequently, 141 quarter milk samples from the positive cows with California mastitis test score 1-4 have been undergone the laboratory culture and Micromast test in accordance with their respective steps. The values obtained from these tests showing greater sensitivity of positive samples using the MicroMast test at the level of 64.5% compared to cultures on Columbia blood agar at the level of 61.7%. After biochemical identification of cultured colonies, the Columbia blood agar and Micromast test identified both as the main pathogen present *S. aureus* with results of 13.4% and 14.9%, respectively. It will be a relevant importance in the following decades to succeed in the development of tests with directly detection of udder pathogens.

Key words: cows, mastitis, detection, cultivation, pathogens

ÚVOD

Mlieko prežúvavcov patrí celosvetovo medzi najviac používané živočíšne produkty pre jeho špecifické zloženie a nutričnú hodnotu. Do jeho produkcie je zapojených približne 150

miliónov farmárov po celom svete, ktoré konzumuje viac ako 6 miliárd ľudí. Získané mlieko je tradičnou surovinou na výrobu celého radu mliečnych výrobkov, ktoré sú jedinečné svojím zložením, no pravidlá EÚ zdôrazňujú, že takéto výrobky musia pochádzať od zdravých zvierat (Audarya a kol., 2022;FAO, 2022).

V súčasnosti, zápal mliečnej žľazy – mastitída patrí medzi najdôležitejšie a najnáročnejšie ochorenia dojníc. Jej výskyt má veľký vplyv na ekonomiku produkčných chovov a to aj napriek zvyšovaniu hygieny produkcie mlieka a zootechnickej kontroly. Mastitídy vplývajú na zdravie a úžitkové parametre ako je zníženie produkcie mlieka, zvýšenie počet somatických buniek (PSB; čo má priamy vplyv na cenu mlieka), zníženie kvalitatívnych zložiek (laktóza a kazeín, dôležité pre syry spracovanie), ale zvyšujú sa aj nežiaduce prvky (lipáza a plazmín, ovplyvňujúce životnosť mlieka). Okrem toho medzi nepriame straty spôsobené mastitídou môžeme zaradiť zvýšené brakovanie chorých dojníc, stratu prémií, predčasné zasušovanie, aspekty welfare zvierat a ďalšie súvisiace zdravotné problémy. Pri klinických formách mastitíd sa náklady na liečbu môžu vyšplhať až do 200 EUR/ks (Cobirka a kol., 2020).

Do dnešného dňa je evidovaných viac ako 137 rôznych pôvodcov intramamárnej infekcie (IMI) prežúvavcov zahŕňajúc baktérie, vírusy, mykoplazmy, kvasinky a riasy. Až z 95% IMI je najčastejšie zapríčinená baktériami. Vzhľadom na polyetologický pôvod mastitíd sa toto ochorenie nedá úplne eradikovať z chovu najmä kvôli environmentálnym patogénom napr. stafylokoky, streptokoky alebo *E. coli,* ktoré atakujú mliečnu žľazu z prostredia. Ochorenie môže mať klinické prejavy so zjavnými zmenami vzhľadu mlieka (následky zápalovej odpovede) s príznakmi zápalu mliečnej žľazy, ale môže byť aj subklinické, čo znamená, že infekcia je prítomná (a môže sa rozšíriť na iné zvieratá), ale bez viditeľných klinických príznakov (Foltys a Kirchnerova, 2003).

V súčasnosti je možné mastitídu odhaliť pomocou farmových testov, z ktorých najbežnejším je NK-test, ale neumožňuje identifikáciu patogénov. Ich prítomnosť sa deteguje najčastejšie v laboratóriu kultiváciou na rôznych selekčných agaroch, ktoré sú časovo náročné. V poslednej dobe je cieľom vytvoriť test, ktorý bude rovnako účinný ako laboratórna kultivácia a bude ho môcť vykonávať zaškolená osoba priamo na farme, čo chovateľovi ušetrí čas spojený s prepravou a vyhodnotením vzoriek (Prášek, 2023).

Cieľom štúdie bolo porovnať dva testy na kultiváciu patogénov zo vzoriek surového kravského mlieka pomocou klasickej laboratórnej kultivácií na Columbia agare s 5% prídavkom ovčej krvi a Micromast testu.

MATERIÁL A METODIKA

Chov dojníc, ustajnenie a dojenie

Pre praktické účely štúdie bola monitorovaná farma s 200 ks dojníc slovenského strakatého dobytka lokalizovaná na východnom Slovensku. Prostredie chovu tvorila moderná budova s vysokovzduchovým odvetrávaním s odpratávaním exkrementov pomocou automatizovaného čistenia. Dojnice boli ustajnené v maštali rozdelenej na 2 časti pomocou kŕmneho stola, v ktorých boli samostatné štyri podsekcie. Každá z nich pozostáva zo 42 ležovísk navrhnutých v troch radoch oproti sebe.

Počas štúdie bolo dojených 172 kráv dvakrát denne o 5:00 a 16:00 hod. v paralelnej dojárni 2 × 12 (BouMatic). Pred samotným dojením sa mlieko z každej štvrte vemena podrobilo senzorickej analýze v nádobke s tmavým dnom a bola vykonaná dezinfekcia ceckov vemena použitím napeňovacieho prípravku G-Mix Power s obsahom oxidu chloričitého (Agromont, SR) a ich vysušením pomocou jednorázovej papierovej utierky. Po automatickom ukončení dojenia s prietokom mlieka nižším ako 0,2L/min., bola vykonaná koncová dezinfekcia ceckov prípravkom Power Blue Mix (Agromont, Slovensko) na báze kyseliny mliečnej.

Vyšetrenie dojníc s odberom vzoriek mlieka

Za účelom odberu vzoriek mlieka bola každá dojnica komplexne vyšetrená na základe klinického vyšetrenia a palpáciou vemena. Odstreky mlieka z každej štvrte vemena boli podrobené senzorickému vyšetreniu a hodnotené NK-testom podľa Tančin a Tančinová (2008).

Pre laboratórnu diagnostiku bakteriálnych patogénov bolo podľa National Mastitis Council (2001) odobratých 141 štvrťových vzoriek mlieka od kráv s pozitívnym NK-test skóre 1 až 4. Rovnaké vzorky boli použité aj na kultiváciu patogénov mliečnej žľazy na MicroMast platniach (Prášek, CZ). Všetky vzorky boli odvezené do laboratória a vyšetrené v ten istý deň.

