

<https://doi.org/10.15414/2021.9788055223537>

BEZPEČNOSŤ A KVALITA POTRAVÍN

(zborník vedeckých prác)

Nitra 2021



KATEDRA HYGIENY
A BEZPEČNOSTI POTRAVÍN

FAKULTA BIOTECHNOLÓGIE
A POTRAVINÁRSTVA



SLOVENSKÁ POĽNOHOSPODÁRSKA UNIVERZITA V NITRE
FAKULTA BIOTECHNOLÓGIE A POTRAVINÁRSTVA
KATEDRA HYGIENY A BEZPEČNOSTI POTRAVÍN

BEZPEČNOSŤ A KVALITA POTRAVÍN

(zborník vedeckých prác)



Nitra 2021

Názov:

Bezpečnosť a kvalita potravín - zborník vedeckých prác

Zostavovatelia:

prof. Ing. Jozef Golian, Dr.

Ing. Jozef Čapla, PhD.

Recenzenti:

prof. Ing. Mária Angelovičová, CSc.

prof. Ing. Marcela Capcarová, DrSc.

prof. Ing. Jozef Golian, Dr.

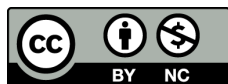
doc. Ing. Andrea Mendelová, PhD.

prof. Ing. Dana Tančinová, PhD.

Schválila rektorka Slovenskej poľnohospodárskej univerzity v Nitre dňa 19. 7. 2021
ako online zborník vedeckých prác.

This work is published under the license of the Creative Commons Attribution NonCommercial
4.0 International Public License (CC BY-NC 4.0).

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>



Nitra 2021

ISBN 978-80-552-2353-7

OBSAH

Produkcia ochratoxínu a kmeňmi rodu <i>Aspergillus</i> <i>Zuzana Barboráková, Roman Labuda, Georg Häubl, Zuzana Mašková, Dana Tančinová</i>	5
Rozdiely v zložení zdanlivo rovnakých značkových potravinárskych výrobkov a vplyv na spotrebiteľov <i>Jozef Čapla, Peter Zajác, Jozef Golian, Lucia Benešová, Tomáš Vlčko</i>	11
Analytické prístupy k hodnoteniu chráneného označenia pôvodu potravín <i>Jozef Čapla, Peter Zajác, Jozef Golian, Alica Bobková, Ľubomír Belej, Alžbeta Demianová</i>	22
Falšovanie mlieka a metódy detekcie <i>Jozef Čurlej, Peter Zajác, Jozef Čapla, Jozef Golian, Silvia Jakobová</i>	35
Antifungálna aktivita vybraných druhov rastlinných silíc na rast izolátov <i>Penicillium commune</i> <i>Denisa Foltinová, Dana Tančinová, Miroslava Císarová</i>	50
Implementácia Nutri-Score v Európe ako nástroja verejného zdravia na zlepšenie výživového stavu populácie na základe prísneho vedeckého zázemia <i>Jozef Golian, Tomáš Vlčko, Jozef Čapla</i>	55
Variabilita obsahu organických kyselín vo vybraných odrodových bielych vínach slovenskej produkcie <i>Silvia Jakobová, Martina Fikselová, Zuzana Aláčová, Martin Marko, Andrea Mendelová, Michal Ševčík</i>	63
Biodiverzita lokálnych genetických zdrojov hovädzieho dobytku ako súčasť potravinovej bezpečnosti Slovenska <i>Radovan Kasarda, Jozef Golian, Ľuboš Vostrý, Hana Vostrá-Vydrová, Radoslav Židek, Ľubomír Belej, Nina Moravčíková</i>	70
Využitie bezlepkových kvasov vo výrobkoch určených pre celiatikov <i>Jana Kolačková, Martina Fikselová, Stanislava Lukáčová, Michaela Kleinová, Jozef Čurlej, Dagmar Kozelová</i>	77
Účinok podávania xantohumolu v krmive na rast, jatočnú výťažnosť, oxidačnú stabilitu a biochémii krvi u japonských prepelíc <i>Zuzana Lacková, František Zigo, Zuzana Farkašová</i>	86
Mikrobiálne fýla zastúpené v ovčom hrdkovom syre <i>Andrea Lauková, Lenka Micenková, Valentína Focková, Monika Pogány Simonová, Martin Tomáška, Miroslav Kološta</i>	92
Sledovanie vybraných parametrov mikrobiologickej kvality bravčových klobás od rôznych domácich producentov <i>Ľubomír Lopašovský, Lucia Zeleňáková, Simona Kunová, Silvia Jakobová</i>	96
Stanovení kvalitatívnych parametrov jablčného moštu odrúdy 'golden delicious' pomocí dvou typů near infrared spektrometru <i>Martina Marečková, Veronika Danková, Ľubor Zelený, Pavol Suran</i>	105
Mykocenóza jačmeňa slovenského pôvodu so zameraním na zástupcov rodu <i>Fusarium</i> <i>Zuzana Mašková, Dana Tančinová, Zuzana Barboráková, Miriam Solgajová</i>	114
Antimikrobiálna rezistencia baktérii <i>Staphylococcus chromogenes</i> izolovaných zo syrov <i>Ivana Regecová, Jana Výrostková, František Zigo, Monika Pipová, Pavlína Jevinová, Soňa Demjanová</i>	123
The importance of monitoring the quality of drinking water to farms for primary milk production <i>Nad'a Sasáková, Tatiana Hrušková, Zuzana Bujdošová, Mária Vargová, Katarína Veszelits Laktičová, Ján Kachnič, František Zigo</i>	128
Technologické zpracování jedlého hmyzu <i>Petra Škvorová, Lenka Kouřimská, Rudolf Ševčík</i>	134
Determination of hygienic level of slaughterhouse by ATP method and by microbiological control of effectiveness of disinfection <i>Mária Vargová, Katarína Veszelits Laktičová, Nad'a Sasáková, František Zigo</i>	139
Plytvanie potravinami a spotrebiteľské správanie <i>Tomáš Vlčko, Jozef Golian, Kristína Zimanová, Jozef Čapla</i>	145
Detekcia druhov rodu <i>Enterococcus</i> v syroch a ich antimikrobiálna rezistencia <i>Jana Výrostková, Ivana Regecová, František Zigo, Eva Dudriková, Jana Maľová, Boris Semjon</i>	158
Hygienicko-epidemiologické aspekty výskytu vírusových gastroenteritíd na Slovensku <i>Zeleňáková Lucia</i>	163
Regenerácia zeleninovo-ryžových jedál pomocou mikrovlnného ohrevu z hľadiska mikrobiologického hodnotenia <i>Lucia Zeleňáková, Anna Kolesárová, Simona Kunová</i>	174
Vplyv aplikácie inokulantu na obsah vybraných polyfenolových zlúčenín v semenách lupiny bielej <i>Zetochová Erika, Tirdilová Ivana, Vollmannová Alena</i>	182
Occurrence of some pathogenity factors in <i>Staphylococci</i> isolated from mastitic dairy cows <i>František Zigo, Zuzana Farkašová, Zuzana Lacková, Jana Výrostková, Ivana Regecová, Mária Vargová, Nad'a Sasáková</i>	190

PRODUKCIA OCHRATOXÍNU A KMEŇMI RODU *ASPERGILLUS* OCHRATOXIN A PRODUCTION BY *ASPERGILLUS* STRAINS

Zuzana Barboráková, Roman Labuda, Georg Häubl, Zuzana Mašková, Dana Tančinová

Abstract: The aim of this study was to obtain the information on the OTA production by *Aspergillus* strains on YES (Yeast Extract Sucrose agar) under different cultivation conditions. Production of OTA was observed on 10th day of cultivation at room temperature (23 ± 1 °C), at 18 ± 1 °C and 30 ± 1 °C. HPLC analysis (High Performance Liquid Chromatography) was used for confirmation of OTA production. Based on the results from this study we can conclude that the most productive OTA producers were *A. westerdijkiae* strains obtained from grapes of Slovak origin (isolated in 2011). In addition, the strains *A. sulphureus*, *A. ochraceus* 2 and *A. albertensis* possessed good production ability, as well. The strains of *A. carbonarius* tested in this study were found to be the weakest producers of OTA. The OTA production was significantly affected by cultivation conditions that were dependent on requirements of individual strains surveyed here. Thus, each strain tested in this study showed different optimal conditions for the OTA production.

Keywords: *Aspergillus*, HPLC, ochratoxin A, YES, temperature

ÚVOD

Ochratoxín A (OTA) je jeden z najdôležitejších a najtoxickejších mykotoxínov (Jørgensen, K., 1998; Malir et al., 2016). Prvýkrát bol izolovaný a chemicky analyzovaný v roku 1965 v Južnej Afrike ako toxický metabolit *Aspergillus ochraceus* (Van der Merwe et al., 1965). Jedná sa o sekundárny metabolit mikroskopických vlákňitých húb patriacich do rodov *Aspergillus* a *Penicillium* (Khouri et Atoui, 2010). Z penicílií produkujú tento mykotoxín iba druhy *P. verrucosum* a *P. nordicum* (Malir et al., 2013), z aspergilov najmä *A. ochraceus* a príbuzné „čierne aspergily“ zo sekcie *Nigri*. Tieto druhy sa líšia svojou ekológiou, komoditami, v ktorých sa vyskytujú a tiež frekvenciou výskytu v rôznych geografických regiónoch (Benford et al., 2001). *P. verrucosum* rastie pri teplotách pod 30 °C a pri vodnej aktivite minimálne 0,8. Nachádza sa preto v chladných miernych oblastiach, je zdrojom OTA v obilninách a vo výrobkoch z obilnín v Európe a Kanade (Benford et al., 2001; Pitt, 2002). V roku 2001 bola potvrdená produkčná schopnosť aj pri druhu *P. nordicum*, ktorý produkuje OTA najmä v syroch, mäse a mäsových výrobkoch (Larsen et al., 2001). *A. ochraceus* rastie pri miernych teplotách a pri vodnej aktivite nad 0,8. Nachádza sa sporadicky v mnohých skladovaných potravinových komoditách vrátane obilnín, môže tiež infikovať kávové zrná počas sušenia na slnku a je zdrojom OTA v zelených kávových zrnách. *A. carbonarius* rastie pri vysokých teplotách a je spájaný s dozrievaním ovocia, najmä hrozna. Vďaka svojim čiernym spóram je vysoko odolný voči slnečnému žiareniu a prežíva sušenie na slnku. Je zdrojom OTA v čerstvom hrozne, hrozienkach, vo víne a káve (Benford et al., 2001). Produkčná schopnosť bola dokázaná aj pri *A. tubingensis* (Medina et al., 2005), *A. westerdijkiae* a *A. steinii* (Frisvad et al., 2004) a tiež pri ďalších aspergiloch zo sekcie *Nigri* – *A. laticoffeatus* a *A. sclerotiorum*, ktoré boli izolované z kávy (Samson et al., 2004). OTA produkujú aj *A. alliaceus* a *A. albertensis*, ktoré boli najskôr zaradené do sekcie *Circumdati*, ale neskôr boli premiestnené do sekcie *Flavi* (Peterson, 2000).

OTA je mykotoxín produkovaný mikromycétami najmä v nevhodne skladovaných potravinárskych komoditách (Pfohl-Leszkowicz et Manderville, 2007). Je produkovaný počas skladovania obilnín, výrobkov z obilnín a iných rastlinných produktov, ako sú bylinky, koreniny a hrozno. OTA sa však môže nachádzať aj v živočíšnych produktoch, najmä v bravčovom mäse, v klobásach obsahujúcich bravčovú krv a v orgánoch (obličky, pečeň),

do ktorých sa dostáva v dôsledku kŕmenia zvierat zaplesneným krmivom (Petzinger et Ziegler, 2000).

OTA sa venuje pozornosť kvôli jeho nefrotoxickým, imunotoxickým, teratogénnym, karcinogénnym (Tessini et al., 2010), hepatotoxickým, embryotoxickým a neurotoxickým účinkom (Malir et al., 2013). OTA môže vyvolať génové mutácie, ale mechanizmus genotoxicity ešte nie je celkom objasnený (Rinaldi et al., 2007). Inhibuje syntézu proteínov, spôsobuje defekt vápnikovej homeostázy, vyvoláva peroxidáciu lipidov, oxidačný stres a poškodenie DNA (Almela et al., 2007).

OTA je u nás legislatívne sledovaný mykotoxín, ktorý má prípustný týždenný príjem vo výške 120 ng.kg⁻¹ telesnej hmotnosti (Nariadenie komisie č. 105/2010). Je evidovaný ako pravdepodobný ľudský karcinogén - trieda 2B (IARC, 1993).

Cieľom našej štúdie bolo zistiť OTA produkčnú schopnosť vybraných domácich i zahraničných kmeňov rodu *Aspergillus*, ktoré boli kultivované 10 dní na YES pri rôznych kultivačných podmienkach.

MATERIÁL A METODIKA

V našej štúdii sme použili 9 kmeňov patriacich do rodu *Aspergillus* (Tabuľka 1). Testované kmene sme kultivovali na agarovom médiu s kvasničným extraktom a sacharózou (YES). Kultivácia prebiehala 10 dní pri izbovej teplote (23 ± 1 °C), pri teplote 18 ± 1 °C, v oboch prípadoch pri prirodzenom svetle a pri teplote 30 ± 1 °C v tme. Na očkovanie médií sme použili spórové suspenzie jednotlivých kmeňov (100 µl), ktoré boli vopred pripravené vo fyziologickom roztoku.

Tabuľka 1: Prehľad kmeňov rodu *Aspergillus* použitých v štúdii

Študovaný kmeň	Pôvod
<i>A. ochraceus</i> 1	Rakúsko/IFA
<i>A. ochraceus</i> 2	Rakúsko/Biomin
<i>A. albertensis</i>	Kanada/UAMH 2976
<i>A. carbonarius</i> 1	Rakúsko/hrozno
<i>A. carbonarius</i> 2	Holandsko/CBS 127.49
<i>A. carbonarius</i> 3	Arménsko
<i>A. sulphureus</i>	Holandsko/CBS 550.65
<i>A. westerdijkiae</i> 1	Slovensko KMi9/hrozno
<i>A. westerdijkiae</i> 2	Slovensko KMi12/hrozno

CBS - Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, Holandsko; IFA – Department für Agrarbiotechnologie, BOKU, Tulln, Rakúsko; KMi - Zbierka Katedry mikrobiológie, Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre; UAMH - Microfungus Collection and Herbarium, University of Alberta, Kanada.

Na 10. deň kultivácie sme korkovrtom o priemere 9 mm urobili 3 výseky zo živného média spolu s mycéliom. Výseky sme extrahovali v 500 µl roztoku etylacetátu s 0,1 % kyselinou octovou. Extrakt sme miešali pomocou vortexu (približne 5 minút) a prefiltrovali cez 13 mm striekačkový filter 0,2 µl PTFE (VWR International, USA). Prefiltrovaný extrakt v objeme 100 µl sme vysušili a pred HPLC analýzou rozpustili pridaním 500 µl roztoku acetonitril:0,1 % H₃PO₄ (20:80, v/v).

HPLC analýzu sme vykonali v laboratóriách spoločnosti Romer Labs Division Holding GmbH (Tulln, Rakúsko) na systéme Dionex Ultimate 3000 s využitím kolóny Luna C₁₈ (II), 250x 3 mm, 5 µm (Phenomenex, Nemecko). Ako rozpúšťadla sme použili 0,1 % H₃PO₄ vo vode (A) a acetonitril (B) s rýchlosťou toku 500 µl.min⁻¹: 0 min 45 % B; 1,5 min 45 – 60 % B; 11,5 min 65 % B; 14,5 min 65 - 45 % B; 14,6 min 45 % B. Injekčný objem bol 20 µl. Detekcia prebiehala pri vlnovej dĺžke 331 nm s využitím fotodiódového detektora.

Na analýzu sme použili referenčný štandard OTA (Romer Labs Division Holding GmbH, Rakúsko).

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Produkcia OTA sa výrazne líšila v závislosti od použitého produkčného kmeňa a použitých kultivačných podmienok (Tabuľka 2). Kmeň *A. ochraceus* 2 bol produkčnejší ako kmeň *A. ochraceus* 1. Na YES médiu pri teplote 18 ± 1 °C a prirodzenom svetle na 10. deň kultivácie vyprodukoval $123,18 \mu\text{g.g}^{-1}$ OTA, zatiaľ čo kmeň *A. ochraceus* 1 vyprodukoval $95,63 \mu\text{g.g}^{-1}$ OTA. Najväčšie množstvo OTA vyprodukoval kmeň *A. ochraceus* 2 kultivovaný pri teplote 30 ± 1 °C v tme ($171,07 \mu\text{g.g}^{-1}$), zatiaľ čo *A. ochraceus* 1 pri rovnakých podmienkach kultivácie vyprodukoval iba $10,94 \mu\text{g.g}^{-1}$. Trenk et al. (1971) tiež sledovali vplyv teploty a dĺžky doby kultivácie na produkciu OTA kmeňom *A. ochraceus*, ktorý bol kultivovaný na rôznych cereálnych produktoch. Podľa citovaných autorov bola optimálna teplota pre produkciu OTA 28 °C a optimálna doba kultivácie pri tejto teplote 7 až 14 dní v závislosti od použitého kultivačného substrátu. Bacon et al. (1973) uvádzajú, že interakcia vyššej teploty kultivácie (30 °C) a vyššej vlhkosti má pozitívny vplyv na produkciu OTA. Kultivácia pri teplote 30 ± 1 °C sa však pri našom kmeni *A. ochraceus* 1 ukázala ako najmenej vhodná, ale pre kmeň *A. ochraceus* 2 bola najvhodnejšia, čo sa zhoduje s tvrdením vyššie citovaných autorov.

Kmeň *A. albertensis* vyprodukoval najväčšie množstvo OTA ($159,57 \mu\text{g.g}^{-1}$) pri rovnakých podmienkach kultivácie ako kmeň *A. ochraceus* 2 (kultivácia v tme pri teplote 30 ± 1 °C). Bayman et al. (2002) uvádzajú, že kmene *A. albertensis* produkujú veľké množstvá OTA (50 až $300 \mu\text{g.g}^{-1}$), čo sa zhoduje aj s našim zistením.

„Čierne aspergily“ patria medzi hlavných producentov OTA vyskytujúcich sa v krajinách s teplým podnebím (Kapetanakou et al., 2009). Na produkciu OTA sme testovali 3 kmene *A. carbonarius*, no pri žiadnom z nich sme nezistili významnú produkčnú schopnosť. Najprodukčnejší z nich bol kmeň *A. carbonarius* 1, ktorý na YES médiu vyprodukoval $7,15 \mu\text{g.g}^{-1}$ OTA pri kultivácii pri izbovej teplote 18 ± 1 °C a prirodzenom svetle, teda pri kultivačných podmienkach, ktoré vyhovovali aj kmeňu *A. ochraceus* 1. Zhoduje sa to s výsledkami štúdie Esteban et al. (2016), ktorí uvádzajú, že OTA koncentrácia pri kmeňoch *A. carbonarius* bola vyššia pri teplote 15 °C ako pri teplote 30 °C. Bellí et al. (2004) uvádzajú, že týždňová kultivácia je všeobecne dostatočná pre produkciu OTA, ale že niektoré izoláty vyžadujú kultiváciu dlhšiu ako 14 dní ku dosiahnutiu maximálnej produkcie OTA. Kultivácia pri teplote 30 ± 1 °C, ktorá je v literatúre často označovaná ako najvhodnejšia pre produkciu OTA (Spadaro et al., 2010), sa pri kmeni *A. carbonarius* 1 ukázala ako najmenej vhodná. Množstvo vyprodukovaného OTA bolo pod detekčným limitom (menej ako $0,01 \text{ ng.g}^{-1}$).

Frisvad et al. (2004) uvádzajú, že izoláty *A. sulphureus* produkujú veľké množstvá OTA, čo sa zhoduje aj s našim zistením. Testovaný kmeň *A. sulphureus* vyprodukoval najväčšie množstvo OTA na YES médiu pri izbovej teplote a prirodzenom svetle ($233,90 \mu\text{g.g}^{-1}$), no pomerene vysoké množstvo OTA produkoval aj pri teplote 18 ± 1 °C ($191,34 \mu\text{g.g}^{-1}$). Pre tento kmeň bola najmenej vhodná kultivácia v tme pri teplote 30 ± 1 °C ($9,99 \mu\text{g.g}^{-1}$), rovnako ako pri kmeni *A. carbonarius* 1, čo sa nezhoduje s tvrdením Spadaro et al. (2010).

Na produkciu OTA sme testovali 2 kmene *A. westerdijkiae*, ktoré boli vyizolované z hrozna dopestovaného na Slovensku v roku 2011. Druh *A. westerdijkiae* je morfológicky podobný druhu *A. ochraceus*, ale nerastie pri teplote 37 °C (Frisvad et al., 2004). Oba kmene *A. westerdijkiae* použité v našej štúdii produkovali významné množstvá OTA pri všetkých kultivačných podmienkach, avšak kmeň *A. westerdijkiae* 1 bol produkčnejší. Najväčšie množstvo OTA vyprodukoval tento kmeň na 10. deň kultivácie pri teplote 18 ± 1 °C

a prirodzenom svetle ($498,74 \mu\text{g.g}^{-1}$) a kmeň *A. westerdijkiae* 2 pri izbovej teplote a prirodzenom svetle ($349,50 \mu\text{g.g}^{-1}$).

Z uvedených výsledkov vyplýva, že kultivačné podmienky výrazne vplyvajú na produkciu OTA, no tieto podmienky nemôžeme zovšeobecniť. Každý testovaný kmeň použitý v našej štúdii sa líšil v optimálnych podmienkach pre produkciu OTA, čo sa zhoduje aj so zistením Esteban et al. (2004). Najviac produkčnými boli kmene *A. westerdijkiae*, najmenej produkčnými kmene *A. carbonarius*, ktoré pri niektorých kultivačných podmienkach produkovali množstvo OTA pod detekčným limitom (menej ako $0,01 \text{ ng.g}^{-1}$). Tri kmene (*A. ochraceus* 1, *A. carbonarius* 1, *A. westerdijkiae* 1) produkovali najviac OTA na YES médiu pri teplote $18 \pm 1^\circ\text{C}$ a prirodzenom svetle, tri kmene (*A. carbonarius* 3, *A. sulphureus*, *A. westerdijkiae* 2) produkovali najviac OTA na tomto médiu pri kultivácii pri izbovej teplote a prirodzenom svetle a dvom kmeňom (*A. ochraceus* 2, *A. albertensis*) vyhovovala pre produkciu OTA kultivácia v tme pri teplote $30 \pm 1^\circ\text{C}$.

Tabuľka 2 Produkcia ochratoxínu A na YES médiu kmeňmi použitými v štúdii (HPLC analýza)

Študovaný kmeň	Teplota kultivácie ($^\circ\text{C}$)/podmienky	Produkcia OTA ($\mu\text{g.g}^{-1}$) na 10. deň kultivácie
<i>Aspergillus ochraceus</i> 1	18/PS	95,63
	IT/PS	12,06
	30/T	10,94
<i>Aspergillus ochraceus</i> 2	18/PS	123,18
	IT/PS	16,49
	30/T	171,07
<i>Aspergillus albertensis</i>	18/PS	56,18
	IT/PS	54,92
	30/T	159,57
<i>Aspergillus carbonarius</i> 1	18/PS	7,15
	IT/PS	3,55
	30/T	<LOD
<i>Aspergillus carbonarius</i> 2	18/PS	<LOD
	IT/PS	<LOD
	30/T	<LOD
<i>Aspergillus carbonarius</i> 3	18/PS	<LOD
	IT/PS	4,23
	30/T	2,00
<i>Aspergillus sulphureus</i>	18/PS	191,34
	IT/PS	233,90
	30/T	9,99
<i>Aspergillus westerdijkiae</i> 1	18/PS	498,74
	IT/PS	147,23
	30/T	381,81
<i>Aspergillus westerdijkiae</i> 2	18/PS	316,87
	IT/PS	349,50
	30/T	244,31

IT - izbová teplota ($23 \pm 1^\circ\text{C}$), LOD - detekčný limit $0,01 \text{ ng.g}^{-1}$, YES - agar s kvasničným extraktom a sacharózou, HPLC - vysokoúčinná kvapalinová chromatografia, PS – kultivácia na prirodzenom svetle, T – kultivácie v tme.

ZÁVER

Na základe získaných výsledkov môžeme skonštatovať, že kmene použité v našej štúdii sa výrazne líšili produkciou OTA pri zvolených kultivačných podmienkach. OTA najproduktívnejšími kmeňmi našej štúdie boli kmene *A. westerdijkiae* izolované z hrozna dopestovaného na Slovensku (v roku 2011). Dobrú produkčnú schopnosť mali aj kmene *A. sulphureus*, *A. ochraceus* 2 a *A. albertensis*. Najmenej produkčnými boli kmene *A. carbonarius*, ktoré pri niektorých kultivačných podmienkach produkovali množstvo OTA pod detekčným limitom (menej ako 0,01 ng.g⁻¹).

Na produkciu OTA mali významný vplyv kultivačné podmienky, ktoré však nemôžeme zovšeobecniť. Každému produkčnému kmeňu vyhovovali iné podmienky kultivácie. Teplota 30 °C, ktorá sa v mnohých literárnych zdrojoch uvádza ako najviac vhodná pre produkciu OTA, sa v našej štúdii nepreukázala ako najvhodnejšia.

LITERATÚRA

- Almela, L. - Rabe, V. - Sánchez, B. - Torella, F. - Pérez-López, J. - Gabaldón, J. A. - Guardiola, L. 2007. Ochratoxin A in red paprika: Relationship with the origin of the raw material. In *Food Microbiology*. vol. 24, 2007, pp. 319-327.
- Bacon, C. W. - Sweeney, J. G. - Robbins, J. D. - Burdick, D. 1973. Production of penicillic acid and ochratoxin A on poultry feed by *Aspergillus ochraceus*: Temperature and moisture requirements. In *Applied Microbiology*. vol. 26, no. 2, p. 155-160.
- Bayman, P. - Baker, J. L. - Dodster, M. A. - Michailides, T. J. - Mahoney, N. E. 2002. Ochratoxin production by the *Aspergillus ochraceus* group and *Aspergillus alliaceus*. In *Applied and Environmental Microbiology*. vol. 68, pp. 2326-2329.
- Benford, D. - Boyle, C. - Dekant, W. - Fuchs, E. - Gaylor, D. W. - Hard, G. - Gregory, D. B. - Pitt, J. I. - Pleština, R. - Shephard, G. - Solfrizzo, M. - Verger, P. J. P. - Walker, R. 2001. Ochratoxin A Safety Evaluation of Certain Mycotoxins in Food. WHO Food Additives Series 47. In *FAO Food and Nutrition Paper*. vol. 74, WHO Geneva, Switzerland, pp. 281-415.
- Esteban, A. - Abarca, M. L. - Bragulat, M. R. - Cabañes, F. J. 2004. Effects of temperature and incubation time on production of ochratoxin A by black aspergilli. In *Research in Microbiology*. vol. 155, pp. 861-866.
- Esteban, A. - Abarca, M. L. - Bragulat, M. R. - Cabañes, F. J. 2006. Study of the effect of water activity and temperature on ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius*. In *Food Microbiology*. vol. 23, pp. 634-640.
- Frisvad, J. C. - Frank, J. M. - Houbaken, J. A. M. P. - Kuijpers, A. F. A. - Samson, R. A. 2004. New Ochratoxin A producing species of *Aspergillus* section *Circumdati*. In *Studies in Mycology*. vol. 50, pp. 23-43.
- IARC. 1993. Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans: Some Naturally Occurring Substances: Food Items and Constituents, Heterocyclic Aromatic Amines and Mycotoxins. IARC: Lyon, France. vol. 56, pp. 489-524.
- Jørgensen, K. Survey of pork, poultry, coffee, beer and pulses for Ochratoxin A. 1998. In *Food Additives and Contaminants*. vol. 15, pp. 550-554.
- Kapetanakou, A. E. - Panagou, E. Z. - Gialitaki, M. - Drosinos, E. H. - Skandamis, P. N. 2009. Evaluating the combined effect of water activity, pH and temperature on ochratoxin A production by *Aspergillus ochraceus* and *Aspergillus carbonarius* on culture medium and Corinth raisins. In *Food Control*. vol. 20, pp. 725-732.
- Khoury, A. - Atoui, A. 2010. Ochratoxin A: General Overview and Actual Molecular Status. In *Toxins*. vol. 7, pp. 461-493, ISSN 2072-6651. Dostupné na: doi:10.3390/toxins2040461
- Larsen, T. O. - Svendsen, A. - Smedsgaard, J. 2001. Biochemical characterization of Ochratoxin A-Producing strains of the genus *Penicillium*. In *Applied and Environmental Microbiology*. vol. 67, pp. 3630-3635.
- Malir, F. - Ostry, V. - Pfohl-Leszkowicz, A. - Novotná, E. 2013. Ochratoxin A: Developmental and reproductive toxicity-An overview. In *Birth Defects Research B*. vol. 98, pp. 493-502.
- Malir, F. - Ostry, V. - Pfohl-Leszkowicz, A. - Malir J. - Toman, J. 2016. Ochratoxin A: 50 Years of Research. In *Toxins*. pp. 1-49.
- Medina, A. - Mateo, R. - López-Ocaña, L. - Valle-Algarra, F. M. - Jiménez, M. 2005. Study of Spanish grape mycobiota and Ochratoxin A production by isolates of *Aspergillus tubingensis* and other members of *Aspergillus* section *Nigri*. In *Applied and Environmental Microbiology*. vol. 71, pp. 4696-4702.
- NARIADENIE KOMISIE (EÚ) č. 105/2010 z 5. februára 2010, ktorým sa mení a dopĺňa nariadenie (ES) č. 1831/2006, ktorým sa ustanovujú maximálne hodnoty obsahu niektorých kontaminantov v potravinách, pokiaľ ide o ochratoxín A.

- Peterson, S. W. 2000. Phylogenetic relationships in *Aspergillus* based on rDNA sequence analysis, p. 323–356. In Samson, R. A. – Pitt, J. I. (ed.). *Classification of Penicillium and Aspergillus: Integration of modern taxonomic methods*. Harwood Publishers, Reading, United Kingdom. 2003. 524 p.
- Petzinger, E. – Ziegler, K. 2000. Ochratoxin A from a toxicological perspective. In *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. vol. 23, no. 2, pp. 91-98. Dostupné na: doi: 10.1046/j.1365-2885.2000.00244.x
- Pfohl-Leszhowicz, A. – Petkova-Bocharova, T. – Chernozemsky, I. N. – Castegnaro, M. 2002. Balcan endemic nephropathy and associated urinary tract tumors: A review on aetiological causes and the potential role of mycotoxin. In *Food Additives and Contaminants*. vol. 19, pp. 282-303.
- Pitt, J. I. 2002. Biology and ecology of toxigenic *Penicillium* species. In: DeVries, J. W. – Truckseess, M. W. – Jackson, L. S. (ed). *Mycotoxins and Food Safety*. Kluwer Academic, Plenum Publisher: New York, NY, USA, 2002. pp. 29–41.
- Rinaldi, G. – Mancini, E. – Ferruzza, S. – Sambuy, Y. – Perruzzi, G. 2007. Effect of red wine on ochratoxin A toxicity in intestinal Caco-2/TC7 cells. In *Toxicology In Vitro*. vol. 21, pp. 204-210.
- Samson, R. A. – Houbraken, J. A. M. P. – Kuijpers, A. F. A. – Frank, J. M. – Frisvad, J. C. 2004. New Ochratoxin A or sclerotium producing species in *Aspergillus* section *Nigri*. In *Studies in Mycology*. vol. 50, pp. 45-61.
- Spadaro, D. – Patharajan, S. – Lore, A. – Gullino, M. L. – Garibaldi, A. 2010. Effect of pH, water activity and temperature on the growth and accumulation of ochratoxin A produced by three strains of *Aspergillus carbonarius* isolated from Italian vineyards. In *Phytopathologia Mediterranea*. vol. 49, no. 1, pp. 65-73.
- Tessini, C. – Mardones, C., von Baer, D. – Vega, M. – Herlitz, E. – Saelzer, R. – Silva, J. – Torres, O. 2010. Alternatives for samples pre-treatment and HPLC determination of Ochratoxin A in red wine using fluorescence detection. In *Analytica Chimica Acta*. vol. 660, pp. 119-126.
- Trenk, H. L. – Brutz, M. E. – Chu, F. Z. 1971. Productions of ochratoxins in different cereal products by *Aspergillus ochraceus*. In *Applien in Environmental Microbiology*. vol. 21, no. 6, p. 1032-1035.
- Van der Merwe, K. J. – Steyn, P. S. – Fourie, L. 1965. Ochratoxin A, a toxic metabolite produced by *Aspergillus ochraceus* Wilh. In *Nature*. vol. 205, pp. 1112-1113.

Pod'akovanie: Štúdiá vznikla v laboratóriách spoločnosti Romer Labs Division Holding GmbH, Tulln (Rakúsko), v ktorej bola realizovaná stáž a s podporou SAIA, n. o. – štipendium Ernsta Macha. Príspevok vznikol s podporou GA SPU 40/2019.

Kontaktná adresa: Ing. Zuzana Barboráková, PhD., Katedra mikrobiológie, Fakulta biotechnológie a potravinárstva, Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, e-mail: barborakova@uniag.sk

doc. Ing. Roman Labuda, PhD. Institute of Food Safety, Food Technology and Veterinary Public Health, Unit of Food Microbiology, University of Veterinary Medicine Vienna, Veterinärpl. 1, 1210 Wien, Österreich, e-mail: Roman.Labuda@vetmeduni.ac.at

DI Georg Häubl, Romer Labs Division Holding GmbH, Technopark 1, 3430 Tulln, Österreich, e-mail: georg.haeubl@romerlabs.com

ROZDIELY V ZLOŽENÍ ZDANLIVO ROVNAKÝCH ZNAČKOVÝCH POTRAVINÁRSKYCH VÝROBKOV A VPLYV NA SPOTREBITEĽOV DIFFERENCES IN COMPOSITION OF SEEMINGLY IDENTICAL BRANDED FOOD PRODUCTS AND IMPACT ON CONSUMERS

Jozef Čapla, Peter Zajác, Jozef Golian, Lucia Benešová, Tomáš Vlčko

Abstract: The problem of Differences in Composition of Seemingly Identical branded Products (DC-SIP) refers to cases where a good in one Member State is marketed as identical to a good marketed in other Member States, while in reality that good has significantly different composition or characteristics. Many tests and studies carried out at European level prove poorer-quality products offered by Multi-National Companies to Central and Eastern Europe consumers even if with the same packaging and prices (or even more expensive) of Western countries. Most of these refer to food products, but similar claims have been made regarding cosmetics and detergents. In June 2019, the results on the JRC pan-European testing campaign that has analysed nearly 1,400 food products in 19 EU Member States were published. The study shows that 9% of the products compared differed in composition, although the front of the pack was identical. Additionally, 22% of products had a different composition and a similar front of pack.

Keywords: dual quality, identical branded products (DC-SIP), different quality products, food legislation

ÚVOD

Dvojaká kvalita je postup, pri ktorom nadnárodné potravinárske spoločnosti používajú rôzne recepty, formulácie alebo normy pre výrobky predávané pod rovnakou značkou a s veľmi podobným vzhľadom, ale nižšej kvality (Sisto et al., 2019). Rozdiely medzi kultúrami a preferenciami spotrebiteľov ovplyvňujú recepty na prípravu potravín, spracovanie potraviny, ich príchuť a textúru (Metin a Kitzin, 2015). To je dôvod, prečo uznávané svetové značky prispôbujú recepty a chute výrobkov trhom, na ktorých pôsobia (Ioanid et al., 2014). Potraviny predávané pod rovnakou značkou a balené s odlišným zložením musia byť považované za nekalé: spotrebiteľia sú uvedení do omylu skutočnými vlastnosťami produktu. V dôsledku toho môžu stratiť nákupné rozhodnutie pri kúpe produktu, ktorý by si pravdepodobne nekúpili (Borzan, 2017). Okrem toho nie sú dobre informovaní, či sa rozdiel v cene zhoduje s rozdielom v kvalite. Znamená to, že existujú asymetrické informácie: nevyvážené informácie môžu spôsobiť nevýhodu kupujúcich, pretože pri výbere produktu sa môžu mýliť alebo môžu byť ovplyvnení dodávateľmi na účely predaja (Kogan et al., 2017).

Obavy z rozdielov v zložení zdánlivo identických výrobkov (DC-SIP) v posledných rokoch vzrastajú. Prieskumy ukazujú, že spotrebiteľia sú znepokojení možnými rozdielmi v kvalite výrobkov rovnakých značiek a obalov distribuovaných na jednotný trh. V roku 2017 vydala Európska komisia súbor usmernení o uplatňovaní právnych predpisov EÚ o potravinách a ochrane spotrebiteľa v otázke DC-SIP (Európska komisia, 2017). V usmernení bolo vysvetlené, ako by príslušné orgány mali pri analýze potenciálnych problémov DC-SIP uplatňovať príslušné právne požiadavky, najmä smernicu o nekalých obchodných praktikách 2005/29/ES. V apríli 2018 Európska komisia predložila návrh smernice o modernizácii pravidiel EÚ na ochranu spotrebiteľa v rámci „Novej dohody pre spotrebiteľov“ (Európska komisia, 2018). Okrem iného bola zameraná aj na zavedenie konkrétnejších pravidiel týkajúcich sa otázky DC-SIP prostredníctvom zmeny a doplnenia smernice o nekalých obchodných praktikách. Európsky parlament a rada prijali pozmeňujúcu smernicu 27. novembra 2019 (EÚ, 2019a). Nové ustanovenie v smernici o nekalých obchodných praktikách stanovuje, že príslušné orgány musia klasifikovať postupy DC-SIP ako zavádzajúce

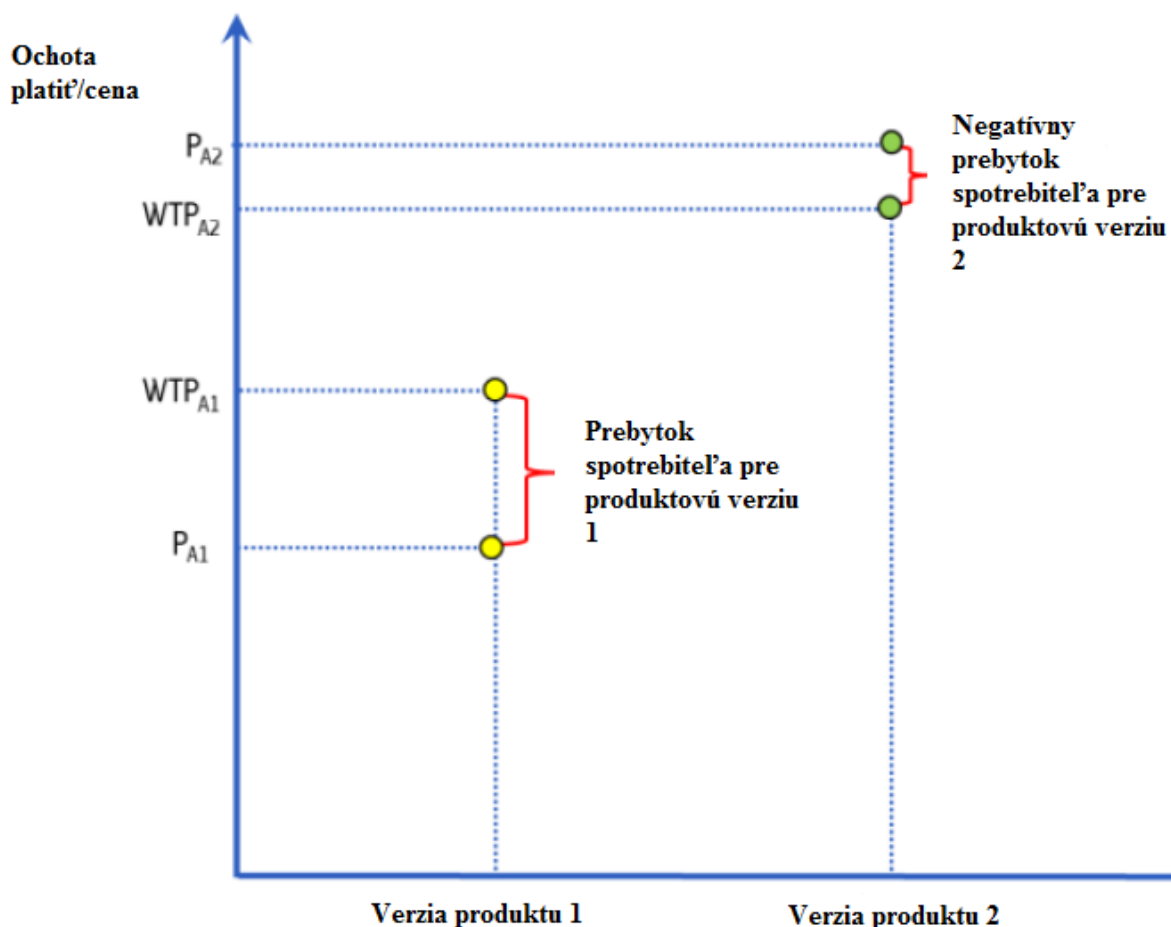
v jednotlivých prípadoch, pričom sa zohľadní vplyv tohto postupu na spotrebiteľské transakčné (nákupné) rozhodnutia (EÚ, 2019b). Správa Spoločného výskumného centra (JRC), poskytuje koncepčnú analýzu toho, či a ako ovplyvňuje nákupné rozhodnutia a blahobyť spotrebiteľov skutočnosť, že ten istý vlastník značky ponúka na trhoch rôznych krajín zdanlivo identické značkové potravinové výrobky s rôznym zložením. Z výsledkov štúdie vyberáme základné ciele, ktoré analyzujú, či a ako ovplyvňuje problém DC-SIP spotrebiteľov (Colen et al., 2020).