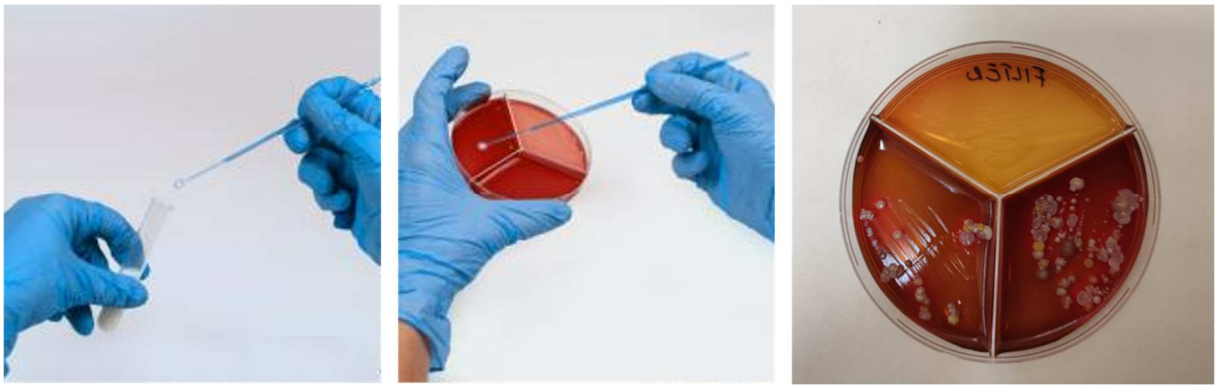
Kultivácia vzoriek a detekcia patogénov mliečnej žľazy

Inokulum každej vzorky mlieka (0,2 ml) sa naočkovalo na platne s Columbia krvným agarom s prímesou 5% ovčej krvi (OXOID Ltd, UK), ktoré sa inkubovali pri 37 °C a po 24 hodinách sa vyhodnotili. Pre bližšiu identifikáciu bakteriálnych pôvodcov mastitíd boli primokultivované kolónie z krvného agaru na základe morfologických vlastností znovu subkultivované na rôznych selektívnych živných pôdach: Edwards Medium, Staphylococcal medium N◦ 110, a Mac Conkey Agar (Oxoid, Ltd., Basingstoke, Hants, UK) ďalších 24 hodín pri 37 °C s vykonaním testov katalázovej aktivity, hemolýzy, produkcie pigmentu a koagulázy a farbenie podľa Grama. Identifikácia každého druhu bola vykonaná biochemickými testami a to STAPHYtestom 24, STREPTOtestom 24, resp. ENTEROtestom 24 a vyhodnotená

programom TNW ProAuto 7.0 (Erba-Lachema, Brno, CZ) s pravdepodobnosťou správneho označenia druhu nad 90%.

Rýchlo test "MicroMast "

Tento test je navrhnutý pre rýchlu 24 hodinovú kultiváciu vzoriek priamo v podmienkach farmy pomocou súpravy pre odber vzoriek mlieka, kultivačných platní a prenosného termostatu farme. Odobraté štvrťové vzorky mlieka od pozitívnych kráv sa v rovnakom čase kultivovali sa na platniach MicroMast v ten istý deň pri teplote 37 °C. Výsledky sa analyzovali po 24 hodinách z každej platne, ktorá je rozdelená do troch zón.



Obrázok 1. Kultivácia vzoriek na MikroMast platniach

V prvej zóne „A" sa vylučuje kontaminácia vzoriek tým, že všetky vzorky sú negatívne bez prítomnosti porastu. Druhá zóna „B" je určená na identifikáciu Gram-pozitívnych patogénov, ako sú: *Staphylococcus aureus*, koaguláza-negatívne stafylokoky (KNS), *Streptococcus agalactiae, Streptococcus uberis* a iné streptokoky z prostredia, *Enterococcus* spp., *Corynebacterium* spp., *Trueperella pyogenes* alebo *Bacilus* spp. Tretia zóna „C" je určená na identifikáciu Gram-negatívnych patogénov, akými sú: *E. coli, Klebsiella* spp. a iné *Enterobacteriaceae, Proteus vulgaris*, *Pseudomonas* spp., *Serratia marcescens* alebo *Pasteurella* spp.

Následne, po kultivácii na platniach MicroMast, boli kolónie tvoriace jednotky (CFU) analyzované pomocou dodatočných testov a rekultivácie na selektívnych pôdach rovnakým spôsobom ako v predchádzajúcom postupe analýzy patogénov z krvného agaru.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Mastitída sa považuje za celosvetové ochorenie, ktoré sa prejavuje rôznymi formami (subklinickými, chronickými a klinickými) spôsobené najmä kontagióznymi a environmentálnymi baktériami. Jedným z prvých indikátorov infekcie mliečnej žľazy je

zvýšený počet somatických buniek (PSB) často spojený so zníženou produkciou mlieka (Tongel a Mihina, 2005). Somatické bunky stále patria medzi dobrý nástroj prvotného hodnotenia mlieka, pretože je preukázaný rozdiel medzi hodnotami zdravého a chorého zvieraťa. Pre rýchle posúdenie štvrťových vzoriek mlieka sa na farmách využíva NK-test, ktorý slúži najmä na detekciu subklinických foriem mastitíd (Tančin a Tančinová, 2008).

Počas komplexného vyšetrenia mliečnej žľazy bol u 172 ks kráv vykonaný NK-test po prvých odstrekoch mlieka z každej štvrte. Z 688 vyšetrených štvrtí, 23 bolo atrofovaných alebo bez produdkcie mlieka. Z vyhodnotených 665 štvrtí bolo 524 (78.8%) negatívnych s NK-test skóre 0. U 141 vyšetrených štvrtí bol zaznamenaný pozitívny výsledok NK-test skóre (21.2%) v rozpätí 1-4. Najviac pozitívnych štvrtí (8.6%) vykazovalo NK-test skóre 1.

Okrem posúdenia PSB sa v súčasnosti hľadajú nové spôsoby detekcie mastitíd s vývojom nových testov aby chovatelia mohli, v čo najkratšom čase reagovať na pozitívne jedince so zavedením príslušných opatrení prípadne zahájením včasnej liečby, ktorá býva účinnejšia a menej nákladná ako v neskorších fázach s vývojom rezistencie patogénov na používané intramamárne antibiotiká. V súčasnosti je jedným z riešení vývoj rýchlych farmových testov kultivácie vzoriek, ktoré skracujú čas a náklady spojené s prepravou a detekciou vzoriek v laboratórnych podmienkach (Prášek, 2023).

Za účelom porovnania dvoch kultivačných metód, sme zo 141 pozitívnych štvrtí s NK-test skóre 1-4 odobrali individuálne vzorky mlieka a podrobili laboratórnej diagnostike na krvnom agare s prímesou 5% ovčej krvi a zároveň vyočkovali na platne MicroMast testu. Po 24 hodinovej kultivácií na krvnom agare boli v 87 vzorkách (61,7%) potvrdené bakteriálne patogény mliečnej žľazy. V 54 prípadoch (38,3%) boli vzorky negatívne bez prítomnosti kolónií na kultivátoch (Tabuľka 1).

Pri rovnakom postupe bolo po kultivácií zo 141 vzoriek na platniach MicroMast testu pozitívnych 91 vzoriek (64,5%) v sektoroch B a C, ktoré sú určené pre odlíšenie G pozitívnych a Gram negatívnych baktérií. Ani na jednej platni nebol zaznamenaný porast v sektore A, ktorý by znamenal kontaminovanú vzorku. Zvyšných 50 vzoriek (35,5%) bolo negatívnych bez porastu vo všetkých troch sektoroch (Tabuľka 2).

Pre ďalšiu analýzu bakteriálnych patogénov boli všetky kultiváty z primokultivácie na krvnom agare a MicroMast platniach podrobené kultivácií na selektívnych médiách s identifikáciou pomocou biochemických testov. V obidvoch prípadoch boli najčastejšie izolované koaguláza negatívne stafylokoky (KNS) a *S. aureus*. Z ostatných patogénov bola v oboch prípadoch izolovaná *E. coli*. (Tabuľka 1 a 2).

Tabuľka č. 1, Kultivácia patogénov na Columbia krvnom agare a ich zastúpenie po identifikácií biochemickými testami

Stav / patogén	**Počet vzoriek z testovaných štvrtí**	**% z 141 vzoriek**
Negatívne vzorky	54	38,3
Pozitívne vzorky	87	61,7
Celkovo	141	100,0
***Staphylococcus* spp.**		
S. aureus	19	135
S. warneri	9	6,4
S. chromogenes	8	5,7
S. epidermidis	4	2,8
S. intermedius	3	2,1
S. hyicus	2	1,4
S. sciuri	1	0,7
S. cohni urealytic	1	0,7
Ostatné patogény		
E. coli	22	15,6
Proteus spp.	7	4,9
E. faecalis	3	2,1
Zmiešaná infekcia*	8	5,7

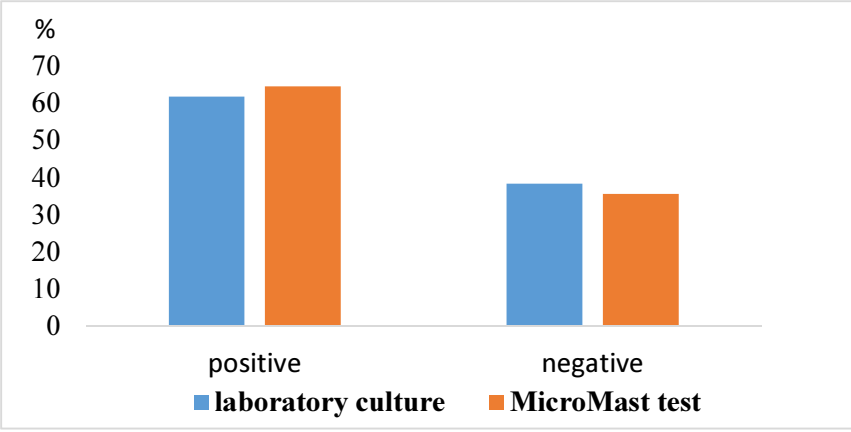
Poznámka: Zmiešaná infekcia* - predstavujú pozitívnu vzorku s dvoma a viacerými patogénmi.

Porovnaním MicroMast testu a laboratórnej diagnostiky pomocou kultivácie na krvnom agare s 5% prímesou baranej krvi bola zistená väčšia citlivosť pozitívnych vzoriek pomocou MicroMast testu na úrovni 64.5% oproti kultivácií na krvnom agare na úrovni 61.7% (garf 1).

Tabuľka č. 2, Distribúcia patogénov z testovaných štvrtí pomocou MicroMast testu

	Počet štvrtí	**% z 141 štvrtí**	**Pozitívne v "C"** n / %	**Pozitívne v "B"** n / %
Pozitívne vzorky	91	64,5	28 (19,9%)	63 (44,7%)
Negatívne vzorky	50	35,5	-	-
Zastúpenie bakteriálnych patogénov po biochemickej identifikácií z platní MicroMast				
	Pozitívne v "C"	**% z 141 štvrtí**	**Pozitívne v "B"**	**% z 141 štvrtí**
E. coli	20	14,2		
Proteus spp.	3	2,1		
S. epidermis			3	2,1
S. aureus			21	14,9
S. sciuri			1	0,7
S. warneri			11	7,8
S. intermedius			3	2,1
S. felis			2	1,4
S. chromogenes			17	12,1
Zmiešaná infekcia*	5	3,5	5	3,5

Poznámka: C zóna je súčasťou testu umožňujúceho detekciu gramnegatívnych patogénov; B zóna je súčasťou testu umožňujúceho detekciu grampozitívnych patogénov; Zmiešaná infekcia* - predstavujú pozitívnu vzorku s dvoma a viacerými patogénmi.



Graf č. 1, Porovnanie citlivosti kultivácie na krvnom agare a MicMast platniach

Podľa Wentz a kol. (2001), mastitídy dojníc predstavujú vážny zdravotný problém vzhľadom na širokú škálu pôvodcov. Holko a kol. (2019) vo svojej štúdií zistil, že mnohé

prípady IMI v slovenských chovoch dojníc spôsobujú grampozitívne mikroorganizmy *Staphylococcus* spp. alebo *Streptococcus* spp., čo sa potvrdilo aj v našej štúdii avšak prevalencia IMI zapríčinených koliformnými baktériami sa vyskytuje do 20,0% v závislosti od štruktúry farmy a hygienického stavu.

Identifikáciou bakteriálnych patogénov mliečnej žľazy biochemickými testami a ich porovnaním z oboch metód boli zistené rozdielne počty najmä u koaguláza negatívnych stafylokokov a *Proteus* spp. Pomerne rovnaká zhoda bola u *S. aureus* a *E. coli*, ktoré boli najviac zastúpené z pomedzi testovaných vzoriek u oboch metód (Tab. 3).

Tabuľka č. 3, Porovnanie patogénov podľa kultivácie na Columbia krvnom agare a Micromast testu

patogén	Columbia krvný agar		Micromast platne	
	Pozitívne	% z 141 vzoriek	Pozitívne	% z 141 vzoriek
***Staphylococcus* spp.**				
S. aureus	19	*13,4*	21	*14,9*
S. chromogenes	8	*5,7*	17	*12,1*
S. warneri	9	*6,4*	11	*7,8*
S. epidermidis	4	*2,8*	3	*2,1*
S. intermedius	2	*1,4*	3	*2,1*
S. hyicus	3	*2,1*	-	-
S. felis	-	-	2	*1,4*
S. sciuri	1	*0,7*	1	*0,7*
S. cohni urealyticus	1	*0,7*	-	-
Ostatné patogény				
E. coli	22	*15,6*	20	*14,2*
Proteus spp.	7	*5,0*	3	*2,1*
E. faecalis	3	*2,1*	-	-
Zmiešaná infekcia*	8	*5,7*	10	*7,1*
Celkom	**87**	***61,7***	**91**	***64,5***

Poznámka: Zmiešaná infekcia* - predstavujú pozitívnu vzorku s dvoma a viacerými patogénmi.

ZÁVER

Údaje použité v tejto štúdii umožnili preukázať, že aj keď NK-test neumožňuje identifikáciu patogénov, môže naznačovať prebiehajúci alebo začínajúci zápal mliečnej žľazy.

Porovnaním kultivácie vzoriek mlieka na dvoma metodámi, bola zistená väčšia citlivosť pozitívnych vzoriek pomocou MicroMast testu na úrovni 64,5% oproti kultivácií na krvnom agare na úrovni 61,7%. V oboch prípadoch boli najčastejšie izolované KNS a *E. coli*. Z kontagióznych patogénov bol izolovaný *S. aureus* na úrovni 13,4% z krvného agaru a 14,9% po kultivácií na MicroMast platniach s následnou identifikáciou biochemickými testami. Potvrdenie výskytu *Staphylococcus* spp. a zároveň výrazného podielu koaguláza-negatívnych stafylokokov vo vzorkách mlieka z mastitídnych kráv upozorňuje na možné zdravotné riziká pre konzumentov. Je preto potrebné aby chovatelia, čo najskôr vedeli identifikovať infekčné zvieratá. Používanie NK-testu s doplnením rýchlych kultivačných testov je jedným zo spôsobov ako môžu chovatelia priamo na farme zachytiť subklinické infekcie spôsobené patogénmi mliečnej žľazy, a tak začať včasnú liečbu a znížiť zdravotný a ekonomický dopad mastitíd u kráv.

POĎAKOVANIE

Táto práca bola podporená projektami APVV-22-0457: Bezantibiotické prístupy kontroly mastitíd dojníc so zvýšením hygieny prostredia na produkčných farmách, SAIA-2022-05-15-001: Vplyv patogénov mliečnej žľazy na produkciu a stupeň oxidačného stresu u dojníc a projektom VEGA-1-0162-23: Zníženie používania antibiotík v programoch kontroly mastitíd dojníc.