KVALITA POTRAVÍN, ROZHODOVANIE O NÁKUPE A STAROSTLIVOSŤ O SPOTREBITEĽA

Na účely posúdenia, či má DC-SIP vplyv na spotrebiteľov, možno otázku obmedziť na to, či by sa rozhodnutia spotrebiteľov o nákupe líšili, keby sa namiesto verzie pre vlastnú krajinu ponúkala alternatívna verzia produktu, a či by to pozitívne, negatívne alebo vôbec ovplyvnilo blaho spotrebiteľov. Vplyv DC-SIP na rozhodovanie a blaho spotrebiteľov pri nákupe nie je priamy. Spotrebiteľom záleží na kvalite potravín, ale ak sa zohľadnia rôzne spotrebiteľské preferencie, vnímanie kvality potravín a ceny, teoretický dopad DC-SIP nie je zrejmý ani homogénny (Merten-Lenz, 2018). Prezentácia verzie produktu, ktorá sa zvyčajne ponúka na trhu s inou krajinou, namiesto verzie produktu, ktorá bola ponúkaná v rámci DC-SIP, môže mať vplyv na nákupné rozhodnutia a blahobyť pozitívne, negatívne alebo žiadne.

Výsledky tohto hodnotenia sú nasledovné:

1. DC-SIP ovplyvní blahobyť spotrebiteľov, iba ak zákazníci vnímajú a hodnotia kvalitu verzie produktu pre vlastnú krajinu a alternatívne verzie produktu odlišne. Ak nie sú vyslovene informovaní o rozdieloch, spotrebiteľia nemusia byť schopní spoznať rozdiely v zložení a nemusia si ich nevyhnutne všimnúť na základe zoznamov zložiek. A aj keď si všimneme rozdiely, spotrebiteľia sa o ne nevyhnutne nezaujímajú. Malé rozdiely medzi verziami produktov môžu zostať nepovšimnuté a preto nebudú mať vplyv na nákupné rozhodnutia alebo blaho spotrebiteľov.
2. Ak zákazníci identifikujú a oceňujú rozdiely medzi verziami produktu, vnímanie a hodnotenie kvality verzie pre vlastnú krajinu môže byť vyššie alebo nižšie ako v prípade verzie produktu pre inú krajinu. Keď sa spoločnostiam podarí prispôbiť verzie produktu konkrétnym preferenciám v každej krajine, potom bude verzia produktu pre vlastnú krajinu ocenená v priemere vyššie ako (a bude to preferované) pre verzie produktu z inej krajiny. Pokiaľ ceny nevyvážia rozdiely v oceňovaní spotrebiteľov medzi verziami, zákazníci by pravdepodobne uprednostnili a kúpili verziu produktu ponúkanú v ich vlastnej krajine. V takom prípade DC-SIP zvyšuje blaho spotrebiteľov.
3. Ak spoločnosti ponúkajú rôzne verzie produktov a zákazníci vnímajú verziu ponúkanú v ich vlastnej krajine ako verziu s nižšou hodnotou, bude potenciálny negatívny vplyv závisieť od ceny, za ktorú sa ponúka. Ak je možné alternatívnu verziu produktu z inej krajiny ponúknuť iba za cenu, ktorá je vyššia ako dodatočné ocenenie verzie pre vlastnú krajinu, potom DC-SIP stále zvyšuje blahobyť. Táto situácia je znázornená na obrázku 1, kde DC-SIP pozitívne ovplyvňuje blahobyť spotrebiteľov, aj keď verzia produktu ponúkaná v krajine je považovaná za verziu nižšej kvality ako verzia produktu ponúkaná v inej krajine. Produkt s vyššou hodnotou verzia 2 dosiahol vyššiu cenu ako spotrebiteľské ocenenie produktu v krajine A ($WTPA2-PA2 = CSA2 < 0$). Spotrebiteľia by vnímali kvalitu produktu verzie 2 vyššie ako produkt verzie 1 a boli by ochotní zaň zaplatiť vyššiu cenu, ale nie vyššiu, ako je cena účtovaná v krajine A. Výsledkom je, že prebytok spotrebiteľov pri produkte z inej krajiny, verzia 2, by bol negatívny a racionálny spotrebiteľ by si ho nekúpil. V takom prípade by spotrebiteľia v krajine A stratili, keby bola verzia 1 ich vlastnej krajiny nahradená produktom verzie 2, a dopyt po produkte by klesol. Ak by to platilo pre veľkú časť spotrebiteľov, pravdepodobne by to znamenalo, že produkt by sa na trhu jednoducho neponúkal, ako je podrobne uvedené v dokumente od autorov Colamatteo et al. (2020).



Obr. 1 Ochota spotrebiteľa platiť a prebytok spotrebiteľa v krajine A: odlišná cena
(Colen et al., 2020)

4. Ak je však cena alternatívnej verzie produktu nižšia, alebo rovnaká alebo nedostatočne vyššia ako cena verzie pre vlastnú krajinu, nevyrovná to dodatočné ocenenie verzie pre inú krajinu.

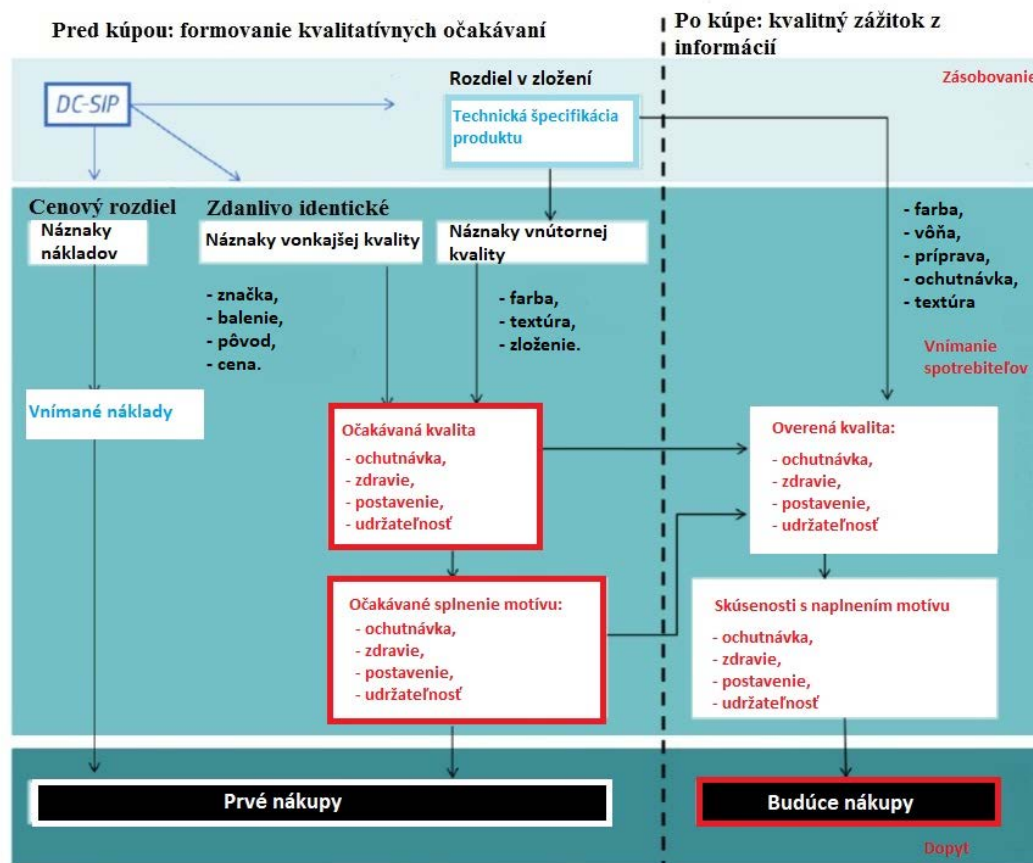
VNÍMANIE KVALITY POTRAVÍN A ZÁMERY NÁKUPU

Vertikálny rozmer vnímania kvality potravín

Názny produktu môžu byť vnútorné alebo vonkajšie. Vnútorné podnety sa týkajú fyzikálnych vlastností produktu, ako sú zložky, s ktorými nemožno manipulovať bez toho, aby sa nezmenili aj fyzikálne vlastnosti produktu. Vonkajšie podnety odkazujú na všetko ostatné, ako napríklad cena, obchodná značka, balenie, image obchodu a reklama, ktoré nie sú súčasťou produktu (Olson a Jacoby, 1972).

Horizontálny rozmer vnímania kvality potravín

V skutočnosti je veľa nákupov potravín súčasťou série opakovaných nákupov. Najdôležitejšie hodnotenie sa potom uskutoční pred prvým nákupom (skúšobným nákupom), v ktorom sú očakávania založené iba na informačných vodítkach. Na základe očakávaného vnímania kvality a súvisiaceho očakávania splnenia motívu, je urobené prvé nákupné rozhodnutie.



Obr. 2 Kvalitné vnímanie, skúsenosti a nákupné rozhodnutie v prípade DC-SIP
(Colen et al., 2020)

Ak je možné všetky informácie o produkte pred kúpou dokonale a ľahko zistiť, zodpovedajú tieto očakávania realite a nie je dôvod, aby sa budúce nákupy odlišovali. Napriek tomu vo väčšine prípadov, najmä pri potravinách, nie je možné pozorovať mnoho príslušných atribútov kvality. Napríklad očakávania chuti budú založené na vnútorných a vonkajších podnetoch a dajú sa konfrontovať so skúseným vkusom až po zakúpení. Skúsenosti spotrebiteľov s výrobkami nie sú nezávislé od jeho predtým vytvorených očakávaní založených na vonkajších náznakoch, ale teraz sú priamo známe aj prirodzené, fyzické vlastnosti produktu. Očakávania formované podľa kvality potravinového výrobku na základe podnetov môžu byť potvrdené alebo nepotvrdené a budú určovať spokojnosť spotrebiteľa a zámer spotrebiteľa produkt kúpiť, alebo nekúpiť (Oliver, 1989).

Dôležitosť kvality potravín

Existuje veľká podpora skutočnosti, že spotrebitelia dôrazne prehlasujú, že im záleží na kvalite potravín, a v diskusiách zameraných na skupiny došlo aj k širokej zhode na dôležitosti kvality potravín pri rozhodovaní o nákupe (Di Marcantonio et al., 2020). Keď sa európskych spotrebiteľov spýtajú na to, aké sú ich rozhodnutia pri nákupe potravín, kvalita vystupuje ako najdôležitejší atribút všetkých európskych spotrebiteľov pred cenou, geografickým pôvodom a značkou. Takmer 11,65 % európskych spotrebiteľov uvádza, že kvalita potravín je veľmi dôležitá, a pre 31 % spotrebiteľov to je dôležité. Iba v 6 z 27 krajín mala cena prednosť pred kvalitou, aj keď s malým rozdielom. Dôležitý je aj geografický pôvod a značka (Grunert a Wills, 2007).

VNÚTORNÉ ATRIBÚTY KVALITY PRODUKTU

Väčšina kvalitatívnych ukazovateľov, o ktoré sa spotrebitelia starajú (napr. chuť, vôňa, zdravie), sa priamo dotýka základných fyzikálnych vlastností potravinárskych výrobkov. Väčšina spotrebiteľov uviedla, že výrobok považujú za kvalitný, keď obsahuje vhodné zložky, chuť a má dobrý vzhľad. Napríklad vo Švédsku sa ohľaduplnosť k životnému prostrediu považuje za súčasť kvality potravín (Di Marcantonio et al., 2020). Tieto skutočné atribúty však s najväčšou pravdepodobnosťou nie je možné priamo pozorovať pred zakúpením, pretože veľa značkových balených výrobkov používa netransparentné obaly a výrobky nie je možné ochutnať už v čase nákupu. Zloženie potravinárskeho výrobku je uvedené na zadnej strane obalu v zozname zložiek a tiež vo výživových hodnotách (Fetscherin a Henrich, 2015). Nie je však jasné, či si priemerný spotrebiteľ dáva čas na kontrolu týchto informácií, a dokáže z týchto zoznamov odvodiť príslušné kvalitatívne aspekty. Štúdie o používaní informácií o výživovej hodnote naznačujú, že nie všetci spotrebitelia majú tendenciu tieto informácie skutočne používať. V štúdiu uskutočnenej v 38 európskych krajinách 18 % spotrebiteľov uviedlo, že „vždy“ kontrolujú výživové informácie (AcNielsen, 2005). Skutočné pozorovanie nákupného správania však naznačuje, že spotrebitelia majú tendenciu vytvárať veľké nadhodnotenia a že skutočný počet spotrebiteľov, ktorí kontrolujú informácie, môže byť len polovica z nich (Van Ittersum et al., 2003). Prieskumy zamerané na cieľovú skupinu spotrebiteľov nakupujúcich potraviny potvrdzujú, že informácie a etikety na vonkajšej strane balenia sa bežne nekontrolujú, aj keď v poslednej dobe je možné im venovať väčšiu pozornosť z dôvodu zvýšených zdravotných alebo environmentálnych obáv. Spotrebitelia môžu hľadať konkrétne zložky, ktoré považujú za nezdravé, škodlivé pre životné prostredie alebo na prítomnosť alergénov (Di Marcantonio et al., 2020).

VONKAJŠIE ATRIBÚTY KVALITY PRODUKTU

Vnímanie značky a kvality potravín

Značka sa chápe ako „názov, výraz, znak, symbol alebo dizajn alebo ich kombinácia, ktorá je určená na identifikáciu tovarov a služieb jedného predajcu alebo skupiny predajcov a na ich odlišenie od tovaru a služieb konkurencie (Kotler, 1997). Na otázku o dôležitosti značky pri nákupe potravín odpovedalo v priemere 47 % respondentov EÚ, že ju považujú za „veľmi dôležitú“ alebo „dôležitú“. Značky sú najdôležitejšie v Taliansku (68 %). Všetky nové členské štáty uviedli percentuálne podiely, ktoré sú výrazne nad priemerom EÚ, v rozmedzí od 55 % do 66 % (okrem Estónska so 42 %). Existujú dve hlavné vysvetlenia úlohy značiek v procese vnímania kvality. Prvý sa týka informačnej ekonómie a uvádza sa v ňom, že značky pôsobia ako signál, ktorý znižuje informačné asymetrie a neistotu. Značky komunikujú zákazníkovi kvalitné umiestnenie produktu, zjednodušujú proces vyhľadávania a znižujú náklady spotrebiteľov na vyhľadávanie (Erdem a Swait, 1998). Druhá sa týka modelu asociatívnej siete (Aaker, 1991; Keller, 1993), ktorá vysvetľuje preferenciu značkových výrobkov podľa ich asociácií, aké vnímanie imidžu predstavuje pre spotrebiteľov (t. j. prestíž, stav bohatstva, jedinečnosť, modernosť alebo „globálnosť“). Diskusie v cieľových skupinách potvrdili najmä prvé vysvetlenie, v ktorom sa uvádza, že značky sa považujú za synonymum zaručenej kvality, spoľahlivosti a dôvery (Colen et al., 2020).

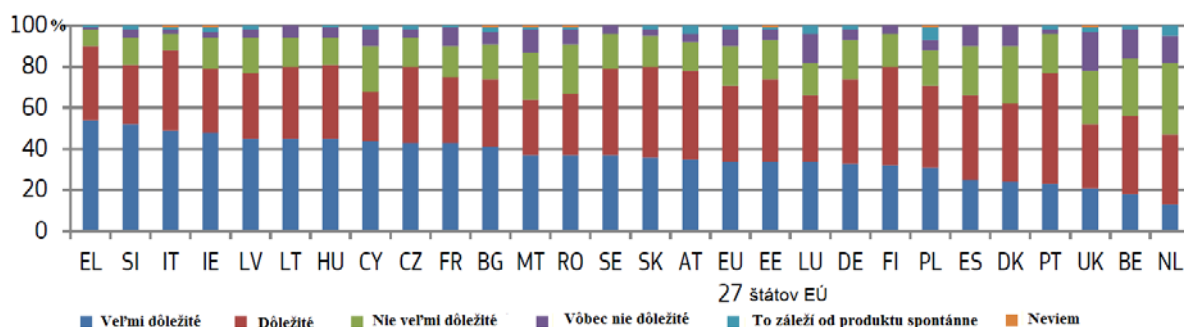
Niekoľko empirických štúdií ukazuje, že značky výrazne ovplyvňujú hodnotenie výrobkov a rozhodovanie o nákupe. Experimentálne štúdie o vnímaní kvality pív (Jacoby et al., 1971) ukazujú, že názvy značiek môžu preháňať úsudok iba na základe rozdielov v zložení (t. j. zvýšiť vnímanie kvality „objektívne“ vyššej a znižovať ju v prípade menej kvalitného produktu). Čím menej je človek oboznámený s kategóriou potravín, alebo čím je vnímaná heterogenita kvality v triede výrobkov vyššia, tým je pravdepodobnejšie, že sa na odvolenie chuťových vlastností použije značka (Zhu et al., 2019). Psychologické združenia značiek tiež zohrávajú veľkú úlohu pri rozhodovaní spotrebiteľov v spoločnostiach, kde je

dôležitejšia skupinová identita (pretože značky posilňujú skupinovú identitu), alebo v spoločnostiach s väčšou sociálnou nerovnosťou (pretože značky signalizujú bohatstvo alebo prestíž). Niektoré štúdie skutočne zistili, že v kolektivistických spoločnostiach sa značky, ktoré posilňujú členstvo v skupine, považujú za atraktívnejšie a vernejšie dominantnej skupine. Tiež sa uvádza, že kultúry, ktoré majú tendenciu zdôrazňovať rozdiely medzi sociálnymi a ekonomickými triedami, prikladajú značkám výrobkov väčší význam (Erdem et al., 2006; Roth, 1995). Nakoniec, ocenenie značiek spotrebiteľmi sa nemusí nevyhnutne prejavíť v nákupných zámeroch (Keller et al., 2008).

Geografický pôvod, „globálnosť“ a cieľové krajiny

Informácie o geografickom pôvode tiež majú dôležitú úlohu pri rozhodovaní o kúpe väčšiny (v priemere 71 %) európskych spotrebiteľov (Európska komisia, 2012). Vo väčšine krajín sa toto percento pohybuje medzi 62 a 81 %, hoci v prípade Grécka je to 90 a 88 %, zatiaľ čo v Belgicku, Spojenom kráľovstve a Holandsku je to podstatne menej dôležité. Takýto geografický pôvod sa vzťahuje na krajinu (alebo región), v ktorej bol výrobok vyrobený, a združenia, ktoré spotrebiteľia v tejto krajine majú (Wilcox, 2015). Takéto informácie môžu ovplyvňovať rozhodovanie o nákupe prostredníctvom dvoch mechanizmov: 1) spotrebiteľia môžu priamo uprednostňovať výrobky vyrobené v určitej krajine a 2) informácie o geografickom pôvode môžu pôsobiť ako „svätožiara“, ktorá vytvára zaujatosť, pozitívnu alebo negatívnu, vo viere spotrebiteľov o iných aspektoch výrobku. Napríklad také informácie môžu slúžiť ako signál kvality, keď je krajina spojená s vyšším štandardom výroby, lepším know-how, dlhoročnou tradíciou v niektorých potravinách alebo spotrebiteľmi, ktorí viac dbajú na kvalitu (Van Der Lans et al., 2001; Zhu et al., 2019). Svoju úlohu zohráva aj afinita jednotlivcov ku krajine (Oberecker a Diamantopoulos, 2011). Schooler (1965) ako prvý opísal zaujatosť krajiny pôvodu a od tej doby bolo na túto tému publikovaných veľmi veľké množstvo empirických štúdií (Papadopoulos a Heslop, 2002; Verlegh a Steenkamp, 1999), ktoré potvrdzujú jej dôležitosť.

Pri absencii silných značiek sa zistilo, že krajina pôvodu hrá dôležitú úlohu pri hodnotení kvality spotrebiteľov (Ettenson, 1993; Ozretic-Dosen et al., 2007). Webb a Po (2000) tvrdia, že s rastúcou globalizáciou a rastúcou zložitosťou výrobkov sa spotrebiteľia čoraz viac spoliehajú na krajinu pôvodu a informácie o značke ako na prostriedok na zjednodušenie spracovania informácií. Druh geografického pôvodu sa tiež všeobecnejšie týka rozlíšenia medzi miestnymi a nelokálnymi výrobkami, domácimi a zahraničnými výrobkami a pojmu „globálnosť“ (Thakor a Lavack, 2003). Vo vyspelých ekonomikách majú spotrebiteľia často tendenciu uprednostňovať domáce výrobky (označované ako „spotrebiteľský etnocentrizmus“) buď z hrdosti na domáce výrobky, z viery, že nákup zahraničných výrobkov by poškodil domácu ekonomiku (Balabanis et al., 2001), alebo z dôvodu vnímanej vyššej kvality miestnych výrobkov (Arsil et al., 2018; Naspetti a Bodini, 2008). Cieľové skupiny v členských štátoch s vyššími príjmami (Švédsko a Nemecko) potvrdzujú túto dôveru v miestne výrobky (Di Marcantonio et al., 2020). Naopak, v menej rozvinutých alebo transformujúcich sa krajinách sa často zistí, že spotrebiteľia uprednostňujú nelokálne alebo zahraničné výrobky a silne uprednostňujú globálne značky. Spotrebiteľia si často spájajú globálne produkty s modernosťou a pokrokom, kvalitou a spoľahlivosťou, aspiráciami, spoločenskou zodpovednosťou alebo statusom a prestížou (Batra et al., 2000; Dimofte et al., 2008; Han, 1989; Özsomer a Altaras, 2008; Steenkamp et al., 2003). Di Marcantonio et al., (2020) očakávajú, že nadnárodné značky budú automaticky spĺňať štandardy kvality a očakávajú, že nadnárodné spoločnosti budú transparentné a etické. „Globálne“ značky môžu odvodiť podstatnú časť svojho imania z krajiny pôvodu (Pappu et al., 2006; Roth et al., 2008), a navyše ich možno oceniť na základe predpokladanej jednotnosti a štandardizácie fyzikálnych vlastností a zloženia produktu bez osobitného prispôsobenia miestnym trhom (Özsomer, 2012).



Obr. 3 Dôležitosť geografického pôvodu pri rozhodovaní o nákupe potravín (Eurobarometer, 2012)

Vnímanie spotrebiteľov na podvody a nespravodlivosť

Nespokojnosť vyplývajúca z vystavenia spotrebiteľov problémom DC-SIP môže pochádzať z dvoch potenciálnych zdrojov: 1) vnímanie klamstva a 2) vnímanie nespravodlivosti. V prvom rade môže povedomie o rôznych verziách výrobkov dodávaných na rôzne trhy jednotlivých krajín vyvrátiť očakávania spotrebiteľov týkajúce sa (globálneho alebo zahraničného) značkového produktu. Ich dôvera v hodnotu a atribúty prisudzované značkovému (globálnemu alebo zahraničnému) produktu vrátane hodnôt transparentnosti a etického správania (Di Marcantonio et al., 2020), môže narušiť ich vieru v to, že značkové výrobky sú v jednotlivých krajinách identické, ako to naznačujú podobné alebo identické balenia a značka, ich pocit príslušnosti k väčšej komunite alebo viera v to, že značkový produkt zaručuje minimálnu alebo vyššiu kvalitu. Toto nepotvrdenie očakávaní môže viesť spotrebiteľov k pocitu podvodu alebo zavádzania. Po druhé, skutočnosť, že verzie výrobkov nie sú rovnaké na trhoch jednotlivých krajín, môže sama osebe vyvolať pocit nespravodlivosti. Aj keď spotrebiteľia uznávajú rozdiely v miestnych preferenciách medzi európskymi krajinami a vítajú, že sa tieto rozdiely v preferenciách berú do úvahy, trvajú na tom, že všade by mali byť zaručené normy bezpečnosti potravín, minimálne normy kvality a hlavné vlastnosti produktu. Ak vznikne dojem, že tieto základné požiadavky nie sú rešpektované rovnako na všetkých trhoch krajín, môže to viesť k pocitu nespravodlivého zaobchádzania (Di Marcantonio et al., 2020). Na vysvetlenie konceptu spravodlivosti boli vyvinuté rôzne teórie. Poznatky o vnímaní nespravodlivosti zo strany spotrebiteľa možno odvodiť z literatúry o cenovej nerovnosti a cenovej spravodlivosti (Campbell, 1999; Oliver a Swan, 1989b; Xia et al., 2004). Teória spravodlivosti naznačuje, že vnímanie nespravodlivosti sa vyvoláva, keď človek porovnáva výsledok s výsledkom iného. Vnímanie cenovej nespravodlivosti nastáva, keď sa spotrebiteľia dozvedia, že zaplatili viac, ako porovnateľná referenčná strana za produkt alebo službu. Touto „referenčnou stranou“ môže byť „iná osoba, skupina ľudí, organizácia alebo jednotlivec vo vzťahu k svojim skúsenostiam z predchádzajúceho časového obdobia“ (Xia et al., 2004). Vnímanie cenovej nespravodlivosti naznačuje, že zákazníci hodnotia cenu predajcu ako neprimeranú, neprijateľnú alebo neoprávnenú. Zainteresované strany môžu tiež reagovať, ak hodnotia pevné strategické správanie ako nelegitímne, klamlivé a neetické a nespravodlivé (Smith et al., 2010).

ZÁVER

Rozdiely v zložení zdanlivo identických značkových potravinárskych výrobkov (DC-SIP) vyvolali obavy z ponúkania výrobkov rôznej kvality na rôznych častiach jednotného trhu EÚ. Tieto informácie vychádzajú z existujúcej koncepcnej a empirickej literatúry s cieľom analyzovať možný vplyv DC-SIP na nákupné rozhodnutia a blaho spotrebiteľov. Proces hodnotenia produktu, t.j. formovanie očakávaní kvality prostredníctvom hodnotenia rôznych

vnútorných a vonkajších faktorov spotrebiteľmi, je preto zásadný. Umožnenie rôznych preferencií a funkcií vnímania kvality v jednotlivých krajinách a spotrebiteľoch vedie k rôznym možným výsledkom. S cieľom analyzovať vplyv DC-SIP, literatúra ukazuje, že spotrebiteľom záleží na kvalite potravinárskych výrobkov. Je pravdepodobné, že spotrebiteľia nezistia rozdiely v zložení. Po prvé, je to preto, že okrem tých, ktorí často nakupujú v zahraničí, nie je možné priame porovnanie rôznych verzií produktov. Ale aj u tých, ktorí porovnávajú produkty, môžu byť rozdiely malé alebo si ich možno ľahko nevšimne. Spotrebiteľia sa pri formovaní očakávaní kvality spoliehajú predovšetkým na vonkajšie vlastnosti (značka, geografický pôvod, balenie), čo vedie k podstatným rozdielom v zložení, ktoré zostávajú nepovšimnuté. Spotrebiteľia môžu napríklad pri rozhodovaní o nákupe vychádzať z predpokladu, že značkové výrobky, a najmä zahraničné alebo globálne značky, zaručujú minimálnu alebo homogénnu kvalitu na všetkých trhoch. Stupeň, v akom tieto vonkajšie faktory zohrávajú úlohu, sa bude líšiť v závislosti od sily značky, krajiny, s ktorou je značka spojená, stavu alebo očakávaní kvality, ktoré spotrebiteľia v tejto spoločnosti pripisujú značkám (globálnym/zahraničným), kategórii výrobkov, úsudku atď. Rozdiely medzi verziami DC-SIP si spotrebiteľia pravdepodobne všimnú iba v situáciách, keď sú skutočné rozdiely značné, sú dôležitým vodítkom pre kvalitu signálu alebo ak sú relatívne ľahko zistiteľné. Rôzne scenáre sú možné, keď si spotrebiteľia uvedomia alebo zažijú rozdiely, a to buď tým, že sú informovaní o rozdieloch medzi verziami porovnaním informácií zo zadnej časti balenia, alebo skúsenosťou s produktom (čo sa stáva iba zriedka). Spočiatku v týchto situáciách nemusí byť ovplyvnený nákup a blahobyt spotrebiteľa, napríklad preto, že daná dimenzia kvality môže mať pri ich konečnom rozhodovaní buď malý alebo žiadny význam. Spotrebiteľia môžu tiež uprednostniť svoju miestnu verziu pred verziami ponúkanými v iných členských štátoch. Ak sa verzie produktu úspešne prispôbia miestnemu vkusu, potom by zákazníci v priemere uprednostnili verziu produktu dodanú na ich trh, pokiaľ nebol produkt z inej krajiny ponúkaný za nižšiu cenu, ktorá kompenzuje nižšiu vnímanú kvalitu. Mediálne pokrytie tejto témy odhalilo, že existujú rôzne verzie produktov a vyvolalo reakcie spotrebiteľov, ktoré sa nedajú ľahko zachytiť. Po prvé, ide o vplyv vnímania klamu spotrebiteľmi, ktorý vyplýva z nepotvrdenia očakávaní. Najmä v tých krajinách a medzi spotrebiteľmi, ktorí globálnym značkám pripisujú vysokú hodnotu a status a očakávajú od nich dôveru (globálne/zahraničné) značkové výrobky, ktoré sú v rôznych krajinách rovnaké, môže dôjsť k veľkému podvodu. Práca popisuje, ako sú očakávania týkajúce sa značiek, geografického pôvodu a globalizácie zvyčajne silné v nových členských štátoch EÚ a rozvíjajúcich sa krajinách a v spoločnostiach s vyššou nerovnosťou.

Okrem nepotvrdenia očakávaní možno samotnú existenciu rôznych verzií produktu na jednotnom trhu považovať za nespravodlivú. Pretože vnímanie nespravodlivosti je zvyčajne asymetrické, je pravdepodobné, že tieto pocity nespravodlivého zaobchádzania budú vnímané iba tými, ktorí dostali vnímanú nižšiu verziu produktu. Môže to vyvolať nespokojnosť spotrebiteľov a ovplyvniť dôveru značky. Spotrebiteľia sa zapoja do stratégií zvládania. Ak sú pocity silné, zákazníci môžu reagovať negatívne rôznymi spôsobmi (napr. prechodom na iné značky, znížením dôvery a imidžu značky spoločnosti, narušením dôvery spotrebiteľov v uniformitu alebo status, ktorý majú s globálnymi značkami), vrátane sťažovania sa na verejnosti a zastavenia nákupu konkrétnej značky.

LITERATÚRA

- Aaker, D. A. 1991. Managing brand equity: The Free Press, New York.
- AcNielsen. 2005. Global food labelling survey. PowerPoint presentation, cited in Grunert and Wills 2007.
- Arsil, P. M., Brindal, K., Sularso, E., Mulyani, A. 2018. Determinants of consumer's preferences for local food: A comparison study from urban and rural areas in Indonesia. In *Journal of Business and Retail Management Research* [online], vol. 13, no.2, pp.184-195 [cit. 2020-11-24]. ISSN (ONLINE): 2056-6271. Dostupné na: DOI:10.24052/JBRMR/V13IS02/ART-16.
- Balabanis, G., Diamantopoulos, A., Mueller, R. D., Melewar, T. 2001. The impact of nationalism, patriotism and internationalism on consumer ethnocentric tendencies. In *Journal of International Business Studies* [online], vol.

- 32, no. 1, pp. 157-175 [cit. 2020-11-24]. ISSN: 1478-6990. Dostupné na: <https://www.jstor.org/stable/3069515?seq=1>.
- Batra, R., Ramaswamy, V., Alden, D. L., Steenkamp, J.-B. E., Ramachander, S. 2000. Effects of brand local and nonlocal origin on consumer attitudes in developing countries. In *Journal of consumer Psychology* [online], vol. 9, no. 2, pp. 83-95 [cit. 2020-11-24]. ISSN: 1532-7663. Dostupné na: https://doi.org/10.1207/S15327663JCP0902_3.
- Borzan, B. 2017. One Union – One Quality. Quality Research of Seemingly Identical Products in Markets of Old and New EU Member States – Results. Zagreb, September 1, 2017. Dostupné na: http://www.biljanaborzan.eu/upload_data/site_files/survey-eng.pdf.
- Campbell, M. C. 1999. Perceptions of price unfairness: antecedents and consequences. In *Journal of Marketing Research* [online], vol. 36, no. 2, pp. 187-199 [cit. 2020-11-17]. ISSN: 00222437. Dostupné na: <https://doi.org/10.2307/3152092>.
- Colamatteo, A., Fathinejad, N., Menapace, L., Pagnanelli, M. A., Russo, C., Sansone, M., Twum, K. 2020. Economic rationale behind differences in the composition of seemingly identical branded food products in the Single Market, JRC Technical Reports, European Commission.
- Colen, L., Chryssochoidis, G., Ciaian, P., Di Marcantonio, F. 2020. Differences in composition of seemingly identical branded food products: Impact on consumer purchasing decisions and welfare, EUR 30026 EN, European Union, Luxembourg, ISBN 978-92-79-14303-1. Dostupné na: doi:10.2760/51123, JRC118149.
- Di Marcantonio, F., et al. 2020. Empirical testing of consumers' preferences for different compositions of seemingly identical branded food products. *JRC Technical Report (forthcoming)*.
- Dimofte, C. V., Johansson, J. K., Ronkainen, I. A. 2008. Cognitive and affective reactions of US consumers to global brands. In *Journal of International Marketing* [online], vol. 16, no. 4, pp. 113-135 [cit. 2020-11-20]. ISSN: 1069031X. Dostupné na: DOI: 10.1509/jimk.16.4.113.
- Erdem, T., Swait, J. 1998. Brand equity as a signalling phenomenon. In *Journal of consumer Psychology* [online], vol. 7, no. 2, pp. 131-157 [cit. 2020-11-24]. ISSN: 1532-7663. Dostupné na: https://doi.org/10.1207/s15327663jcp0702_02.
- Erdem, T., Swait, J., Valenzuela, A. 2006. Brands as signals: a cross-country validation study. In *Journal of Marketing* [online], vol. 70, no. 1, pp. 34-49 [cit. 2020-11-12]. ISSN: 00222429. Dostupné na: <https://doi.org/10.1509/jmkg.70.1.034.qxd>.
- Ettenson, R. 1993. Brand Name and Country of Origin Effects in the Emerging Market Economies of Russia, Poland and Hungary. In *International Marketing Review* [online], vol. 10, no. 5 [cit. 2020-11-22]. ISSN: 0265-1335. Dostupné na: <https://doi.org/10.1108/02651339310050057>.
- EU. 2019. Directive of the European Parliament and of the Council amending Council Directive 93/13/EEC and Directives 98/6/EC, 2005/29/EC and 2011/83/EU of the European Parliament and of the Council as regards the better enforcement and modernisation of Union consumer protection rules. [cit. 2020-11-24]. Dostupné na: <https://data.consilium.europa.eu/doc/document/PE-83-2019-INIT/en/pdf>.
- European Commission. 2012. Europeans' attitudes towards food security, food quality and the countryside, Special Eurobarometer 389.
- European Commission. 2017. Commission Notice on the application of EU food and consumer protection law to issues of Dual Quality of products - The specific case of food. Official Journal of the European Union, [cit. 2020-11-24]. Dostupné na: [https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=OJ:C:2017:327: FULL&from=EN](https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=OJ:C:2017:327:FULL&from=EN).
- European Commission. 2018. Proposal for a Directive of the European Parliament and of the Council amending Council Directive 93/13/EEC of 5 April 1993, Directive 98/6/EC of the European Parliament and of the Council, Directive 2005/29/EC of the European Parliament and of the Council and Directive 2011/83/EU of the European Parliament and of the Councils regards better enforcement and modernisation of EU consumer protection rules. European Commission. [cit. 2020-11-24]. Dostupné na: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?qid=1523880940100&uri=COM:2018:185:FIN>.
- European Commission. 2019a. Directive (EU) 2019/2161 of the European Parliament and of the Council of 27 November 2019 amending Council Directive 93/13/EEC and Directives 98/6/EC, 2005/29/EC and 2011/83/EU of the European Parliament and of the Council as regards the better enforcement and modernisation of Union consumer protection rules. European Commission. [cit. 2020-11-24]. Dostupné na: <https://eur-lex.europa.eu/eli/dir/2019/2161/oj>.
- European Commission. 2019b. Results of an EU wide comparison of quality related characteristics of food products, Luxembourg, European Commission, JRC.
- European Parliament. 2013. A new agenda for European consumer policy. Official Journal of the European Union, [cit. 2020-11-24]. Dostupné na: [https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:52013 IPO239&from=EN](https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:52013IPO239&from=EN).

- Fetscherin, M., Heinrich, D. 2015. Consumer brand relationships research: A bibliometric citation meta-analysis, In *Journal of Business research* [online], vol. 68, no. 2, pp. 380-390 [cit. 2020-11-10]. [cit. 2020-11-24]. Dostupné na: <https://doi.org/10.1016/j.jbusres.2014.06.010>.
- Grunert, K. G., Wills, J. M. 2007. A review of European research on consumer response to nutrition information on food labels. In *Journal of Public Health* [online], vol. 15, no. 5, pp. 385-399 [cit. 2020-11-19]. ISSN: 0033-3506. Dostupné na: <https://doi.org/10.1007/s10389-007-0101-9>.
- Grunert, K. G., J. M. Wills, Fernández-Celemín, L. 2010. Nutrition knowledge, and use and understanding of nutrition information on food labels among consumers in the UK, In *Appetite* [online], vol. 55, no. 2, pp. 177-189 [cit. 2020-11-23]. ISSN: 0195-6663. Dostupné na: DOI: 10.1016/j.appet.2010.05.045.
- Han, C. M. 1989. Country image: halo or summary construct? In *Journal of Marketing Research* [online], vol. 26, no. 2, pp. 222-229 [cit. 2020-11-24]. ISSN: 00222437. Dostupné na: <https://doi.org/10.2307/3172608>.
- Ioanid A., Mihai P., Militaru G. 2014. Integrating country-specific culture in the branding strategy for building global success. SEA Practical Application of Science, 2.
- Jacoby, J., Olson, J. C., Haddock, R. A. 1971. Price, brand name, and product composition characteristics as determinants of perceived quality. In *Journal of Applied Psychology* [online], vol. 55, no. 6, pp. 570-579. [cit. 2020-11-24]. ISSN: 0021-9010. Dostupné na: DOI: 10.1037/h0032045.
- Keller, K. L. 1993. Conceptualizing, Measuring, and Managing Customer-Based Brand Equity. In *Journal of Marketing* [online], vol. 57, no. 1, pp. 1-22 [cit. 2020-11-21]. ISSN: 00222429. Dostupné na: <https://doi.org/10.2307/1252054>.
- Kogan L., Ross S.A., Wang J., Westerfield M.M. 2017. Market selection. In *Journal of Economic Theory* [online], vol., 168, pp. 209–236 [cit. 2020-11-18]. ISSN: 0022-0531. DOI: 10.1016/j.jet.2016.12.002
- Kotler, P. 1997. Marketing Management Analysis, Planning, Implementation, and Control: Prentice-Hall International, Englewood Cliffs, NJ.
- Merten-Lenz K. 2018. Dual quality food: are different recipes for different markets legal? [cit. 2020-11-24]. Dostupné na: <https://www.foodnavigator.com/article/2018/01/08/dual-quality-food-are-different-recipes-for-different-markets-legal>.
- Metin I., Kizgin Y. 2015. Multinational fast food chains' "Global Think, Local Act Strategy" and consumer preferences in Turkey. In *International Journal of Marketing Studies* [online], vol. 7, pp. 106–116 [cit. 2020-11-24]. ISSN: 1918-719X. Dostupné na: DOI: 10.5539/ijms.v7n1p106.
- Naspetti, S., Bodini, A. 2008. Consumer perception of local and organic products: substitution or complementary goods? In *The International Journal of Interdisciplinary Social Sciences* [online], vol. 3, no. 2, pp. 111-122 [cit. 2020-11-23]. ISSN 18331882. Dostupné na: DOI: 10.18848/1833-1882/CGP/v03i02/52526.
- Oberecker, E. M., Diamantopoulos, A. 2011. Consumers' emotional bonds with foreign countries: does consumer affinity affect behavioural intentions? In *Journal of International Marketing* [online], vol. 19, no. 2, pp. 45-72 [cit. 2020-11-20]. ISSN: 1069031X. Dostupné na: <https://doi.org/10.1509/jimk.19.2.45>.
- Oliver, R. L. 1980. A cognitive model of the antecedents and consequences of satisfaction decisions. In *Journal of Marketing Research* [online], vol. 17, no. 4, pp. 460-469 [cit. 2020-11-17]. ISSN: 00222437. Dostupné na: <https://doi.org/10.2307/3150499>.
- Oliver, R. L., Swan, J. E. 1989. Consumer perceptions of interpersonal equity and satisfaction in transactions: a field survey approach. In *Journal of Marketing* [online], vol. 53, no. 2, pp. 21-35. [cit. 2020-11-12]. ISSN: 00222429. Dostupné na: <https://doi.org/10.2307/1251411>.
- Olson, J. C., Jacoby, J. 1972. Cue utilization in the quality perception process. ACR Special Volumes.
- Ozretic-Dosen, D., Skare, V., Krupka, Z. 2007. Assessments of country of origin and brand cues in evaluating a Croatian, western and eastern European food product. In *Journal of Business research* [online], vol. 60, no. 2, pp. 130-136 [cit. 2020-11-10]. Dostupné na: <https://doi.org/10.1016/j.jbusres.2006.10.011>.
- Özsomer, A. 2012. The Interplay between Global and Local Brands: A Closer Look at Perceived Brand Globalness and Local Iconness. In *Journal of International Marketing* [online], vol. 20, no. 2, pp. 72-95 [cit. 2020-11-20]. ISSN: 1069031X. Dostupné na: DOI: 10.2307/23268747.
- Özsomer, A., Altaras, S. 2008. Global Brand Purchase Likelihood: A Critical Synthesis and an Integrated Conceptual Framework. In *Journal of International Marketing* [online], vol. 16, no. 4, pp. 1-28 [cit. 2020-11-20]. ISSN: 1069031X. Dostupné na: DOI: 10.1509/jimk.16.4.1.
- Papadopoulos, N., Heslop, L. 2002. Country equity and country branding: Problems and prospects. In *Journal of Brand Management* [online], vol. 9, no. 4, pp. 294-314 [cit. 2020-11-24]. ISSN: 1479-1803. Dostupné na: <https://doi.org/10.1057/palgrave.bm.2540079>.
- Pappu, R., Quester, P. G., Cooksey, R. W. 2006. Consumer-based brand equity and country-of-origin relationships: some empirical evidence. In *European Journal of Marketing* [online], vol. 40, no.5/6, pp. 696-717 [cit. 2020-11-12]. ISSN: 00222429. Dostupné na: <https://doi.org/10.1108/03090560610657903>.
- Roth, K. P. Z., Diamantopoulos, A., Montesinos, M. Á. 2008. Home country image, country brand equity and consumers' product preferences: an empirical study. In *Management International Review* [online], vol. 48, no. 5, pp. 577-602 [cit. 2020-11-15]. ISSN: 1861-8901. Dostupné na: DOI: 10.1007/s11575-008-0031-y.

- Roth, M. S. 1995. The effects of culture and socioeconomics on the performance of global brand image strategies. In *Journal of Marketing Research* [online], vol. 32, no. 2, pp. 163-175 [cit. 2020-11-17]. ISSN: 00222437. Dostupné na: <https://doi.org/10.2307/3152045>.
- Schooler, R. 1965. Product bias in the Central American common market. In *JMR, Journal of Marketing Research (pre-1986)* [online], vol. 2(000004), pp. 394 [cit. 2020-11-17]. ISSN: 00222437. Dostupné na: <https://doi.org/10.2307/3149486>.
- Sisto R., Pellegrini G., La Sala, P. 2019. Dual quality food: A negative social externality or a competitiveness opportunity? In *Agricultural Economics – Czech* [online], vol. 65, pp. 307–313 [cit. 2020-11-24]. ISSN: 1805-9295. Dostupné na: <https://doi.org/10.17221/307/2018-AGRICECON>
- Steenkamp, J.-B. E., Batra, R., Alden, D. L. 2003. How perceived brand global ness creates brand value. In *Journal of International Business Studies* [online], vol. 34, no. 1, pp. 53-65 [cit. 2020-11-24]. ISSN: 1478-6990. Dostupné na: DOI: 10.1057/palgrave.jibs.8400002.
- Thakor, M. V., Lavack, A. M. 2003. Effect of perceived brand origin associations on consumer perceptions of quality. In *Journal of Product & Brand Management* [online], vol. 12, no. 6, pp. 394-407 [cit. 2020-11-22]. ISSN: 1061-0421. Dostupné na: DOI: 10.1108/10610420310498821.
- Van Der Lans, I. A., Van Ittersum, K., De Cicco, A., Loseby, M. 2001. The role of the region of origin and EU certificates of origin in consumer evaluation of food products. In *European Review of Agricultural Economies* [online], vol. 28, no. 4, pp. 451-478 [cit. 2020-11-24]. ISSN 1464-3618. Dostupné na: <https://doi.org/10.1093/erae/28.4.451>.
- Van Ittersum, K., Candel, M. J. J. M., Meulenberg, M. T. G. 2003. The influence of the image of a product's region of origin on product evaluation. In *Journal of Business research* [online], vol. 56, no. 3, pp. 215-226 [cit. 2020-11-10]. ISSN: 0148-2963. Dostupné na: [https://doi.org/10.1016/S0148-2963\(01\)00223-5](https://doi.org/10.1016/S0148-2963(01)00223-5).
- Verlegh, P. W. J., Steenkamp, J.-B. E. M. 1999. A review and meta-analysis of country-of-origin research. In *Journal of Economic Psychology* [online], vol. 20, no. 5, pp. 521-546 [cit. 2020-11-20]. ISSN: 0167-4870. Dostupné na: [https://doi.org/10.1016/S0167-4870\(99\)00023-9](https://doi.org/10.1016/S0167-4870(99)00023-9).
- Webb, D., Po, K. 2000. Country-of-origin and brand effects in a university setting. In (Editor Ed.)^Eds.), Book Country-of-origin and brand effects in a university setting, pp. 1376-1380, City: Promaco Conventions Pty. Ltd.
- Wilcox, D. 2015. Country-Of-Origin Bias: A Literature Review and Prescription for the Global World', in (Editor Ed.)^Eds.), Book Country-Of-Origin Bias: A Literature Review and Prescription for the Global World, pp. 86-96. City: Springer International Publishing.
- Xia, L., Monroe, K. B., Cox, J. L. 2004. The price is unfair! A conceptual framework of price fairness perceptions. In *Journal of Marketing* [online], vol. 68, no. 4, pp. 1-15 [cit. 2020-11-12]. ISSN: 00222429. Dostupné na: <https://doi.org/10.1509/jmkg.68.4.1.42733>.
- Zhu, G., Chrysoschoidis, G., Zhou, L. 2019. Do extra ingredients on the package lead to extra calorie estimates? In *European Journal of Marketing* [online], vol. 53, no. 11 [cit. 2020-11-12]. ISSN: 00222429. Dostupné na: <https://doi.org/10.1108/EJM-11-2017-0856>.

Pod'akovanie:

"Táto práca bola podporená Agentúrou na podporu výskumu a vývoja na základe Zmluvy č. APVV-17-0508 a APVV-19-0180".

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

ANALYTICKÉ PRÍSTUPY K HODNOTENIU CHRÁNENÉHO OZNAČENIA PÔVODU POTRAVÍN ANALYTICAL APPROACHES FOR THE EVALUATION OF FOOD PROTECTED DESIGNATION OF ORIGIN

Jozef Čapla, Peter Zajác, Jozef Golian, Alica Bobková, Ľubomír Belej, Alžbeta Demianová

Abstract: Agriculture in particular and food sectors in general have become global industries, transcending national boundaries and supplying a worldwide marketplace. This globalization of food markets, facilitated by the fast transport of goods around the world, caused a growing public distrust as a consequence of the increasing number of incidents related to food safety and mislabeling worldwide. Consumers around the world increasingly demand safe and high-quality products, understanding quality as the sum of features, characteristics, and properties of a product, which bear on its ability to satisfy stated or implied needs (Will and Guenther, 2007). Quality is a flexible term in which intrinsic attributes such as taste, texture, and shelf life and extrinsic ones such as the use of pesticides, type of packaging material, processing technology, or the use of genetically modified organisms are important features. In summary, consumers demand agricultural products or foodstuffs with identifiable origins and specific characteristics. In particular, those linked to the geographical origin of food and their production conditions are of important concern.

Keywords: Geographical indications, Organic compounds, Protected designation of origin

ÚVOD

Svetová organizácia duševného vlastníctva (WIPO) definuje zemepisné označenie (GI) ako „označenie používané na výrobkoch, ktoré má špecifický zemepisný pôvod a má povest alebo vlastnosti, ktoré mu možno v zásade pripísať“ (WIPO, 2015). Označenia pôvodu (AO) sú osobitným druhom zemepisného označenia. Tento výraz bol použitý v Parížskom dohovore z roku 1883 a bol definovaný v Lisabonskej dohode z roku 1958. Prvé nariadenie o zemepisných označeniach bolo prijaté v EÚ v roku 1992 s cieľom harmonizovať rôzne ochranné nástroje existujúce v niektorých členských štátoch a vytvoriť systém registrácie a ochrany označenia zlučiteľný s jednotným spoločným trhom. Odvtedy právne predpisy EÚ stanovujú prísne požiadavky zaručujúce normy všetkých európskych výrobkov. EÚ vytvorila tri spôsoby týkajúce sa chráneného označenia pôvodu (CHOP), chráneného zemepisného označenia (CHZO) a záručenej tradičnej špeciality (ZTS) (pozri obr. 1). Tieto systémy podnecujú rôznorodú poľnohospodársku výrobu, chránia názvy výrobkov pred zneužitím a napodobňovaním a pomáhajú spotrebiteľom tým, že im poskytujú informácie o osobitnom charaktere označených výrobkov.



Obrázok 1. Chránené spôsoby označenia potravín v rámci EÚ

CHOP zahŕňa poľnohospodárske výrobky a potraviny, ktoré sa vyrábajú, spracúvajú a pripravujú v danej zemepisnej oblasti (konkrétne miesto, región alebo, vo výnimočných prípadoch, krajina) pomocou uznávaného know-how, ktorého kvalita alebo vlastnosti sú v podstate alebo výlučne dôsledkom na konkrétne geografické prostredie s jeho prirodzenými prírodnými a ľudskými faktormi a výrobné kroky, ktoré sa všetky uskutočňujú vo vymedzenej zemepisnej oblasti.

CHZO chráni poľnohospodárske výrobky a potraviny úzko spojené s geografickou oblasťou (konkrétnym miestom, regiónom alebo krajinou), ktorej daná kvalita, povest' alebo iné vlastnosti sa dajú v zásade pripísať jej geografickému pôvodu a najmenej jednej z etáp výroby, spracovanie alebo príprava sa uskutočňuje vo vymedzenej zemepisnej oblasti.

ZTŠ označuje tradičný charakter potravín, či už v zložení alebo výrobných postupoch. Opisuje konkrétny výrobok alebo potravinu, ktoré sú výsledkom spôsobu výroby, spracovania alebo zloženia zodpovedajúceho tradičnej praxi pre tento výrobok alebo potravinu, alebo sú vyrobené zo surovín alebo prísad, ktoré sa bežne nepoužívajú.

V EÚ sa vedie zoznam registrovaných názvov podľa krajiny pôvodu s 33 % Taliansko, pokiaľ ide o syry, mäso a olivový olej; Nemecko s 25 % (pivo, pečivo a mäso); Francúzsko so 17 % (mliečne výrobky a čerstvé a spracované mäso), nasleduje Španielsko (ovocie a zelenina, mäso a syry) a Grécko (mliekareský sektor a olivový olej). Začlenenie CHOP nie je len európskou históriou. Mexiko bolo prvou mimoeurópskou krajinou, ktorá zaviedla systém ochrany zemepisného označenia v roku 1974. Brazília a Peru prijali právne predpisy o zemepisných označeniach v roku 1996, potom nasledovali Južná Kórea a India v roku 1999, Kolumbia v roku 2000 a Čile v roku 2005. Potraviny so zemepisným označením chránené kolektívnymi alebo certifikačnými známkami v krajine pôvodu predstavujú banány z Kostariky, pomaranče Jaffa z Izraela, zemiaky Idaho (USA), čaj Puer (Čína), broskyne Pinggu (Čína), tequila, káva, ovocie mango, vanilka, ryža a čili z Mexika, fazuľa Lima, biela kukurica, crooknecká tekvica a čerstvá a sušená Maca z Peru, káva z Kolumbie a víno z Alžírsku (Bowen a Valenzuela-Zapata, 2009).

ANALYTICKÉ METÓDY NA AUTENTIFIKÁCIU CHRÁNENÉHO OZNAČENIA POTRAVÍN

Použitie analytických techník na určenie GI potravinárskych výrobkov je najlepším spôsobom, ako zabrániť falšovaniu a nesprávne označovaniu po začlenení potravín na trh. Stratégie používané na zisťovanie falšovaných alebo nesprávne označených výrobkov sa spoliehali na inštrumentálne techniky najmä kvôli zložitosti podvodných postupov. Rôzne inštrumentálne techniky založené na stanovení organických zlúčenín, ako napríklad kvapalinová chromatografia (LC), plynová chromatografia (GC), UV – Visible (UV – Vis) a infračervená spektroskopia (IR) boli navrhnuté pre pravosť potravín na účely kontroly prítomnosti hlavných zložiek vzorky alebo niektorých organických zlúčenín, ktoré môžu byť charakteristické pre CHOP. Normálny rozsah organických zlúčenín v potravinách sa však líši podľa hnojenia, klimatických podmienok v roku kultivácie, histórie polí a odrody alebo druhu, ako aj zemepisnej polohy a pôdných charakteristík, pretože je niekedy ťažké definitívne určiť pravosť potraviny. Stratégie pre autentifikáciu označených potravín by sa teda dali klasifikovať do dvoch hlavných kategórií na základe (1) zloženia stopových prvkov a stabilného pomeru izotopov a (2) organických zlúčenín a analýzy založenej na indexoch (tabuľka 1) (Cserhádi et al., 2005).

Tabuľka 1. Analytické techniky používané na autentifikáciu potravinového pôvodu

Minerálny profil	Pomer izotopov	Organické zlúčeniny
ICP-OES	IRMS GC-IRMS EA-IRMS TI-MS	Separácia Globálny index Spektroskopia GC Farba MIR LC Polyfenoly celkom NIR Raman Elektroforéza Antokyány celkom Fluorescencia
ICP-MS	NMR	
AAS FAAS ETAAS XRF WDXRF EDXRF SRXRF TXRF IR MIR NIR NAA		

Ďalšie vyvinuté analytické postupy na určovanie pravosti potravín sa opierajú o genetické techniky a techniky založené na DNA (Cserhádi et al., 2005).

Zloženie stopových prvkov a pomer stabilného izotopu pre rozlíšenie potravín s chráneným označením

Je dobre známe, že obsah vybraných minerálnych látok a stopových prvkov jasne odráža pôdny typ pestovateľskej oblasti a podmienky životného prostredia pre produkciu potravín a preto bolo navrhnuté hodnotenie obsahu stopových prvkov na zabezpečenie zemepisného pôvodu vzoriek potravín (Drivelos et al., 2014).

Metódy na získanie elementárneho odtlačku potravinovej vzorky sú hlavne tie s viacdielnou detekčnou schopnosťou, ako napríklad metódy založené na ICP: Induktívne viazaná plazmová optická emisná spektroskopia (ICP-OES) a indukčne viazaná plazmová hmotnostná spektrometria (ICP-MS) (Iglesias et al., 2007). ICP-MS zvyčajne poskytuje limity detekcie (LOD) pre 70 prvkov v rozsahu častí na miliardu a častí na milión. Na druhej strane, ICP-OES je rýchla viacprvková technika s rozšíreným dynamickým lineárnym rozsahom a stredne nízkymi hodnotami LOD v rozmedzí niekoľkých častí na milión. Na jednu sériu vzorky je možné skríňovať až 60 prvkov za menej ako jednu minútu a zloženie stopových prvkov je možné určiť v rôznych vodných alebo organických matriciach. Avšak hlavnými nevýhodami ICP-MS a ICP-OES sú drahé prístrojové a prevádzkové náklady, požiadavka na vyškolených operátorov a vo väčšine prípadov potreba krokov predúpravy vzorky, ktoré často zahŕňajú úplnú mineralizáciu vzoriek.

Ako alternatívne analytické techniky na určovanie geografického pôvodu potravín možno použiť klasickú atómovú absorpčnú spektrometriu (AAS) založenú na oboch metódach: plameňová technika atomizácie (FAAS) alebo elektrotermické rozprašovanie (ETAAS). AAS poskytuje citlivý a vysoko selektívny spektrometrický nástroj vhodný na stanovenie mnohých prvkov na stopovej a ultrastopovej úrovni. Hlavnými výhodami FAAS sú nízke prevádzkové náklady a dobrý analytický výkon. Na druhej strane je možná priama analýza tuhých vzoriek so zníženým predbežným spracovaním pomocou techniky ETAAS, nazývanej tiež atómová absorpčná spektrometria grafitovej pece (GFAAS), ponúkajúca zvýšenú citlivosť s LOD ppb a vhodnú selektivitu za rozumnú cenu s možnosťou stanovenia nízkych hladín nekovov (napr. Cl, F, P alebo S). Emisná spektrometria sa tiež používa ako analytická technika na zaručenie geografického pôvodu potravín (Frías et al., 2003). Hlavná nevýhoda plameňovej atómovej emisnej spektrometrie (FAES) je účinok malých zmien teploty na úroveň excitácie a následne na produkciu voľných atómov a prítomnosť spektrálnych interferencií v dôsledku prekryvania

spektrálnych čiar. Avšak obmedzená schopnosť AAS techník na súčasné alebo rýchle postupné stanovenie mnohých prvkov v jednej vzorke silne obmedzuje možnosti použitia klasických FAAS a ETAAS na autentifikáciu potravinového pôvodu.

Medzi ďalšie menej bežné prístupy patrí rádiochemická analýza aktivácie neutrónov (RNAA) a inštrumentálna analýza aktivácie neutrónov (INAA) (Pellerano et al., 2008), čo sú veľmi vhodné techniky, ktoré nevyžadujú predbežné ošetrovanie vzorky alebo redukované ošetrovanie vzorky. Avšak použitie zariadení na atómovú energiu a dlhá doba potrebná na niektoré stanovenia prvkov obmedzujú ich použiteľnosť.

V menšej miere je röntgenová fluorescencia (XRF) ďalšou vhodnou technikou klasifikácie potravín s CHOP na základe minerálneho profilu vzoriek (Haswell a Walmsley, 1998). V súčasnosti existuje veľa typov XRF spektrometrov: vlnová dĺžka disperzná (WDXRF), energetická disperzia (EDXRF), synchrotrónové žiarenie (SRXRF) a XRF s úplným odrazom (TXRF), ktoré ponúkajú širokú škálu citlivosti a analytických podmienok.

XRF ponúka možnosť vykonávania viacdielnej priamej analýzy (kvalitatívnych, semikvantitatívnych a/alebo kvantitatívnych) tuhých vzoriek v širokom dynamickom rozsahu. Okrem toho je TXRF mikrometóda, ktorá vyžaduje iba pár ml roztoku a ponúka vysoko intenzívne synchrotrónové zdroje (štyri alebo päť rádov väčšie ako WDXRF alebo EDXRF). Hlavnou nevýhodou prístrojovej techniky XRF bola jej obmedzená citlivosť na niektoré prvky (napr. Cd a Pb) v dôsledku vysokej intenzity pozadia, ktorú je možné pripísať vysokému stupňu rozptylu röntgenového zdroja a nákladov na sofistikované röntgenové lúče. Pozadie možno výrazne znížiť použitím TXRF alebo SRXRF spektrometrov, ale jedným z problémov aplikácie TXRF je príprava reflektorov čistej vzorky. Aj pri použití ultra čistých reagentov sa však môžu objaviť nečistoty. Takže v skutočnosti je autentifikácia potravín založená na minerálnom profile vzoriek z ich röntgenových spektier dosť obmedzená.

V niektorých prípadoch je možné minerálne zloženie potravín rozlišovať na základe vnútorných a vonkajších informácií poskytovaných infračerveným spektrom v oboch smeroch: NIR (Near Infrared Range) a Mid Infrared Range (MIR); existujú aj štúdie, ktoré používajú vyššie uvedené techniky autentifikácie potravín.

Stanovenie pomeru stabilného izotopu (SIR) sa ukázalo ako dobrý deskriptor pre charakterizáciu vzoriek potravín s CHOP. Hmotnostná spektrometria s pomerom izotopov (IRMS) je technika zvyčajne používaná na meranie relatívneho množstva prírodných izotopov v danej vzorke. Na zavedenie vzoriek do IRMS sa používa niekoľko rôznych rozhraní, najbežnejšie sú analyzátory elementov (EA-IRMS) a plynové chromatografy (GC-IRMS). EA-IRMS zahŕňa predúpravu vzorky a je vhodný na analýzu neprchavých látok, aj keď poskytuje iba priemernú hodnotu pomeru izotopov pre celú vzorku. GC-IRMS však môže poskytnúť izotopovú analýzu komplexnej zmesi vrátane ďalších informácií a vysokej rozlišovacej schopnosti.

IRMS sa často používa pre $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$, $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ a $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$, pričom sa meria ich atómová hmotnosť podľa hodnôt magnetickej odchýlky. Pre meranie stabilného izotopu Sr alebo Pb je však vhodnejšie použiť techniky termálnej ionizácie MS (TIMS), ktoré sú založené na tepelnej ionizácii vzorky tuhej látky vlozenej do zdroja hmotnostného spektrometra. Táto technika je lacnejšia ako IRMS a je vhodná na charakterizáciu druhov s nízkym ionizačným potenciálom.

Na meranie stabilných izotopov sa bežne používa nukleárna magnetická rezonancia (NMR) v kombinácii s IRMS. NMR umožňuje meranie ^1H a ^{13}C a ďalších jadier. NMR sa preukázala ako užitočný nástroj pri analýze rôznych tried potravín a nápojov pri klasifikácii a rozlišovaní (geografický a botanický pôvod, ako aj pri overovaní pravosti značky) (Monakhova et al., 2013).

GENETICKÉ TECHNIKY ROZLIŠOVANIA POTRAVÍN S CHRÁNENÝM OZNAČENÍM PÔVODU

Autentifikácia potravín na základe DNA je v súčasnosti rozsiahlou disciplínou, ktorá pretína populačnú genetiku, forenznú genetiku, fylogenetiku, fylogeografiu a všeobecné molekulárne technológie. DNA má niekoľko charakteristík, ktoré z nej robia užitočný cieľ pre analýzu potravinárskych výrobkov: vysoká chemická a tepelná stabilita a prítomnosť vo väčšine buniek a skutočnosť, že od konkrétneho jedinca možno získať prakticky identické informácie (Lockley a Bardsley, 2000).

Metódy založené na DNA spočívajú hlavne v troch rôznych krokoch: (1) izolácia alebo extrakcia DNA, (2) polymerázová reťazová reakcia (PCR), amplifikácia fragmentov DNA obsahujúcich príslušné genetické markery a (3) detekcia profilov DNA. V súčasnosti sú najbežnejšie používané metódy zamerané na DNA pomocou primérov PCR, po ktorej nasleduje elektroforetická separácia a porovnanie výsledných profilov alebo sekvencií s adekvátnymi kontrolami alebo odkazmi.

Genetické štúdie týkajúce sa analýzy potravín s CHOP sú založené hlavne na identifikácii druhov s cieľom posúdiť pravosť potravín. Spravidla sa vykonáva na zistenie podvodnej náhrady daného druhu podobnou látkou s nízkou hodnotou. Metódy založené na DNA sa preukázali ako vhodný spôsob jednoznačnej identifikácie druhov, plemien alebo odrôd prítomných v potravinárskych výrobkoch, keď preskúmanie morfológických charakteristík nie je z dôvodu spracovania alebo polospracovania možné ani spoľahlivé. Je nevyhnutné zvoliť spoľahlivé genetické markery, ktoré umožňujú diskrimináciu medzi druhmi, populáciami, plemenami alebo odrodami ako funkcia ich CHOP.

VÍNO, LIEHOVINY A INÉ NÁPOJE

Zákonné uznanie geografického pôvodu vín certifikátmi ako CHZO je pre spotrebiteľov aj výrobcov veľmi zaujímavé, pretože zaisťuje určitú úroveň kvality a pomáha udržiavať individualitu produktu na globálnom trhu. Aby sa dosiahli tieto certifikácie, musia sa konkrétne odrody viniča pestovať v presne určených geografických oblastiach a vyrobené vína musia podliehať predpisom a kontrolám vykonávaným regulačnými radami (Pérez-Magariño a González-San José, 2001).

Veľké množstvo parametrov ovplyvňujúcich kvalitu vína malo pôvod vo vývoji rôznych protokolov pre ich analýzu, a preto sú zložky vína prísne regulované medzinárodnými organizáciami alebo vládnyimi agentúrami, aby sa zabránilo podvodom a zdravotným rizikám.

Medzi typické príklady nedávno publikovaných metodík (od roku 2010 do roku 2015) na autentifikáciu chráneného označenia vín patria:

Lambrusco, červené víno s chráneným označením pôvodu (CHOP) v Modene (Taliansko), pre ktoré bol študovaný izotopový pomer Sr-87/Sr-86, ktorý sa tradične používa ako značka pôvodu, a vzorky pochádzajúce zo štyroch rôznych ročníkov (2009, 2010, 2011 a 2012). Výsledky nenaznačili významnú variabilitu medzi rôznymi ročníkmi vín a dokonalú zhodu medzi izotopovým rozsahom pôd a vín. Napriek tomu nebol izotopový pomer Sr-87/ Sr-86 dostatočne silný na to, aby rozlišoval medzi podobnými výrobkami (Durante et al., 2015).

Na klasifikáciu pôvodných a nepôvodných odrôd sa použilo minerálne zloženie tureckých vín. Vína zo štyroch ročníkov (2006 - 2009) boli analyzované ICP-OES a ICP-MS, po ktorých nasledovala viacrozmerná analýza. Efektívne premenné pre rozlišovaciu analýzu boli prírodné minerálne látky (Sr, Li, Al, Ba a B) a minerálne látky pochádzajúce z poľnohospodárskych činností, spracovania alebo znečistenia (Ca, Cu, Mg, Co, Pb a Ni). Charakteristika tureckých vín z domácich a nepôvodných odrôd viniča, ako sú Cabernet Sauvignon, Merlot, Syrah a Chardonnay, boli definované z hľadiska ich obsahu minerálnych látok (Sen a Tokatli, 2014).

Na stanovenie biogénnych amínov vo vínach z dvoch vinárskych oblastí (Jumilla a Bullas CHOP) nachádzajúcich sa v oblasti Murcia (Španielsko) sa použil podobný postup založený na LC s predkolonovou derivatizáciou o-ftalldialdehydu a detekciou fluorescence. Histamín a putrescín boli najrozšírenejšími amínmi vo vínach Jumilla (49 %, respektíve 48 %), zatiaľ čo tryptamín a putrescín boli najrozšírenejšími amínmi vo vínach Bullas (19 % a 38 %) (Tuberoso et al., 2015), čo dokazuje, že veľmi nízke hladiny biogénnych amínov by mohli ponúknuť cenný nástroj na autentifikáciu vína.

Ďalšie analytické metódy používané na klasifikáciu vín podľa ich pôvodu boli založené na spektroskopických meraniach. Analýza kombinovaných signálov ANN získaných v spektrách UV – Vis a NIR spektroskopie sa vyhodnotili ako rýchla metóda na klasifikáciu vín patriacich k označeniam pôvodu Rias Baixas, Ribeira Sacra, Monterrei, Ribeiro a Valdeorras (Španielsko). Výsledky ukázali uskutočniteľnosť použitia ANN na analýzu UV – Vis – NIR na autentifikáciu vín.

Informácie o genetickom polymorfizme dané jednoduchými sekvenčnými opakovaniami (SSR; mikrosatelitné markery) sa osvedčili, keď sa použili na odlíšenie muštov „Barbera“ a „Dolcetto“ od muštov „Nebbiolo“ pomocou kapilárnej mikroelektroforézy (technológia lab-on-chip) (Recupero et al., 2013).

Pivá zo Španielska boli analyzované s cieľom použitia stopových prvkov ako chemických deskriptorov na ich rozlíšenie podľa geografického pôvodu. Obsah Zn, P, B, Mn, Fe, Mg, Al, Sr, Ca, Ba, Na a K stanovený pomocou ICP-OES v kombinácii s niekoľkými technikami rozpoznávania vzorov (napr. LDA) bol úspešne použitý so zistením, že prvky s najväčšou rozlišovacou schopnosťou boli P, Mg, K, Mn, Ca a Na (Alcazar et al., 2003).

Medzi ďalšie registrované nápoje chránené označením s certifikátom pôvodu patrí cider, ktorého hlavnými producentmi sú Spojené kráľovstvo, Írsko, Francúzsko a Španielsko, a čaj, pričom hlavnými producentmi sú Čína a India.

Na vyhodnotenie autenticity ciderov Garcia-Ruiz et al. (2007) bol použitý kombinovaný izotopový pomer a minerálny profil použitím MC-ICP-MS a ICP-OES na stanovenie celkovo 37 prvkov. Koncentrácie Na, Mg, Al, K, Ca, Ti, V, Mn, Zn, As, Rb, Sr, Mo, Ba a pomer 87-Sr/86-Sr boli spracované pomocou ANOVA a LDA. Použitie 87-Sr/86-Sr ako jedinečnej premennej nestačilo na rozlíšenie medzi vzorkami pochádzajúcimi z oblastí blízko seba. Kombinácia s koncentráciou stopových prvkov však umožnila oddeliť vzorky jablčného muštu a otvorila cestu pre správnu autentizáciu jablčného muštu.

Polyfenolické profily jablkového džúsu rôznych odrôd a oblastí z Číny sa použili na charakterizáciu a klasifikáciu jablkových štiav z okresov s CHOP. Polyfenoly sa stanovili pomocou LC a MS v kombinácii s LDA, čo poskytlo 98,3 % a 91,2 % úspešnosť z hľadiska predikčnej schopnosti (Guo et al., 2013).

Moreda-Pineiro et al. (2003) vykonali analýzu stopových prvkov v čaji z rôznych ázijských a afrických krajín pomocou ICP-OES a ICP-MS. Koncentrácie Co, Cr, Cs, Cu, Ni, Pb, Rb, Ti a V merané pomocou ICP-MS a Al, Ba, Ca, Fe, Mg, Mn, Sr a Zn boli použité ako premenné v analýze údajov pomocou rôznych techník rozpoznávania vzorov (napr. PCA, CA, LDA a SIMCA). Údaje získali správne rozlíšené vzorky z Číny, Indie a Srí Lanky pomocou protokolu LDA.

Rozlíšenie destilátov a destilátov z vín sa uskutočňovalo pomocou fluorescenčnej spektroskopie na prednej strane a viacrozmernej analýzy údajov. Zaznamenala sa celková luminiscencia a synchronné skenovacie fluorescenčné spektrá, po ktorých nasledovala klasifikácia vzoriek pomocou PCA a HCA. Obe boli uskutočňované na emisných spektrách (360–650 nm) zaznamenaných pri excitačnej vlnovej dĺžke 350 nm a synchronné fluorescenčné spektrá (200–700 nm) zhromaždené v intervale vlnových dĺžok 90 nm poskytovali veľmi dobrú diferenciáciu medzi týmito dvoma triedami liehovín. Získané výsledky naznačujú, že

fluorescenčná spektroskopia prednej strany ponúka sľubný prístup k autentifikácii brandy (Sádecka et al., 2009).

OLIVOVÝ OLEJ

Dôležitosť tukov rastlinného pôvodu pre zdravú výživu odôvodňuje rastúci záujem o výrobu, ochranu a autentizáciu rastlinných olejov, najmä olivového oleja, a potrebu ich jasného rozlíšenia od ostatných olejov a olivového oleja vyrábaného za rôznych podmienok a v iných rôznych miestach.

Španielsko je vedúcou krajinou na výrobu olivového oleja na svete s priemernou ročnou produkciou 700 000 - 800 000 t, ktorá v posledných rokoch dokonca dosiahla 1 400 000 t. Pretože cena v eurách za tonu olivového oleja závisí od jeho kvality a pôvodu (napr. rafinovaný, panenský alebo extra panenský olivový olej a s certifikátom pôvodu CHOP alebo nie), je zjavné, že je potrebné presne určiť pôvod olivového oleja pomocou pokročilých vedeckých metód. To je pre EÚ obzvlášť dôležité vzhľadom na rastúci dopyt spotrebiteľov po vysoko kvalitných a zdravých potravinách.

Mnoho fyzikálno-chemických vlastností, ako je nap. kyslosť, peroxidové číslo a pod. závisia od kvality olív pred zberom, od procesu extrakcie za účelom získania olejov a ich konzervácie. Zloženie mastných kyselín by mohlo poskytnúť najspoľahlivejšie výsledky charakterizácie olivových olejov s CHOP. Vo vedeckej literatúre je však k dispozícii veľa rôznych postupov na autentifikáciu olivových olejov.

Tuniské odrody panenského olivového oleja (VOO) boli charakterizované GC a NIR spektroskopiou. GC metylesterov mastných kyselín (FAME) a NIR spektrá olejov spojené s chemometrickým spracovaním umožnili štúdium medzirodovej variability a overenie pôvodu odrôd niektorých tuniských komerčných VOO. Špecifickosť tuniských VOO sa hodnotila porovnaním vzoriek so vzorkami vyrobenými v Alžírsku, Maroku a Francúzsku s CHOP. Klasifikácia odrodových pôvodov podľa SIMCA použila kompozície FAME a NIR spektrá najbežnejšie používaných odrôd a preukázala vysoký potenciál na autentifikáciu odrodového pôvodu tuniského VOO (Laroussi-Mezghani et al., 2015). Ďalej sa úspešne vyvinula autentifikácia olivových olejov dosiahnutá spektroskopiou MIR-NIR kombinovanou s chemometriou pre vysledovateľnosť extra VOO od CHOP Sabina (Taliano).

Okrem toho predikcia geografického pôvodu monovarietálnych vzoriek VOO z troch oblastí južného Grécka zozbieraných za päť zberových rokov (2001 - 2006), bola vykonaná pomocou ^1H a ^{31}P NMR spektroskopie a ich obsahu mastných kyselín, fenolov, diacylglycerolov, celkových voľných sterolov, voľných mastných kyselín a jódového čísla (Petrakis et al., 2008). Ukázalo sa, že geografická predpoveď na úrovni troch regiónov je veľmi vysoká (87 %). Okrem toho použitie klasifikácie a binárnych stromov umožnilo vytvoriť algoritmus geografickej predikcie pre neznáme vzorky spôsobom sebazdokonaľovania, ktorý je možné ľahko rozšíriť na ďalšie odrody a oblasti.

Na overenie geografického pôvodu extra VOO z troch rôznych oblastí Ligúrie sa použila technológia elektronického nosa a UV – Vis spektroskopia (Casale et al., 2007). Aplikácia LDA po výbere funkcií stačila na odlíšenie troch zemepisných označení Ligúria („Riviera dei Fiori“, „Riviera del Ponente Savonese“ a „Riviera di Levante“), ktoré dosiahli 100 % úspešnosť pri klasifikácii a takmer 100 % správnych predpovedí.

Bola preukázaná použiteľnosť markerov SSR pri analýze s vysokým rozlíšením (High Resolution Melting - HRM) na identifikáciu kultivarov olív použitých v extra panenskom olivovom oleji s CHOP „Terra di Bari“. Panel deviatich kultivarov bol testovaný so 17 párami primérov SSR a produkty PCR boli najskôr analyzované automatickým sekvencerom Genetic Analyzer. Pre deväť kultivarov bol získaný identifikačný kľúč, ktorý ukázal jednoznačné rozlíšenie medzi odrodami, ktoré tvoria extra panenský olivový olej s CHOP „Terra di Bari“: Cimadi Bitonto, Coratina a Ogliarola. Následne bola s markerom DCA18 nastavená metóda

založená na SSR spojená s analýzou HRM na rozlíšenie olivového oleja Terra di Bari od iného ako Terra di Bari olivového oleja s použitím rôznych zmesí. Táto analýza teda umožnila rozlíšenie a identifikáciu zmesí CHOP.

SYRY

Analyzoval sa obsah stopových prvkov v rôznych vzorkách syra z CHOP nachádzajúcich sa v severnom Španielsku s cieľom študovať vplyv podmienok spracovania na konečnú koncentráciu syra (Moreno-Rojas et al., 2012). Používanie ovčieho mlieka, živočíšneho syridla, solenia ponorením do solného kúpeľa a zrenia v syroch uvádzali všeobecne najvyššiu hladinu stopových prvkov. Okrem toho sa na zistenie geografickej sledovateľnosti a na detekciu možných napodobení so správnou klasifikáciou v 98,5 % prípadov použila analýza rozpoznávania vzorov viacdielných údajov založená na obsahu minerálnych látok a stopových prvkov.

Minerálne prvky ako Ba, Ca, Cr, Cu, Hg, K, Mg, Mn, Mo, Na, Ni a V stanovili FAAS a ETAAS v 278 vzorkách syrov z rôznych európskych krajín. Použitie PCA, CA, FA a CDA ako viacrozmerných štatistických nástrojov preukázalo, že koncentrácia vybraných stopových prvkov sa môže použiť ako značka na autentifikáciu syra, pričom CDA je pre tento účel najvhodnejším chemometrickým nástrojom.

Rôzne polotvrde a tvrdé syry z regiónu Marche (Taliansko) vyrobené z bahníc, kôz a kráv alebo zo zmiešaného mlieka sa analyzovali na pH, aktivitu vody, základné zloženie, bakteriálnu ekológiu a profil prchavých látok. Výsledky PCA a PLS-DA umožnili zoskupenie syrov podľa typu úpravy použitého procesu výroby mlieka a syrov. Nebolo však možné dosiahnuť jasné oddelenie medzi CHOP, medzerami a špeciálnymi syrmi od podobných výrobov alebo priemyselných konkurentov, čo naznačuje potrebu použitia doplnkových techník na presnú autentifikáciu pomocou CHOP.

Ako prostriedok na predkoncentrovanie prchavých organických zlúčenín (VOC) do syra bol vyvinutý produkt Purge/cryotrap/thaw/static headspace Solid Phase Microextraction (SPME). Monoterpény boli vyhodnotené ako potenciálne označenia pre príslušný geografický pôvod piatich tradičných slovinských syrov s CHOP. Údaje o deviatich monoterpénach (alfa-pinén, kamfén, alfa-fellandré, beta-pinén, 3-karén, 2-karén, limonén, tricyklén a gama-terpinén) vo vzorkách syrov preukázali zhlukovanie súvisiace s oblasťou výroby.

Pre citlivú a selektívnu detekciu falšovania mozzarely byvola bola vyvinutá ultra výkonná LC-elektrosprejová ionizáčno-tandemová metodika MS/MS založená na monitorovaní viacerých reakcií (MRM) (Russo et al., 2012). Cílená kvantitatívna analýza sa uskutočňovala monitorovaním špecifických prechodov fosforylovaného beta-kazeínového peptidu f33-48, identifikovaného ako nový druhovo špecifický proteotypový marker. Vysoká citlivosť MS založenej na MRM a široký dynamický rozsah trojitých kvadrupólových spektrometrov sa ukázali byť cenným nástrojom na analýzu potravinových matric, ako sú mliečne výrobky, a teda ponúkali nové príležitosti na sledovanie kvality a falšovania potravín.

NIR spektroskopia sa ukázala ako užitočný nástroj na presný odhad niekoľkých chemických vlastností a na klasifikáciu vzoriek podľa ich pôvodu. Boli vyvinuté latentné variabilné modely aplikované na spektrálne údaje NIR a použité na odhad niekoľkých chemických vlastností a na klasifikáciu dostupného súboru údajov podľa umiestnenia a prevádzky na výrobu syra (nížinnej a alpskej), veku zrenia (6, 12, 18, a 36 mesiacov), nadmorskej výšky výroby mlieka (nízka, stredná, stredne vysoká a vysoká) a obdobia roku výroby syra (máj, júl a september) v talianskych syroch. Podobným spôsobom ATR-FTIR v kombinácii s chemometrickou analýzou sa použil na klasifikáciu strúhaného syra Parmigiano-Reggiano z iných syrov typu grana z Talianska a strednej a severnej Európy (Gori et al., 2012). Na analýzu spektrálnych údajov sa použila LDA. Metóda úspešne klasifikovala štyri triedy

vzoriek strúhaného syra a LDA sa považovala za najlepší chemometrický prístup (Kim et al., 2015).

RYBY A MORSKÉ PRODUKTY

Chemické zloženie týkajúce sa makro a stopových prvkov, profilov mastných kyselín a stabilných izotopov sa použilo ako nástroj sledovateľnosti na hodnotenie geografického pôvodu a sezónnosti pekáča (*Micropogonias furnieri*) (Chaguri et al., 2015). Napriek tomu je stále potrebné ďalšie analyzovanie s väčšími vzorkami pekáča, aby sa umožnilo použitie mastných kyselín, prvkov alebo stabilného izotopu ako nástrojov autenticity pre orgány na kontrolu potravín.