POUŽITÁ LITERATÚRA

1. AUDARYA, S.D. et al. Epidemiology of Bovine Mastitis and Its Diagnosis, Prevention, and Control. Mastitis in Dairy Cattle, Sheep and Goats. *Intechopen*, 2022. doi: 10.5772/intechopen.100582.
2. ČOBIRKA, M. - TANČIN, V. - SLAMA, P. Epidemiology and Classification of Mastitis. *Animals (Basel)*, 2020. 10(12):2212. doi: 10.3390/ani10122212. PMID: 33255907; PMCID: PMC7760962.
3. FAO, Dairy market review [online]. 2020, [cit. 2022-09-06]. Dostupné z: https://www.fao.org/3/cb2322en/CB2322EN.pdf
4. FOLTÝS, V., KIRCHNEROVÁ, K. Application of Control Mastitis Program in Practice. Nitra: *Institute of Scientific and Technical Information for Agriculture*, 2003. Dostupné z: http://www.agroporadenstvo.sk/zv/hd/drobnosti/mastitpr.htm.
5. HOLKO, I. et al. Prevalence and Antimicrobial Susceptibility of Udder Pathogens Isolated from Dairy Cows in Slovakia. *Journal of Dairy Research,* 2019, vol. 86, p. 436-439.

6. MALINOWSKI, E. et al. Etiological Agents of Dairy Cow´s Mastitis in Western Part of Poland. *Polish Journal of Veterinary Sciences*, 2006, vol. 9, p. 191-194. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17020014/
7. NATIONAL MASTITIS COUNCIL. National Mastitis Council Recommended Mastitis Control Program. Verona: *Natl. Mastitis Counc. Ann. Mtg. Proc., Reno, NV. Natl. Mastitis Counc., Inc., WI*, 2001. 408 p. ISBN 978-0-309-06997-7. https://doi.org/10.17226/9825.
8. PRÁŠEK, J. Micromast test. *Veterinární činnost*, 2023. Dostupné z: http://www.josefprasek.cz/micromast-examination-procedure/
9. TANČIN, V. - TANČINOVÁ, D. Strojové dojenie mlieka a kvalita mlieka. Nitra: *SCPV*, 2008, s. 47 – 74. ISBN 978-80-88872-80-1.
10. TONGEĽ, P. - MIHINA, Š. Mastitis - a Milk Thief. Nitra: *Institute of Scientific and Technical Information for Agriculture,* 2005. Dostupné z: http://www.agroporadenstvo.sk/zv/hd/mlieko/mastitida.htm
11. WENZ, J.R. - BARRINGTON, G.M. - GARRY, F.B. Bacteremia associated with naturally occuring acute coliform mastitis in dairy cows. J. *Am. Vet. Med. Assoc.,* 2001, 219, p. 976-981.

Kontaktná adresa: Doc. MVDr. František Zigo, PhD., Katedra výživy a chovu zvierat, Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, Komenského 73, 041 81, Košice, E-mail: frantisek.zigo@uvlf.sk

ŠTÚDIUM OCTOVEJ FERMENTÁCIE VÍNA POMOCOU RÔZNYCH KMEŇOV OCTOVÝCH BAKTÉRIÍ

STUDY OF ACETIC FERMENTATION OF WINE USING DIFFERENT STRAINS OF ACETIC ACID BACTERIA NÁZOV PRÍSPEVKU V ANGLICKOM JAZYKU

Ženišová Katarína

Odbor mikrobiológie, molekulárnej biológie a biotechnológií, Výskumný ústav potravinársky-Národné poľnohospodárske a potravinárske centrum, Priemyselná 4, P. O. Box 31, 824 75 Bratislava 25, Slovenská republika

ABSTRACT

The vinegar is a 5-10% solution of acetic acid, which is obtained by double fermentation of the input raw materials (alcoholic and acetic fermentation). We analyzed the fermentation of vinegar made from wine and grape pomace (skins, seeds and stems of grapes from wine production) of the Grüner Veltliner variety from the Small Carpathian wine region using acetic acid bacteria, namely *Acetobacter aceti*, *Gluconobacter oxydans*, an autochthonous strain of *Gluconacetobacter saccharivorans* isolated from vinegar, and a commercial strain of the genus *Acetobacter* sp. During the production of vinegar, we monitored the analytical parameters (alcohol content, volatile acids, organic acids, acetic acid and pH) and the content of aroma-active substances. In all monitored parameters, the values were significantly higher in grape pomace wine.

Key words: wine vinegar, grape pomace, acetic acid, acetic acid bacteria

ÚVOD

Odpad pri výrobe vína pozostáva hlavne z výliskov, čistiaceho sedimentu ako sú kaly a kvasnicového sedimentu. Hroznové výlisky (matolíny) sú jedným z najbohatších tuhých vedľajších produktov vznikajúcich pri výrobe vína a pozostávajú zo šupiek, stoniek a semien hrozna. Sú odpadom pri lisovaní hrozna. Množstvo matolín závisí od kultivaru, ročníka, vyzretia hrozna a spôsobu spracovania. Je ich 20 – 30 % z celkového množstva hrozna (Kalli a kol., 2018; Beres a kol., 2017). Tradičný ocot sa vyrába zo surovín obsahujúcich cukor alebo škrob dvojstupňovou fermentáciou, kedy v prvej fáze fermentácie prichádza k premene cukru na etanol a v druhej fáze k premene etanolu na kyselinu octovú. Ocot sa môže vyrábať z rôznych surovín ako je hrozno, jablko, kukurica, jačmeň, ryža, srvátka, med a dokonca aj pivo. Kvalita octu závisí od použitej suroviny, spôsobu výroby, od octových baktérií, od spôsobu zrenia, od

pridávaných prímesí a pod. Octové baktérie sú prítomné v celom životnom prostredí a majú síce negatívny vplyv na hrozno a víno, ale sú hlavnými činiteľmi pri výrobe octu (Budak a kol.,2014; Mas a kol., 2014.

MATERIÁL A METODIKA

Priebeh octovej fermentácie sme sledovali v dvoch typoch vína: v hroznovom víne a matolínovom víne z odrody Veltlínske zelené z Malokarpatskej vinohradníckej oblasti. Do oboch vín sme jednotlivo aplikovali štyri rôzne druhy baktérií octového kvasenia, a to CCM 3620 *Acetobacter aceti*, CCM 3618 *Gluconobacter oxydans*, autochtónny kmeň *Gluconacetobacter saccharivorans* a komerčný kmeň z rodu *Acetobacter* sp. získaný z octárne zo Slovenska. Autochtónny kmeň sme izolovali z octu vyrobeného spontálnou fermentáciou a identifikovali pomocou PCR 16S rDNA génu. Štartovacie kultúry sme kultivovali v tekutom médiu Nutrient Broth No1 (Merck KGaA, Darmstadt, Nemecko). Octová fermentácia prebiehala v 4 L nádobách pri teplote 28 °C pomocou vzduchového kompresoru, ktorý vháňal vzduch do vína.