Analýza stabilných izotopov sa ukázala ako sľubný prístup k identifikácii autenticity a vysledovateľnosti produktov z morských plodov a akvakultúry. Ako rozlišovacie kritériá sa použili pomery izotopov stabilných voči uhlíku a dusíku u troch komerčných rýb, a to makrel, žltých croakerov a pollockov pochádzajúcich z rôznych krajín. Okrem druhovo závislých odchýlok v izotopových hodnotách boli pozorované výrazné rozdiely v pomeroch delta C-13 a delta N-15 aj vzhľadom na krajinu pôvodu. To naznačuje, že izotopové prvky C a N by mohli byť spoľahlivými nástrojmi na identifikáciu a sledovanie pôvodu komerčných rýb.

Produkčná metóda (divoká alebo farmová), geografický pôvod a biologické druhy sa u kreviet diferencovali pomocou stabilnej analýzy pomeru izotopov uhlíka a dusíka a/alebo viacprvkového zloženia (Ortea a Gallardo, 2015). Dosiahla sa správna klasifikácia 100 % vzoriek podľa skutočného pôvodu a spôsobu výroby a 93,5 % podľa biologických druhov.

ICP-MS v kombinácii s rôznymi kontrolovanými chemometrickými prístupmi sa úspešne použil na klasifikáciu mušlí pestovaných v Haliči (severozápad Španielska) pod európskou značkou CHOP.

Hyperspektrálne zobrazovanie je rýchla, bez reagensií a nedeštruktívna analytická technika, ktorá integruje tradičné spektroskopické a zobrazovacie techniky do systému dosiahnuť spektrálne aj priestorové informácie z objektu, ktoré sa nedajú dosiahnuť ani digitálnym zobrazovaním, ani konvenčnými spektroskopickými technikami. Táto technika sa používala na zisťovanie falšovania, kontaminácie a autenticity mäsa, hydiny a rýb (Kamruzzaman et al., 2015). Na zisťovanie nesprávneho označenia a podvodov týkajúcich sa druhov rýb sa však skôr ako na hodnotenie CHOP rýb alebo morských plodov používajú molekulárne a genetické techniky. Bola vykonaná genetická identifikácia hlavných komerčne dostupných druhov rybích markerov na základe amplifikácie fragmentu mitochondriálneho génu 16S rRNA a následnej analýzy základného nástroja na vyhľadávanie lokálneho zarovnania (BLAST) (Wen et al., 2015). Výsledky naznačili, že táto metóda bola použiteľná pre všetky z nich, a preukázali, že 53,3 % výrobkov bolo nesprávne označených a 58,3 % výrobkov „croaker“ bolo nahradených druhmi sumcov alebo ostriežov.

Čiarový kód DNA možno použiť na presnú identifikáciu produktu z morských plodov podľa druhov na základe jeho genetického podpisu, a poskytuje tak prostriedok na testovanie pravosti a presnosti označenia morských plodov (Lamendin et al., 2015). To môže byť obzvlášť užitočné pri výrobkoch, ako sú filé, ktoré majú malý alebo žiadny jednoznačný identifikačný znak a môžu byť ľahko nesprávne označené.

Cross et al. (2006) vyvinuli multiplexnú PCR založenú na génových sekvenciách 5S rDNA na identifikáciu štyroch druhov ustríc (*Ostrea edulis*, *Ostrea stentina*, *Crassostrea angulata* a *Crassostrea gigas*). Tieto druhy priamo súvisia so ZTŠ, ale všeobecne nariadenie o CHOP implikuje ďalšie aspekty, ktoré nie je možné identifikovať molekulárnymi metódami. Napríklad Fal Oyster je CHOP Spojeného kráľovstva, ktoré sa udeľuje ustricám uloveným v určenej oblasti, ktoré používajú iba tradičné plachetnice v období od 1. októbra do 31. marca.

OSTATNÉ POTRAVINY

Ďalšími výrobkami, na ktoré sa vzťahujú nariadenia o CHOP/CHZO kvôli ich vysokej hodnote a kvalite, sú čerstvé a konzervované mäso, ovocie a zelenina.

Posledné príklady hodnotenia CHOP ovocia, zeleniny a strukovín zahŕňajú „Fava Santorinis“, žltý štiepaný hrach s CHOP pestovaný na Santorini, ktorý bol klasifikovaný pomocou koncentrácie prvkov vzácnych zemín meranej pomocou ICP-MS (Drivelos et al., 2014). Cibuľa CHZO Tropea (Taliansko) sa tiež odlišuje od cibule CHZO inej ako Tropea pomocou minerálneho profilu meraného pomocou ICP-MS (Furia et al., 2011). Čerešne z Alicante's Mountain CHZO (Matos-Reyes et al., 2013) a Arròs de Valencia PDO (Gonzalvez et al., 2011) boli diferencované pomocou obsahu minerálnych látok nameraného pomocou ICP-OES; zemiaky z Galície CHZO (Španielsko) s použitím minerálneho profilu meraného pomocou FAAS a FAES (Herrero Latorre et al., 2013). Talianske zemiaky zo Sicílie, Apúlie a Toskánska boli tiež klasifikované pomocou údajov z mikroskopickej extrakcie na pevnej fáze headspace GC – MS a IRMS (Longobardi et al., 2011); paradajky s talianskeho CHOP boli odlišené od ne-talianskej s použitím profilu minerálnou získaný dynamickou reakciou buniek (DRC), ICP-MS CH 4 ako reakčný plyn (Lo Feudo et al., 2010); a mandle zo Španielska a Spojených štátov boli rozlíšené okrem iného technikami termickej analýzy ATR-FTIR, diferenciálnou skenovacou kalorimetriou (DSC) a termogravimetrickou analýzou (TGA) (Valdes Garcia et al., 2013).

Chybné označenie komerčných paradajkových produktov bolo zistené pomocou molekulárnej genetickej analýzy (Scarano et al., 2015). SSR boli testované na 20 odrodách paradajok, validované na potravinách a potom použité na zistenie genetickej identity 25 komerčných plechoviek označených ako „San Marzano“.

ZÁVER

Na získanie rýchleho a presného overenia charakteristík a pôvodu potravín je potrebné mať podrobný popis vlastností a zloženia potravín a okrem toho pre všetky označené etikety typické spektroskopické, chromatografické a/alebo DNA záznamy. Tie záznamy musia zahŕňať chránené výrobky, aby sa zabezpečila dobrá porovnateľnosť medzi pôvodnými výrobkami a podozrivými výrobkami.

Pri zvažovaní metodík navrhovaných vo vedeckej literatúre na overenie pravosti pôvodu chránených potravín sa zdá byť zrejmé, že budúce úsilie bude zamerané na súčasné použitie niekoľkých parametrov získaných z rôznych metód. Takto sa zabráni nesprávnemu priradeniu kvôli variabilite plodín v závislosti od klimatických podmienok každého roku, čo znižuje falošne negatívne výsledky.

Na druhej strane je potrebné čo najrýchlejšie jednoznačne potvrdiť pôvod výrobkov, aby sa zabránilo znehodnoteniu potravín a preto sú potrebné ľahké a lacné skríningové metódy, ktoré podporia prácu kontrolných orgánov s najvyššími zárukami spotrebiteľom a výrobcom.

Ako najúčinnější metodika sa osvedčilo použitie minerálneho profilu potravín spolu s prírodnými izotopovými pomermi. V blízkej budúcnosti kombinácia spektroskopie, chromatografie a údajov založených na DNA získaných priamo zo vzoriek za prítomnosti dobre vybraných vnútorných štandardov môže poskytnúť jasný dôkaz o pravosti výrobkov.

LITERATÚRA

Bowen, Sarah, Ana Valenzuela Zapata, 2009. Geographical indications, terroir, and socioeconomic and ecological sustainability: The case of tequila. *Journal of Rural Studies* [online]. 2009, roč. 25, č. 1, s. 108–119. Dostupné na: [doi:10.1016/j.jrurstud.2008.07.003](https://doi.org/10.1016/j.jrurstud.2008.07.003)

- Casale, Monica, Carla Armanino, Chiara Casolino, Michele Forina, 2007. Combining information from headspace mass spectrometry and visible spectroscopy in the classification of the Ligurian olive oils. *Analytica Chimica Acta* [online]. 2007, roč. 589, č. 1, s. 89–95. Dostupné na: doi:10.1016/j.aca.2007.02.043
- Cross, Ismael, Laureana Rebordinos, Edgardo Diaz, 2006. Species Identification of Crassostrea and Ostrea Oysters by Polymerase Chain Reaction Amplification of the 5S rRNA Gene. *Journal of AOAC INTERNATIONAL* [online]. 2006, roč. 89, č. 1, s. 144–148. Dostupné na: doi:10.1093/jaoac/89.1.144
- Cserhádi, Tibor, Esther Forgács, Zdenek Deyl, Ivan Miksik, 2005. Chromatography in authenticity and traceability tests of vegetable oils and dairy products: a review. *Biomedical Chromatography* [online]. 2005, roč. 19, č. 3, s. 183–190. Dostupné na: doi:10.1002/bmc.486
- Drivelos, Spiros A., Kevin Higgins, John H. Kalivas, Serkos A. Haroutounian, Constantinos A. Georgiou, 2014. Data fusion for food authentication. Combining rare earth elements and trace metals to discriminate “Fava Santorinis” from other yellow split peas using chemometric tools. *Food Chemistry* [online]. 2014, roč. 165, s. 316–322. Dostupné na: doi:10.1016/j.foodchem.2014.03.083
- Durante, Caterina, Carlo Baschieri, Lucia Bertacchini, Davide Bertelli, Marina Cocchi, Andrea Marchetti, Daniela Manzini, Giulia Papotti, Simona Sighinolfi, 2015. An analytical approach to Sr isotope ratio determination in Lambrusco wines for geographical traceability purposes. *Food Chemistry* [online]. 2015, roč. 173, s. 557–563. Dostupné na: doi:10.1016/j.foodchem.2014.10.086
- Frías, S., 2003. Classification of commercial wines from the Canary Islands (Spain) by chemometric techniques using metallic contents. *Talanta* [online]. 2003, roč. 59, č. 2, s. 335–344. Dostupné na: doi:10.1016/s0039-9140(02)00524-6
- Furia, Emilia, Attilio Naccarato, Giovanni Sindona, Gaetano Stabile, Antonio Tagarelli, 2011. Multielement Fingerprinting as a Tool in Origin Authentication of PGI Food Products: Tropea Red Onion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 2011, roč. 59, č. 15, s. 8450–8457. Dostupné na: doi:10.1021/jf201556e
- García, Arantzazu Valdés, Ana Beltrán Sanahuja, María Del Carmen Garrigós Selva, 2013. Characterization and Classification of Almond Cultivars by Using Spectroscopic and Thermal Techniques. *Journal of Food Science* [online]. 2013, roč. 78, č. 2, s. C138–C144. Dostupné na: doi:10.1111/1750-3841.12031
- González, A., S. Armenta, M. De La Guardia, 2011. Geographical traceability of “Arròs de Valencia” rice grain based on mineral element composition. *Food Chemistry* [online]. 2011, roč. 126, č. 3, s. 1254–1260. Dostupné na: doi:10.1016/j.foodchem.2010.11.032
- Gori, Alessandro, Rubén M. Maggio, Lorenzo Cerretani, Marco Nocetti, Maria Fiorenza Caboni, 2012. Discrimination of grated cheeses by Fourier transform infrared spectroscopy coupled with chemometric techniques. *International Dairy Journal* [online]. 2012, roč. 23, č. 2, s. 115–120. Dostupné na: doi:10.1016/j.idairyj.2011.11.005
- Guo, Jing, Tianli Yue, Yahong Yuan, Yutang Wang, 2013. Chemometric Classification of Apple Juices According to Variety and Geographical Origin Based on Polyphenolic Profiles. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 2013, roč. 61, č. 28, s. 6949–6963. Dostupné na: doi:10.1021/jf4011774
- Herrero Latorre, Carlos, Julia Barciela García, Sagrario García Martín, Rosa M. Peña Crecente, 2013. Chemometric Classification of Potatoes with Protected Designation of Origin According to Their Producing Area and Variety. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 2013, roč. 61, č. 35, s. 8444–8451. Dostupné na: doi:10.1021/jf402001s
- Chaguri, Milena P., Ana Luísa Maulvault, Maria Leonor Nunes, Debora Aparecida Santiago, Juliana Célia Denadai, Fabiola Helena Fogaça, Léa Silvia Sant’ana, Carlos Ducatti, Narcisa Bandarra, Maria Luisa Carvalho, António Marques, 2015. Different tools to trace geographic origin and seasonality of croaker (*Micropogonias furnieri*). *LWT - Food Science and Technology* [online]. 2015, roč. 61, č. 1, s. 194–200. Dostupné na: doi:10.1016/j.lwt.2014.11.006
- Iglesias, Mònica, Emili Besalú, Enriqueta Anticó, 2007. Internal Standardization–Atomic Spectrometry and Geographical Pattern Recognition Techniques for the Multielement Analysis and Classification of Catalanian Red Wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 2007, roč. 55, č. 2, s. 219–225. Dostupné na: doi:10.1021/jf0629585
- Kamruzzaman, Mohammed, Yoshio Makino, Seiichi Oshita, 2015. Non-invasive analytical technology for the detection of contamination, adulteration, and authenticity of meat, poultry, and fish: A review. *Analytica Chimica Acta* [online]. 2015, roč. 853, s. 19–29. Dostupné na: doi:10.1016/j.aca.2014.08.043
- Kim, Heejoong, K. Suresh Kumar, Kyung-Hoon Shin, 2015. Applicability of stable C and N isotope analysis in inferring the geographical origin and authentication of commercial fish (Mackerel, Yellow Croaker and Pollock). *Food Chemistry* [online]. 2015, roč. 172, s. 523–527. Dostupné na: doi:10.1016/j.foodchem.2014.09.058
- Lamendin, Richard, Karen Miller, Robert D. Ward, 2015. Labelling accuracy in Tasmanian seafood: An investigation using DNA barcoding. *Food Control* [online]. 2015, roč. 47, s. 436–443. Dostupné na: doi:10.1016/j.foodcont.2014.07.039
- Laroussi-Mezghani, S., P. Vanlout, J. Molinet, N. Dupuy, M. Hammami, N. Grati-Kamoun, J. Artaud, 2015. Authentication of Tunisian virgin olive oils by chemometric analysis of fatty acid compositions and NIR spectra.

- Comparison with Maghrebian and French virgin olive oils. *Food Chemistry* [online]. 2015, roč. 173, s. 122–132. Dostupné na: doi:10.1016/j.foodchem.2014.10.002
- Lo Feudo, Gabriella, Attilio Naccarato, Giovanni Sindona, Antonio Tagarelli, 2010. Investigating the Origin of Tomatoes and Triple Concentrated Tomato Pastes through Multielement Determination by Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry and Statistical Analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 2010, roč. 58, č. 6, s. 3801–3807. Dostupné na: doi:10.1021/jf903868j
- Lockley, A.K., R.G Bardsley, 2000. DNA-based methods for food authentication. *Trends in Food Science & Technology* [online]. 2000, roč. 11, č. 2, s. 67–77. Dostupné na: doi:10.1016/s0924-2244(00)00049-2
- Longobardi, F., G. Casiello, D. Sacco, L. Tedone, A. Sacco, 2011. Characterisation of the geographical origin of Italian potatoes, based on stable isotope and volatile compound analyses. *Food Chemistry* [online]. 2011, roč. 124, č. 4, s. 1708–1713. Dostupné na: doi:10.1016/j.foodchem.2010.07.092
- Matos-Reyes, M.N., J. Simonot, O. López-Salazar, M.L. Cervera, M. De La Guardia, 2013. Authentication of Alicante's Mountain cherries protected designation of origin by their mineral profile. *Food Chemistry* [online]. 2013, roč. 141, č. 3, s. 2191–2197. Dostupné na: doi:10.1016/j.foodchem.2013.04.097
- Monakhova, Yu. B., T. Kuballa, D. W. Lachenmeier, 2013. Chemometric methods in NMR spectroscopic analysis of food products. *Journal of Analytical Chemistry* [online]. 2013, roč. 68, č. 9, s. 755–766. Dostupné na: doi:10.1134/s1061934813090098
- Moreno-Rojas, Rafael, Fernando Cámara-Martos, Pedro José Sánchez-Segarra, Manuel Ángel Amaro-López, 2012. Influence of manufacturing conditions and discrimination of Northern Spanish cheeses using multi-element analysis. *International Journal of Dairy Technology* [online]. 2012, roč. 65, č. 4, s. 594–602. Dostupné na: doi:10.1111/j.1471-0307.2012.00853.x
- Ortea, Ignacio, José M. Gallardo, 2015. Investigation of production method, geographical origin and species authentication in commercially relevant shrimps using stable isotope ratio and/or multi-element analyses combined with chemometrics: An exploratory analysis. *Food Chemistry* [online]. 2015, roč. 170, s. 145–153. Dostupné na: doi:10.1016/j.foodchem.2014.08.049
- Pellerano, Roberto G., Silvia S. Mazza, Raúl A. Marigliano, Eduardo J. Marchevsky, 2008. Multielement Analysis of Argentinean Lemon Juices by Instrumental Neutronic Activation Analysis and Their Classification According to Geographical Origin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 2008, roč. 56, č. 13, s. 5222–5225. Dostupné na: doi:10.1021/jf073555n
- Pérez-Magariño, S., M. L. González-San JOS, 2001. Differentiation Parameters of Ribera del Duero Wines from Other Spanish Denominations of Origin. *Food Science and Technology International* [online]. 2001, roč. 7, č. 3, s. 237–244. Dostupné na: doi:10.1106/he6f-9lb0-twffj-cyu9
- Peruzzo, C. M. K., 2003. Tempo de Ousadia: Reminiscências da Primeira Mestre. *Comunicação & Sociedade* [online]. 2003, roč. 25, č. 40, s. 21–37. Dostupné na: doi:10.15603/2175-7755/cs.v25n40p21-37
- Petrakis, Panos V., Alexia Agiomyrgianaki, Stella Christophoridou, Apostolos Spyros, Photis Dais, 2008. Geographical Characterization of Greek Virgin Olive Oils (Cv. Koroneiki) Using 1H and 31P NMR Fingerprinting with Canonical Discriminant Analysis and Classification Binary Trees. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 2008, roč. 56, č. 9, s. 3200–3207. Dostupné na: doi:10.1021/jf072957s
- Recupero, Michael, Cristiano Garino, Angelo De Paolis, Elisabetta Cereti, Jean-Daniel Coisson, Fabiano Travaglia, Marco Arlorio, 2012. A Method to Check and Discover Adulteration of Nebbiolo-Based Monovarietal Musts: Detection of Barbera and Dolcetto cv via SSR Analysis Coupled with Lab-On-Chip® Microcapillary Electrophoresis. *Food Analytical Methods* [online]. 2012, roč. 6, č. 3, s. 952–962. Dostupné na: doi:10.1007/s12161-012-9506-3
- Russo, Rosita, Valeria Severino, Alberto Mendez, Josep Lliberia, Augusto Parente, Angela Chambery, 2012. Detection of buffalo mozzarella adulteration by an ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry methodology. *Journal of Mass Spectrometry* [online]. 2012, roč. 47, č. 11, s. 1407–1414. Dostupné na: doi:10.1002/jms.3064
- Sádecká, Jana, Jana Tóthová, Pavel Májek, 2009. Classification of brandies and wine distillates using front face fluorescence spectroscopy. *Food Chemistry* [online]. 2009, roč. 117, č. 3, s. 491–498. Dostupné na: doi:10.1016/j.foodchem.2009.04.053
- Scarano, Daria, Rosa Rao, Paolo Masi, Giandomenico Corrado, 2015. SSR fingerprint reveals mislabeling in commercial processed tomato products. *Food Control* [online]. 2015, roč. 51, s. 397–401. Dostupné na: doi:10.1016/j.foodcont.2014.12.006
- Sen, I., F. Tokatli, 2013. Characterization and Classification of Turkish Wines Based on Elemental Composition. *American Journal of Enology and Viticulture* [online]. 2013, roč. 65, č. 1, s. 134–142. Dostupné na: doi:10.5344/ajev.2013.13081
- Tuberoso, Carlo Ignazio Giovanni, Francesca Congiu, Gabriele Serreli, Stefano Mameli, 2015. Determination of dansylated amino acids and biogenic amines in Cannonau and Vermentino wines by HPLC-FLD. *Food Chemistry* [online]. 2015, roč. 175, s. 29–35. Dostupné na: doi:10.1016/j.foodchem.2014.11.120

Wen, Jing, Ling Zeng, Yulin Sun, Daohai Chen, Youhou Xu, Peng Luo, Zhe Zhao, Zonghe Yu, Sigang Fan, 2015. Authentication and traceability of fish maw products from the market using DNA sequencing. *Food Control* [online]. 2015, roč. 55, s. 185–189. Dostupné na: doi:10.1016/j.foodcont.2015.02.033
WORLD INTELLECTUAL PROPERTY ORGANIZATION. 1983. Switzerland, Geneva. http://www.wipo.int/treaties/en/ip/paris/summary_paris.html

PodĎakovanie: „Táto práca bola podporená Agentúrou na podporu výskumu a vývoja na základe Zmluvy č. APVV-19-0180“.

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

FALŠOVANIE MLIEKA A METÓDY DETEKCIE MILK COUNTERFEITING AND DETECTION METHODS

Jozef Čurlej, Peter Zajác, Jozef Čapla, Jozef Golian, Silvia Jakabová

Abstrakt: Falšovanie potravín je z celosvetového hľadiska v centre pozornosti kontrolných inštitúcií, rozvojové krajiny sú v tomto smere identifikované ako krajiny s vyšším rizikom týchto praktík, najmä kvôli nedostatku monitorovania a slabým postihom voči falšovateľom. Falšované mlieko môžu spôsobiť vážne zdravotné riziká či smrteľné ochorenia. Tento príspevok prináša prehľad najčastejších spôsobov falšovania mlieka a rôznych metód identifikácie týchto praktík, cestou kvalitatívnych aj kvantitatívnych analýz. Okrem bežných metód neustále pokračuje vývoj nových detekčných techník. V súčasnosti falšovanie, mlieka prebieha sofistikovanejšími spôsobmi, čo si vyžaduje špičkový výskum v oblasti vývoja metód pre identifikáciu falšovania.

Kľúčové slová: spracovanie mlieka, falšovanie, bezpečnosť výrobkov, mliečne výrobky, ELISA

ÚVOD

Falšovanie mlieka a mliečnych výrobkov sa dostalo do centra pozornosti v dnešnej dobe po prelomení kauzy v roku 2008 ohľadom kontaminácie mlieka melamínom v súvislosti s mliečnymi výrobkami pochádzajúcimi z Číny, určenými pre deti (Xin a Stone, 2008). História falšovania mlieka je však pomerne starou témou. Škandál s falšovaním mlieka bol reportovaný už v roku 1850, v tejto súvislosti došlo k úmrtiu vyše 8000 detí len v samotnom New Yorku (kauza známa pod titulkou: Ako otrávime svoje deti 1858). Mlieko sa považuje za „ideálnu potravinu“ pre dostatok výživných látok potrebných pre deti i dospelých. Je jedným z najlepších zdrojov bielkovín, tukov, sacharidov, vitamínov a minerálnych látok. Nanešťastie, mlieko je pomerne ľahko falšovateľné v celosvetovom meradle. Možnými dôvodmi týchto praktík sú dopyt a výpadok v dodávkach, charakter mlieka ako suroviny podliehajúcej rýchlejšej skaze, nízka kúpyschopnosť zákazníka a nedostatok vhodných detekčných testov (Kamthania et al. 2014). Motiváciou potravinových podvodov je najmä ekonomický zisk, avšak často s dopadom na oblasť zdravia spotrebiteľa (Ellis et al., 2012; Singh a Gándhí, 2015). Situácia je výrazne horšia v rozvojových a zaostalých krajinách, najmä v dôsledku absencie primeraného monitorovania a slabej vymožitelnosti práva. Detekciu cudzorodých (falšujúcich) zložiek v mlieku je možné pomerne ľahko uskutočniť rôznymi kvalitatívnymi analytickými skúškami, a v prípade nutnosti stanovenia množstva prítomnej kontaminujúcej zložky sa uplatňujú kvantitatívne skúšky. Zvolený typ kvantitatívnych detekčných metód závisí od charakteru falšujúcich zložiek v mlieku. Napríklad kvapalinová chromatografia a ELISA test sú najbežnejšie metódy používané na detekciu cudzieho proteínu; PCR a elektroforéza (polyakrylamidová gélová elektroforéza) sa zvyčajne používajú na detekciu pôvodu mlieka v zmysle identifikácie zastúpenia mlieka od iných druhov zvierat ako je deklarované. Metódy pre identifikáciu falšovania mlieka musia byť presné a rýchle, aby efektívne odhalili tieto nekalé praktiky (Garcia et al., 2012).

Zložky využívané v procese falšovania mlieka:

Sušené mlieko je druhou najčastejšou potravinou v súvislosti s rizikom falšovania, hneď po olivovom oleji (Moore et al. 2012). Medzi zložky, ktoré sa pridávajú za účelom falšovania v mlieku patria najmä rastlinné bielkoviny, mlieko od iných druhov zvierat ako je deklarované výrobcom, pridanie srvátky a vody, zložky pridávané za účelom ekonomického zisku na úkor záujmov spotrebiteľa (Fischer et al., 2011). Menované spôsoby falšovania nemusia predstavovať zdravotné riziko ak tieto pridané zložky sú bezpečné avšak, nedeklarovanie prídavku zložky vedie k strate výsledovateľnosti jednotlivých zložiek a ku klamaniu zákazníkov a konečných spotrebiteľov. Niektoré zložky používané za účelom falšovania sú škodlivé pre ľudské zdravie a je potrebné im venovať náležitú pozornosť. Zložky s ktorými sa falšuje surové mlieko sú napríklad močovina, formalín, detergenty, síran amónny, kyselina boritá, sodný výluh, kyselina benzoová, kyselina salicylová, peroxid vodíka, cukry a melamín. Bežné parametre, ktoré sa sledujú pri hodnotení kvality mlieka sú: obsah tuku, obsah sušiny, obsah bielkovín a teplota tuhnutia mlieka. Zložky falšovania sa pridávajú do mlieka za účelom zlepšenia menovaných parametrov, pre nadobudnutie dojmu vyššej kvality mlieka. Napríklad trstinový cukor, škrob, síranové soli, močovina a bežná kuchynská soľ sa pridávajú za účelom zvýšenia zastúpenosti sušiny v mlieku. Na zvýšenie zastúpenia dusíka sa do mlieka pridáva komerčná močovina (Sharma et al., 2012). Melamín sa pridáva za účelom zvýšenia zastúpenia bielkovín (Liu et al., 2012). Síran amónny sa pridáva za účelom zachovania hustoty u zriedeného mlieka, pri použití mliečneho hustomeru pri meraní tejto veličiny. Formalín, kyselina salicylová, kyselina benzoová a peroxid vodíka pôsobia ako konzervačné látky, za účelom predĺženia trvanlivosti mlieka (Singh a Gandhi, 2015). Keďže mliečny tuk je pomerne drahá zložka, niektorí výrobcovia mlieka a mliečných výrobkov odstraňujú mliečny tuk z mlieka odstreďovaním a následne ho v mlieku nahrádzajú prídavkom rastlinného oleja čím zvyšujú svoj ekonomický zisk. Detergenty sú pridávané za účelom emulgácie a rozpustenia pridaného rastlinného oleja v mlieku (Singuluri a Sukumaran, 2014). Niektoré cudzorodé látky ako melamín sa môžu kumulovať v organizme a ich účinok sa môže prejaviť až po určitom čase. Prídavok melamínu môže viesť k zlyhaniu obličiek prípadne až k smrti u malých detí (Domingo et al., 2014). Peroxidy a detergenty v mlieku môžu spôsobiť gastrointestinálne komplikácie, ktoré môžu viesť ku gastritíde a zápalu čriev. Nadmerný obsah škrobu v mlieku môže vyvolať hnačku v dôsledku účinku nestráveného škrobu v hrubom čreve. Nedeklarovaná prítomnosť škrobu môže negatívne vplyvať na ľudí s diagnózou diabetes (Singuluri a Sukumaran, 2014). Močovina v mlieku nadmerne zaťažuje obličky (Kandpal et al., 2012). Ďalej uhličitaný a bikarbonáty môžu spôsobiť narušenie hormonálnej sústavy, regulujúcej vývoj a reprodukciu (Príručka metód pre analýzu potravín: Mlieko a mliečne produkty 2005).

Kvantitatívne detekčné metódy:

Falšovanie mlieka cudzími bielkovinami: bielkoviny sóje, ryže a mandlí sú zámerne spracované na produkty imitujúce mliečne výrobky a predávané ako mliečne doplnky pre spotrebiteľov s intoleranciou laktózy (Kolar et al., 1979). Sójové, pšeničné a mandľové bielkoviny sú považované za alergény (Označovanie potravinových alergénov a ochrana spotrebiteľa) od roku 2004 (Scholl et al., 2014), ďalej proteíny hrachu, ryže, vľčieho bôbu a kukurice boli klinicky označené ako alergény na základe klinických štúdií (Sanchez - Monge et al., 2004; Satoh a Nakamura 2011; Saz a Marina, 2007). Skutočnosť, že výrobné náklady na sójové mlieko sú o 70 % nižšie ako pri bežnom mlieku a sójové proteíny sú oveľa lacnejšie ako mliečne bielkoviny, vedie k tomu, že ich výrobcovia potravín môžu použiť pre účely falšovania (May et al., 1982); Dawson et al., 1988). Detekčné techniky zamerané na identifikáciu prítomnosti sójového mlieka zahŕňajú napríklad polarimetrickú metódu, izoelektrickú fokusáciu, SDS-PAGE, HPLC a imunodifúziu metódu (Sharma et al., 2012). NIR (blízka infračervená) spektroskopia sa používa na zisťovanie falšovania sušeného mlieka

rastlinnou bielkoviny (Maraboli et al., 2002). V minulosti bolo identifikované aj falšovanie sušeného mlieka proteínmi sóje, hrachu a pšenice. Za účelom identifikácie uvedených zložiek je možné použiť ELISA metódu s polyklonálnymi protilátkami (Sanchez et al., 2002). Existuje niekoľko komerčných ELISA kitov, ktoré je možné pre tento účel použiť. Odstredené sušené mlieko falšované sójou, hrachom, hnedou ryžou a hydrolyzovaným pšeničným proteínom bolo identifikované pomocou UHPLC (ultra HPLC) (Jablonski et al., 2014). Techniky založené na hmotnostnej spektroskopii pre identifikáciu jednotlivých frakcií mliečnych bielkovín boli aplikované v šúdii Siciliano et al. (2000). Selektivita tlmivého roztoku tetraboritan-EDTA na extrakciu rastlinných bielkovín z mlieka sa využila pri vývoji rýchleho turbidimetrického detekčného systému pre detekciu nerozpustného rastlinného proteínu (Scholl et al., 2014).

Kvalitatívne detekčné metódy:

Pre účely detekcie prítomnosti falšujúcich zložiek v mlieku je možné použiť jednoduché chemické analýzy zakladajúce sa na reakcii činidla s kontaminujúcou látkou s následnou zmenou farby. Môžu sa vykonávať v ktoromkoľvek laboratóriu. Hlavnou nevýhodou týchto techník je skutočnosť, že sú platné len pre obmedzený rozsah koncentrácií a nie sú dostatočne presné. Aj napriek tomu, kvalitatívne detekcie sú výhodné, pretože sú jednoduché, rýchle a ľahko realizovateľné. Niektoré požívateľné zlúčeniny sa často používajú ako prísady na zlepšenie chuti mlieka. Ich prítomnosť v mlieku sa dá odhaliť rýchlo (tabuľka 1). Existujú však aj niektoré nebezpečné chemikálie pridávané do mlieka na zlepšenie vzhľadu a predĺženie trvanosti. Niektoré z nich sú veľmi nebezpečné a môžu viesť k nebezpečným ochoreniam s následkom smrti. Tabuľka 2 prezentuje techniky pre rýchlu a jednoduchú detekciu nebezpečných chemikálií v mlieku. Chemické látky ako sú detergenty, mydlo, prípadne farbivá sa niekedy pridávajú do mlieka pre zlepšenie vzhľadu. Kvalitatívna analýza niektorých z týchto bežných zložiek falšovania v mlieku je predmetom diskusie v Tabuľke 3. Pre účely detekcie falšovania ovčieho mlieka prídavkom iných druhov mliek je možné stanoviť prítomnosť cudzej DNA pomocou metódy taqman Real-Time PCR (Šnirc et al., 2017). Falšovanie kozieho mlieka inými druhmi mliek je možné odhaliť pomocou komerčnej qPCR analýzy (Fekete et al., 2017).

Falšovanie mlieka melamínom:

Nakoľko melamín nie je povolenou prísadou, ani prirodzenou zložkou vyskytujúcou sa v potravinách, limit v jeho súvislosti nebol stanovený legislatívou v oblasti potravinárskej produkcie až po prípad kontaminácie melamínom v Číne v roku 2008. Európska komisia aj Úrad pre potraviny a liečivá v USA (USFDA) definovali maximálny prijateľný limit 2,5 mg / kg pre melamín v dovážaných potravinách a 1 mg / kg pre detskú výživu (Lawley, 2013). Tento limit bol prijatý v medzinárodnom meradle komisiou pre Codex Alimentarius, prostredníctvom nových pravidiel v roku 2010 (Domingo et al., 2014; FAO, 2010; B. Liu et al., 2010). Melamín sa môže použiť za účelom falšovania sušeného mlieka ako aj mnohých iných potravín a krmív (Ingelfinger, 2008; Lin et al., 2008). Hoci melamín nie je karcinogénny, v extrémnych prípadoch spôsobuje zlyhanie obličiek a úmrtie detí (Cheng et al., 2010) Kvantitatívna detekcia melamínu sa stala reálnou aplikáciou SERS metódy (metóda povrchovo zosilnenej Ramanovej spektroskopie) (Zhanget al., 2010). Prenosný senzor založený na metóde SERS bol vyvinutý pre okamžitú detekciu melamínu (Kim et al., 2012). SB-ATR FTIR (Jednoskoková metóda úplného odrazu - Infračervená spektroskopia s Fourierovou transformáciou) sa použila na kvantifikáciu melamínu v mlieku a sušenom mlieku (Jawaid et al., 2013). Rôzne typy hmotnostnej spektroskopie boli využité pri detekcii melamínu v mliečnych výrobkoch, vrátane LC-MS / MS, APCIMS (Chemická ionizácia za atmosférického tlaku – Hmotnostná spektroskopia) a EESI-MS (Extrakčná elektrosprejová ionizačná hmotnostná spektrometria) (Yang et al., 2009; Zhu et al., 2009). Na detekciu melamínu v mlieku a v produktoch detskej výživy sa často používa LC-MS / MS (Chang a Arora, 2008; Guelph, 2008; Smoker a

Krynitsky, 2008; Sherri et al., 2008). HPLC je ďalšou možnosťou pre kvantifikáciu melamínu v mlieku a mliečnych výrobkoch (Gopalakrishnan Venkatasami a Sowa, 2010; Ruicheng et al., 2009). Pomocou Ramanovho pásu pri vlnovej dĺžke 676 cm⁻¹ je možné okamžite detegovať prítomnosť melamínu v sušenom mlieku bez potreby jeho extrakcie z mlieka (Okazaki et al., 2009). Prenosný skriningový systém založený na laserovej Ramanovej spektroskopii bol vyvinutý za účelom kvantifikácie melamínu (Cheng et al., 2010). Nanočastice zlata boli navrhnuté tak, že ich povrch je vrúbľovaný s melamínom a derivátom kyseliny kyanurovej. Pri tvorbe väzby s melamínom tieto nanočastice okamžite menia farbu z červenej na modrú, táto metóda sa dá použiť ako metóda pre detekciu melamínu na mieste (Ai et al., 2009). Použitie oxidovanej polykryštalickej zlatej elektródy bolo využité pri detekcii melamínu, spolu s konvenčnou metódou, ako je GC-MS (Tsai et al., 2010; Veyrand et al., 2009). Nedávny vývoj v oblasti detekcie melamínu opisujú vo svojej štúdiu Liu et al. (2012).

Falšovanie mlieka pridávaním mlieka od iných druhov hospodárskych zvierat, ako je deklarované:

Miešanie mlieka z rôznych zdrojov a od rôznych druhov hospodárskych zvierat je najjednoduchším spôsobom falšovania tejto suroviny, ich kvantitatívna detekcia je pomerne komplexným procesom najmä z dôvodu genetickému a negenetickému polymorfizmu (Recio et al., 1997). Určenie geografického pôvodu mlieka je možné vďaka metóde ICP-OES (atómová emisná spektrometria s indukčne viazanou plazmou). Súčasne s hmotnostnou spektrometriou na stanovenie izotopového pomeru (IRMS), táto metóda určuje obsah minerálov (anorganické kovy a nekovy) v potravinách a identifikuje geografické rozdiely pomocou chemometrických techník založených na viacrozmerných štatistických metódach (Bakircioglu et al., 2011; Brescia et al., 2003). Falšovanie kozieho mlieka kravským bolo kvantifikované pomocou HPLC/ESIMS (vysokoúčinná kvapalinová chromatografia / elektrosprejová ionizačná hmotnostná spektroskopia) (Chen et al., 2004). Táto metóda identifikuje jednotlivé zložky mlieka na základe ich molekulových hmotností, čo umožňuje stanoviť nielen prítomnosť ale aj množstvo pridaných bielkovín iných živočíšnych druhov ale aj proteínov rastlinného pôvodu. Detekcia pridaneho kravského mlieka do kozieho a ovčieho mlieka je opísaná vo viacerých štúdiách (Abrantes et al., 2014; Romero et al., 1996; Song et al., 2011). Nakoľko syry označené CHOP (chránené označenie pôvodu) predstavujú produkty vysokej hodnoty podľa legislatívnych požiadaviek a podmienok pre označovanie, boli vyvinuté rôzne analytické metódy pre stanovenie pravosti takto označených výrobkov. Proces kvantifikácie a detekcie podielu jednotlivých zložiek vo výrobkoch vyrobených zo zmesi kravského, ovčieho a kozieho mlieka je možný pomocou RP-HPLC (HPLC s reverznou fázou) (Ferreira a Cacote, 2003; Guerreiro et al., 2013), metóda tavenia s vysokým rozlíšením (HRM) využívajúca špecifické mitochondriálne priméry (Ganopoulos et al., 2013) a mikroextrakčná hmotnostná spektrometria na pevnej fáze (SPME-MS) založená na profile prchavosti látok (Majcher et al., 2015). Na detekciu falšovania kozieho, ovčieho a byvolieho mlieka kravským mliekom bola použitá nepriama kompetitívna ELISA metóda, v štúdiu Hurley et al. (2004). Falšovanie kozieho mlieka kravským lieko bolo detekované aj pomocou metódy PCR (Bania et al., 2001). Okrem toho sa PCR metóda využila pri detekcii prítomnosti kravského mlieka v ovčom mlieku (López-Calleja et al., 2004), kozom syre (Maudet a Taberlet, 2001) a byvolom mozzarella syre (Bottero et al., 2002). Elektronický jazyk, ktorý je schopný rozpoznať 5 základných chutí sa používa na detekciu falšovania kravského kozieho mlieka kravským mliekom (Dias et al., 2009). Je alternatívnou metódou ku klasickým analytickým metódam. Na analýzu jednotlivých skupín proteínov bola použitá PAGE metóda (Strange et al., 1992). Pridanie kravského mlieka do ovčieho jogurtu (Kaminarides a Koukiassa, 2002) a do kozieho mlieka (Tamime et al., 1999) bolo kvantifikované pomocou rovnakej PAGE metódy. Použitie IEF (Izoelektrická fokusácia) na miesto PAGE metódy sa javí ako výhodnejšie v uvedených

prípadoch (Borková a Snášelová, 2005). Metóda zisťovania prítomnosti kravského mlieka a kazeinátu v syroch vyrobených z ovčieho mlieka, kozieho mlieka alebo byvolieho mlieka, alebo zo zmesi kozieho, ovčieho a byvolieho mlieka sa vykonáva pomocou izoelektrickej fokusácie gama kazeínov (VYKONÁVACIE NARIADENIE KOMISIE (EÚ) 2018/150). Kombinácia imunochemických metód a DNA metódy (PCR-LCR-EIA – Polymerázová reťazová reakcia, Ligázová reťazová reakcia, Enzymatická imunoanalýza) bola použitá na detekciu špecifického nukleotidu prítomného v kravskom mlieku pre odhalenie falšovania ovčieho, kozieho a byvolieho mlieka (Klotz a Einspanier, 2001). Na separáciu a stanovenie odlišných kazeínov v kravskom, ovčom a kozom mlieku sa používa hydrofóbná interaktívna chromatografia (Bramanti et al., 2003).

Falšovanie mlieka močovinou:

Močovina, ktorá je prirodzenou zložkou mlieka, predstavuje hlavnú časť nebielkovinových dusíkatých látok v mlieku. Mlieko sa falšuje prídavkom močoviny za účelom zvýšenia celkového obsahu bielkovín. Množstvo močoviny v mlieku je možné stanoviť aj pomocou FTIR prístrojov. Pre účely stanovenia množstva močoviny je ďalej možné použiť Ramanovu spektroskopiu v blízkej infračervenej oblasti a to bez nutnosti predprípravy vzorky (Khan et al., 2014). Kvapalinová chromatografia (LC) sa využila pre kvantifikáciu močoviny ako falšujúcej zložky v mlieku (Dai et al., 2013). Metóda založená na GC / IDMS (Plynová chromatografia / izotopová riediaca hmotnostná spektrometria) sa použila na kvantifikáciu močoviny prítomnej v mlieku (Dai et al., 2010). HPLC metóda sa využila pre detekciu zastúpenia močoviny prirodzene prítomnej v mlieku, s možnosťou premeny močoviny na derivát obsahujúci chromafór pred HPLC analýzou (Czauderna a Kowalczyk, 2009). Kombinácia referenčnej Kjeldahlovej metódy určenej na stanovenie celkového obsahu dusíka a spektrofotometrie bola navrhnutá pre detekciu falšovania mlieka melamínom, močovinou a síranom amónnym (de Lourdes et al., 2013). Šesť odlišných metód pre detekciu močoviny s ich výhodami a nevýhodami je opísaných v práci Banupriya et al. (2014). Amoniak absorbuje infračervené svetlo pri charakteristickej vlnovej dĺžke 1530 nm, preto je možné na detekciu amoniaku využiť optické sensory (Bamiedakis et al., 2013). Pre účely detekcie amoniaku je možné aplikovať aj sensory vzduchu (Inaba et al., 2013). Pizoelektrický snímač na princípe enzýmu bol vyvinutý pre detekciu močoviny v mlieku, kde bolo zistené lineárne správanie medzi ekvivalentným elektrickým signálom a množstvom plynného amoniaku (Renny et al., 2014). EISCAP (Elektrolyt izolátor semikonduktor kondenzátor), potenciometrický biosenzor založený na enzymatickej reakcii bol vyvinutý pre detekciu močoviny (Indranil Basu et al., 2004). Niektoré ďalšie biosenzory fungujúce na rôznych princípoch ako manometria, enzým, potenciometria boli taktiež vyvinuté na detekciu močoviny v mlieku (Renny et al., 2014; Mishra et al., 2010; Jenkins a Delwiche 2002; Trivedi et al., 2009).

Falšovanie mlieka inými zlúčeninami:

NIR (infračervená spektrometria v blízkej oblasti) (1100-2500 nm) bola použitá pri kvantifikácii prídavku vody a srvátky do kravského mlieka (Kasemsumran et al., 2007). Pri experimentálnej komparatívnej štúdii NIR a MIR spektrometrie (infračervená spektrometria v strednej oblasti) Santos et al. (2013a) vyvinuli prenosný spektrometer so záverom že MIR fungoval rovnako dobre ako NIR a je možné ho uplatniť pri detekcii falšujúcich zložiek ako je voda, srvátka, peroxid vodíka, syntetická močovina a močovina. Rovnako ako močovina, aj syntetická močovina sa používa za účelom zvýšenia obsahu dusíka v mlieku. V prípadovej štúdii uskutočnenej v Brazílii, bola močovina identifikovaná vo všetkých vzorkách UHT mlieka cestou chemometrickej analýzy (Souza et al., 2011). Prítomnosť syntetickej močoviny po koncentrácii 0,78 mg.l⁻¹ je možné v mlieku identifikovať metódou pracujúcou na princípe infračervenej mikrospektroskopie a chemometrickej analýzy (Santos et al., 2013b). Podobný

prístup bol využitý pri vývoji ručného infračerveného spektrometra pre analýzu mlieka (Santos et al., 2013b). Prítomnosť močoviny bola zistená pozorovaním zmeny koncentrácie sodíka a vápnika vo vzorkách podrobených plameňovej atómovej absorpčnej spektroskopie (Santos et al., 2012). MALDI-QTOF MS (Hmotnostná spektrometria s laserovou desorpciou a ionizáciou za prítomnosti matrice s prietokovým analyzátorom) bola použitá na kvantifikáciu rastlinného oleja v mlieku (Garcia et al., 2012). Ďalej, bolo umožnené identifikovať viacero falšujúcich zložiek vrátane síranu amónneho, dikyándiamidu, melamínu a močoviny v sušenom mlieku metódou Ramanovho chemického zobrazovania (Qin et al., 2013). Falšovanie mliečnych tukov je tiež častým problémom, z tohto dôvodu bolo vyvinutých niekoľko techník odhaľujúcich falšovanie na princípe Butyrovho Refraktometra (Arora et al., 1996), fluorescenčnej spektroskopie (Ntakatsane et al., 2013), derivačnej spektroskopie (Jirankalgikar a De, 2014) a Ramanovej spektroskopie (Uysal et al., 2013). Pre účely odhaľovania falšovania masla prídavkom cudzieho tuku sa aplikuje referenčná metóda stanovenia čistoty mliečneho tuku plynovou chromatografickou analýzou triglyceridov (Nariadenie Komisie ES č. 273/2008). Podľa tohto nariadenia sa čistota mliečneho tuku určuje pomocou rovníc definovaných triglyceridov. V zásade sa táto metóda všeobecne používa pri kravskom mlieku alebo z neho vyrobených výrobkov bez ohľadu na kŕmne, chovné alebo laktačné podmienky. Len výnimočne môže kŕmenie čistými rastlinnými olejmi ako napríklad repkovým olejom mať za následok nesprávne pozitívny výsledok. K nesprávne pozitívnemu výsledku sa môže dospieť aj v prípade mliečnych výrobkov získaných od jednotlivých kráv. Metóda sa aplikuje predovšetkým na tuk extrahovaný z mliečnych výrobkov údajne obsahujúcich čistý mliečny tuk s nezmeneným zložením, ako je maslo, smotana, mlieko a sušené mlieko. Technologické ošetrenie mliečneho tuku ako napríklad odstránenie cholesterolu alebo frakčná destilácia môže spôsobiť nesprávne pozitívny výsledok. To platí aj pre mliečny tuk získaný z odstredeného mlieka alebo cmaru. Metóda sa nedá vždy použiť na tuk extrahovaný zo syra, lebo proces zrenia môže ovplyvniť zloženie tuku natoľko, že výsledok je nesprávne pozitívny. Podľa Suhaja a Kováča (2001), je možné autentifikáciu jedlých tukov a olejov vykonať na základe zloženia mastných kyselín jedine v prípade jednoduchého prídania maximálne jedného typu tuku alebo oleja do druhého. Kontrolou profilu triacylglycerolov možno identifikovať nefalšovanosť mliečneho tuku.

Tabuľka 1 Metódy rýchlej kvalitatívnej analýzy požívateľných falšujúcich zložiek v mlieku

<i>Falšujúca zložka</i>	<i>Postup</i>	<i>Pozorovanie</i>	<i>Detekčný limit (v/v)</i> (Sharma, et al. 2012)	<i>Literatúra</i>
Cukor	Pridajte 5 ml vzorky mlieka do skúmavky, k nemu pridajte 1 ml koncentrovanej HCl a 0,1 g resolcinového činidla. Umiestni skúmavku so vzorkou do vodného kúpeľa na 5 minút.	Prítomnosť červeného sfarbenia indikuje prítomnosť pridaného cukru	0,2 % (w/v)	(Sharma et al., 2012); (Kamthania et al., 2014); (Arvind Singh et al., 2012)
Škrob	Pridajte 3ml vzorky mlieka do skúmavky. Po prevarení vzorky, ochlaďte ju na izbovú teplotu. Pridajte jednu kvapku 1% jódu.	Prítomnosť modrého sfarbenia indikuje prítomnosť škrobu.	0,02 % (w/v)	Sharma et al., 2012); (Arvind Singh et al., 2012); (Kumar et al., 1998)
Glukóza	Pridajte 1ml mlieka do skúmavky. Ku vzorke pridajte 1 ml modifikovaného Barfoedovho činidla. Ohrej vzorku presne 3 minúty vo vodnom roztoku pri bode varu. Následne rýchle schlaďte vzorku pod tečúcou vodou. Pridajte 1 ml činidla kyseliny fosfomolybdénovej k zakalenému roztoku.	Prítomnosť okamžitého tmavo-modrého sfarbenia indikuje prítomnosť glukózy.	0,1 % (w/v)	(Sharma et al., 2011)
Sol'	Pridajte 5 ml vzorky mlieka do skúmavky. K vzorke pridajte 1 ml 0,1 N roztoku dusičnanu strieborného. Dobre premiešajte vzorku a následne pridajte 0,5 ml 10 % roztoku chromanu draselného.	Prítomnosť žltého sfarbenia indikuje prítomnosť pridanej soli, kým tehlovo-červené sfarbenie indikuje mlieko bez prídavku soli	0,02 % (w/v)	(Sharma et al., 2012)

Tabuľka 2a Rýchla kvalitatívna analýza rôznych nebezpečných látok v mlieku

<i>Falšujúca zložka</i>	<i>Postup</i>	<i>Pozorovanie</i>	<i>Detekčný limit (v/v) (Sharma et al., 2012)</i>	<i>Literatúra</i>
Peroxid vodíka	A) Pridajte 5ml podozrivej vzorky mlieka do testovacej skúmavky, pridajte rovnaký objem čistého mlieka a k tejto zmesi 5 kvapiek 2 % roztoku paraformylendiamínu.	Prítomnosť modrého sfarbenia indikuje prítomný peroxide vodíka.	0,025 %	(Arvind Singh et al., 2012); (Kamthania et al., 2014); (Sharma et al., 2012)
	B) Pridajte 10 ml vzorky mlieka do skúmavky, ku vzorke aplikujte 1ml jodid draselný – škrobové reakčné činidlo a dobre zamiešajte.	Prítomnosť modrého sfarbenia indikuje prítomný peroxide vodíka.	0,004 %	(Sharma et al., 2012)
Formalín	A) Pridajte 10 ml vzorky mlieka do skúmavky. Ku vzorke aplikujte 5 ml koncentrovanej kyseliny sírovej s malým množstvom chloridu železitého bez trasenia.	Prítomnosť fialového prípadne modrého sfarbenia na spojenci dvoch vrstiev tekutín indikuje prítomnosť formalínu.	-	(Arvind Singh et al., 2012); (Kamthania et al., 2014)
	B) Pridajte 5 ml vzorky mlieka do skúmavky. Pridajte 1 ml 10 % roztoku chloridu železitého do 500 ml fľaše a dopln'te objem koncentrovanou kyselinou chlorovodíkovou. Z tohto roztoku vezmite 5 ml a pridajte ich ku vzorke mlieka. Umiestnite vzorku mlieka do vodného kúpeľa pri bode varu počas 3-4 minút.	Prítomnosť hnedo-ružového sfarbenia indikuje prítomnosť formalínu.	0,1 %	(Sharma et al., 2012)
	C) Pridajte 1 ml vzorky mlieka do skúmavky. Vezmite nasýtený roztok kyseliny 1,8- dihydroxynafthalén-3,6- disulfónovej v približne 72 % kyseline sírovej pre prípravu roztoku kyseliny chromotropovej. Pridajte 1 ml roztoku kyseliny chromotropovej ku vzorke mlieka.	Prítomnosť hnedo-ružového sfarbenia indikuje prítomnosť formalínu.	0,05 %	(Sharma et al., 2012)
Síran amónny	A) Pridajte 2 ml vzorky mlieka do skúmavky ku ktorej aplikujte 0,5 ml 2 % NaOH, 0,5 ml 2 % chlomanu sodného a 0,5 ml 5 % fenolu. Zmes ohrejte vo vodnom roztoku pri bode varu približne 20 sekúnd.	Namodralé sfarbenie sa ihneď objavuje, postupne sa mení na tmavomodré. Nekontaminované mlieko vykazuje lososovo-ružové sfarbenie, ktoré sa postupne mení na namodralé po dvoch hodinách.	-	(Kumar et al., 2002)
	B) Pridajte 10 ml vzorky mlieka do 50 ml uzatvárateľnej skúmavky. Pridajte 10 ml TCA roztoku. Prefiltrujte vyzrážané mlieko cez Whatmanov filtračný papier stupňa 42. Vezmite 5 ml čistého filtrátu a pridajte niekoľko kvapiek roztoku chloridu bárnateho.	Formovanie mliečno-bielej zrazeniny indikuje prítomnosť síranov, ako sú: síran amónny, síran sodný, síran zinočnatý, síran horečnatý, atď.	0.05 % (w/v)	(Sharma et al., 2012)
Močovina	A) Pridajte 5 ml vzorky mlieka do skúmavky. K vzorke následne pridajte rovnaké množstvo 24 % TCA za účelom vyzrážania tuku a bielkovín mlieka. Vezmite 1ml filtrátu a pridajte 0,5 ml 2 % chlomanu sodného, 0,5 ml 2 % hydroxidu sodného a 0,5 ml 5 % fenolu, následne premiešajte.	Charakteristické modré prípadne modro-zelené sfarbenie vzniká v prítomnosti pridanej močoviny, kým čisté mlieko ostáva bez sfarbenia.	-	(Meisel, 1995)

Tabuľka 2b Rýchla kvalitatívna analýza rôznych nebezpečných látok v mlieku

<i>Falšujúca zložka</i>	<i>Postup</i>	<i>Pozorovanie</i>	<i>Detekčný limit (v/v)</i> (Sharma et al., 2012)	<i>Literatúra</i>
Močovina	B) Pridajte 5 ml vzorky mlieka do skúmavky, ku ktorej aplikujte 0,2 ml ureázy (20 mg.ml⁻¹). Dobre premiešajte pri izbovej teplote a následne pridajte 0,1 ml 0,5% roztoku Bromotymolovej modrej (BTB). C) Pridajte 5 ml vzorky mlieka do skúmavky, ku ktorej aplikujte 5 ml činidla p-dimetylamínbenzaldehyd.	Objavenie sa modrého sfarbenia po 10-15 minútach indikuje prítomnosť močoviny v mlieku. Čisté mlieko vykazuje slabo modré sfarbenie v dôsledku prirodzeného zastúpenia močoviny v mlieku. Prítomnosť výrazne žltého sfarbenia indikuje prítomnosť pridanej močoviny, kým slabo žlté sfarbenie indikuje prirodzenú močovinu v mlieku	- 0,2 % (w/v)	(Sharma et al., 1993); (Arvind Singh et al., 2012), (Sharma et al., 1993); (Arvind Singh et al., 2012); (Bector et al., 1998); (Kavita, 2000)
Dusičnan	Pridajte 10 ml vzorky mlieka do kadičky. K vzorke aplikujte 10 ml roztoku chloridu ortuťnatého, po premiešaní prefiltrujte zmes cez whatmanov filtračný papier stupňa 42. Vezmite 1 ml filtrátu a pridajte 4 ml činidla difenyl amínsulfát alebo difenylbenzidín.	Prítomnosť modrého sfarbenia indikuje prítomnosť dusičnanu. Čisté mlieko je bez sfarbenia.	0,2 %	(Sharma et al., 2011)
Kyselina benzoová, kyselina salicyová	Pridajte 5ml vzorky mlieka do skúmavky. Na okyslenie použite koncentrovanú kyselinu sírovú, 0,5 % roztok chloridu železitého pridávajte po kvapkách. Premiešajte vzorku.	Formovanie hnede-žltého sfarbenia indikuje prítomnosť kyseliny benzoovej, fialové sfarbenie indikuje prítomnosť kyseliny salicyovej	-	(Arvind Singh et al., 2012)
Kyselina boraxová, kyselina boritá	Pridajte 5 ml vzorky mlieka do skúmavky. Ku vzorke aplikujte 1ml koncentrovanej HCl. Ponorte kurkumový papier a následne ho vysušte na hodinovom sklíčku pri teplote 100 stupňov.	V prípade, ak kurkumový papier sčervená, indikuje to prítomnosť kyseliny boraxovej prípadne kyseliny boritej.	-	(Arvind Singh et al., 2012)

Tabuľka 3 Rýchle kvalitatívne analytické metódy pre detekciu rôznych zmesných falšujúcich zložiek v mlieku

<i>Falšujúca zložka</i>	<i>Postup</i>	<i>Pozorovanie</i>	<i>Dekečný limit (v/v) (Sharma et al., 2012)</i>	<i>Literatúra</i>
Detergent	A) Pridajte 5 ml vzorky mlieka do skúmavky a aplikujte 0,1 ml 0,5 % roztoku Bromokrezol fialovej (BCP).	Prítomnosť fialového sfarbenia indikuje prítomnosť detergent. Čisté mlieko vykazuje slabo fialové sfarbenie.	- 0.0125 %	(Singhal, 1980); (Arvind Singh et al., 2012) (Rajput, Sharma, a Kaur)
	B) Pridajte 5 ml vzorky mlieka do 15 ml skúmavky. K vzorke aplikujte 1ml farbiva – roztok Metylénovej modreja 2 ml chloroformu. Obsah vortexujte približne 15 sekúnd a následne centrifugujte tri minúty pri 1100 otáčkach/minutu.	Prítomnosť relatívne intenzívneho modrého sfarbenia v spodnej vrstve indikuje prítomnosť detergent v mlieku. Prítomnosť relatívne intenzívnejšieho modrého sfarbenia v hornej vrstve indikuje čistú vzorku mlieka bez detergentu.		
Mydlo	Pridajte 10 ml vzorky mlieka do skúmavky. Aplikujte k vzorke rovnaké množstvo horúcej vody. Následne pridajte 1-2 kvapky indikátora fenolftaleínu.	Prítomnosť ružového sfarbenia indikuje prítomnosť mydla.	-	(Arvind Singh et al., 2012); (Kamthania et al., 2014); (Ghodekar 1974)
Farbivo	A) Pridajte 10 ml vzorky mlieka do testovacej skúmavky. K vzorke aplikujte 10ml dietyl éteru. Po premiešaní, nechajte vzorku odstáť.	Prítomnosť žltého sfarbenia v jemnej vrstve indikuje prítomnosť pridaného farbiva	- -	(Batis et al., 1981) (Lechner a Klostermeyer, 1981)
	B) Pripravte alkalickú vzorku mlieka pridaním hydrogenuhličitanu sodného. Do vzorky ponorte pásik filtračného papierika na dve hodiny.	Prítomnosť červeného sfarbenia filtračného papierika indikuje prítomnosť farbiva annatto (pomarančovo-červené). Ošetrenie tohto papierika chloridom cinatým vedie k ružovému sfarbeniu.	-	(de Souza et al., 2000)
	C) Pridajte pár kvapiek kyseliny chlorovodíkovej k vzorke mlieka.	Prítomnosť ružového sfarbenia indikuje použitie azo farbív.		

ZÁVER

Aj keď finančný zisk je jedným z hlavných dôvodov falšovania mlieka, nedostatočné zásobovanie pre neustále rastúcu populáciu na celom svete sa rovnako podpísalo na uplatňovaní týchto praktík. Tento problém je akútnejší v rozvojových a málo rozvinutých krajinách, z dôvodu nedostatku primeraného monitoringu a legislatívnej podpory. Existujúce bežné detekčné techniky nie sú vždy uplatniteľné a dostupné v týchto krajinách, čo sťažuje odhaľovanie rôznych spôsobov falšovania mlieka. Z uvedených dôvodov je nevyhnutné prijať spoločné úsilie od vedeckej komunity a regulačných orgánov prostredníctvom vývoja, implementácie a využívania kvalitnejších techník, odhaľujúcich fenomén falšovania mlieka. Okrem toho povedomie verejnosti a prístup k informáciám môžu v daných regiónoch hrať zásadnú úlohu pri vysporiadávaní sa s touto otázkou. Niektoré z jednoduchých metód detekcie uplatniteľných na úrovni spotrebiteľa a najmodernejších techník na úrovni odbornej verejnosti môžu pomôcť riešiť tento problém a tak predísť zdravotným rizikám, či dokonca úmrtiam, vrátane zvýšenia ochrany milióna detí v rozvojových krajinách.

LITERATÚRA

- Abrantes, M. R., A. R. M. De Oliveira, M. Cabral Rocha, G. O. De Souza, E. O. Telles, S. M. Sakamoto, J. B. A. Da Silva, 2014. Detection of bovine milk contaminants in adulterated milk and curd goat cheese. *Acta Sci Vet.* 2014, roč. 42, č. 1, s. 1213.
- Ai, K., Y. Liu, L. Lu, 2009. Hydrogen-bonding recognition-induced color change of gold nanoparticles for visual detection of melamine in raw milk and infant formula. *J Am Chem Soc.* 2009, roč. 131, č. 27, s. 9496–9497.
- Arora, K. L., D. Lal, R. Seth, J. Ram, 1996. Platform test for detection of refined mustard oil adulteration in milk. *Indian J Dairy Sci.* 1996, roč. 49, č. 10, s. 721–723.
- Arvind Singh, G. C., A. Aggarwal, P. Kumar, 2012. Adulteration Detection in Milk. *Res News For U (RNFU)* 2012, roč. 5, s. 52–55.
- Bakircioglu, D., Y. B. Kurtulus, G. Ucar, 2011. Determination of some traces metal levels in cheese samples packaged in plastic and tin containers by ICP-OES after dry, wet and microwave digestion. *Food Chem Toxicol.* 2011, roč. 49, č. 1, s. 202–207.
- Bamiedakis, N., T. Hutter, R. V. Pentty, I. H. White, S. R. Elliott, 2013. Pcb- integrated optical wave guide sensors: an ammonia gas sensor. *J Lightwave Technol.* 2013, roč. 31, č. 10, s. 1628–1635.
- Bania, J, M. Ugorski, A. Polanowski, E. Adamczyk, 2001. Application of polymerase chain reaction for detection of goats' milk adulteration by milk of cow. *J Dairy Res.* 2001, roč. 68, s. 333–336.
- Banupriya, P. C. R. S., T. V. Supriya, V. Varshitha, 2014. Comparison of different methods used for detection of urea in milk by quantification of ammonia. *Int J Adv Res Elect, Electron Instrum Eng.* 2014, roč. 3, č. 3, s. 7858–7863.
- Batis, V. K., S. K. Garg, H. Chander, B. Ranganathan, 1981. Reflectance infrared Fourier transform spectroscopy. *Indian Dairyman.* 1981, roč. 33, s. 435.
- Bector, B. S., M. Ram, O. P. Singhal, 1998. Rapid platform test for the detection/ determination of added urea in milk. *Indian Dairyman.* 1998, roč. 50, č. 4, s. 59–62.
- Borková, M., J. Snášelová, 2005. Possibilities of different animal milk detection in milk and dairy products – a review. *Czech J Food Sci.* 2005, roč. 23, č. 2, s. 41–50.
- Bottero, M. T., T. Civera, A. Anastasio, R. M. Turi, S. Rosati, 2002. Identification of cow's milk in buffalo cheese by duplex polymerase chain reaction. *J Food Prot.* 2002, roč. 65, s. 362–366.
- Bramanti, E., C. Sortino, M. Onor, F. Beni, G. Raspi, 2003. Separation and determination of denatured α s1-, α s2-, β - and κ -caseins by hydrophobic interaction chromatography in cows', ewes' and goats' milk, milk mixtures and cheeses. *J Chromatogr A.* 2003, roč. 994, s. 59–74.
- Brescia, M., V. Caldarola, G. Buccolieri, A. Dell'atti, A. Sacco, 2003. Chemometric determination of the geographical origin of cow milk using icp-oes data and isotopic ratios: a preliminary study. *Ital J Food Sci.* 2003, roč. 15, s. 3.
- Chang, E., I. Arora, 2008. Simultaneous, Fast Analysis of Melamine, Cyanuric Acid, and Related Compounds in Milk and Infant Formula by LC/MS/MS. 2008. (s. 1-4): http://www.ingenieria-analitica.com/downloads/dl/file/id/2737/product/110/simultaneous_fast_analysis_of_melamine_cyanuric_acid_and_related_compounds_in_milk_and_infant_formula_by_lc_ms_ms.pdf.
- Chen, R. K., L. W. Chang, Y. Y. Chung, M. H. Lee, Y. C. Ling, 2004. Quantification of cow milk adulteration in goat milk using high-performance liquid chromatography with electrospray ionization mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 2004, roč. 18, s. 1167–1171.

- Cheng, Y., Y. Dong, J. Wu, X. Yang, H. Bai, H. Zheng, 2010. Screening melamine adulterant in milk powder with laser Raman spectrometry. *J Food Compos Anal.* 2010, roč. 23, č. 2, s. 199–202.
- Czauderna, M., J. Kowalczyk, 2009. Easy and accurate determination of urea in milk, blood plasma, urine and selected diets of mammals by high-performance liquid chromatography with photodiode array detection preceded by precolumn derivatization. *Chemia Analityczna.* 2009, roč. 54, s. 919–937.
- Dai, X. F., Y. Zhao, M. Li, X. Fang, X. Li, H. Li, B. Xu, 2013. Determination of urea in milk by liquid chromatography-isotope dilution mass spectrometry. *Analytical Letters.* 2013, roč. 45, s. 1557–1565.
- Dai, X. F., S. Fuhai, M. Yang, H. Li, J. Zhou, R. Xu, 2010. Accurate analysis of urea in milk and milk powder by isotope dilution gas chromatography–mass spectrometry. *J Chromatogr B.* 2010, roč. 878, s. 1634–1638.
- Dawson, D. P., J. L. Morrill, P. G. Reddy, H. C. Minocha, H. A. Ramsey, 1988. Soy protein concentrate and heated soy flours as protein sources in milk replacer for preruminant calves. *J Dairy Sci.* 1988, roč. 71, s. 1301–1309.
- De Souza, E. M. T., S. F. Arruda, P. O. Brandao, E. M. Siqueira, D. Almeida, 2000. Electrophoretic analysis to detect and quantify additional whey in milk and dairy beverages. *Ciênc Tecnol Aliment.* 2000, roč. 20, č. 3, s. 314–317.
- Dias, L. A., A. M. Peres, A. C. A. Veloso, F. S. Reis, M. Vilas-boas, A. A. S. C. Machado, 2009. An electronic tongue taste evaluation: Identification of goat milk adulteration with bovine milk. *Sens Actuators B: Chem.* 2009, roč. 136, č. 1, s. 209–217.
- Domingo, E., A. A. Tirelli, C. A. Nunes, M. C. Guerreiro, S. M. Pinto, 2014. Melamine detection in milk using vibrational spectroscopy and chemometrics analysis: A review. *Food Res Int.* 2014, roč. 60, s. 131–139.
- Ellis, D. I., V. L. Brewster, W. B. Dunn, J. W. Allwood, A. P. Golovanov, R. Goodacre, 2012. Fingerprinting food: current technologies for the detection of food adulteration and contamination. *Chem Soc Rev.* 2012, roč. 41, č. 17, s. 5706–5727.
- FAO. In: Alimentarius C, editor. International experts limit melamine levels in food, vol. 2016. Geneva: Food and Agriculture Organization; 2010.
- Fekete, T., M. Šnirc, Ľ. Belej, R. Židek, J. Golian, P. Haščík, L. Zelenáková, P. Zajác, 2017. Authentication of caprine milk and cheese by commercial qPCR assay. *Potravinárstvo Slovak Journal of Food Sciences*, roč. 11, č. 1, s. 580–586. <https://doi.org/10.5219/780>
- Ferreira, I., H. Cacote, 2003. Detection and quantification of bovine, ovine and caprine milk percentages in protected denomination of origin cheeses by reversed-phase high-performance liquid chromatography of beta-lactoglobulins. *J Chromatogr A.* 2003, roč. 1015, s. 111–118.
- Fischer, W., B. Schilter, A. Tritscher, R. Stadler, 2011. Contaminants of milk and dairy products: contamination resulting from farm and dairy practices. *Encyclopedia of Dairy Sciences.* 2011, roč. 2, s. 887–897.
- Ganopoulos, I., I. Sakaridis, A. Argiriou, P. Madesis, A. Tsaftaris, 2013. A novel closed-tube method based on high resolution melting (HRM) analysis for authenticity testing and quantitative detection in Greek PDO Feta cheese. *Food Chem.* 2013, roč. 141, č. 2, s. 835–840.
- Garcia, J. S., G. B. Sanvido, S. A. Saraiva, J. J. Zacca, R. G. Cosso, M. N. Eberlin, 2012. Bovine milk powder adulteration with vegetable oils or fats revealed by MALDI-QTOF MS. *Food Chem.* 2012, roč. 131, s. 722–726.
- Ghodekar, D. R., A. J. Dudani, B. Ranganathan, 1974. Microbiological quality of Indian milk products. *J Milk Food Technol.* 1974, roč. 37, č. 3, s. 119–122.
- Guelph, U., 2008. Determination of residues of melamine and cyanuric acid in animal food by LCMS/MS. Guelph: University of Guelph, Laboratory Services Division; 2008. s. 1–31.
- Guerreiro, J. S., M. Barros, P. Fernandes, P. Pires, R. Bardsley, 2013. Principal component analysis of proteolytic profiles as markers of authenticity of PDO cheeses. *Food Chem.* 2013, roč. 136, č. 3–4, s. 1526–1532.
- How we poison our children. 1858. New York Times. New York
- Hurley, I. P., R. C. Coleman, H. E. Ireland, J. H. H. Williams, 2004. Measurement of bovine IgG by indirect competitive ELISA as a means of detecting milk adulteration. *J Dairy Sci.* 2004, roč. 87, s. 543–559.
- Inaba, A., G. Yoo, Y. Takei, K. Matsumoto, I. Shimoyama, 2013. A graphene fet gas sensor gated by ionic liquid digital object identifier. In: IEEE 26th International Conference on Micro Electro Mechanical Systems (MEMS). Taipei: IEEE; 2013. s. 969–972.
- Indranil Basu, R. V. S., A. Mathew, A. Chadha, E. Bhattacharya, 2004. Potentiometric biosensors based on silicon and porous silicon. *NSTI-Nanotech.* 2004, roč. 1, s. 224–227.
- Ingelfinger, J. R., 2008. Melamine and the global implications of food contamination. *New England J Med.* 2008, roč. 359, č. 26, s. 2745–2748.
- Jablonski, J. E., J. C. Moore, J. M. Harnly, 2014. Nontargeted detection of adulteration of skim milk powder with foreign proteins using UHPLC – UV. *J Agric Food Chem.* 2014, roč. 62, s. 5198–5206.
- Jawaid, S., F. N. Talpur, S. T. Sherazi, S. M. Nizamani, A. A. Khaskheli, 2013. Rapid detection of melamine adulteration in dairy milk by SB-ATR–Fourier transform infrared spectroscopy. *Food Chem.* 2013, roč. 141, č. 3, s. 3066–3071.
- Jenkins, D. M., M. J. Delwiche, 2002. Manometric biosensor for on-line measurement of milk urea. *Biosens Bioelectron.* 2002, roč. 17, s. 557–563.

- Jirankalgikar, N. M., S. De, 2014. Detection of tallow adulteration in cow ghee by derivative spectrophotometry. *J Nat Sci, Biol, Med.* 2014, roč. 5, č. 2, s. 317–319.
- Kaminarides, S. E., P. Koukiassa, 2002. Detection of bovine milk in ovine yoghurt by electrophoresis of para- κ -casein. *Food Chem.* 2002, roč. 78, s. 53–55.
- Kamthania, M., J. Saxena, K. Saxena, D. K. Sharma, 2014. Methods of Detection & Remedial Measures. *Int J Engg Tech Res.* 2014, roč. 1, s. 15–20.
- Kandpal, S. D., A. K. Srivastava, K. S. Negi, 2012. Estimation of quality of raw milk (open & branded) by milk adulteration testing kit. *Indian J Community Health.* 2012, roč. 24, s. 3.
- Kasemsumran, S., W. Thanapase, A. Kiatsoonthon, 2007. Feasibility of near-infrared spectroscopy to detect and to quantify adulterants in cow milk. *Analytical Sci.* 2007, roč. 23, č. 7, s. 907–910.
- Kavita, P., 2000. Studies on the levels of urea in milk. Karnal: NDRI; 2000.
- Khan, K. M., H. Krishna, S. K. Majumder, P. K. Gupta, 2014. Detection of urea adulteration in milk using near-infrared Raman spectroscopy. *Food Anal. Methods.* 2014, roč. 8, s. 93–102.
- Kim, A., S. J. Barcelo, R. S. Williams, Z. Li, 2012. Melamine sensing in milk products by using surface enhanced Raman scattering. *Anal Chem.* 2012, roč. 84, s. 21, s. 9303–9309.
- Klotz, A. R. Einspanier, 2001. Development of a DNA-based screening method to detect cow milk in ewe, goat and buffalo milk and dairy products using PCR-LCREIA-technique. *Milchwissenschaft.* 2001, roč. 56, s. 67–70.
- Kolar, C. W., I. C. Cho, W. L. Watrous, 1979. Vegetable protein application in yogurt, coffee creamers and whip toppings. *J Am Oil Chem Soc.* 1979, roč. 56, s. 389–391.
- Kumar, R., D. K. Singh, N. K. Chawla, 1998. Adulteration/contamination of milk demystified. *Indian Dairyman.* 1998, roč. 50, s. 25–33.
- Kumar, A., D. Lal, R. Seth, R. Sharma, 2002. Recent trends in detection of adulteration in milk fat a review. *Indian J Dairy Sci.* 2002, roč. 55, s. 319–330.
- Lawley, R., 1981. Nachweis einer Verfälschung von Magermilchpulver mit Molkenpulver (polarographische Methode). *Milchwissenschaft.* 1981, roč. 36, s. 267–270.
- Lawley, R., 2013. Melamine. *Food Safety Watch.* 2013, roč. 2016.
- Lechner, E., H. Klostermeyer, 1981. Nachweis einer Verfälschung von Magermilchpulver mit Molkenpulver (Polarographische Methode). *Milchwissenschaft.* 1981, roč. 36, s. 267–270.
- Lin, M., L. He, J. Awika, L. Yang, D. R. Ledoux, H. A. Li, A. Mustapha, 2008. Detection of melamine in gluten, chicken feed, and processed foods using surface enhanced Raman spectroscopy and HPLC. *J Food Sci.* 2008, roč. 73, č. 8, s. T129–T134.
- Liu, B., M. Lin, H. Li, 2010. Potential of SERS for rapid detection of melamine and cyanuric acid extracted from milk. *Sensing Instrum Food Qual Saf.* 2010, roč. 4, č. 1, s. 13–19.
- Liu, Y., E. E. D. Todd, Q. Zhang, J. R. Shi, X. J. Liu, 2012. Recent developments in the detection of melamine. *J Zhejiang Univ Sci B (Biomed & Biotechnol).* 2012, roč. 13, č. 7, s. 525–532.
- López-Calleja, I., I. González, V. Fajardo, M. A. Rodríguez, P. E. Hernández, T. García, R. Matín, 2004. Rapid detection of cows' milk in sheeps' and goats' milk by a species-specific polymerase chain reaction technique. *J Dairy Sci.* 2004, roč. 87, s. 2839–2845.
- Majcher, M. A., A. Kaczmarek, D. Klensporf-pawlik, J. Pikul, H. H. Jeleń, 2015. SPME-MS-based electronic nose as a tool for determination of authenticity of PDO Cheese, Oscypek. *Food Anal Methods.* 2015, roč. 8, č. 9, s. 2211–2217.
- Manual of Methods of Analysis of Foods: Milk and Milk Products. 2005 D. G. o. H. Services (Ed.): Ministry of Health and Family Welfare, Government of India
- Maraboli, A., T. M. P. Cattaneo, R. Giangiacomo, 2002. Detection of vegetable proteins from soy, pea and wheat isolates in milk powder by near infrared spectroscopy. *J Near Infrared Spectros.* 2002, roč. 10, s. 63–69.
- Maudet, C., P. Taberlet, 2001. Detection of cows' milk in goats' cheeses inferred from mitochondrial DNA polymorphism. *J Dairy Res.* 2001, roč. 68, s. 229–235.
- May, C. D., S. J. Fomon, L. Remigio, 1982. Immunological consequences of feeding infants with cow milk and soy products. *Acta Paediatr Scand.* 1982, roč. 71, s. 43–51.
- Meisel, H., 1995. Application of fourth derivative spectroscopy to quantitation of whey protein and casein in total milk protein. *Milchwissenschaft.* 1995, roč. 50, s. 247–251.
- Mishra, G. K., R. K. Mishra, S. Bhand, 2010. Flow injection analysis biosensor for urea analysis in adulterated milk using enzyme thermistor. *Biosensors and Bioelectronics.* 2010, roč. 26, s. 1560–1564.
- Moore, J. C., J. Spink, M. Lipp, 2012. Development and Application of a Database of Food Ingredient Fraud and Economically Motivated Adulteration from 1980 to 2010. *J FOOD SCI.* 2012, roč. 77, s. R108–R116.
- Nariadenie Komisie (ES) č. 273/2008 z 5. marca 2008, ktorým sa ustanovujú podrobné pravidlá uplatňovania nariadenia Rady (ES) č. 1255/1999 týkajúce sa metód analýzy a hodnotenia kvality mlieka a mliečnych výrobkov. Dostupné na: <https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2008:088:0001:0115:SK:PDF>
- Ntakatsane, M. P., X. M. Liu, P. Zhou, 2013. Short communication: Rapid detection of milk fat adulteration with vegetable oil by fluorescence spectroscopy. *J Dairy Sci.* 2013, roč. 96, č. 4, s. 2130–2136.

- Okazaki, S., M. Hiramatsu, K. Gonmori, O. Suzuki, A. T. Tu, 2009. Rapid nondestructive screening for melamine in dried milk by Raman spectroscopy. *Forensic Toxicol.* 2009, roč. 27, s. 94–97.
- Qin, J., K. Chao, M. S. Kim, 2013. Simultaneous detection of multiple adulterants in dry milk using macro-scale Raman chemical imaging. *Food Chem.* 2013, roč. 138, s. 998–1007.
- Recio, I., M. L. Perez-rodriguez, M. Ramos, L. Amigo, 1997. Capillary electrophoretic analysis of genetic variants of milk proteins from different species. *J Chromatogr A.* 1997, roč. 768, s. 47–56.
- Renny, E. F., D. K. Daniel, A. I. Krastanov, C. A. Zachariah, R. Elizabeth, 2014. Enzyme based sensor for detection of urea in milk. *Biotechnol Biotechnol Equip.* 2014, roč. 19, č. 2, s. 198–201.
- Romero, C., O. Perez-andújar, A. Olmedo, S. Jiménez, 1996. Detection of cow's milk in ewe's or goat's milk by HPLC. *Chromatographia.* 1996, roč. 42, s. 181–184.
- Ruicheng, R. W., Q. Zeng, M. Chen, T. Liu, 2009. High-performance liquid chromatographic method for the determination of cyromazine and melamine residues in milk and pork. *J Chromatogr Sci.* 2009, roč. 47, s. 581–584.
- Sanchez, L., M. D. Perez, P. Puyol, M. Calvo, G. Brett, 2002. Determination of vegetal proteins in milk powder by enzymelinked immunosorbent assay: Interlaboratory study. *J AOAC Int.* 2002, roč. 85, s.1390–1397.
- Sanchez-Monge, R., G. Lopez-T0orrejón, C. Y. Pascual, J. Varela, M. Martin-Esteban, G. Salcedo, 2004. Vicilin and convicilin are potential major allergens from pea. *Clin Exp Allergy.* 2004, roč. 34, s. 1747–1753.
- Santos, P. M. D., L. F. B. Costa, E. R Pereira-Filho, 2012. Study of Calcium and Sodium Behavior to Identify Milk Adulteration Using Flame Atomic Absorption Spectrometry *Food Nutri Sci.* 2012, s. 1228-1232.
- Santos, P. M., E. R. Pereira-Filho, L. E. Rodriguez-Saona, 2013a. Application of Hand-Held and Portable Infrared Spectrometers in Bovine Milk Analysis. *J Agric Food Chem.* 2013a, roč. 61, s. 1205–1211.
- Santos, P. M., E. R. Pereira-Filho, L. E. Rodriguez-Saona, 2013b. Application of hand-held and portable infrared spectrometers in bovine milk analysis. *J Agri Food Chem.* 2013b, roč. 61, č. 6, s. 1205–1211.
- Satoh, R., R. Nakamura, 2011. Proteomic analysis of known and candidate rice allergens between non-transgenic and transgenic plants. *Regul Toxicol Pharmacol.* 2011, roč. 59, s. 437–444.
- Saz, J. M., M. L. Marina, 2007. High performance liquid chromatography and capillary electrophoresis in the analysis of soybean proteins and peptides in foodstuffs. *J Sep Sci.* 2007, roč. 30, s. 431–451.
- Scholl, P. F., S. M. Farris, M. M. Mossoba, 2014. Rapid turbidimetric detection of milk powder adulteration with plant proteins. *J Agric Food Chem.* 2014, roč. 62, s. 1498–1505.
- Sharma, R., Y. S. Rajput, A. K. Barui, N. L. Naik, 2012. Detection of adulterants in milk, A laboratory manual. In N. D. R. Institute (Ed.). Karnal-132001, Haryana, India. 2012.
- Sherri, T., C. C. Nochetto, D. N. Heller, 2008. Determination of melamine and cyanuric acid residues in infant formula using LCMS/MS. In: U.S. Food nd Drug Administration. 2008.
- Siciliano, R. A., B. Rega, A. Amoresano, P. Pucci, 2000. Modern mass spectrometric methodologies in monitoring milk quality. *Analytical Chem.* 2000, roč. 72, s. 408–515.
- Singh, P., N. Gandhi, 2015. Milk preservatives and adulterants: processing, regulatory and safety issues. *Food Rev Int.* 2015, roč. 31, č. 3, s. 236–261.
- Singhal, O. P., 1980. Adulterants and methods for detection. *Indian Dairyman.* 1980, roč. 32,č. 10, s. 771–774.
- Singuluri, H., M. Sukumaran, 2014. Milk adulteration in hyderabad, India – a comparative study on the levels of different adulterants present in milk. *J Chromatograph Separat Techniq.* 2014, roč. 5, s. 212.
- Smoker, M., A. J. Krynitsky, 2008. Interim Method for Determination of Melamine and Cyanuric Acid Residues in Foods using LC-MS/MS: Version 1.0. In: Laboratory Information Bulletin (LIB) 4422: Melamine and Cyanuric Acid Residues In Foods, U.S. Food and Drug Administration. 2008.
- Song, H., H. Xue, Y. Han, 2011. Detection of cow's milk in Shaanxi goat's milk with an ELISA assay. *Food Control.* 2011, roč. 22, č. 6, s. 883–887.
- Souza, S. S., A. G. Cruz, E. H. M. Walter, J. A. F. Faria, R. M. S. Celeghini, M. M. C. Ferreira, D. Granato, A. D. S. Santana, 2011. Monitoring the authenticity of brazilian uht milk: a chemometric Approach. *Food Chem.* 2011, roč. 124, s. 692–695.
- Strange, E. D., E. L. Malin, D. L. Van Hekken, J. J. Basch, 1992. Chromatographic and electrophoretic methods used for analysis of milk proteins. *J Chromatogr A.* 1992, roč. 624, s. 81–102.
- Suhaj, M., Kováč, M. 2001. Metódy identifikácie falšovania a autentifikácie potravín 4. Jedlé tuky a oleje. *Bulletin potravinárskeho výskumu (Bulletin of Food Research)*, roč. 40, č. 4, s. 249–267.
- Šnirc, M., T. Fekete, Ľ. Belej, R. Židek, J. Golian, P. Haščík, P. Zajác, J. Čapla, 2017. Detection of ovine milk adulteration using taqman real-time pcr assay. *Potravinarstvo Slovak Journal of Food Sciences*, roč. 11, č. 1, s. 338–343. <https://doi.org/10.5219/782>
- Tamime, A. Y., M. N. I. Barclay, A. J. R. Law, J. Leaver, E. M. Anifantakis, T. P. O. O'Connor, 1999. Kishk – a dried fermented milk/cereal mixture. 2. Assessment of a variety of protein analytical techniques for determining adulteration and proteolysis. *Lait.* 1999, roč. 79, s. 331–339.