Počas priebehu octovej fermentácie sme pozorovali a vykonávali merania súvisiace so zmenami parametrov. Na meranie pH, teploty a O_2 sme použili prístroj pH meter MultiLine Multi 3620 IDS (Xylem Analytics Germany Sales GmbH & Co. KG, WTW, Weilheim, Germany) s elektródami WTW IDS SenTix 940 a FDO 11OO IDS SI Analytics. Stanovenie obsahu kyseliny octovej sme realizovali pomocou vysokovýkonnej kvapalinovej chromatografie (HPLC). Metódou izotachoforézy (ITP) sme identifikovali kyselinu vínnu, citrónovú, jablčnú a mliečnu. Stanovenie obsahu prchavých kyselín sme robili podľa STN 56 0216-6. Obsah alkoholu sme merali pomocou prístroja ebulioskopicky. Všetky merania sme uskutočnili v troch opakovaniach a vypočítali sme smerodajnú odchylku. Aróma-aktívne látky sme analyzovali pomocou plynového chromatografu Agilent 6890 N (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) vybaveným s hmotnostným spektrometrom Agilent 5973 (Agilent Technologies). Namerané hmotnostné spektrá sme porovnávali s hmotnostnými spektrami v on-line databáze NIST20 (National Institute of Standards and Technology , Maryland, USA) pomocou softvérov Enhanced ChemStation (Agilent technologie, Santa Clara, USA) a AMDIS.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Na začiatku fermentácie hodnota pH vo víne bola 3,51 a v matolínovom víne 4,14, u oboch typoch vína postupne klesala. Obsah alkoholu bol u všetkých vzoriek upravený na 7 % a počas fermentácie klesol až na 0. S klesajúcim obsahom alkoholu stúpal obsah kys. octovej a obsah prchavých kyselín. U hroznového vína bol obsah prchavých kyselín výrazne nižší

u všetkých kmeňov ako v matolínovom víne. Ocot by mal obsahovať min. 5 % kys. octovej. Vo vzorkách hroznového vína sa nám nepodarilo za 35 dní dosiahnúť túto hodnotu. Víno bolo vyrobené iným spôsobom ako matolínové víno a predpokladáme, že boli použité stabilizačné látky, ktoré asi inhibovali octovú fermentáciu. Naopak pri matolínových vínach, kde neboli použité stabilizačné látky, sme dosiahli u všetkých kmeňov viac ako 6% kys. octovej. GC-MS metódou sme identifikovali 32 zlúčenín u hroznového octu (tab. č. 1) a 29 prchavých zlúčenín u matolínového octu (tab. č. 2).

Tabuľka č. 1, Aróma-aktívne zlúčeniny v hroznovom víne

Zlúčeniny	CCM 3618 *Gluconobacter oxydans*		CCM 3620 *Acetobacter aceti*		*Gluconacetobacter saccharivorans*		*Acetobacter* sp.	
	7. deň	15. deň	7. deň	15. deň	7. deň	15. deň	7. deň	15. deň
	Plocha piku							
Izobutanal	0 ± 0,00	0 ± 0,00	0 ± 0,00	0 ± 0,00	0 ± 0,00	0,131 ± 0,19	0 ± 0,00	0 ± 0,00
1,2,5-Oxadiazol	0 ± 0,00	0,136 ± 0,19	0 ± 0,00	0 ± 0,00	0 ± 0,00	0 ± 0,00	0 ± 0,00	0 ± 0,00
Etylacetát	0 ± 0,00	17,073 ± 0,55	0 ± 0,00	4,104 ± 1,17	28,658 ± 0,59	1,492 ± 0,23	2,662 ± 0,25	6,268 ± 0,77
2-Metylbutanal	0 ± 0,00	0 ± 0,00	0 ± 0,00	0 ± 0,00	0 ± 0,00	1,471 ± 0,02	0 ± 0,00	0,128 ± 0,18
Izoamylaldehyd	0 ± 0,00	0 ± 0,00	0 ± 0,00	0 ± 0,00	0 ± 0,00	1,0187 ± 0,12	0 ± 0,00	0,138 ± 0,20
Etanol	35,092 ± 0,81	0,810 ± 0,11	36,154 ± 1,61	10,964 ± 2,07	22,532 ± 0,99	3,084 ± 0,01	36,392 ± 0,79	15,380 ± 0,69
2,4,5-Trimetyl-1,3-dioxolan	0 ± 0,00	0 ± 0,00	0 ± 0,00	0,161 ± 0,23	0 ± 0,00	1,487 ± 0,08	0 ± 0,00	0,646 ± 0,09
2,4-Dimetyl-1,3-dioxan	0 ± 0,00	0 ± 0,00	0 ± 0,00	0 ± 0,00	0,684 ± 0,03	0 ± 0,00	0,691 ± 0,04	0 ± 0,00
Dipropyl sukcinát	0 ± 0,00	0 ± 0,00	0 ± 0,00	0 ± 0,00	0 ± 0,00	1,466 ± 0,54	0 ± 0,00	0 ± 0,00
Izobutyl alkohol	0 ± 0,00	0 ± 0,00	0 ± 0,00	0 ± 0,00	0,096 ± 0,14	0 ± 0,00	0,543 ± 0,00	0,4317 ± 0,03
Izoamyl acetát	0 ± 0,00	1,876 ± 0,24	0 ± 0,00	0 ± 0,00	0,946 ± 0,38	0 ± 0,00	0 ± 0,00	0 ± 0,00
Monometyl sukcinát	0 ± 0,00	0 ± 0,00	0 ± 0,00	0 ± 0,00	0 ± 0,00	1,946 ± 1,15	0 ± 0,00	0 ± 0,00
4,5-dimetyl-2-pentadecyl-1,3-dioxolan	0 ± 0,00	0 ± 0,00	0 ± 0,00	0 ± 0,00	0 ± 0,00	1,307 ± 0,75	0 ± 0,00	0 ± 0,00
2-Heptanón	0,570 ± 0,03	0 ± 0,00	0 ± 0,00	0 ± 0,00	0 ± 0,00	0 ± 0,00	0 ± 0,00	0 ± 0,00
Izoamylalkohol	13,567 ± 0,16	6,918 ± 0,11	10,398 ± 0,65	11,732 ± 3,14	11,950 ± 0,69	11,579 ± 0,65	23,575 ± 0,52	20,095 ± 0,76
Etylhexanoát	5,054 ± 0,05	0 ± 0,00	0 ± 0,00	0,547 ± 0,18	0 ± 0,00	0 ± 0,00	3,584 ± 0,05	0,196 ± 0,28
Acetoín	0,209 ± 0,04	0 ± 0,00	0 ± 0,00	0 ± 0,00	0,209 ± 0,04	0 ± 0,00	0 ± 0,00	0 ± 0,00
Etyl laktát	1,059 ± 0,04	0,656 ± 0,01	1,065 ± 0,02	1,755 ± 0,40	0 ± 0,00	1,049 ± 0,03	0 ± 0,00	0 ± 0,00
Hexanol	0 ± 0,00	0 ± 0,00	0 ± 0,00	0 ± 0,00	0,293 ± 0,02	0 ± 0,00	0 ± 0,00	0 ± 0,00
Etyloktanoát	8,184 ± 0,82	0 ± 0,00	5,979 ± 0,17	0 ± 0,00	2,394 ± 0,20	0 ± 0,00	2,947 ± 0,15	0 ± 0,00
Kys. octová	0,254 ± 0,36	24,204 ± 1,40	0,690 ± 0,03	3,147 ± 0,14	9,856 ± 0,44	2,588 ± 0,20	0,489 ± 0,08	0,888 ± 0,08
Kys. dimetyloctová	0 ± 0,00	0,976 ± 0,05	0 ± 0,00	1,12 ± 0,20	0 ± 0,00	1,249 ± 0,25	0 ± 0,00	0,798 ± 0,07
Fenylacetaldehyd	0 ± 0,00	0 ± 0,00	0 ± 0,00	0 ± 0,00	0 ± 0,00	4,727 ± 0,45	0 ± 0,00	1,586 ± 0,03
Kys. izovalerová	0,600 ± 0,11	9,125 ± 0,14	0,487 ± 0,01	5,521 ± 0,46	0 ± 0,00	10,221 ± 0,23	0,502 ± 0,02	3,442 ± 0,02
Etylsukcinát	6,546 ± 0,19	3,285 ± 0,35	6,435 ± 0,68	7,007 ± 1,13	2,982 ± 0,05	6,103 ± 0,18	5,449 ± 0,01	5,084 ± 0,03
Metyl salicylát	0 ± 0,00	0 ± 0,00	0 ± 0,00	0 ± 0,00	0,141 ± 0,20	0,840 ± 1,19	0 ± 0,00	0,896 ± 0,38
2-fenyletylacetát	0 ± 0,00	4,529 ± 0,20	0 ± 0,00	0 ± 0,00	0,744 ± 0,02	0 ± 0,00	0 ± 0,00	0 ± 0,00
Kys. hexánová	3,753 ± 0,16	1,100 ± 0,13	4,220 ± 0,33	3,83, ± 0,57	1,610 ± 0,06	7,305 ± 0,38	3,609 ± 0,03	4,950 ± 0,07
Fenyletylalkohol	20,266 ± 0,17	28,847 ± 0,77	13,746 ± 0,99	49,085 ± 5,60	6,373 ± 0,28	36,966 ± 0,03	16,185 ± 0,78	36,869 ± 0,32
Kys. oktánová	4,121 ± 0,09	0 ± 0,00	19,988 ± 0,58	0 ± 0,00	10,199 ± 0,45	2,524 ± 0,14	2,777 ± 0,70	0,642 ± 0,05
Kys. nonánová	0,253 ± 0,36	0 ± 0,00	0 ± 0,00	0,212 ± 0,30	0 ± 0,00	0,490 ± 0,00	0 ± 0,00	0,610 ± 0,02
4-Etylfenol	0,679 ± 0,07	0,466 ± 0,04	0,676 ± 0,07	0,973 ± 0,17	0,334 ± 0,00	0,958 ± 0,07	0,594 ± 0,00	0,780 ± 0,03