- Trivedi, U. B., D. Lakshminarayana, I. L. Kothari, N. G. Patel, H. N. Kapse, K. K. Makhija, P. B. Patel, C. J. Panchal, 2009. Potentiometric biosensor for urea determination in milk. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 2009, roč. 140, s. 260–266.
- Tsai, T. H., S. Thiagarajan, S. M. Chen, 2010. Detection of melamine in milk powder and human urine. *J Agric Food Chem*. 2010, roč. 58, s. 4537–5544.
- Uysal, R., I. Boyaci, H. Genis, U. Tamer, 2013. Determination of butter adulteration with margarine using Raman spectroscopy. *Food Chem*. 2013, roč. 141, č. 4, s. 4397–4403.
- Venkatasami, G., J. R. Sowa, 2010. A rapid, acetonitrile-free, HPLC method for determination of melamine in infant formula. *Analytica Chimica Acta*. 2010, roč. 665, s. 227–230.
- Veyrand, B., S. Durand, P. Machand, J. P. Antignac, B. L. Bizec, P. Hancock, 2009. Analysis of melamine and its degradation Products in milk based products using GC-MS/MS. Manchester: Waters Corporation; 2009.
- VYKONÁVACIE NARIADENIE KOMISIE (EÚ) 2018/150, z 30. januára 2018, ktorým sa mení vykonávacie nariadenie (EÚ) 2016/1240, pokiaľ ide o metódy analýzy a hodnotenia kvality mlieka a mliečnych výrobkov oprávnených na verejnú intervenciu a pomoc na súkromné skladovanie. Dostupné na: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/SK/TXT/PDF/?uri=CELEX:32018R0150&from=DA>
- De Lourdes v. M. F., M. M. Gouvea, M. F. F. De carvalho, A. D. N. Pereira, 2013. Is it possible to screen for milk or whey protein adulteration with melamine, urea and ammonium sulphate combining Kjeldahl and classical spectrophotometric methods? *Food Chem*. 2013, roč. 141, s. 3649–3655.
- Xin, H., R. Stone, 2008. Tainted milk scandal. Chinese probe unmasks high-tech adulteration with melamine. *Science*. 2008, roč. 322, s. 1310–1311.
- Yang, S., J. Ding, J. Zheng, B. Hu, J. Li, H. Chen, Z. Zhou, X. Qiao, 2009. Detection of melamine in milk products by surface desorption atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *Analytical Chemistry*. 2009, roč. 81, s. 2426–2436.
- Zhang, X. F., M. Q. Zou, X. H. Qi, F. Liu, X. H. Zhu, B. H. Zhao, 2010. Detection of melamine in liquid milk using surface-enhanced Raman scattering spectroscopy. *J Raman Spectroscopy*. 2010, roč. 41, č. 12, s. 1655–1660.
- Zhu, L., G. Gamez, H. Chen, K. Chingin, R. Zenob, 2009. Rapid Detection of melamine in untreated milk and wheat gluten by ultrasound assisted extractive electrospray ionization mass spectrometry (EESI-MS). *Chem Comm*. 2009, roč. 5, s. 559–561.

Pod'akovanie:

„Táto práca bola podporená Agentúrou na podporu výskumu a vývoja na základe Zmluvy č. APVV-19-0180“.

Kontaktná adresa: doc. Ing. Peter Zajác, PhD., Slovak University of Agriculture, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Department of Food Hygiene and Safety, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovakia, e-mail: peter.zajac@uniag.sk

ANTIFUNGÁLNA AKTIVITA VYBRANÝCH DRUHOV RASTLINNÝCH SILÍC NA RAST IZOLÁTOV *PENICILLIUM COMMUNE* ANTIFUNGAL ACTIVITY OF SELECTED ESSENTIAL OILS ON THE GROWTH OF *PENICILLIUM COMMUNE* ISOLATES

Denisa Foltinová, Dana Tančinová, Miroslava Císarová

Abstract: The aim of this study was focused on the determination of the antifungal activity of selected essential oils on the growth of five isolates of *Penicillium commune*. The isolates were obtained from the dairy products of domestic origin: cheese flavoured with pepper, smoked cheese block, smoked cheese slices, sour cream and parenica (pasta filata). We studied the effect of twelve essential oils - clove, eucalyptus, tea tree, cajeput, niaouli, fennel, dill, anise, cumin, basil, thyme and thyme red in a concentration of 625 $\mu\text{L} \cdot \text{L}^{-1}$ air. We tested the effect of the essential oils by the gaseous diffusion method. The isolates were cultivated on CYA (agar with yeast extract), in the dark, 14 days at $25 \pm 1^\circ\text{C}$, and 35 days at $5 \pm 1^\circ\text{C}$. The diameters of the growing colonies (in mm) were measured on the 3rd, 7th, 11th, 14th at $25 \pm 1^\circ\text{C}$ and 3rd, 7th, 11th, 14th, 21th, 28th and 35th day at $5 \pm 1^\circ\text{C}$ a digital calliper. The results indicate that clove, thyme and thyme red essential oil had a 100 % inhibitory effect on the growth of all tested isolates regardless of cultivation day and temperature. Essential oils from anise and cumin had 100% antifungal activity on the growth of tested strains only at $5 \pm 1^\circ\text{C}$. Eucalyptus, tea tree, cajeput, niaouli, fennel, dill and basil essential oil had not significant antifungal activity on tested isolates *Penicillium commune*. However, these oils affected the growth of colonies throughout the cultivation. Our results showed that some essential oils could be used as a natural preservative useful in the food industry.

Keywords: essential oils, antifungal activity, vapor phase, *Penicillium commune*

ÚVOD

Kontaminácia potravín mikroorganizmami, vrátane mikroskopických vláknitých húb je celosvetovým problémom. Mikroskopické huby dokážu rásť na plodinách ešte keď sú na poli, ale aj na uskladnených potravinách, čo vedie k zníženiu kvality potravín, zníženiu ich nutričnej hodnoty a produkciou mykotoxínov môže dôjsť aj k ohrozeniu zdravia konzumentov. Výskyt mikroskopických vláknitých húb v mliečnych produktoch a na syre predstavuje problém z hľadiska kvality aj bezpečnosti potravín. Rod *Penicillium* je považovaný za najčastejší kontaminant mliečnych výrobkov, pričom druh *P. commune* je jednou z najrozšírenejších mikroskopických vláknitých húb, ktorá spôsobuje kazenie mliečnych produktov, prevažne syrov (Thanushree et al., 2019; De W Blackburn, 2006). Rastlinné silice sú prírodné látky, ktoré sa získavajú z rastlín najmä prostredníctvom parnej destilácie. Majú významné antifungálne, antibakteriálne, antivírusové, protizápalové, antioxidačné a ďalšie účinky a sú účinné aj proti mikroorganizmom, ktoré sa vyskytujú v potravinárskom priemysle (Hesham et al., 2016; Raut a Karuppayil, 2014; Oussalah et al., 2007). Tieto vlastnosti ich predurčujú na možnú aplikáciu v potravinárskom priemysle ako prírodných konzervačných látok a môžu byť alternatívou k syntetickým konzervačným látkam (Debonne et al., 2018; Hyldgaard et al., 2012). Cieľom tejto štúdie bolo zistiť antimykotickú aktivitu vybraných druhov rastlinných silíc na rast kmeňov *P. commune* izolovaných zo zaplesnivených mliečnych produktov.

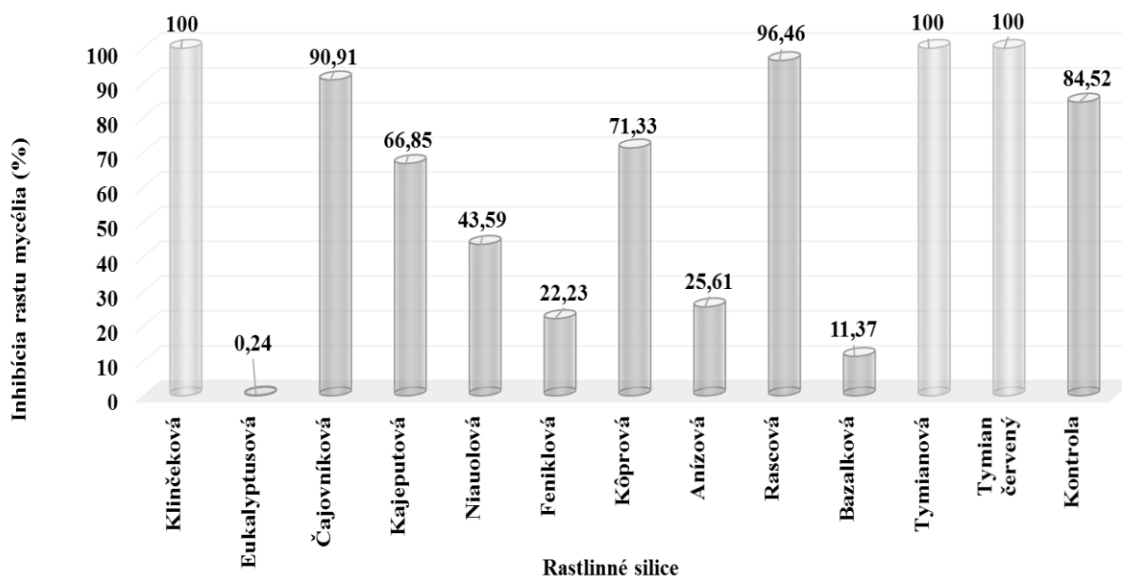
MATERIÁL A METÓDY

Antimykotickú aktivitu dvanástich rastlinných silíc (klinčekovej, eukalyptusovej, čajovníkovej, kajeputovej, niauolovej, feniklovej, kôprovej, anízovej, rascovej, bazalková, tymiánovej a silice z tymiánu červeného) sme sledovali na piatich kmeňoch *Penicillium*

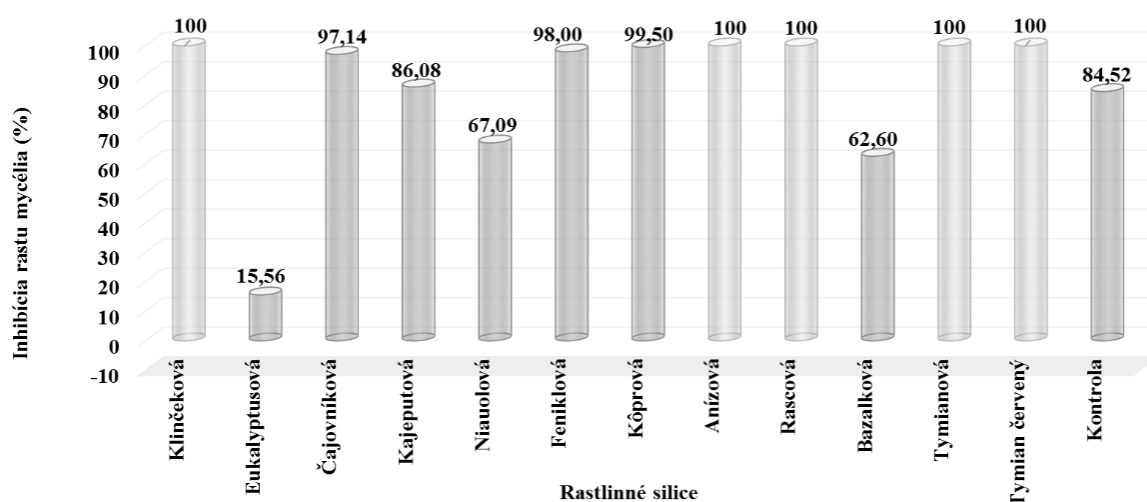
commune. Kmene boli izolované zo zaplesnivených mliečnych produktov domáceho pôvodu (prírodný ochutený syr s paprikou z kravského mlieka, salámový syr údený, salámový syr údený plátkový, kyslá smotana a parenica). Účinok rastlinných silíc sme testovali plynňou difúznou metódou podľa Guynot et al. (2003). Použili sme sterilné dvojkomorové Petriho misky s priemerom 90 mm, s 15 ml živného média CYA. Kmene *P. commune* sme očkovali jednobodovo do stredu obidvoch komôr Petriho misky. Všetky analýzy boli vykonané v štyroch opakovaníach. Do viečka Petriho misky sme umiestnili sterilný filtračný papierik, na ktorý sme rovnomerne napipetovali 50 µl príslušnej silice a bol umiestnený tak, aby nedošlo k priamemu kontaktu so živným médiom. Do kontrolných misiek sme na filtračný papierik napipetovali 50 µl sterilnej destilovanej vody. Takto pripravené Petriho misky sme uzatvorili parafilmom a kultivovali v termostate pri 25±1 °C 14 dní a v chladničke pri 5±1 °C 35 dní. Celkovo bolo v Petriho miske 80 ml vzduchu a koncentrácia silice bola 625 µl.l⁻¹ vzduchu. Rast kolónií kultivovaných pri 25±1 °C sme merali na 3., 7., 11., a 14. deň a pri miskách kultivovaných pri 5±1 °C sme merania vykonali na 3., 7., 11., 14., 21., 28., a 35. deň. Účinok antifungálnej aktivity dvanástich rastlinných silíc sme vypočítali ako priemernú percentuálnu inhibíciu rastu mycélia pri obidvoch kultivačných teplotách (po 14 dňoch kultivácie pri 25±1 °C a po 35 dňoch kultivácie pri 5±1 °C).

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Všetky rastlinné silice prejavili určitú schopnosť inhibovať alebo potláčať rast jednotlivých kmeňov. Výsledky sme vyjadrili ako percentuálnu inhibíciu rastu mycélia pri dvoch kultivačných teplotách. Úplný (100 %) účinok na rast všetkých kmeňov počas celej doby kultivácie pri oboch kultivačných teplotách preukázali klinčeková a tymiánová silica a silica z tymiánu červeného. Antimikrobiálnym, antifungálnym a antimykotickým účinkom rastlinných silíc konkrétne z klinčeka, oregána, škoric a tymiánu sa vo svojej štúdií venovali aj autori (Cíсарová et al., 2020; Foltinová et al., 2019; Tančinová et al., 2018; Tylor 2015), ktorí rovnako ako my potvrdili 100 % účinok týchto rastlinných silíc. Anízová a rascová silica mali tiež 100 % inhibičný účinok, ale len pri nižšej kultivačnej teplote (5±1 °C), počas celej doby kultivácie (35 dní). Podobný inhibičný účinok uvedených silíc vo svojej štúdií potvrdzuje aj ďalšia skupina autorov (Massa et al., 2018; Aminifard a Bayat 2017; Cíсарová et al., 2015; Rajkovic et al., 2015; Zhavah et al., 2015). Medzi silice, ktoré tiež prejavili významnú antifungálnu aktivitu môžeme zaradiť čajovníkovú (90,91 %), kajeputovú (66,85 %) a kôprovú (71,33 %) silicu pri 25±1 °C a čajovníkovú (97,14 %), kajeputovú (86,08 %), feniklovú (98,00 %) a kôprovú (99,50 %) silicu pri 5±1 °C, čo je porovnateľné aj s výsledkami iných autorov (Chidi et al., 2020; Dahiya 2016; Stević et al., 2014). Autori Kocić-Tnackov et al. (2012), Piyo et al. (2009), Ilić et al. (2019) vo svojej práci uvádzajú, že silice z bazalky, feniklu sú účinné proti zástupcom rodu *Penicillium* a to konkrétne proti *P. aurantiogriseum*, *P. glabrum*, *P. chrysogenum* a *P. brevicompactum*. Dixit et al. (2014) sledovali antifungálny účinok rastlinných silíc z *Eucalyptus globulus* (eukaliptová silica) a *Ocinum basilicum* (bazalková silica) voči testovaným druhom *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Aspergillus niger*, *Penicillium commune* a *Candida albicans*. Výsledky ich štúdie potvrdili čiastočný inhibičný účinok týchto rastlinných silíc najmä na *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* a *Aspergillus niger*. Na základe našich výsledkov môžeme konštatovať, že rastlinné silice: niaulová, bazalková a eukalyptusová prejavili najnižší inhibičný účinok na rast všetkých testovaných kmeňov počas oboch kultivačných teplôt. Podobné účinky uvedených rastlinných silíc preukazujú aj výsledky iných autorov (Davari a Ezazi 2017; Schroder et al., 2017; Patil a Parthiban 2017).



Obrázok 1 Antifungálna aktivita 12 rastlinných silíc v percentách na rast *P. commune* počas 14 dňovej kultivácie na CYA pri 25 ± 1 °C, v štyroch opakovaníach (počet kmeňov 5)



Obrázok 2 Antifungálna aktivita 12 rastlinných silíc v percentách na rast *P. commune* počas 35 dňovej kultivácie na CYA pri 5 ± 1 °C, v štyroch opakovaníach (počet kmeňov 5)

ZÁVER

Výsledky nášho výskumu preukázali významný antifungálny a inhibičný účinok niektorých druhov rastlinných silíc na rast kmeňov *P. commune*. Z výsledkov vyplýva, že rastlinné silice by mohli byť využiteľné v potravinárskom priemysle ako prírodné konzervačné látky a mohli by predstavovať vhodnú alternatívu ku chemickým konzervačným látkam.

LITERATÚRA

Aminifard, M. H., Bayat, H. 2017. Antifungal activity of black caraway and anise essential oils against *Penicillium digitatum* on blood orange fruits. *International Journal of Fruit Science*, vol. 18, no. 3, p. 307-319. <https://doi.org/10.1080/15538362.2017.1409682>

- Císarová, M., Hleba, L., Medo, J., Tančinová, D., Mašková, Z., Čuboň, J., Kováčik, A., Foltinová, D., Božik, M., Klouček, P. 2020. The *in vitro* and *in situ* effect of selected essential oils in vapour phase against bread spoilage toxicogenic aspergilli. *Food Control*, vol. 110, 107007. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.107007>
- Císarová, M., Tančinová, D., Brodová, M. 2015. The inhibitory effect of essential oils on the growth of genus *Penicillium* isolated from peanuts by contact vapor. *Journal of Microbiology, Biotechnology & Food Sciences*, vol. 4, no. 1, p. 6-11. <https://doi.org/10.15414/jmbfs.2014.4.special1.6-11>
- Dahiya, P. 2016. Evaluation of *in vitro* antimicrobial potential and phytochemical analysis of spruce, cajeput and jamrosa essential oil against clinical isolates. *International Journal of Green Pharmacy (IJGP)*, vol. 10, no. 1, p. 2-7.
- Davari, M., Ezazi, R. 2017. Chemical composition and antifungal activity of the essential oil of *Zhumeria majdae*, *Heracleum persicum* and *Eucalyptus* sp. against some important phytopathogenic fungi. *Journal de Mycologie Medicale*, vol. 27, no. 4, p. 463-468. <https://doi.org/10.1016/j.mycmed.2017.06.001>
- Debonne, E., Van Bockstaele, F., Samapundo, S., Eeckhout, M., Devlieghere, F. 2018. The use of essential oils as natural antifungal preservatives in bread products. *Journal of Essential Oil Research*. ISSN 1041-2905, vol. 30, no. 5, p. 309-318. <https://doi.org/10.1080/10412905.2018.1486239>
- De W Blackburn, C. 2006. *Food spoilage microorganisms*. Cambridge, England : Woodhead Publishing. p. 736. ISBN 10-0-8493-9156-3. <https://doi.org/10.1533/9781845691417>
- Dixit, A., Rohilla, A., Singh, V. 2014. Antimicrobial Activity of Volatile oil of *Eucalyptus globulus* Labill. *International Journal of Advances in Pharmacy, Biology and Chemistry*, vol. 3, no. 2, p. 384-387. ISSN 2277-4688.
- Foltinová, D., Tančinová, D., Císarová, M. 2019. Inhibitory effect of essential oils on the growth of *Geotrichum candidum*. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*. vol. 9, no. Special Issue, p. 380-384. <https://doi.org/10.15414/jmbfs.2019.9.special.380-384>
- Guynot, M. E., Ramos, A. J., Setó, L., Purroy, P., Sanchis, V., Marín, S. 2003. Antifungal activity of volatile compounds generated by essential oils against fungi commonly causing deterioration of bakery products. *Journal of Applied Microbiology*, vol. 94, p. 893-899. ISSN 1365-2672. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2003.01927.x>
- Hesham, H. A. R., Abdurahman, H. N., Rosli, M. Y. 2016. Techniques For Extraction of Essential Oils From Plants: A review. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, vol. 10, no. 16, p. 117-127. ISSN 1991-8178.
- Hyldgaard, M., Mygind, T., Meyer, R. L. 2012. Essential oils in food preservation: Mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. *Frontiers in Microbiology*, vol. 3, no. 1, p. 1-24. ISSN 1664302X. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00012>
- Chidi, F., Bouhoudan, A., Khaddor, M. 2020. Antifungal effect of the tea tree essential oil (*Melaleuca alternifolia*) against *Penicillium griseofulvum* and *Penicillium verrucosum*. *Journal of King Saud University–Science*, vol. 32, no. 3, p. 2041-2045. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2020.02.012>
- Ilić, D. P., Stanojević, L. P., Troter, D. Z., Stanojević, J. S., Danilović, B. R., Nikolić, V. D., & Nikolić, L. B. 2019. Improvement of the yield and antimicrobial activity of fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.) essential oil by fruit milling. *Industrial Crops and Products*, vol. 142. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.111854>
- Kocić-Tanackov, S. D., Dimić, G. R., Pejin, D. J., Mojović, L. V., Pejin, J. D., Tanackov, I. J. 2012. Antifungal activity of the basil (*Ocimum basilicum* L.) extract on the *Penicillium aurantiogriseum*, *P. glabrum*, *P. chrysogenum*, and *P. brevisompactum*. *Acta Periodica Technologica*, vol. 43, p. 247-256. <https://doi.org/10.2298/APT1243247K>
- Massa, N., Cantamessa, S., Novello, G., Ranzato, E., Martinotti, S., Pavan, M., Bona, E. 2018. Antifungal activity of essential oils against azole-resistant and azole-susceptible vaginal *Candida glabrata* strains. *Canadian Journal of Microbiology*, vol. 64, no. 10, p. 647-663. <https://doi.org/10.1139/cjm-2018-0082>
- Oussalah, M., Caillet, S., Saucier, L., Lacroix, M. 2007. Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E. coli* O157:H7, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. *Food Control*, vol. 18, no. 5, p. 414-420. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2005.11.009>
- Patil, S. R., Parthiban, V. K. 2017. Effect of botanicals for antifungal activity against penicillium species in sweet orange. *Journal of Plant Disease Sciences*, vol. 12, no. 1, p. 42-49.
- Piyo, A., Udomsilp, J., Khang-Khun, P., Thobunluepop, P. 2009. Antifungal activity of essential oils from basil (*Ocimum basilicum* Linn.) and sweet fennel (*Ocimum gratissimum* Linn.): alternative strategies to control pathogenic fungi in organic rice. *Asian Journal of Food and Agro-Industry*, vol. Special Issue, p. S2-S9. ISSN: 1906-3040.
- Rajkovic, K., Pekmezovic, M., Barac, A., Nikodinovic-Runic, J., Arsić Arsenijević, V. 2015. Inhibitory effect of thyme and cinnamon essential oils on *Aspergillus flavus*: Optimization and activity prediction model development. *Industrial Crops and Products*, vol. 65, p. 7-13. ISSN 09266690. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.11.039>

- Raut, J. S., Karuppaiyil, S. M. 2014. A status review on the medicinal properties of essential oils. *Industrial Crops and Products*. ISSN 0926-6690, vol. 62, p. 250-264. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.05.055>
- Schroder, T., Gaskin, S., Ross, K., Whiley, H. 2017. Antifungal activity of essential oils against fungi isolated from air. *International Journal of Occupational and Environmental Health*, vol. 23, no. 3, p. 181-186. <https://doi.org/10.1080/10773525.2018.1447320>
- Stević, T., Berić, T., Šavikin, K., Soković, M., Godevac, D., Dimkić, I., Stanković, S. 2014. Antifungal activity of selected essential oils against fungi isolated from medicinal plant. *Industrial Crops and Products*, vol. 55, p. 116-122. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.02.011>
- Tančinová, D., Mašková, Z., Foltinová, D., Štefániková, J., Árvay, J. 2018. Effect of essential oils of *Lamiaceae* plants on the *Rhizopus* spp. *Potravinárstvo Slovak Journal of Food Sciences*, vol. 12, no. 1, p. 491-498. <https://doi.org/10.5219/921>
- Taylor, T. M. 2015. Handbook of Natural Antimicrobials for Food Safety and Quality. [p. l.] : Elsevier. eISBN 978-1-78242-042-2.
- Thanushree, M. P., Sailendri, D., Yoha, K. S., Moses, J. A., Anandharamakrishnan, C. 2019. Mycotoxin contamination in food: an exposition on spices. *Trends in Food Science & Technology*, vol. 93, p. 69-80. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.08.010>
- Zhaveh, S., Mohsenifar, A., Beiki, M., Khalili, S. T., Abdollahi, A., Rahmani - Cherati, T., Tabatabaei, M. 2015. Encapsulation of *Cuminum cyminum* essential oils in chitosan - caffeic acid nanogel with enhanced antimicrobial activity against *Aspergillus flavus*. *Industrial Crops and Products*, vol. 69, p. 251-256. <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.02.028>

Pod'akovanie: Výskum bol realizovaný s podporou projektov: KEGA 015SPU-4/2018 a Operačného programu Integrovaná infraštruktúra pre projekt: Dopytovo-orientovaný výskum pre udržateľné a inovatívne potraviny, Drive4SIFood 313011V336, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

Kontaktná adresa: Ing. Denisa Foltinová, Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre, Fakulta biotechnológie a potravinárstva, Katedra mikrobiológie, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovakia, email:foltinova.d@gmail.com

IMPLEMENTÁCIA NUTRI-SCORE V EURÓPE AKO NÁSTROJA VEREJNÉHO ZDRAVIA NA ZLEPŠENIE VÝŽIVOVÉHO STAVU POPULÁCIE NA ZÁKLADE PRÍSNEHO VEDECKÉHO ZÁZEMIA IMPLEMENTING THE NUTRI-SCORE IN EUROPE AS A PUBLIC HEALTH TOOL TO IMPROVE PEOPLE'S NUTRITIONAL STATUS BASED ON A SOUND SCIENTIFIC BACKGROUND

Jozef Golian, Tomáš Vlčko, Jozef Čapla

Abstract: We consider food labelling in the form of a Nutri-Score label to be a public health tool in order to improve the nutritional status of the population. Nutri-Score is a progressive form of food labelling related to nutrition information. The Nutri-Score label should be placed on the front of the product packaging and inform the consumer in a simplified way about the nutritional composition and thus the quality of the food. Nutri-Score uses colour scales to categorize food based on nutritional data. The aim is also to motivate producers to improve the quality of their food so that it is placed on a better colour scale. Nutri-Score is a system based on scientific knowledge, in recent years dozens of scientific papers have been published in international peer-reviewed journals, which confirm the correctness of the idea and the design of the Nutri-Score label.

Keywords: Nutri-Score, food labelling, nutrition data.

ÚVOD

Nutri-Score sa opiera o vedecký základ, ktorý vznikol na základe systému výživových profilov vyvinutých pracovníkmi Oxfordskej univerzity pre Food Standard Agency (FSA) vo Veľkej Británii, s cieľom stanoviť pravidlá regulácie televíznej reklamy pre deti. Bol použitý precízny vedecký proces zahŕňajúci viaceré štúdie na odôvodnenie potreby podpory prítomnosti viacerých skupín živín a látok, ktoré podporujú zdravý metabolizmus. Z opačného hľadiska boli vybrané a označované skupiny živín, ktorých prítomnosť by sa v potravinách mala obmedziť. V roku 2015 bol predmetom štúdiu systém konečného profilovania živín s názvom FSA NPS, ktorý sa mal pôvodne v Spojenom Kráľovstve používať na schvaľovanie televíznych reklám na potraviny určené pre deti. Agentúra pre bezpečnosť potravín ANSES a Francúzska rada pre verejné zdravie HCSP, ktorá je nezávislou agentúrou stanovila 4 prahové hodnoty definujúce 5 farebných škál a písmen, konkrétne od A zelenej po E červenú. HCSP stanovil s odôvodnením verejného zdravia kalibráciu pôvodného plánu FSA NPS pre tri kategórie potravín a to pre nápoje, syry a pridané tuky s cieľom zlepšiť viditeľnosť variability výživovej kvality. Dôvodom bolo najmä to, že pôvodný návrh kategorizoval všetky skupiny syrov do kategórie E a nezohľadňoval prínos syrov ako mliečnych produktov obsahujúcich vysoké množstvá vápnika a plnohodnotných bielkovín. Takýmto spôsobom sa neumožňovalo spotrebiteľom rozlišovať rôzne kategórie syrov na základe výživových vlastností. Po menšej úprave sa syry zaraďujú do kategórii D a E, niektoré aj do kategórie C ako napr. syry Ricotta alebo Mozzarella. Obdobný postup sa aplikoval na nápoje a pridané tuky. Na základe vedeckých dát a najmä výsledkov nedávnych intervenčných štúdií s olivovým olejom začlenila Francúzska agentúra pre verejné zdravie zodpovedná za správu Nutri-Score olivový olej do kategórie ovocia, zeleniny a orechov. Z toho dôvodu je zaradený olivový olej do kategórie C a nie D. Väčšina krajín EÚ považuje olivový olej za zdravší variant v prípade príjmu tukov a olejov (Rayner, Scarborough, Stockley, 2004; 2005; Rayner, Scarborough, Lobstein, 2009; Arambepola, Scarborough, Rayner, 2008).

SYSTÉM OZNAČOVANIA NUTRI-SCORE

Na posudzovanie Nutri-Score ako označenia výživovej hodnoty potraviny na prednej strane obalu výrobku existuje koncepčná schéma opísaná vo viacerých publikáciách (Townsend, 2010; Grunert, Wills, 2007) a podrobný postup bol publikovaný zo strany Svetovej Zdravotníckej organizácie popisujúci validačné štúdie potrebné na vyhodnotenie a výber označenia výživovej hodnoty (WHO, 2019; 2020; 2020). Početné publikácie v recenzovaných medzinárodných časopisoch popisujú validáciu výpočtového algoritmu a grafického formátu Nutri-Score (Renaudin et al., 2017).



Obr.1 Logo Nutri – Score (Egnell et al., 2019)

Pomocou Nutri-Score je možné vedieť výživové zloženie konkrétnej potraviny, ktorých výsledok je vyjadrený päťstupňovou farebnou stupnicou písmen, pričom zelené A znamená: priaznivé zloženie výživovej hodnoty a tmavooranžové E znamená: nepriaznivé zloženie výživovej hodnoty.

V prípade validácie algoritmu, ktorý je základom Nutri-Score, boli zrealizované tri kroky koncepcnej schémy.

Krok č. 1

Rôzne štúdie analyzujúce potraviny z hľadiska výživy zdôrazňujú, že pre všetky testované európske krajiny klasifikácia potravín podľa Nutri-Score je v súlade s výživovými odporúčaniami pre verejné zdravie (Dréano-Trécant et al., 2020). Väčšina produktov, najmä ovocie a zelenina je zaradená do kategórie A alebo B, zatiaľ čo väčšina sladkých a solených pochutín, omáčok, živočíšnych tukov sú zaradené do kategórie D alebo E. Konzistencia sa zobrazuje aj v rámci konkrétnych skupín potravín, v skupine škrobových potravín sú strukoviny, cestoviny a ryža lepšie hodnotené ako raňajkové cereálie, v mliečnej skupine sú mlieko a jogurty hodnotené lepšie ako syry. Kompozitné jedlá sú široko distribuované, čo zdôrazňuje variabilitu výživového zloženia produktov v tejto špecifickej kategórii. A nakoniec, pokiaľ sa jedná o nápoje, zatiaľ čo väčšina ovocných štiav je klasifikovaná do kategórie C, nealkoholické ochutené nápoje sú klasifikované do kategórie E, voda je zaradená do kategórie A. Vo všetkých krajinách EÚ sa pozoruje veľká variabilita všetkých skupín potravín, pokiaľ boli tieto potraviny rozdelené do troch tried Nutri-Score. V prípade podobných výrobkov sú častokrát identifikované najmenej dve farebné kategórie. Schopnosť systému Nutri-Score identifikovať rozdiely vo výživovej kvalite potravín je obzvlášť výhodná, pokiaľ umožňuje spotrebiteľom porovnávať potraviny v rámci kategórii.

Krok č.2

Systémom Nutri-Score a jeho dopadmi na spotrebiteľov sa viacerí autori zaoberali aj v epidemiologických štúdiách (Julia et al., 2014; 2015; Deschamps et al., 2015). Spotrebiteľia riadiaci sa Nutri-Score pri výbere potravín sa vyznačujú častejšou konzumáciou ovocia, zeleniny, rýb a na druhej strane nižšou mierou konzumácie sladkých, mastných a slaných jedál, taktiež prijímajú viac vlákniny, vápnika, betakaroténu, vitamínu C, zinku a železa. V štúdiách sa eviduje u týchto spotrebiteľov nižší príjem nasýtených mastných kyselín a celkovo lepšie dodržiavanie výživových usmernení verejného zdravia. Predmetné štúdie poukazujú na fakt, že konzumácia potravín zaradených na lepšej stupnici Nutri-Score je priamo spojená s celkovo lepším dodržiavaním zásad správneho stravovania sa.

Krok č. 3

Nutri-Score sa skúmalo aj z hľadiska jeho asociácie na individuálnej úrovni zdravotných javov v kohortách. Analýza zrealizovaná vo Francúzsku, ktorá zahŕňala skupinu 6 435 subjektov sledovaných po dobu 13 rokov (Donnenfeld et al., 2015; Adriouch et al., 2016; Julia et al., 2015; 2015) a skupinu 46 864 subjektov sledovaných po dobu 6 rokov (Adriouch et al., 2017; Deschasaux et al., 2017) ukázala, že konzumácia potravín s vyššou FSA NPS zodpovedajúca konzumácii potravín s menej priaznivým hodnotením Nutri-Score je spojená s vyšším rizikom vzniku chronických ochorení vrátane rakoviny, kardiovaskulárnych ochorení, obezity a iných. Obdobné výsledky sa preukázali pri analýzach realizovaných v Španielsku na vzorke 20 503 osôb po dobu 10 rokov (Goméz-Dono et al., 2020) a analýzach realizovaných vo viac ako 10 krajinách EÚ o vzorke viac ako 500 000 sledovaných viac ako 15 rokov (Deschasaux et al., 2018; 2020). Celkovo všetky prospektívne kohortné štúdie uskutočňované v rôznych kontextoch zistili súvislosť medzi konzumáciou potravín dobre klasifikovaných podľa Nutri-Score a nižším rizikom chronických ochorení a nižšou úmrtnosťou. Tieto výsledky vedú k záveru, že ak má každý z výživových prvkov, ktoré sa berú do úvahy pri výpočte výživového skóre, vedecké opodstatnenie, je agregácia týchto zložiek v rámci celkového algoritmu jeho výpočtu silne overená. Tento krok validácie predstavuje dôležitý argument v prospech relevantnosti a spoľahlivosti tohto algoritmu, pokiaľ ide o výber prvkov použitých pri jeho výpočte a pridelenie bodov rôznym základným prvkom (Egnell et al., 2021).

V prípade validácie grafického formátu sa tiež zrealizovali kroky koncepcnej schémy. Viaceré štúdie (Ducrot et al., 2015; Julia et al., 2017; De Temmerman et al., 2021) sa zaoberali účinnosťou 5 farebného grafického formátu Nutri-Score vo vzťahu k spotrebiteľovi v porovnaní s inými existujúcimi označeniami. Výsledky štúdií zrealizovaných v Nemecku (BMEL, 2019), Francúzsku (Sarda et al., 2020), Španielsku (Hispacoop, 2020), Belgicku (Test Achat, 2020) sú konvergentné, čo signalizuje výbornú účinnosť Nutri-Score v porovnaní s inými testovanými výživovými označeniami, najmä čo sa týka vnímania, ľahkej identifikácie a porozumenia zo strany spotrebiteľov. Všetky predmetné štúdie poukazujú, že Nutri-Score je spotrebiteľmi silne preferované a javí sa ako preferovaný formát v porovnaní s inými označeniami, najmä u populácie s nižšou úrovňou znalostí v oblasti výživy. Nie je postačujúce len aby spotrebiteľia evidovali tento grafický formát. Je potrebné aby sa zvýšila efektívnosť samotnej myšlienky, ktorej gro je pomôcť spotrebiteľom pri výbere výživovo kvalitných potravín. Boli vykonané štúdie zaoberajúce sa porovnávaním Nutri-Score s inými výživovými označeniami potravín. Štúdie boli vykonané na veľkých vzorkách spotrebiteľov (12 000) v 12 krajinách EÚ a v 6 krajinách Ázie a Oceánie (6 000) (Egnell et al., 2018; 2021). Štúdie jasne preukázali, že označenie Nutri-Score je efektívnejší spôsob pre spotrebiteľov na správne klasifikovanie výživovo kvalitných potravín v porovnaní s označeniami UK Multiple Traffic Light, Chilean Health Warnings, Australian Health Star Ratings. Ďalšia obdobná štúdia zrealizovaná vo Francúzsku na viac ako 14 000 subjektoch ukázala, že pravdepodobnosť správnej klasifikácie výrobkov na základe výživového označenia bola obzvlášť vysoká u spotrebiteľov s nižšou sociálno-ekonomickou úrovňou a minimálnymi znalosťami v oblasti výživy (Ducrot et al., 2015). Najrelevantnejšie štúdie boli zamerané na porovnanie vplyvu Nutri-Score na výživovú kvalitu uskutočnených nákupov v porovnaní s inými výživovými označeniami alebo bez nich. Boli vykonané 4 štúdie prostredníctvom virtuálnych supermarketov zameraných na študentov, osoby s chronickým ochorením, priemernú populáciu a osoby s nízkymi príjmami (Ducrot et al., 2016; Egnell et al., 2019). Ďalšie štúdie sa uskutočnili v obchodnej sieti na niekoľkých stovkách subjektov pri reálnych nákupoch (Crosetto, Muller, Ruffieux, 2016; Crosetto et al., 2017; 2020) a bola vykonaná štúdia vo Francúzsku v 60 supermarketoch, z ktorých 10 malo označenie Nutri-Score, 10 Multiple Traffic Light, 10 systém SENS, 10 GDA/RIS a 20 supermarketov malo produkty bez označenia. V danej štúdii sa analyzovalo 1,7 milióna hotovostných tržieb (Ministere des Solidarites et de la Sante; Dubois et al., 2020). Výsledky všetkých vyššie spomenutých štúdií konzistentne

poukazujú na to, že prítomnosť označenia Nutri-Score zlepšuje výživovú kvalitu nákupov a účinnosť Nutri-Score sa preukázala ako najefektívnejšia. Je predpoklad, že označenie Nutri-Score a na to nadväzujúce nakupovanie výživovo kvalitnejších potravín by mohlo vplývať na úmrtnosť v dôsledku chronických ochorení a to jej znížením o 3,4 % (Egnell et al., 2019). Početnosť a kvalita štúdií preukazujúca pozitívny prínos označenia Nutri-Score je evidentná. Žiadne iné výživové označenie nebolo podrobené takej sume skúmania a validácii realizovaných na základe metodiky WHO s tak pozitívnymi výsledkami. Všetky predmetné štúdie preukázali zreteľne lepšie výsledky v porovnaní s inými výživovými označeniami. Výsledkom je aj prijatie Nutri Score orgánmi verejného zdravia viacerých európskych štátov (Francúzsko, Belgicko, Nemecko, Španielsko, Luxembursko, Holandsko a Švajčiarsko) (Julia, Hercberg, 2016; 2018; 2018; Mialon et al., 2018).

PRÍKLADY APLIKÁCIE NUTRI-SCORE NA VÝROBKOCH



Obr. 2 Označenie jogurtov Nutri-Score (<http://businessindustry.ch>)



Obr. 3 Označenie výrobkov ALPRO Nutri-Score (Alpro, 2019)



Obr. 4a Rozdiely v označení výrobkov rovnakej značky podľa Nutri-Score (Pionke, 2019)



Obr. 4b Rozdelenie tyčiniek podľa Nutri-Score (<https://www.consumentenbond.nl/>)



Obr. 5 Porovnanie dvoch výrobkov jednej značky s iným zložením (Albert, Kwasniewski, 2019)

ZÁVER

Nutri-Score pozostáva zo systému označovania výživovej hodnoty na podporu vyváženej stravy. S cieľom zlepšiť prístup k vyváženej strave poskytuje tento návrh odporúčanie syntetického systému označovania výživovej hodnoty, ktoré je jednoduché a dostupné pre všetkých. Nutri-Score je ochranná známka zapísaná vo Francúzsku spoločnosťou Santé publique France a ako kolektívna ochranná známka, ktorá sa riadi stanovami používania a grafickou predlohou. Je to prostriedok, ktorý je výsledkom vedeckého, inovatívneho a inkluzívneho prístupu založeného na dialógu so zúčastnenými stranami. Veľká časť členských štátov Európskej únie je v procese zavádzania legislatívnych ustanovení potrebných na podporu tohto jednotného systému v celej Európe. Týmto zjednodušeným označovaním umiestneným na prednej strane obalu potravín môže spotrebiteľ rýchlo posúdiť výživovú kvalitu výrobku. Takto môže porovnávať potraviny medzi sebou, medzi rôznymi skupinami výrobkov, v rámci tej istej skupiny alebo rovnakú potravinu rôznych značiek. Vďaka tejto transparentnosti môžu spotrebiteľia ľahko začleniť výživový rozmer do svojho nákupného úkonu a nasmerovať svoj výber na potraviny s vyššou výživovou kvalitou.

Literatúra

- Adriouch, S. et al. 2016 Prospective association between a dietary quality index based on a nutrient profiling system and cardiovascular disease risk. In *European Journal of Preventive Cardiology*, vol. 23, no. 15, pp. 1669-1679. ISSN: 2047-4881. DOI: 10.1177/2047487316640659.
- Adriouch, S. et al. 2017. Association between a dietary quality index based on the food standard agency nutrient profiling system and cardiovascular disease risk among French adults. In *International Journal of Cardiology*, vol. 234, pp. 22-27. ISSN: 0167-5273. DOI: 10.1016/j.ijcard.2017.02.092
- Albert, A., Kwasniewski, N. 2019. *Zwei Fertigpizzas, ganz unterschiedliche Noten*. <https://www.spiegel.de/wirtschaft/service/nutri-score-gute-pizza-schlechte-pizza-a-1258731.html>
- ALPRO. 2019. *Alpro® führt ab September 2019 das Nährwertkennzeichnungssystem auf Produkten ein: Bewusstes Einkaufen durch Nutri-Score*. <https://www.ernaehrungs-umschau.de/branche-aktuell/01-10-2019-bewusstes-einkaufen-durch-nutri-score/>
- Arambepola, C., Scarborough, P., Rayner, M. 2008. Validating a nutrient profile model. In *Public Health Nutrition*, vol. 4, pp. 371-378. ISSN: 1475-2727. DOI: 10.1017/S1368980007000377
- BMEL. 2019. *Evaluation von erweiterten Nährwertkennzeichnungs-Modellen – Ergebnisbericht der Fokusgruppendifkussionen*. Berlin: BMEL. 82 s.
- Crosetto, P., Muller, L., Ruffieux, B. 2016. Réponses des consommateurs à trois systèmes d'étiquetage nutritionnel face avant. In *Cahiers de Nutrition et de Diététique*, vol. 51, pp. 124-131. ISSN: 0007-9960. DOI: 10.1016/j.cnd.2016.04.002
- Crosetto, P. et al. 2017. Modification des achats alimentaires en réponse à cinq logos nutritionnels. In *Cahiers de Nutrition et de Diététique*, vol. 52, no. 3, pp. 129-133. ISSN: 0007-9960. DOI: 10.1016/j.cnd.2017.04.002.
- Crosetto, P. et al. 2020. Nutritional and economic impact of five alternative front-of-pack nutritional labels: experimental evidence. In *European Review of Agricultural Economics*, vol. 47, no. 2, pp. 785-818. ISSN: 1464-3618. DOI: 10.1093/erae/jbz037
- De Temmerman, J. et al. 2021. The impact of the Nutri-Score nutrition label on perceived healthiness and purchase intentions. In *Appetite*, vol. 157, pp. 104995. ISSN: 0195-6663. DOI: 10.1016/j.appet.2020.104995
- Deschamps, V. et al. 2015. Score de qualité nutritionnelle des aliments de la Food Standards Agency appliqué aux consommations alimentaires individuelles des adultes en France. In *Bulletin épidémiologique hebdomadaire*, pp. 466-475. ISSN: 1953-8030
- Deschasaux, M. et al. 2017. Are self-reported unhealthy food choices associated with an increased risk of breast cancer? Prospective cohort study using the British Food Standards Agency nutrient profiling system. In *BMJ Open*, vol. 7, no. 6. ISSN: 2044-6055. DOI: 10.1136/bmjopen-2016-013718
- Deschasaux, M. et al. 2018. Nutritional quality of food as represented by the FSAm-NPS nutrient profiling system underlying the Nutri-Score label and cancer risk in Europe: Results from the EPIC prospective cohort study. In *PLoS Medicine*, vol. 15, no. 9. ISSN: 1549-1676. DOI: 10.1371/journal.pmed.1002651
- Deschasaux, M. et al. 2020. Association between nutritional profiles of foods underlying Nutri-Score front-of-pack labels and mortality: EPIC cohort study in 10 European countries. In *BMJ Open*, vol. 370. ISSN: 2044-6055. DOI: 10.1136/bmj.m3173
- Dréano-Trécant, L. et al. 2020. 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. In *Nutrients*, vol. 12, no. 5, pp. 1303. ISSN: 2072-6643. DOI: 10.3390/nu12051303

- Donnenfeld, M. 2015. Prospective association between cancer risk and an individual dietary index based on the British Food Standards Agency Nutrient Profiling System. In *British Journal of Nutrition*, vol. 114, no. 10, pp. 1702-1710. ISSN: 1475-2662. DOI: 10.1017/S0007114515003384
- Dubois, P. et al. 2020. Effects of front-of-pack labels on the nutritional quality of supermarket food purchases: evidence from a large-scale randomized controlled trial. In *Journal of the Academy of Marketing Science*, vol. 49, pp. 119-138. ISSN: 1552-7824. DOI: 10.1007/s11747-020-00723-5
- Ducrot, P. 2015. Effectiveness of Front-Of-Pack Nutrition Labels in French Adults: Results from the NutriNet-Santé Cohort Study. In *Plos One*, vol. 10, no. 10. ISSN: 1932-6203. DOI: 10.1371/journal.pone.0140898
- Ducrot, P. 2015. Objective Understanding of Front-of-Package Nutrition Labels among Nutritionally At-Risk Individuals. In *Nutrients*, vol. 7, no. 8, pp. 7106-7125. ISSN: 2072-6643. DOI: 10.3390/nu7085325
- Ducrot, P. 2016. Impact of Different Front-of-Pack Nutrition Labels on Consumer Purchasing Intentions: A Randomized Controlled Trial. In *American Journal of Preventive Medicine*, vol. 50, no. 5, pp. 627-636. ISSN: 1873-2607. DOI: 10.1016/j.amepre.2015.10.020
- Egnell, M. et al. 2018. Impact of Front-of-Pack Nutrition Labels on Portion Size Selection: An Experimental Study in a French Cohort. In *Nutrients*, vol. 10, no. 9, pp. 1268. ISSN: 2072-6643. DOI: 10.3390/nu10091268
- Egnell, M. et al. 2019. Modelling the impact of different front-of-package nutrition labels on mortality from non-communicable chronic disease. In *International Journal of Behavioral Nutrition and Physical Activity*, vol. 16, no. 1, pp. 56. ISSN: 1479-5868. DOI: 10.1186/s12966-019-0817-2
- Egnell, M. et al. 2019. Front-of-Pack Labelling and the Nutritional Quality of Students' Food Purchases: A 3-Arm Randomized Controlled Trial. In *American Journal of Public Health*, vol. 109, no. 8, pp. 1122-1129. ISSN: 1541-0048. DOI: 10.2105/AJPH.2019.305115
- Egnell, M. et al. 2021. Prospective associations of the original Food Standards Agency nutrient profiling system and three variants with weight gain, overweight and obesity risk: results from the French NutriNet-Santé cohort. In *British Journal of Nutrition*, vol. 125, no. 8, pp. 902-914. ISSN: 1475-2662. DOI: 10.1017/S0007114520003384
- Gómez, D. et al. 2020. Association between the nutrient profile system underpinning the Nutri-Score front-of-pack nutrition label and mortality in the SUN project: A prospective cohort study. In *Clinical Nutrition*, vol. 40, no. 3, pp. 1085-1094. ISSN: 0261-5614. DOI: 10.1016/j.clnu.2020.07.008
- Grunert, G., Wills, M. 2007. Informing Food Consumption Choices: Innovations in Measuring and Labelling. In *Journal of Public Health*, vol. 15, pp. 385-399. ISSN: 1741-3850. DOI: 10.1007/s10389-007-0101-9
- HISPACOOOP. 2020. *HISPACOOOP Study on Nutri-Score*. <https://www.eurocoop.coop/news/281-HISPACOOOP-Survey-on-Nutri-Score.html>
- Julia, Ch., Hercberg, S. 2018. Big Food's Opposition to the French Nutri-Score Front-of-Pack Labelling Warrants a Global Reaction. In *Am J Public Health*, vol. 108, no. 3, pp. 318-320. ISSN: 1541-0048. DOI: 10.2105/AJPH.2017.304284
- Julia, Ch., Hercberg, S. 2018. The policy dystopia model adapted to the food industry: the example of the Nutri-Score saga in France. In *World Nutrition*, vol. 9, no. 2, pp. 109-120. ISSN: 2041-9775. DOI: 10.26596/wn.201892109-120
- Julia, Ch. et al. 2017. Perception of different formats of front-of-pack nutrition labels according to sociodemographic, lifestyle and dietary factors in a French population: cross-sectional study among the NutriNet-Santé cohort participants. In *BMJ Open*, vol. 15, no. 7. ISSN: 2044-6055. DOI: 10.1136/bmjopen-2017-016108
- Julia, Ch. et al. 2015. Prospective associations between a dietary index based on the British Food Standard Agency nutrient profiling system and 13-year weight gain in the SU.VI.MAX cohort. In *Preventive Medicine*, vol. 81, pp. 189-194. ISSN: 1553-7404. DOI: 10.1016/j.ypmed.2015.08.022
- JULIA, Ch. et al. 2015. The Nutrient Profile of Foods Consumed Using the British Food Standards Agency Nutrient Profiling System Is Associated with Metabolic Syndrome in the SU.VI.MAX Cohort. In *The Journal of Nutrition*, vol. 145, no. 10, pp. 2355-2361. ISSN: 1541-6100. DOI: 10.3945/jn.115.213629
- Julia, Ch. et al. 2014. Application of the British Food Standards Agency nutrient profiling system in a French food composition database. In *British Journal of Nutrition*, vol. 112, no. 10, pp. 1699-1705. ISSN: 1475-2662. DOI: 10.1017/S0007114514002761
- Julia, Ch., Hercberg, S. 2016. Research and lobbying conflicting on the issue of a front-of-pack nutrition labelling in France. In *Archives of Public Health*, vol. 74, no. 51. ISSN: 2049-3258. DOI: 10.1186/s13690-016-0162-8
- Julia, Ch. et al. 2016. Validation of the FSA nutrient profiling system dietary index in French adults-findings from SUVIMAX study. In *European Journal of Nutrition*, vol. 55, no. 5, pp. 1901-1910. ISSN: 1436-6215. DOI: 10.1007/s00394-015-1006-y
- Julia, Ch. et al. 2015. Discriminating nutritional quality of foods using the 5-Color nutrition label in the French food market: consistency with nutritional recommendations. In *Nutrition Journal* vol. 14, no. 100. ISSN: 1475-2891. DOI: 10.1186/s12937-015-0090-4
- Mialon, M., Julia, Ch., Hercberg, S. 2018. The policy dystopia model adapted to the food industry: the example of the Nutri-Score saga in France. In *WPHNA*, vol. 9, no. 2. ISSN: 2041-9775. DOI: 10.26596/wn.201892109-120

- Ministere des Solidarites et de la Sante. *Nutri-Score: Etudes spécifiques pays-régions*. <https://solidarites-sante.gouv.fr/prevention-en-sante/preserver-sa-sante/nutrition/article/nutri-score-etudes-specifiques-pays-regions>
- Nutriscore laat zien: veel 'verantwoorde' tussendoortjes niet zo gezond. 2019. https://www.consumentenbond.nl/nieuws/2019/nutriscore-laat-zien-veel-verantwoorde-tussendoortjes-niet-zo-gezond?cid=ext_twitter_content_gripopjegezondheid_nutriscoreNB_201915_99AC
- Pionke, M. 2019. *Verbraucherschützer forcieren französische Ampel*. <https://www.agrarzeitung.de/nachrichten/politik/lebensmittelkennzeichnung-verbraucherschuetzer-forcieren-franzoesische-ampel-85687?crefresh=1>
- Rayner, M., Scarborough, P., Stockley, L. 2004. *Nutrient profiles: Options for Definitions For use in Relation to Food Promotion and Children's Diets*: Final report. London: Food Standard Agency.
- Rayner, M., Scarborough, P., Stockley, L. 2005. *Nutrient profiles: Applicability of Currently Proposed Model for Uses in Relation to Promotion of Foods to Children Aged 5–10 and Adults*: Final report. London: Food Standard Agency.
- Rayner, M., Scarborough, P., Lobstein, T. 2009. *The UK Ofcom Nutrient Profiling Model Defining 'healthy' and 'unhealthy' foods and drinks for TV advertising to children*. Oxford: University of Oxford. 11 p.
- Renaudin, M. 2017. *Evaluation ex ante de systemes d'étiquetage nutritionnel graphique simplifié : Rapport final du comite scientifique*. Paris : Ministère des Solidarites et de la Sante. 14 p.
- Sarda, B. et al. 2020. Appropriation of the Front-of-Pack Nutrition Label Nutri-Score across the French Population: Evolution of Awareness, Support, and Purchasing Behaviours between 2018 and 2019. In *Nutrients*, vol. 12, no. 9, pp. 2887. ISSN: 2072-6643. DOI: 10.3390/nu12092887
- Test Achat. 2020. <https://www.test-achats.be/action/espace-presse/communiques-de-presse/2020/peiling-nutri-score>
- Townsend, M. 2010. Where is the science? What will it take to show that nutrient profiling systems work? In *The American Journal of Clinical Nutrition*, vol. 91, no. 4, pp. 1109-1115. ISSN: 1938-3207. DOI: 10.3945/ajcn.2010.28450F
- WHO. 2020. *Manual to develop and implement front-of-pack nutrition labelling*. Denmark: WHO. 24 s. WHO/EURO: 2020-1569-41320-56234
- WHO. 2019. *Guiding principles and framework manual for front-of-pack labelling for promoting healthy diet*. Geneva: WHO. 46 s.
- WHO. 2020. *Appendix Manual to develop and implement front-of-pack nutrition labelling*. Copenhagen: WHO. 12 s. WHO/EURO: 2020 - 1570-41321-56235

Pod'akovanie: 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.

Kontaktná adresa: Ing. Tomáš Vlčko, Slovak University of Agriculture, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Department of Food Hygiene and Safety, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovakia, e-mail: tomas.vlcko@uniag.sk

**VARIABILITA OBSAHU ORGANICKÝCH KYSELÍN
VO VYBRANÝCH ODRODOVÝCH BIELYCH VÍNACH
SLOVENSKEJ PRODUKCIE
VARIABILITY OF ORGANIC ACIDS CONTENT IN SELECTED
MONOVARIETAL WHITE WINES OF THE SLOVAK PRODUCTION**

*Silvia Jakabová, Martina Fikselová, Zuzana Aláčová, Martin Marko, Andrea Mendelová,
Michal Ševčík*

Abstract: The wine acidity is an important wine attribute which is a result of composition and content of organic acids in wine. The organic acids greatly contribute to the organoleptic properties of grapes and wines. The profile and concentration of these primary metabolites are important parameters in relation to the processing of grape juices and wines and the determination of their chemical composition. In this work, organic acids (total acid content, malic and tartaric acids) of twelve monovarietal (Chardonnay, Pinot blanc and Pinot gris varieties) white wines of Slovak origin were studied. The wine samples were examined by FTIR method. Mean content of total acids varied between 4.63 ± 0.09 and 6.63 ± 0.05 g.l⁻¹, tartaric acid varied between 1.62 ± 0.09 and 2.93 ± 0.03 g.l⁻¹, malic acid was found in the concentration levels between 0.07 ± 0.05 and 2.50 ± 0.08 g.l⁻¹. The statistical significant differences were observed between the wines and wine-growing regions based on content of organic acids. Especially malic acid in particular proved to be an important marker of difference. Organic acids, their contents and ratios in wine are proving to be promising markers with usability in wine classification.

Keywords: white wines, organic acids, malic acid, tartaric acid, variability

ÚVOD

Organickým kyselinám sa v posledných rokoch venuje zvýšená pozornosť najmä v súvislosti s ich významom a zdraviu prospešným účinkom. Organické kyseliny sú prírodné látky, ktoré prispievajú k organoleptickým (chuť, farba a aróma) a bioaktívnym vlastnostiam (antioxidačná a antimikrobiálna aktivita) potravín ako aj významné ochranné účinky na myokard, ktoré boli preukázané napr. u kyseliny citrónovej a jablčnej (Nelson, Rush and Wilson, 2016; Tang et al., 2013, Daglia et al., 2007). Prirodzene sú organické kyseliny prítomné vo všetkých druhoch potravín, ako sú rôzne druhy ovocia a zeleniny, huby a nápoje ako džús, káva, čaj a víno (Robles et al., 2019). Organické kyseliny sú bohato zastúpené v hrozne, čo má za následok ich vysoký podiel vo víne. Podieľajú sa tak na zložení, stabilite a organoleptických vlastnostiach vína, a významne vplyvajú aj na konzervačné vlastnosti, akými sú mikrobiologická a fyzikálno-chemická stabilita, keďže obsah kyseliny vínnej je tiež kritickým kontrolným parametrom pri stabilizácii vína. (Ribéreau-Gayon et al., 2006; Robles et al., 2019; Do Nascimento Silva et al., 2015). Chemické zloženie hrozna a typ fermentácie sú tiež zodpovedné za výrazné rozdiely vo výsledných vínach pochádzajúcich z geograficky odlišných regiónov a rozdielnosť sa pripisuje aj rôznym pomerom medzi karboxylovými kyselinami (najmä jablčnej, vínnej, mliečnej a citrónovej) (Abrahamse & Bartowsky, 2011; Milovanovic et al., 2019; Ribereau-Gayon et al., 2006).

Hlavné organické kyseliny vo víne sú kyselina šťaveľová, vínna, mravčia, jablčná, octová, citrónová, fumarová, jantárová, galová a mliečna. Viac ako 90 % všetkých zastúpených organických kyselín v hrozne, a tým aj vo víne, predstavujú kyselina jablčná a vínna. Organické kyseliny sú hlavnými zložkami zodpovednými za kyslosť (pH okolo 3) a vyváženosť chuťových vlastností vína (Lima et al. 2010). Pokiaľ ide o preferencie

zákazníkov z hľadiska organoleptického a estetického charakteru, je potrebné udržiavať rovnováhu medzi obsahom cukru a kyselín vo víne (do Nascimento Silva et al., 2015).

Kyselina jablčná a vínna sú dve v hrozne najrozšírenejšie kyseliny, ich obsah sa často používa na určenie dátumu zberu, pretože každá kyselina sa počas procesu zrenia správa inak. Kým počas procesu zrenia obsah kyseliny jablčnej neustále klesá, obsah kyseliny vínnej zostáva takmer konštantný. Výsledkom sú rôzne pomery týchto kyselín počas dozrievania hrozna. Ideálny dátum zberu hrozna je možné určiť na základe pomeru kyseliny jablčnej a vínnej (Palma & Barroso, 2002). Organické kyseliny, ich obsahy a pomery je možné využívať aj ako markery pri klasifikácii vína, ako popisujú Milovanovič et al. (2019).

Analýza obsahu organických kyselín je možná viacerými metódami. Celkový obsah kyselín je definovaný ako koncentrácia organických kyselín v hrozne alebo vo víne (Boulton, 1980). Celková kyslosť sa tak môže definovať ako protónová ekvivalencia aniónov organických kyselín. Organické kyseliny z muštu alebo vína sú pomerne slabé a dá sa očakávať, že k ich neutralizácii silnou zásadou (napr. hydroxidom sodným) dôjde pri hodnotách pH nad 7,0. Podľa AOAC je úroveň pH v potenciometrických meraniach nastavená na 8,2, alebo je koncový bod stanovený pomocou titračného indikátora fenolftaleínu (Zoecklein, Fugelsang, Gump, & Nury, 1995). Celková kyslosť sa zvyčajne vyjadruje v gramoch kyseliny vínnej na liter (Darias-Martin a kol., 2003).

FTIR spektroskopia je v posledných rokoch jednou z rutinne používaných analytických metód v mnohých laboratóriách na monitoring vlastností vína. Umožňuje takmer okamžitú analýzu niekoľkých parametrov vína, zvyčajne s veľmi dobrou presnosťou a presnými výsledkami (Moreira a Santor, 2005; Regmi et al., 2012). Ide o nedeštruktívnu techniku, ktorá poskytuje informácie o molekulárnych vlastnostiach veľkého množstva zlúčenín. Jej hlavnými výhodami sú rýchlosť, vysoký stupeň automatizácie, stredné rozlíšenie, a efektívnosť z hľadiska vstupných nákladov (Bauer et al., 2008).

Cieľom príspevku bolo zhodnotiť obsahy organických kyselín (celkový obsah kyselín, obsah kyseliny jablčnej a vínnej) vo vzorkách bielych odrodových vín slovenskej produkcie a zistiť prípadnú súvislosť vo vzťahu k produkčnej oblasti, založenú na rozdielnosti v stanovených chemických ukazovateľoch.

MATERIÁL A METODIKA

Vzorky dvanástich akostných odrodových bielych vín (Chardonnay, Rulandské biele a Rulandské šedé, ročník 2018) pochádzali zo štyroch rôznych vinohradníckych oblastí Slovenska. Vzorky vína, vrátane charakteristiky z hľadiska obsahu zvyškového cukru a vinohradníckej oblasti sú opísané v tabuľke 1.

Stanovenie obsahu vybraných chemických parametrov vo vzorkách vín bolo vykonané pomocou analyzátora ALPHA Bruker Optik GMBH. Použili sme spektrometrickú metódu FT-IR (Fourier Transform Infrared Spectroscopy) s postupom merania ATR (Attenuated total reflect). Vzorky vína sa analyzovali bez ďalších úprav. Pred začiatkom merania sa ALPHA analyzátor prepláchol deionizovanou vodou a zmerala sa slepá vzorka – deionizovaná voda. Vzorka vína s objemom 20 ml sa pomocou aplikátora naniesla na meraciu hlavicu ALPHA analyzátora, kde sa vytemperovala na 40 °C a následne prebehlo meranie. Zmeralo sa spektrum v rozsahu vlnových dĺžok 0,78 – 1000 nm. Prístroj v priebehu 70 – 100 sekúnd vzorku vyhodnotil a výsledok bol zaznamenaný.

V štatistickom programe R sa realizovala analýza rozdielov jednotlivých vzoriek na úrovni vinohradníckych oblastí. Na testovanie rozdielnosti na základe chemických parametrov vo vzťahu k vinohradníckym oblastiam bola použitá ANOVA pre opakované merania. Rozdiely sa testovali na hladine významnosti $P < 0,05$. Hodnoty sa štandardizovali s priemernou hodnotou 0 a následne sa pre každý parameter testovali rozdiely medzi oblasťami.

Tabuľka 1 Charakterizácia vzoriek vína

Označenie vzorky	Odroda	Kategória vína z hľadiska obsahu zvyškového cukru	Vinohradnícka oblasť
CH1	Chardonnay	Suché	Južnoslovenská v.o.
CH2	Chardonnay	Suché	Stredoslovenská v.o.
CH3	Chardonnay	Suché	Malokarpatská v.o.
CH4	Chardonnay	Suché	Nitrianska v.o.
RB1	Rulandské biele	Suché	Južnoslovenská v.o.
RB2	Rulandské biele	Suché	Stredoslovenská v.o.
RB3	Rulandské biele	polosuché	Malokarpatská v.o.
RB4	Rulandské biele	polosuché	Nitrianska v.o.
RS1	Rulandské šedé	Suché	Južnoslovenská v.o.
RS2	Rulandské šedé	Suché	Stredoslovenská v.o.
RS3	Rulandské šedé	polosuché	Malokarpatská v.o.
RS4	Rulandské šedé	Suché	Nitrianska v.o.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

V prvej fáze boli hodnotené zmeny v obsahu vybraných organických kyselín (jablčná a vínna), ako aj celková kyslosť v bielych vínach zo štyroch rôznych slovenských vinohradníckych oblastí. Výsledky sú uvedené v tabuľke 2.

Najvyšší obsah celkových organických kyselín bol zaznamenaný vo vzorke Rulandského bieleho vína z Južnoslovenskej vinohradníckej oblasti ($6,63 \pm 0,05 \text{ g.l}^{-1}$), naopak najnižší obsah sa zistil u Rulandského šedého, pochádzajúceho z Nitrianskej vinohradníckej oblasti ($4,63 \pm 0,09 \text{ g.l}^{-1}$).

Obsah kyseliny vínnej, ktorá je vo víne najzastúpenejšou organickou kyselinou, bol najvyšší vo vzorke Chardonnay zo Stredoslovenskej vinohradníckej oblasti ($2,93 \pm 0,03 \text{ g.l}^{-1}$), najnižší obsah sme stanovili vo vzorkách Chardonnay a Rulandské šedé z Nitrianskej vinohradníckej oblasti.

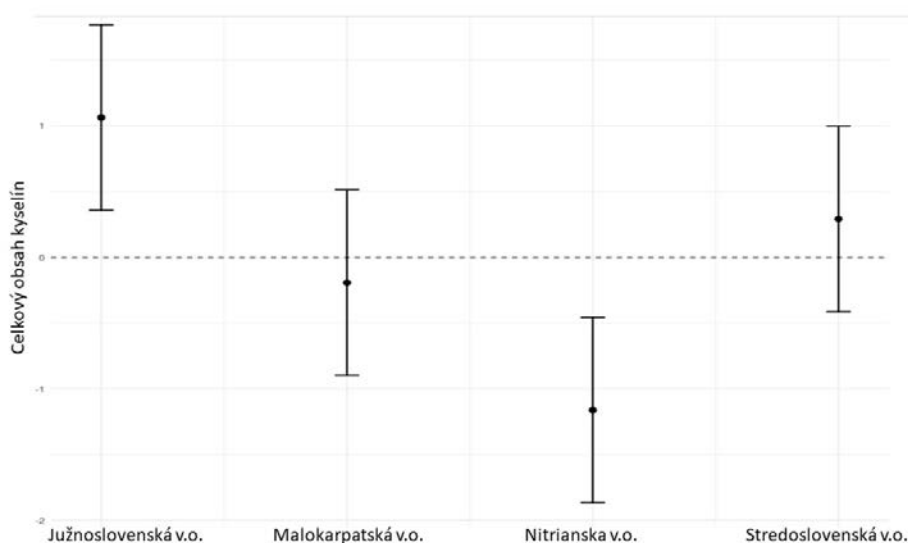
Tabuľka 2 Výsledky hodnotenia vína v obsahu kyselín [g.l^{-1}]

Vzorky vína	Celkový obsah kyselín	Kyselina vínna	Kyselina jablčná
	$\bar{x} \pm s_D$	$\bar{x} \pm s_D$	$\bar{x} \pm s_D$
CH1	$6,37 \pm 0,05$	$2,61 \pm 0,02$	$2,50 \pm 0,08$
CH2	$5,47 \pm 0,05$	$2,93 \pm 0,03$	$0,07 \pm 0,05$
CH3	$5,23 \pm 0,05$	$2,32 \pm 0,06$	$1,50 \pm 0,08$
CH4	$5,10 \pm 0,001$	$1,62 \pm 0,09$	$1,00 \pm 0,08$
RB1	$6,63 \pm 0,05$	$2,78 \pm 0,04$	$2,43 \pm 0,12$
RB2	$5,77 \pm 0,05$	$2,56 \pm 0,06$	$1,03 \pm 0,19$
RB3	$5,23 \pm 0,05$	$2,09 \pm 0,07$	$1,10 \pm 0,14$
RB4	$4,93 \pm 0,05$	$2,04 \pm 0,08$	$1,87 \pm 0,05$
RS1	$5,43 \pm 0,05$	$2,24 \pm 0,01$	$1,87 \pm 0,05$
RS2	$5,77 \pm 0,05$	$2,77 \pm 0,04$	$0,77 \pm 0,12$
RS3	$5,67 \pm 0,05$	$2,57 \pm 0,03$	$1,17 \pm 0,05$
RS4	$4,63 \pm 0,09$	$1,63 \pm 0,06$	$1,63 \pm 0,12$

Rajković, Novaković, Petrović (2007) uvádzajú celkový obsah kyselín v hroznovom mušte vo väčšine prípadov v rozmedzí 5,0-8,0 g.l⁻¹. Coelho et al. (2017) analyzovali obsah kyselín a cukrov v brazílskych vínach a zistili, že obsah celkových kyselín vo vzorkách bol od 3,60 do 7,58 g.l⁻¹.

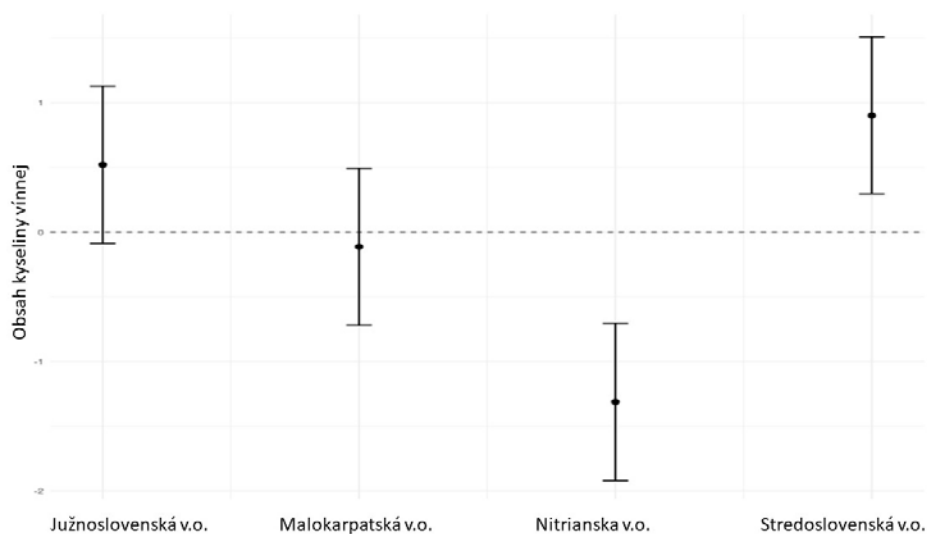
Obsah kyseliny vínnej uvádzajú autori Regmi et al. (2012) v koncentračnom rozmedzí 1,5 – 4,0 g.l⁻¹ a u kyseliny jablčnej sú bežne namerané koncentrácie v rozpätí 0 – 4,0 g.l⁻¹. Výsledky FTIR analýzy organických kyselín v bielych vínach v štúdiu publikovanej autormi Regmi et al. (2012) zistili, že kyselina vínna sa nachádzala v bielych vínach v rozmedzí medzi 1,01 - 3,0 g.l⁻¹ a kyselina jablčná sa pohybovala medzi 0,2 - 2,28 g.l⁻¹. Mato, Suárez-Luque & Huidobro (2007) uvádzali priemerný obsah kyseliny vínnej 3,09 g.l⁻¹ a kyseliny jablčnej 1,97 g.l⁻¹ v španielskych bielych vínach. Brazílske biele víno obsahovalo 1,05 – 1,36 g.l⁻¹ kyseliny vínnej a 1,12 – 2,63 g.l⁻¹ kyseliny jablčnej (Peres et al., 2009). Coelho et al. (2017) uvádzajú v brazílskych vínach zo severovýchodnej oblasti obsah kyseliny vínnej vo vínach a džúse v rozmedzí od 0,63 do 5,63 g.l⁻¹, pričom sa táto kyselina podieľala na vyše 50 % celkových stanovených kyselín. Koncentrácia kyseliny jablčnej sa pohybovala vo vzorkách vína od < 0,007 do 3,18 g.l⁻¹. Naše výsledky sú v súlade s publikovanými údajmi.

Rozdiely obsahov celkových kyselín v analyzovaných vzorkách boli štatisticky významné medzi vzorkami Južnoslovenskej a Nitrianskej vinohradníckej oblasti (P=0,0102). Ostatné regióny nevykazovali pri vzájomnom porovnaní štatisticky významné rozdiely. Vizualizáciu výsledkov zaznamenávajú obr. 1 – 3.

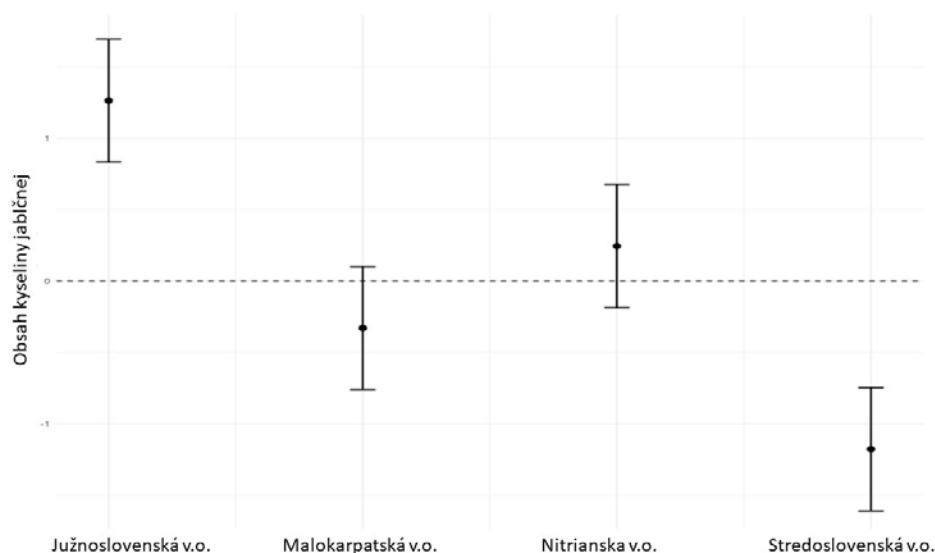


Obr.1 Rozdiely v obsahu celkových kyselín vo vzťahu k vinohradníckej oblasti

Analýza rozdielnosti vzoriek z hľadiska obsahu kyseliny vínnej poukázala na štatisticky významný rozdiel medzi vzorkami Južnoslovenskej a Nitrianskej vinohradníckej oblasti (P=0,0130) a medzi vzorkami Nitrianskej a Stredoslovenskej vinohradníckej oblasti (P=0,0043). Obsahy kyseliny jablčnej boli štatisticky významne rozdielne medzi Južnoslovenskou vinohradníckou oblasťou a Malokarpatskou v.o. (P= 0,0039), Nitrianskou v.o. (P= 0,0449) a aj Stredoslovenskou v.o. (P= 0,0002) a tiež medzi Nitrianskou a Stredoslovenskou v.o. (P= 0,0078).



Obr.2 Rozdiely v obsahu kyseliny vínnej vo vzťahu k vinohradníckej oblasti



Obr.3 Rozdiely v obsahu kyseliny jablčnej vo vzťahu k vinohradníckej oblasti

Získané informácie o organických kyselinách v analyzovaných vzorkách boli v súlade s typickými vlastnosťami bielych vín. Naše výsledky sú tiež v súlade so štúdiami autorov Zheng et al. (2009) a Robles et al. (2019), ktorí analyzovali obsah a zastúpenie organických kyselín vo vínach, pričom zistili, že oba parametre korelujú s odrodou hrozna, oblasťou vinárstva, technikami spracovania (najmä alkoholovým a mliečnym kvasením) a procesom starnutia.

ZÁVER

V súčasnosti je rastúci záujem o prírodné zlúčeniny s antioxidačnými, antimikrobiálnymi a protizápalovými vlastnosťami, medzi ktoré patria primárne a sekundárne rastlinné metabolity, ako sú organické kyseliny a polyfenoly. Analýza organických kyselín vo vínach je nevyhnutná na kontrolu kvality a tiež na sledovanie vývoja kyslosti v rôznych fázach výroby vína, pretože dôležité zmeny vo víne možno zistiť aj zmenami obsahu kyselín.

V nami sledovaných bielych akostných vínach sme zistili štatisticky významné rozdiely medzi obsahmi organických kyselín a vinohradníckymi oblasťami, odkiaľ vína pochádzali. Významným markerom rozdielnosti sa ukázala najmä kyselina jablčná. Organické kyseliny, ich obsahy a pomery sa ukazujú ako sľubné markery s využiteľnosťou pri klasifikácii vína, čo potvrdili aj ďalšie aktuálne štúdie zo sveta. Na implementáciu týchto potenciálnych chemotaxonomických parametrov je však nutný rozsiahlejší prieskum z hľadiska ich aplikácie pre bezpečné stanovenie pôvodu vín, nakoľko do systému vstupujú aj ďalšie premenné, ovplyvňujúce tvorbu primárnych a sekundárnych metabolitov v hrozne a tým aj ich obsah vo víne.