Tabuľka č. 2, Aróma-aktívne zlúčeniny v matolínovom víne

Zlúčeniny	CCM 3618 *Gluconobacter oxydans*		CCM 3620 *Acetobacter aceti*		*Gluconacetobacter saccharivorans*		*Acetobacter* sp.	
	7. deň	15. deň	7. deň	15. deň	7. deň	15. deň	7. deň	15. deň
	Plocha piku							
Etylacetát	15,229 ± 2,22	0,852 ± 0,01	9,816 ± 1,09	0 ± 0,00	22,048 ± 6,55	22,400 ± 4,71	18,040 ± 0,07	19,078 ± 5,39
Etanol	21,067 ± 2,20	0 ± 0,00	28,830 ± 0,38	0 ± 0,00	20,634 ± 0,15	10,558 ± 1,09	22,954 ± 0,59	4,198 ± 0,20
2,4-Dimetyl-1,3-dioxan	0 ± 0,00	0 ± 0,00	0 ± 0,00	0 ± 0,00	0,1566 ± 0,22	0,247 ± 0,00	0,3761 ± 0,06	0 ± 0,00
Izobutyl alkohol	0 ± 0,00	0 ± 0,00	0,408 ± 0,01	0 ± 0,00	0,415 ± 0,05	0,286 ± 0,02	0,5436 ± 0,02	0,105 ± 0,15
Izoamyl acetát	0,232 ± 0,33	0 ± 0,00	0 ± 0,00	1,403 ± 0,17	1,198 ± 1,05	0,203 ± 0,29	0,844 ± 0,45	0 ± 0,00
Izoamylalkohol	5,951 ± 1,11	0 ± 0,00	14,89 ± 0,94	2,421 ± 0,05	11,539 ± 0,36	7,466 ± 0,82	13,638 ± 0,09	4,567 ± 0,22
Etylhexanoát	0 ± 0,00	0 ± 0,00	0 ± 0,00	0 ± 0,00	0,185 ± 0,26	0,110 ± 0,16	0,395 ± 0,16	0 ± 0,00
Acetoín	0 ± 0,00	1,710 ± 0,08	0 ± 0,00	0,380 ± 0,02	0 ± 0,00	0 ± 0,00	0 ± 0,00	0 ± 0,00
1-Hexanol	0 ± 0,00	0 ± 0,00	0,156 ± 0,22	0 ± 0,00	0 ± 0,00	0 ± 0,00	0 ± 0,00	0 ± 0,00
2-Acetoxy-3-butanón	0 ± 0,00	0,655 ± 0,01	0 ± 0,00	0 ± 0,00	0 ± 0,00	0 ± 0,00	0 ± 0,00	0 ± 0,00
Etyloktanoát	3,310 ± 0,59	0 ± 0,00	4,005 ± 0,11	0 ± 0,00	3,781 ± 1,23	1,232 ± 0,56	5,898 ± 1,39	0,296 ± 0,11
Kys. octová	8,562 ± 0,92	32,420 ± 0,55	3,858 ± 0,01	47,878 ± 0,05	7,835 ± 0,95	21,479 ± 2,23	13,467 ± 0,19	37,879 ± 2,29
2,3-Diacetoxybután	0 ± 0,00	16,453 ± 0,58	0 ± 0,00	0,310 ± 0,00	0 ± 0,00	0 ± 0,00	0 ± 0,00	0 ± 0,00
Benzaldehyd	0 ± 0,00	0,617 ± 0,01	0 ± 0,00	0,303 ± 0,00	0 ± 0,00	0 ± 0,00	0 ± 0,00	0 ± 0,00
Kys. izomaslová	0 ± 0,00	3,437 ± 0,11	0 ± 0,00	0 ± 0,00	0 ± 0,00	0 ± 0,00	0 ± 0,00	0,283 ± 0,07
Ethyl decanoát	0 ± 0,00	0 ± 0,00	0,226 ± 0,32	0 ± 0,00	0 ± 0,00	0 ± 0,00	0 ± 0,00	0 ± 0,00
Kys. Izovalerová	0 ± 0,00	15,615 ± 0,07	0 ± 0,00	2,015 ± 0,00	0 ± 0,00	1,017 ± 0,19	0,886 ± 0,03	2,918 ± 0,49
Etylsukcinát	5,403 ± 0,35	7,922 ± 0,29	5,264 ± 0,24	4,472 ± 0,02	4,527 ± 1,15	4,438 ± 0,18	4,507 ± 0,43	4,778 ± 0,17
Etyl 9-decenoát	0 ± 0,00	0 ± 0,00	0,688 ± 0,04	0 ± 0,00	0 ± 0,00	0 ± 0,00	0 ± 0,00	0 ± 0,00
Metyl salicylát	0 ± 0,00	0 ± 0,00	0 ± 0,00	0 ± 0,00	0 ± 0,00	0,914 ± 0,73	0 ± 0,00	1,471 ± 1,08
2-fenyletylacetát	0,936 ± 0,00	0,710 ± 0,04	0,124 ± 0,18	12,886 ± 0,11	1,829 ± 0,32	3,129 ± 0,49	0,392 ± 0,03	3,639 ± 0,44
Fenyletyl izobutyrát	0 ± 0,00	0 ± 0,00	0,348 ± 0,08	0 ± 0,00	0 ± 0,00	0 ± 0,00	0 ± 0,00	0 ± 0,00
Kys. hexánová	1,154 ± 0,07	4,313 ± 0,07	0,881 ± 0,10	1,706 ± 0,03	1,087 ± 0,22	1,590 ± 0,11	1,198 ± 0,03	2,131 ± 0,17
Fenyletylalkohol	33,396 ± 4,03	8,250 ± 0,33	23,296 ± 1,30	19,190 ± 0,04	18,977 ± 4,84	20,806 ± 0,94	10,206 ± 0,62	12,060 ± 0,91
2-Metoxy-4-etylfenol	0 ± 0,00	0 ± 0,00	0,814 ± 0,02	0,736 ± 0,01	0,759 ± 0,18	0,765 ± 0,03	0,786 ± 0,08	0,768 ± 0,02
Kreosol	0,878 ± 0,09	1,516 ± 0,05	0 ± 0,00	0 ± 0,00	0 ± 0,00	0 ± 0,00	0 ± 0,00	0 ± 0,00
Kys. oktánová	3,884 ± 0,04	3,329 ± 0,10	5,670 ± 0,24	5,773 ± 0,00	5,028 ± 1,48	3,361 ± 0,07	5,410 ± 0,02	5,202 ± 0,11
Etyl hydrogen sukcinát	0 ± 0,00	0 ± 0,00	0,690 ± 0,01	0,527 ± 0,16	0 ± 0,00	0 ± 0,00	0 ± 0,00	0 ± 0,00
Kyselina fenyloctová	0 ± 0,00	2,200 ± 0,65	0 ± 0,00	0 ± 0,00	0 ± 0,00	0 ± 0,00	0,459 ± 0,06	0,627 ± 0,05

ZÁVER

Výsledky predstavujú rozšírenie vedeckých poznatkov a tiež môžu prispieť k produkcií octu vysokej kvality, napr. môžu sa využiť pri navrhovaní nových štartovacích kultúr. Uvedené aróma-aktívne látky môžu pozitívne ovplyvňovať vôňu a chuť octu. Každý ocot mal svoj vlastný špecifický charakter, čo potvrdilo dôležitosť výberu štartérov pre výrobu octu. Výsledky meraní použitých pri vzorkách hroznového vína a matolínového vína naznačili, že matolíny sú vhodnejšie na výrobu octu. Do budúcna sa predpokladá využitie týchto kmeňov aj v submerznej fermentácií s hoblinami, ktoré by mohli uplatniť aj malovýrobcovia vínnych octov.

POĎAKOVANIE

Táto publikácia vznikla vďaka podpore v rámci Operačného programu Integrovaná infraštruktúra pre projekt: Dopytovo-orientovaný výskum pre udržateľné a inovatívne potraviny, Drive4SIFood, 313011V336 (313V33600009), spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

POUŽITÁ LITERATÚRA

1. BERES, C., SIMAS-TOSIN, F.F., CABEZUDO, I., FREITAS, S.P., IACOMINI, M., MELLINGER-SILVA, C., CABRAL, L.M., 2016. Antioxidant dietary fibre recovery from Brazilian Pinot noir grape pomace. Food Chem. 201, 145–152. http://dx.doi.org/10.1016/ j.foodchem.2016.01.039.
2. BUDAK, NILGÜN H., ELIF AYKIN, ATIF C. SEYDIM, ANNEL K. GREENE A ZEYNEP B. GUZEL-SEYDIM. Functional Properties of Vinegar. *Journal of Food Science* [online]. Institute of Food Technologists, 8. May 2014, (5) [cit. 2021-11-24]. Dostupné z: https://ift.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/1750-3841.12434
3. KALLI, E., LAPPA, I., BOUCHAGIER, P., TARANTILIS, P.A., SKOTTI E., 2018. Novel application and industrial exploitation of winery by products. Bioresource and Bioprocessing, 5, 46, https://doi.org/10.1186/s40643-018-0232-6.
4. MAS, ALBERT, MARÍA JESÚS TORIJA, MARÍA DEL CARMEN GARCÍA-PARRILLA A ANA MARÍA TRONCOSO. Acetic Acid Bacteria and the Production and Quality of Wine Vinegar. *The Scientific World Journal* [online]. Spain: Facultad de Enología, Universitat Rovira i Virgili, 2014, , 6 pages [cit. 2021-11-25]. Dostupné z: https://www.hindawi.com/journals/tswj/2014/394671/

Kontaktná adresa: Ženišová Katarína, Department of microbiology, molecular biology and biotechnology, Food Research Institute -National Agricultural and Food Centre, Priemyselná 4, P. O. Box 31, 824 75 Bratislava 25, Slovak Republic; E-mail: katarina.zenisova@nppc.sk

GENERÁLNY PARTNER - SYRÁREŇ BEL SLOVENSKO, a.s.



HLAVNÍ PARTNERI - BILLA, s.r.o. Bratislava



HLAVNÍ PARTNERI - BILLA, s.r.o. Bratislava



HLAVNÍ PARTNERI - Labaš, s.r.o. a Potraviny FRESH, s.r.o.





HLAVNÍ PARTNERI - Labaš, s.r.o. a Potraviny FRESH, s.r.o.



HLAVNÍ PARTNERI - Labaš, s.r.o. a Potraviny FRESH, s.r.o.



HLAVNÍ PARTNERI - Tesco Stores SR, a.s.



MEDIÁLNI PARTNERI - FOLIA VETERINARIA - vedecké periodikum Univerzity veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach

FOLIA VETERINARIA

The scientific journal of the
UNIVERSITY OF VETERINARY MEDICINE
AND PHARMACY IN KOŠICE — Slovakia

ISSN 0015-5748
eISSN 2453-7837

SPONZORI - AQUA PRO EUROPE, a.s.



SPONZORI - AT Dunaj, spol. s r.o., Mliekareň - Syráreň Dubník



SPONZORI - Dalton, spol. s r.o. - Staromestská Mäsiareň

DALTON
MÄSOKOMBINÁT KOŠICE

Staromestská
Mäsiareň

SPONZORI - Koliba, a.s.



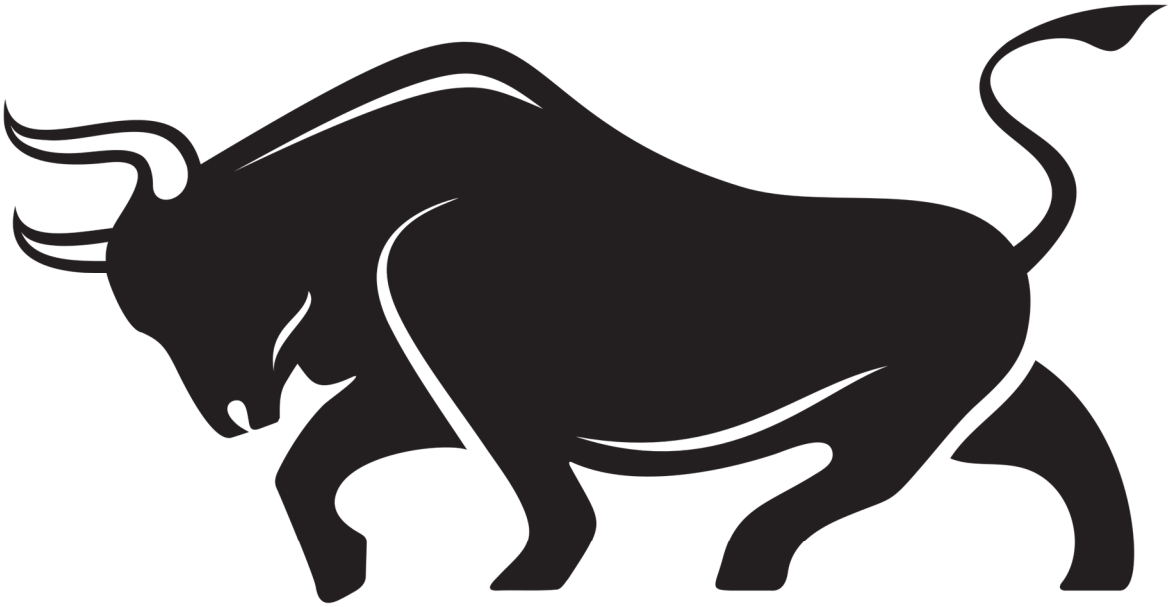
SPONZORI - Milk Agro, s.r.o.



SPONZORI - REGIA TT, s.r.o. - Pivnica Orechová

PIVNICA
ORECHOVÁ

SPONZORI - TAURIS® GROUP



TAURIS® GROUP

TAURIS

mäsiarstvo u Býka

ORIGINÁL TAURIS Zipser CHUŤ KVALITY A TRADÍCIE

Ryba Bistro

Ryba KOŠICE

VYSTAVOVATELIA - BioIng, s.r.o.



VYSTAVOVATELIA - Biomedica Slovakia, s.r.o.

BIOMEDICA

Your
Partner in
Agrofood
Diagnostics


Mycotoxins

HACCP/
Food Hygiene

Allergens

Pathogen


GMO/
Residues


Biomedica Slovakia s.r.o.
Drobného 27 • 841 01 Bratislava • Slovakia
T +421 2 693 099 01 • office@bmgrp.sk • www.bmgrp.sk

VYSTAVOVATELIA - Chr. Hansen Poland Sp. z o.o.



Zlepšite svoju produktivitu

Optimalizujte svoj výrobný proces bez ovplyvnenia chute, konzistencie alebo kvality Vašich výrobkov.

Kultúry a enzýmy spoločnosti Chr. Hansen Vám pomôžu získať viac z menšieho množstva surovín.

Po naskenovaní QR kódu získate viac informácií na našich lokálnych webových stránkach

Chr. Hansen Poland Sp. z o.o., organizačná zložka
Pre viac informácií kontaktujte pljahu@chr-hansen.com
alebo navštívte www.chr-hansen.com

CHR. HANSEN
Improving food & health

VYSTAVOVATELIA - JEMO TRADING, spol. s r.o.

profood
JEMO TRADING

* Špecifické testy pre laboratória
** Testy pre výrobné prevádzky
*** Sterové testy pre reštaurácie, jedálne, predajne potravín

Z ponuky vyberáme: mykotoxíny, alergény, vitamíny, PCR testy, obsahové látky, ATP, mikrobiológia, ...



www.profood.sk

VYSTAVOVATELIA - Latte ingredients, s.r.o.



VYSTAVOVATELIA - NOACK - SLOVAKIA, spol. s r.o.

NOACK – SLOVAKIA
Diagnostika

Dodávame diagnostické súpravy a prístroje pre chemické a mikrobiologické analýzy a kontrolu hygieny a sanitácie

V portfóliu našich produktov nájdete:

- mikrobiologické živné pôdy Solabia Biokar a 3M Petrifilm
- rýchla mikrobiologická metóda CertaBlue (24 hod. CPM, 48 hod. Kv. a pl...)
- kontrola ovzdušia – AirWel 200 L/min
- pomôcky na odber vzoriek z prostredia – sterové tampóny, abrazívne hubky
- rýchle metódy stanovenia patogénov Salmonella, Listeria, Cronobacter
- prístroj na rýchlu kontrolu hygieny – 3M Clean-Trace luminometer LM1
- rýchle testy na kontrolu alergénov, mykotoxínov, inhibičných látok
- enzymatické testy – chemické zloženie potravín (kyseliny, cukry, vláknina a.i.)
- analyzátory mlieka, mäsa a obilnín a produktov z nich

V prípade záujmu nás neváhajte kontaktovať, rady vám poskytneme informácie o všetkých dodávaných testoch.



www.noackgroup.com

NOACK – SLOVAKIA, spol. s r.o.
Seberíniho 1
821 03 Bratislava
tel.: +421 2 4341 1631
mob.: +421 905 293 756
e-mail: office.sk@noackgroup.com

AUSTRIA BULGARIA CROATIA CZECH REPUBLIC HUNGARY POLAND ROMANIA SERBIA SLOVAKIA SLOVENIA

VYSTAVOVATELIA - O.K. SERVIS BioPro, s.r.o.



VYSTAVOVATELIA - ŠKOLSKÉ HOSPODÁRSTVO - BÚŠLAK, spol. s r.o.


Nitra, Slovak Republic
Košice, Slovak Republic
FOODINOVO
ERASMUS+
PARTNERSHIP
Brno, Czech Republic
Krakow, Poland
Co-funded by the
Erasmus+ Programme
of the European Union
Erasmus+ Key Action 2
Cooperation among
organisations and institutions
FOODINOVO
Innovation of the structure and content of study programs
profiling food study fields with a view to digitizing teaching
The implementation of the project will significantly improve the quality of undergraduate and postgraduate education as well as the professional level of the teachers of the universities involved in the project. Project investigators have been cooperating on a long-term basis and contribute significantly to the education and training of food professionals in their countries.
Slovak University of Agriculture in Nitra
University of Veterinary Medicine and Pharmacy in Košice
University of Veterinary Sciences Brno
University of Agriculture in Krakow

Názov publikácie:	HYGIENA ALIMENTORUM XLIII ZDRAVOTNÁ BEZPEČNOSŤ A KVALITA MLIEČNYCH A RASTLINNÝCH KOMODÍT – AKTUÁLNE PROBLÉMY A TRENDY SAFETY AND QUALITY OF MILK AND PLANT COMMODITIES – CURRENT ISSUES AND TRENDS
Druh publikácie:	Recenzovaný zborník prednášok a posterových prezentácií z medzinárodnej vedeckej konferencie
Autori:	Kolektív autorov
Zostavili:	BODNÁROVÁ Libuša, MVDr.
Recenzovali:	VAŠKOVÁ Janka, doc. RNDr., PhD. Univerzita Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach, Slovenská republika LOVAYOVÁ Viera, Ing., PhD. Univerzita Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach, Slovenská republika
Vydal:	Štátna veterinárna a potravinová správa Slovenskej republiky Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach
Vytlačil:	Štátna veterinárna a potravinová správa Slovenskej republiky, Botanická 17, 842 13 Bratislava
Náklad:	220 ks
Počet strán:	702 strán
Dátum vydania:	Máj 2023
Vydanie:	Prvé
Poďakovanie:	Publikácia bola spolufinancovaná programom Európskej Únie Erasmus+ projektom Inovácia štruktúry a obsahového zamerania študijných programov profilujúcich potravinárske študijné odbory s ohľadom na digitalizáciu výučby (FOODINOVO, 2020-1-SK01-KA203-078333).

ISBN 978 – 80 – 8077 – 787 – 6

ISBN 978 – 80 – 8077 – 787 – 6