LITERATÚRA

- Abrahamse, C. E., Bartowsky, E. J. 2011. Timing of malolactic fermentation inoculation in Shiraz grape must and wine: Influence on chemical composition. In *World Journal of Microbiology and Biotechnology* [online], no. 28, pp. 255-265 [cit. 2021-16-02]. ISSN 1573-0972. Dostupné na: <https://doi.org/10.1007/s11274-011-0814-3>
- Bauer, R., Nieuwoudt, H., Bauer, F. F., Kossmann, J., Koch, K. R., Esbensen, K. H. 2008. FTIR spectroscopy for grape and wine analysis. In *Analytical Chemistry* [online], pp.1371-1379 [cit. 2021-08-02] Dostupné na: <https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/ac086051c>
- Boulton, R. B. 1980. The general relationship between potassium, sodium and pH in grape juice. In *American Journal of Enology and Viticulture* [online], vol. 3, no.2, pp. 182–186 [cit. 2021-08-02] Dostupné na: <https://www.ajevonline.org/content/31/2/182.short>
- Coelho, E. M., da Silva Padilha, C. V., Miskinis, G.A., de Sá, A. G. B., Pereira, G. E., de Azevêdo, L. C., dos Santos Lima, M., 2018. Simultaneous analysis of sugars and organic acids in wine and grape juices by HPLC: Method validation and characterization of products from northeast Brazil. In *Journal of Food Composition and Analysis* [online], no.66, pp.160-167 [cit. 2021-16-02]. ISSN: 0889-1575 Dostupné na: <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2017.12.017>
- Daglia, M., Papetti, A., Grisoli, P., Aceti, C., Dacarro, C., Gazzani, G. 2007. Antibacterial activity of red and white wine against oral streptococci. In *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online], vol. 55, no.13, pp. 5038-5042 [cit. 2021-08-02]. ISSN 1520-5118. Dostupné na: <https://doi.org/10.1021/jf070352q>
- Darias-Martín, J., Socas-Hernández, A., Díaz-Romero, C. and Díaz-Díaz, E., 2003. Comparative study of methods for determination of titrable acidity in wine. In *Journal of Food Composition and Analysis* [online], vol. 16, no.5, pp. 555-562 [cit. 2021-08-02]. ISSN 0889-1575. Dostupné na: [https://doi.org/10.1016/S0889-1575\(03\)00032-2](https://doi.org/10.1016/S0889-1575(03)00032-2)
- Do Nascimento Silva, F. L., Schmidt, E. M., Messias, C. L., Eberlin, M. N., Sawaya, A. C. H. F. 2015. Quantitation of organic acids in wine and grapes by direct infusion electrospray ionization mass spectrometry. In *Analytical Methods* [online], vol.7, no.1, pp. 53-62. [cit. 2021-08-02]. ISSN 1759-9679. Dostupné na: <https://doi.org/10.1039/C4AY00114A>
- Lima, L. L., Schuler, A., Guerra, N. B., Pereira, G. E., Lima, T. L., Rocha, H. 2010. Optimization and validation method for organic acid determination in wines by high performance liquid chromatography. In *Química Nova* [online], vol. 33, no.5, pp.1186-1189. [cit. 2021-08-02]. ISSN 1678-7064. Dostupné na: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422010000500032>
- Mato, I., Suárez-Luque, S., Huidobro, J. F. 2007. Simple determination of main organic acids in grape juice and wine by using capillary zone electrophoresis with direct UV detection. In *Food Chemistry* [online], vol. 102, no. 1, pp. 104-112. [cit. 2021-08-02]. ISSN 0308-8146. Dostupné na: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.05.002>
- Moreira, J. L., Santos, L. 2005. Analysis of organic acids in wines by Fourier-transform infrared spectroscopy. In *Analytical and Bioanalytical Chemistry* [online], vol. 382, no. 2, pp. 421-425. [cit. 2021-08-02]. ISSN 1618-2642. Dostupné na: <https://doi.org/10.1007/s00216-005-3062-2>
- Milovanovic, M., Žeravík, J., Obořil, M., Pelcová, M., Lacina, K., Cakar, U., Petrovic, A., Glatz, Z., Skládal, P. 2019. A novel method for classification of wine based on organic acids. In *Food Chemistry* [online], no. 284, pp.296-302. [cit. 2021-08-02]. ISSN 0308-8146. Dostupné na: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.01.113>
- Nelson, H. N., Rush, K. L., Wilson, T. (2016). *Functions of common beverage ingredients*. In *Beverage Impacts on Health and Nutrition*. Cham: Humana Press, pp. 317-329 ISBN 978-3-319-23672-8. Dostupné na: https://doi.org/10.1007/978-3-319-23672-8_22
- Palma, M., Barroso, C. G. 2002. Ultrasound-assisted extraction and determination of tartaric and malic acids from grapes and winemaking by-products. In *Analytica Chimica Acta* [online], vol. 458, no.1, pp. 119-130. [cit. 2021-08-02]. ISSN 0003-2670. Dostupné na: [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(01\)01527-6](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(01)01527-6)

- Peres, R. G., Moraes, E. P., Micke, G. A., Tonin, F. G., Tavares, M. F. M., Rodriguez-Amaya, D. B. 2009. Rapid method for the determination of organic acids in wine by capillary electrophoresis with indirect UV detection. In *Food Control* [online], vol. 20, no.6, pp. 548-552. [cit. 2021-08-02]. ISSN 0956-7135. Dostupné na: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2008.08.004>
- Rajković, M. B., Novaković, I. D., Petrović, A. 2007. Determination of titratable acidity in white wine. In *Journal of Agricultural Sciences (Belgrade)* [online], vol. 52, no.2, pp.169-184. [cit. 2021-08-02]. ISSN 2406-0968. Dostupné na: <https://scindeks-clanci.ceon.rs/data/pdf/1450-8109/2007/1450-81090702169R.pdf>
- Regmi, U., Palma, M., Barroso, C. G. (2012). Direct determination of organic acids in wine and wine-derived products by Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy and chemo metric techniques. In *Analytica Chimica Acta* [online], no.732, pp.137-144 [cit. 2021-08-02]. ISSN 0003-2670. Dostupné na: <https://doi.org/10.1016/j.aca.2011.11.009>
- Ribéreau-Gayon, P., Glories, Y., Maujean, A., Dubourdieu, D. 2006. *Handbook of Enology, Volume 2: The Chemistry of Wine-Stabilization and Treatments*. Chichester, England: John Wiley & Sons Ltd., pp. 450. ISBN – 13: 978-0-470-01037-2.
- Robles, A., Fabjanowicz, M., Chmiel, T., Plotka-Wasyłka, J. 2019. Determination and identification of organic acids in wine samples. Problems and challenges. In *TrAC Trends in Analytical Chemistry* [online], no. 120, p.115630. [cit. 2021-08-02]. ISSN 0165-9936. Dostupné na: <https://doi.org/10.1016/j.trac.2019.115630>
- Tang, X., Liu, J., Dong, W., Li, P., Li, L., Lin, C., Zheng, Y., Hou, J., Li, D., 2013. The cardio protective effects of citric acid and L-malic acid on myocardial ischemia/reperfusion injury. In *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* [online], vol. 2013, pp. 1-11 [cit. 2021-08-02]. ISSN 1741-4288. Dostupné na: <https://doi.org/10.1155/2013/820695>
- Zheng, Y. J., Duan, Y. T., Zhang, Y. F., Pan, Q. H., Li, J. M., Huang, W. D. 2009. Determination of organic acids in red wine and must on only one RP-LC-column directly after sample dilution and filtration. In *Chromatographia* [online], vol. 69, no. 11, pp.1391-1395. [cit. 2021-08-02]. ISSN 1612-1112. Dostupné na: <https://doi.org/10.1365/s10337-009-1085-0>
- Zoecklein, B. W., Fugelsang, K. C., Gump, B. H., Nury, F. S. 1995. *Wine analysis and production*. New York: Chapman & Hall. pp. 620 ISBN 978-1-4757-6969-2.

Pod'akovanie: Analýzy a príspevok vznikli s finančnou podporou projektu Agentúry pre podporu výskumu a vývoja – projekt č. APVV-19-0180, projektu KEGA č. 017/SPU-4/2019 a pod'akovanie patrí tiež Výskumnému Centru AgroBioTech SPU za vykonanie FTIR analýz.

Kontaktná adresa: Silvia Jakobová, PaedDr. PhD, Centrum BioFood, Fakulta biotechnológií a potravinárstva, Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre, Tr. A. Hlinku 2, 94976 Nitra, e-mail: silvia.jakabova@uniag.sk

BIODIVERZITA LOKÁLNYCH GENETICKÝCH ZDROJOV HOVÄDZIEHO DOBYTKA AKO SÚČASŤ POTRAVINOVEJ BEZPEČNOSTI SLOVENSKA

BIODIVERSITY OF LOCAL GENETIC RESOURCES OF CATTLE AS A PART OF FOOD SAFETY SYSTEM IN SLOVAKIA

*Radovan Kasarda, Jozef Golian, Ľuboš Vostrý, Hana Vostrá-Vydrová, Radoslav Židek,
Lubomír Belej, Nina Moravčíková*

Abstract: The aim of the study was to assess the level of diversity of selected cattle breeds, which are part of the genetic resources used in agriculture for food production of animal origin and food safety system in Slovakia. The genomic data of overall five breeds were evaluated in this study. The analysis of specific genetic variants distributed in their genomes allowed for fine-scale differentiation of their gene pool, especially in the case of genes related to carcass traits. Charolais genome differs significantly from others, mainly due to CAPN1 gene polymorphism. On the other hand, Slovak Spotted cattle showed specific alleles in several genomic regions, including PLAG1, SREBP1, LCORL, MYF5 and MYOD genes. Testing of genetic differentiation depending on the genes responsible for the fatty acid profile did not show significant differences between breeds. Animal genetic resources diversity has a great effect on the functionality and sustainability of food resources production systems. Thus, analysis of known and novel genetic variants continually contributes to knowledge of genetic control of those complex traits, usually affected by several genes or QTLs. Moreover, such analyses of specific genetic variants could help to protect local livestock populations in their original phenotype.

Keywords: carcass traits, fatty acids profile, genetic predisposition, genome-wide analysis

ÚVOD

Diverzita živočíšnych genetických zdrojov má obrovský vplyv na funkčnosť a udržateľnosť produkcie potravinových zdrojov a potravín pre ľudí. Tento systém priamym spôsobom zabezpečuje aj mimo produkčné úlohy, ktoré súvisia s udržateľnosťou prírodného prostredia a prispievajú k zdraviu, výžive a potravinovej bezpečnosti krajiny prostredníctvom celého spektra domestikovaných a voľne žijúcich potravinových zdrojov. V prípade hospodárskych zvierat, tieto zabezpečujú udržateľnosť a rezistenciu voči prudkým výkyvom resp. výpadkom príjmov v dôsledku vývoja na trhu ale aj tých spôsobených prírodnými podmienkami (Féron, 1995; Thrupp, 2000; FAO, 2019).

V posledných desaťročiach bol zaznamenaný významný pokles živočíšnej genetickej premenlivosti a to nielen v lokálnom ale aj v globálnom meradle. Táto doslova genetická erózia je spôsobená vysokým selekčným tlakom na špecializáciu v danom smere úžitkovosti, čo favorizuje využívanie nízkeho počtu vysoko výkonných plemien (Hoffmann, 2011). Je potrebné zdôrazniť, že intenzívna selekcia „najlepších“ plemenníkov a široké používanie inseminácie v rámci aktívnej populácie kráv vedie k redukcii vnútro-populačnej genetickej diverzity plemien aj v súčasnosti. Z tohto dôvodu sa monitorovanie stavu genetickej diverzity hospodárskych zvierat stalo nevyhnutnou súčasťou šľachtiteľských programov a to najmä v prípade lokálnych, ohrozených plemien, ktoré sú dôležité pre udržateľnosť na regionálnej úrovni a zároveň sú súčasťou kultúrneho dedičstva (NAWA, 2020; Kasarda, Jamborová a Moravčíková, 2020).

CIEĽ PRÁCE A STAV RIEŠENEJ PROBLEMATIKY

Cieľom práce bolo posúdiť úroveň diverzity selektovaných plemien hovädzieho dobytku, ktoré sú súčasťou genetických zdrojov využívaných v poľnohospodárstve na produkciu potravín živočíšneho pôvodu a podieľajúcich sa na potravinovej bezpečnosti na Slovensku.

Vo všeobecnosti je živočíšna biodiverzita chápaná na úrovni rozdielov medzi jednotlivými druhmi, plemenami, chovnými líniami alebo rodinami. Tento termín sa často používa aj na vyjadrenie rozdielnosti jedincov na úrovni fenotypu, v podobe viditeľných a merateľných produkčných a reprodukčných znakov a vlastností, zdravotného stavu alebo tzv. reprodukčného fitnes. Na druhej strane môže byť diverzita ovplyvnená genetickými zmenami, ktoré spôsobujú ustálenie dedičnosti znakov a vlastností dobytku v dôsledku procesu domestikácie a zošľachtovania, ktoré nie sú navonok merateľné. Preto je na stanovenie úrovne genetickej diverzity možné použiť aj iné nástroje a miery ako napr. hodnotenie úrovne intenzity príbuzenskej plemenitby, vyjadrenie efektívnej veľkosti populácie alebo miery vnútro a medzi populačnej diferenciácie (Wang, Santiago a Caballero, 2016; Baes et al., 2019; Kukučková et al., 2017).

Vnútro-populačnú diverzitu je možné charakterizovať na základe genetických rozdielov medzi subpopuláciami ale aj rozdielmi medzi jedincami populácie. Existencia vnútro-populačného polymorfizmu má významnú úlohu v ekológii ako aj mikro- a makro-evolučných procesoch. Z ekologického hľadiska, polymorfné populácie môžu lepšie využívať prírodné zdroje, teda lepšie prosperovať v danom produkčnom prostredí. Popri tom sú polymorfné populácie menej náchylné na zmeny vonkajšieho prostredia, resp. majú lepšiu adaptačnú schopnosť genómu vzhľadom na podmienky prostredia. Zároveň majú polymorfné populácie schopnosť lepšie reagovať na krátkodobý selekčný tlak spôsobený prostredím (Vellend a Geber, 2005; Wennersten a Forsman, 2012). Unikátnosť populácií je možné vyjadriť aj ako genetickú vzdialenosť, ktorá zohľadňuje existenciu vzácných alel (ktorými sa odlišujú od iných populácií), či už v dôsledku inbrídingu, vplyvu zakladateľov alebo geografickej izolácie (Eding, 2008; Hall et al., 2012).

Prudký rozvoj technológií v oblasti sekvenovania genómu a analýz DNA viedol k vývoju presnejších parametrov určených na odhad úrovne genetickej diverzity, vrátane intenzity príbuzenskej plemenitby, efektívnej veľkosti populácie a genetickej príbuznosti. Ako sa preukázalo, tak tieto nové metódy je možné úspešne implementovať aj na úrovni lokálnych málopočetných populácií hospodárskych zvierat a zvýšiť tak efektivitu ich manažmentu (Toro, Villanueva a Fernández, 2014).

MATERIÁL A METODIKA

Testovali sme úroveň biodiverzity piatich plemien hovädzieho dobytku s použitím genomických dát. Celkovo bolo analyzovaných 356 vzoriek DNA, ktoré boli genotypované s použitím rôznych SNP mikročipov v závislosti od úžitkového typu jednotlivých plemien (Tab. 1). Zvieratá boli selektované v spolupráci s príslušnými chovateľskými zväzmi s cieľom, čo najpresnejšie zachytiť genofond analyzovaných plemien (plemenné jadro) s ohľadom na najčastejšie využívané otcovské línie a materské rodiny na Slovensku. Na základe kontroly vstupných údajov, realizovanej pomocou programu PLINK 1.9 (Chang et al., 2015), boli z databázy vylúčené všetky SNP markery lokalizované na pohlavných chromozómoch, markery s neznámou pozíciou v bovinnom genóme ako aj SNP lokusy, ktorých úspešnosť genotypovania (call rate) bola nižšia ako 90%.

Tabuľka 1. Zdroje celogenómových dát a veľkosť vzorky analyzovaných plemien

Plemeno	Skratka	Úžitkový typ	N	Použitá platforma
Jersey	JER	Mliekový	29	GeneSeek GGP Bovine 150k
Charolais	CHAR	Mäsový	71	International Dairy & Beef Chip
Limousin	LIM	Mäsový	17	International Dairy & Beef Chip
Slovenský pinzgausky	SP	Kombinovaný	152	BovineSNP50v1 BeadChip
Slovenský strakatý	SS	Kombinovaný	87	BovineSNP50v1 BeadChip International Dairy & Beef Chip

Analýza genetickej diferenciácie bola založená na predpoklade, že frekvencia špecifických alel (haplotypov) je rozdielna v závislosti od plemena a to v dôsledku umelej selekcie zameranej na rozdielne fenotypové vlastnosti, ktorej výsledkom je súčasná špecializácia plemien. K špecifickým zmenám v genóme došlo hlavne v úsekoch DNA, ktoré zodpovedajú za ekonomicky dôležité znaky. Genetická diferenciácia bola analyzovaná s osobitným dôrazom na jatočné ukazovatele a profil mastných kyselín v mäse. V prvom kroku boli na základe dostupných štúdií identifikované proteín-kódujúce gény s preukazným vplyvom na vybrané znaky a vlastnosti (Tab. 2). Chromozómová pozícia týchto génov bola determinovaná pomocou balíka *R ensembl* (Rainer, Gatto a Weichenberger, 2019). V ďalšom kroku boli z databázy SNP údajov vyselektované všetky markery lokalizované priamo v sekvenciách vybraných génov. Následne bola databáza rozdelená na dve časti a to v závislosti od jednotlivých génov a fenotypových vlastností, ktoré kontrolujú. Genetická diferenciácia bola nakoniec testovaná na základe analýzy základných komponentov a faktorovou analýzou pomocou programu R (R Core Team, 2020). V prípade faktorovej analýzy bol každý zo selektovaných génov hodnotený ako individuálny faktor, ktorý potenciálne ovplyvňuje genetickú štruktúru (frekvenciu daných alel v haplotype) analyzovaných populácií.

Tabuľka 2. Proteín-kódujúce gény použité na testovanie genetickej diferenciácie

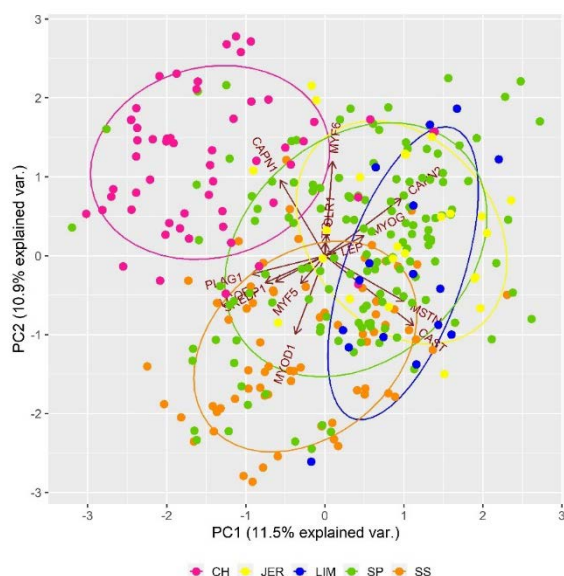
Vlastnosť	Označenie génu	Chr	Start position (bp)	End position (bp)	Počet SNP V regióne
Jatočné ukazovatele	MSTN	2	6278630	6285486	2
	LEP	4	92436922	92453653	2
	MYF6	5	10275115	10277301	2
	MYF5	5	10284434	10287669	2
	OLR1	5	99803497	99815138	2
	LCORL	6	37380296	37557106	6
	CAST	7	96033978	96167151	1
	CAPN3	10	37711578	37766813	1
	TG	14	8217490	8453614	5
	PLAG1	14	23330541	23375751	1
	MYOD1	15	34794122	34796767	2
	MYOG	16	797547	800444	2
	CAPN2	16	27079890	27138327	2

Profil mastných kyselín	SREBP1	19	34633133	34649213	2
	CAPN1	29	43400333	43427397	2
	FABP3	2	122285620	122294666	2
	SLC27A6	7	25037025	25117897	2
	FABP1	11	47917375	47923252	2
	FABP4	14	44676542	44681059	2
	SREBP1	19	34633133	34649213	2
	FASN	19	50775674	50796012	2
	SCD	26	21263727	21279185	2

VÝSLEDKY A DISKUSIA

V dôsledku nízkej kvality genotypovania bolo z databázy vyradených šesť zvierat. Konečná databáza obsahovala informácie o 350 zvieratách a 34384 SNP markeroch pokrývajúcich 2503277,76 kbp autozomálneho genómu. Priemerná vzdialenosť medzi SNP markermi bola $72,86 \pm 80,15$ kbp. Priemerná úroveň genotypovania (call rate) dosiahla hodnotu 98,97 %.

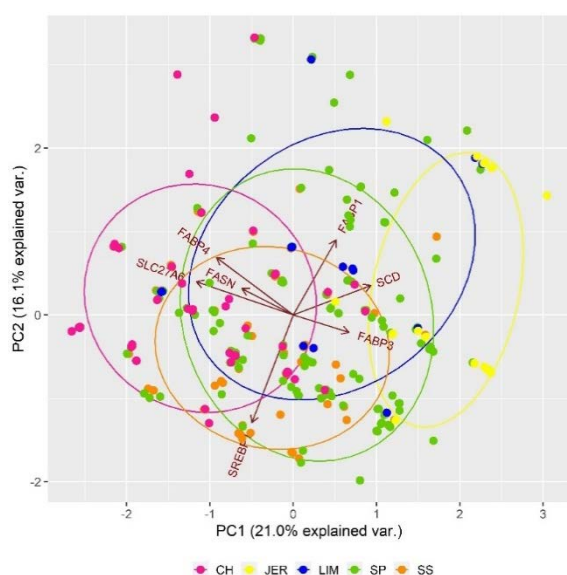
Na obrázku 1 je možné vidieť genetickú diferenciáciu analyzovaných populácií v dôsledku polymorfizmu génov (špecifická frekvencia haplotypov) ovplyvňujúcich jatočné ukazovatele hovädzieho dobytku. Jatočné ukazovatele, vrátane mramorovania, krehkosti a farby mäsa sú kritickými parametrami, ktoré sú zvyčajne používané na hodnotenie čerstvosti, kuchynskej kvality a bezpečnosti výrobkov z hovädzieho mäsa. Ako je možné vidieť, tak variabilita založená na genetickom polymorfizme monitorovaných génov umožnila identifikovať individuálne rozdiely medzi populáciami a to najmä v prípade plemena charolais. Charolais sa odlišuje od ostatných populácií hlavne v dôsledku frekvencie alel markerov lokalizovaných v oblasti génu CAPN1 (μ -calpain), ktorý je zodpovedný za proces postmortálneho zrenia (Koohmarie, 1996). Calpaíny (CAPN1, CAPN2, CAPN3), vrátane ich endogénnych inhibítorov calpastatínov (CAST), boli v predchádzajúcich štúdiách štatisticky významne asociované s krehkosťou mäsa (Casas et al., 2003; Li et al., 2013) a skóre za mramorovanie (Cheong et al., 2008). Získané výsledky rovnako preukázali, že genetický polymorfizmus génov PLAG1, SREBP1, LCORL, MYF5 a MYOD čiastočne zodpovedal za diferenciáciu slovenského strakatého dobytku, pričom gény PLAG1 a LCORL boli v minulosti signifikantne asociované s jatočnou kvalitou plemien švajčiarsky simentál, charolais a limousin (Lee et al., 2016; Song et al., 2016; Moravčíková et al., 2019; Purfield, Evans a Berry, 2019). V strede genetických zhlukov boli lokalizované jedince plemena jersey a slovenského pinzgauského dobytku v dôsledky polymorfizmu génov LEP, OLR1, CAPN3, CAPN2, TG, MYF6 a MYOG.



Obrázok 1. Vplyv polymorfizmu SNP markerov v oblasti génov ovplyvňujúcich jatočné ukazovatele na genetickú diferenciáciu analyzovaných populácií

Obrázok 2 znázorňuje inter-populačnú diferenciáciu na základe polymorfizmu SNP markerov v oblasti génov ovplyvňujúcich profil mastných kyselín vo svalovine. Profil mastných kyselín v tukovom tkanive dobytka je veľmi dôležitým znakom, ktorý ovplyvňuje chuť, krehkosť a celkovú kulinársku kvalitu hovädzieho mäsa. Na základe získaných výsledkov je možné konštatovať, že individuálnu variabilitu nie je v tomto prípade možné zovšeobecniť na

populačnej úrovni. Celkovo bol študovaný polymorfizmus siedmich génov (Tab. 2). Gény rodiny FABP reprezentovali v tejto štúdii FABP1, FABP3 a FABP4, ktoré ovplyvňujú rozličné bunkové procesy, vrátane metabolizmu lipidov. Proteín FABP3 bol identifikovaný vo viacerých tkanivách s vysokými nárokmi na mastné kyseliny ako napr. srdcové a kostrové svalstvo resp. tkanivo mliečnej žľazy počas laktácie. Gény FABP3 a FABP4, exprimované v tukovom tkanive boli asociované s metabolizmom lipidov (lipolýza a lipogenéza), mramorovaním a ukladaním chrbtovej slaniny (Blecha et al., 2015). Polymorfizmus v FABP1, FABP3 a FABP4 môže ovplyvniť citlivosť na príjem mastných kyselín z krvi a ich transport do epitelových buniek (Nafikov et al., 2013). Polymorfizmus génu FASN, ktorý kóduje syntézu mastných kyselín, ovplyvňuje koncentráciu mononenasýtených a nasýtených mastných kyselín v hovädzom mäse (Oh et al., 2012). Viaceré štúdie potvrdili efekt génov bovinnej stearoyl-CoA desaturázy (SCD) a SREBP1 (sterol regulatory element-binding protein) na profil mastných kyselín (Rincon et al., 2012; Gamarra et al., 2018).



Obrázok 2. Vplyv polymorfizmu SNP markerov v oblasti génov zodpovedných za profil mastných kyselín na genetickú diferenciáciu analyzovaných populácií

ZÁVER

Efekt špecializácie plemien a rozdielneho selekčného tlaku na genomické regióny asociované z ekonomicky dôležitými vlastnosťami bol najviditeľnejší v prípade plemena charolais. Dosiahnuté výsledky potvrdili predpoklad, že úžitkový typ analyzovaných plemien môže zodpovedať za rozdielnú frekvenciu špecifických alel (haplotypov) zodpovedných za fenotypový

prejav. Analýza známych a nových genetických variant kontinuálne prispieva k poznaniu genetickej kontroly týchto komplexných znakov a vlastností, ktoré sú zvyčajne ovplyvnené viacerými génmi alebo QTL lokusmi. Navyše, takéto analýzy špecifických genetických variant

môžu napomôcť pri uchovávaní genetickej podstaty lokálnych populácií dobytká v ich originálnom fenotype.

LITERATÚRA

- Baes, Christine et al. 2019. Symposium review: The genomic architecture of inbreeding: How homozygosity affects health and performance. In *Journal of Dairy Science*, vol. 102, no. 3, pp. 2807-2817. ISSN 0022-0302.
- Blecha, Isabella Maiumi Zaidan et al. 2015. Identification and evaluation of polymorphisms in FABP3 and FABP4 in beef cattle. In *Genetics and Molecular Research*, vol. 14, no. 4, pp. 16353-16363. ISSN 1676-5680.
- Casas, Eduardo et al. 2003. Detection of quantitative trait loci for growth and carcass composition in cattle. In *Journal of animal science*, vol. 81, no. 12, pp. 2976-2983. ISSN 1525-3163.
- Eding, Herwin. 2008. *Conservation of Genetic Diversity: assessing genetic variation using marker estimated kinships*. Wageningen: Wageningen University. 120 p. ISBN 9789058085566-119.
- Féron, Erik. 1995. New food sources, conservation of biodiversity and sustainable development: can unconventional animal species contribute to feeding the world?. In *Biodiversity and Conservation*, vol. 4, pp. 233-240. ISSN 1572-9710.
- FAO. 2019. *The biodiversity that is crucial for our food and agriculture is disappearing by the day* [online]. [cit. 2021-01-05]. Dostupné na: <http://www.fao.org/news/story/en/item/1180463/icode/>
- Gamarra, David et al. 2018. Distinct correlations between lipogenic gene expression and fatty acid composition of subcutaneous fat among cattle breeds. In *BMC Veterinary Research*, vol. 14, pp. 167. ISSN 1746-6148.
- Hall, Stephen et al. 2012. The European Cattle Genetic Diversity Consortium. Prioritization based on neutral genetic diversity may fail to conserve important characteristics in cattle breeds. In *Journal of Animal Breeding and Genetics*, vol. 129, no. 4, pp. 218-225. ISSN 1439-0388.
- Hoffmann, Irene. 2011. Livestock biodiversity and sustainability. In *Livestock Science*, vol. 139, no. 1-2, pp. 69-79. ISSN 1871-1413.
- CHANG, Christopher et al. 2015. Second-generation PLINK: rising to the challenge of larger and richer datasets. In *GigaScience*, vol. 4, pp. 7. ISSN 2047-217X.
- Cheong, Hyun Sub et al. 2008. Single nucleotide polymorphism in CAPN1 associated with marbling score in Korean cattle. In *BMC Genetics*, vol. 9, pp. 33. ISSN 1471-2156.
- Kasarda, Radovan – Jamborová, Ľubica – Moravčíková, Nina. 2020. Genetic diversity and production potential of animal food resources. In *Acta Fytotechnica et Zootechnica*, vol. 23, pp. 102-108. ISSN 1336-9245.
- Koohmaraie, Mohammad. 1996. Biochemical factors regulating the toughening and tenderization processes of meat. In *Meat Science*, vol. 43, pp. 193-201. ISSN 0309-1740.
- Kukučková, Veronika et al. 2017. Genomic characterization of Pinzgau cattle: genetic conservation and breeding perspectives. In *Conservation Genetics*, vol. 18, pp. 893-910. ISSN 1572-9737.
- Lee, Seung Hwan et al. 2013. Genome-wide association study identifies major loci for carcass weight on BTA14 in Hanwoo (Korean cattle). In *PLoS One*, vol. 8, pp. e74677. ISSN 1932-6203.
- Li, Xin et al. 2013. Association of polymorphisms at DGAT1, leptin, SCD1, CAPN1 and CAST genes with color, marbling and water holding capacity in meat from beef cattle populations in Sweden. In *Meat Science*, vol. 94, no. 2, pp. 153-158. ISSN 0309-1740.
- Moravčíková, Nina et al. 2019. Analysis of selection signatures in the beef cattle genome. In *Czech Journal of Animal Science*, vol. 64, pp. 491-503. ISSN 1212-1819.
- Nafikov, Rafael et al. 2013. Association of polymorphisms in solute carrier family 27, isoform A6 (SLC27A6) and fatty acid-binding protein-3 and fatty acid-binding protein-4 (FABP3 and FABP4) with fatty acid composition of bovine milk. In *Journal of Dairy Science*, vol. 96, pp. 6007-6021. ISSN 0022-0302.
- NAWA. 2020. *Cultural heritage of small homelands (2018-2021)* [online]. [cit. 2021-01-05]. Dostupné na: <https://foodheritage.urk.edu.pl>

- Oh, Dongyep et al. 2012. Fatty acid composition of beef is associated with exonic nucleotide variants of the gene encoding FASN. In *Molecular Biology Reports*, vol. 39, no. 4, pp. 4083-4090. ISSN 1573-4978.
- Purfield, Deirdre C. – Evans, Ross D. – Berry, Donagh P. 2019. Reaffirmation of known major genes and the identification of novel candidate genes associated with carcass-related metrics based on whole genome sequence within a large multi-breed cattle population. In *BMC Genomics*, vol. 20, no. 1, pp. 720. ISSN 1471-2164.
- R Core Team. 2020. *R: A language and environment for statistical computing* [softvér]. [prístup 2020-01-05]. Dostupné na: <https://www.r-project.org>
- Rainer, Johannes – Gatto, Laurent – Weichenberger, Christian X. 2019. Ensemble db: and R package to create and use Ensembl-based annotation resources. In *Bioinformatics*, vol. 35, no. 17, pp. 3151-3153. ISSN 1460-2059.
- Rincon, Gonzalo et al. 2012. Polymorphisms in genes in the SREBP1 signalling pathway and SCD are associated with milk fatty acid composition in Holstein cattle. In *Journal of Dairy Science*, vol. 79, no. 1, pp. 66-75. ISSN 0022-0302.
- Song, Yuxin et al. 2016. Genome-Wide Association Study Reveals the PLAG1 Gene for Knuckle, Biceps and Shank Weight in Simmental Beef Cattle. In *Plos One*, vol. 11, e0168316. ISSN 1932-6203.
- Thrupp, Lori Ann. 2000. Linking Agricultural Biodiversity and Food Security: The Valuable Role of Sustainable Agriculture. In *International Affairs*, vol. 2, pp. 265-281. ISSN 1468-2346.
- Toro, Miguel A. – Villanueva, Beatriz – Fernández, Jesús. 2014. Genomics applied to management strategies in conservation programmes. In *Livestock Sciences*, vol. 166, p. 48-53. ISSN 1871-1413.
- Vellend, Mark – Geber, Monika A. 2005. Connections between species diversity and genetic diversity. In *Ecology Letters*, vol. 8, pp. 767-781. ISSN 1461-0248.
- Wang, J. – Santiago, Enrique – Caballero, Armando. 2016. Prediction and estimation of effective population size. In *Heredity*, vol. 117, pp. 193-206. ISSN 1365-2540.
- Wennersten, Lena – Forsman, Anders. 2012. Population-level consequences of polymorphism, plasticity and randomized phenotype switching: a review of predictions. In *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*, vol. 87, pp. 756-767. ISSN 1469-185X.

Pod'akovanie: Autori článku týmto ďakujú Ing. P. Polákovi (ZCHMD), Ing. M. Kohútovi (ZCHSSD) a Ing. M. Hubkovi (ZCHPD) za pomoc pri získavaní vzoriek biologického materiálu, SBS a. s. za poskytnutie genetického materiálu na analýzu.

Práca vznikla s podporou projektov APVV-14-0054 and APVV-17-0060, QK1810253.

Kontaktné adresy: Radovan Kasarda prof. Ing. PhD., Nina Moravčíková Ing. PhD., Katedra genetiky a plemenárskej biológie FAPZ, Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre Tr. A. Hlinku 2, 9497 Nitra

Jozef Golian prof. Ing. Dr., Radoslav Židek doc. Ing. PhD., Ľubomír Belej Ing. PhD., Katedra hygieny a bezpečnosti potravín FBP, Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre Tr. A. Hlinku 2, 9497 Nitra
Luboš Vostrý prof. Ing. PhD., Hana Vydrová Vostrá, Ing. PhD., Czech University of Life Sciences Prague Kamýcká 129, 165 00 Praha – Suchbát

VYUŽITIE BEZLEPKOVÝCH KVASOV VO VÝROBKACH URČENÝCH PRE CELIATIKOV USE OF GLUTEN-FREE SOURDOUGHS IN GLUTEN FREE PRODUCTS

Jana Kolačková, Martina Fikselová, Stanislava Lukáčová, Michaela Kleinová, Jozef Čurlej, Dagmar Kozelová

Abstract: The aim of the work was to develop gluten-free sourdoughs in order to test their application to gluten-free products. Products were subsequently analysed for gluten content detection and texturometric determination compared to standard products. In the texturometric determination, the products developed (bread and muffins) showed similar firmness compared to the control samples, except for the corn bread and rice muffins. The crackers samples showed higher hardness compared to the control sample. We recommend developed sourdoughs to use in the production of gluten-free muffins and gluten-free sourdough bread. In the case of gluten-free crackers, it is undesirable in terms of higher hardness confirmed in the texturometric determination.

Keywords: celiac disease, gluten, gluten-free diet, sourdough bread

ÚVOD

Lepok nachádzajúci sa v obilninách dokáže spustiť imunitnú reakciu, ktorej dôsledkom je celiakia (Muir et al., 2019; Lebwohl et al., 2018). V súčasnosti sa celiakia zaraďuje medzi hlavné problémy verejného zdravia na celom svete (Singh et al., 2018).

Nariadenie Komisie č. 41/2009 označuje pojem „glutén“ ako bielkovinovú frakciu z jačmeňa, pšenice, ovsa, raže, alebo ich križených modifikácií a derivátov, na ktorú trpia niektoré osoby neznášanlivosťou. Nie je rozpustná vo vode a v 0,5 M roztoku NaCl. V posledných desaťročiach lepok získal veľkú pozornosť pre zvyšujúci sa počet diagnostikovaných pacientov s neznášanlivosťou na túto proteínovú frakciu. V súvislosti s príjmom lepku sa vyskytujú tri patologické príznaky:

- a) potravinová alergia, ktorá postihuje 0,2 až 0,5 % populácie, má silnejšie klinické dôsledky,
- b) celiakia ako autoimunitná porucha spôsobená požitím gluténu nielen z pšenice, ale aj raže, jačmeňa a niektorých odrôd ovsa, a ktorá postihuje deti aj dospelých po celom svete,
- c) intolerancia/citlivosť na glutén (Rosell et al., 2014).

Priemerný denný príjem lepku potravou je u zdravého človeka 10-20 g. U ľudí trpiacich celiakiou už 50 mg lepku vyvoláva poškodenie tenkého čreva (Muir et al., 2019). Aj keď jedinou účinnou liečbou je diéta, podľa Vici et al. (2016) môže jej dlhodobé dodržiavanie viesť k možnému nedostatku živín alebo dokonca k prebytku niektorých látok v tele človeka. Bezlepkové výrobky sú zvyčajne chudobnejšie na vlákninu, horčík a kyselinu listovú. Bezlepkové obilniny nachádzajúce sa v prírode, majú nižší obsah horčíka v porovnaní s obilninami obsahujúcimi glutén. V mnohých prípadoch bezlepkovým produktom chýbajú minerálne látky alebo obsahujú menšie množstvo vlákniny v porovnaní s produktami obsahujúcimi lepok (Gobbetti et al., 2018). Kukurica a ryža sú tradične využívanými hlavnými zložkami niekoľkých bezlepkových potravín. Okrem nich môžu pseudoobilniny, semená strukovín a orechov nahradiť hlavné zložky bezlepkových výrobkov.

Presvedčenie spoločnosti, že potraviny obsahujúce glutén, sú zodpovedné za širokú škálu zdravotných problémov, viedli k nárastu dopytu po výrobkoch bez obsahu pšenice a iných obilnín obsahujúcich lepok (Muir et al., 2019). S bezlepkovou diétou sa spája aj niekoľko nevýhod týkajúcich sa hlavne výživových deficitov. Preto sa v poslednej dobe zvyšuje

úsilie na zlepšenie výživových vlastností bezlepkových potravín a navrhujú sa rôzne alternatívy stravovania (Gobbetti et al., 2018).

Cieľom práce bol vývoj bezlepkových kvasov z bezlepkových surovín ako sú pohánka, ryža a kukurica a ich potenciálna aplikácia do bezlepkových výrobkov ako sú chlieb, muffiny a kreky.

MATERIÁL A METODIKA

Na prípravu bezlepkových výrobkov sme vyvinuli bezlepkové kvasy. Tie sme vytvorili z ryžovej, pohánkovej a kukuričnej múky. Kvas sme získali po pravidelnom zmiešavaní teplej vody a skúmanej vybranej múky v pomere 2:1 v čase maximálne piatich dní, pri izbovej teplote. Získané kvasy sme použili na aplikáciu do troch typov výrobkov ako chlieb, muffiny a kreky - pohánkové, ryžové, kukuričné a kontrolná vzorka. Na prípravu bezlepkových výrobkov sa použili kvasy vyvinuté z bezlepkových múk od spoločnosti Pekáreň Harmónia, Modra. Samotná príprava výrobkov sa zrealizovala v spolupráci so spoločnosťou Ekvia s.r.o., Nitra.

Pred začiatkom prípravy výrobkov sa vykonalo testovanie krížovej kontaminácie prostredia gluténom z predchádzajúcich výrobkov pomocou interného testu Allergo test Agrastrip gluten G12 kit. Tento test slúžil na overenie účinnosti čistenia a pozostával zo steru z plochy pracovného stola na výrobu bezgluténových výrobkov. Výsledok testu bol negatívny, obsah gluténu bol zistený pod detekčný limit 20 mg.kg⁻¹.

Materiál

Bezlepkový kváskový chlieb

Na výrobu bezlepkových chlebov z vyvinutých kváskov sa použili nasledovné suroviny - bezlepková zmes: v množstve 648 g (deproteínovaný pšeničný škrob, sójová múka, stabilizátor: guarová guma, emulgátor: snečnicový lecitín, dextróza, cukor), voda 520 g, kvások 50 g (podľa druhu), soľ 16 g, olej 13 g, rasca 1 g.

Prvým krokom bolo zmiešanie všetkých surovín. Teplota cesta bola 28 °C. Cesto sme ihneď spracovali, zahŕňalo to rozdelenie cesta na približne rovnaké časti o hmotnosti cca 640 g. Nasledovalo formovanie cesta do drevených ošatiek – veka. Tie sme nechali v kysniarni vykysnúť 11 hodín pri teplote 30 °C a relatívnej vlhkosti vzduchu 85 %. Po jedenástich hodinách sme bochníky vybrali z ošatiek a piekli najskôr pri teplote 240 °C, po piatich minútach sme znížili teplotu na 220 °C. Pri tejto teplote sme chlieb piekli 45 minút.

Bezlepkové kváskové muffiny

Na výrobu bezlepkových kváskových muffinov sme v prvom kroku pripravili štartér: na prípravu sme zmiešali 60 g vytvoreného materského kvásku s vlažným mliekom (400 g) a podľa typu kvásku sme pridali múku: pohánkovú 150 g, kukuričnú 140 g, ryžovú 150 g.

Suroviny sme zmiešali a prikryté potravinárskou fóliou sme nechali naštartovať kvások počas 60 minút. Následne sme použili 120 g vyvinutého štartéra a pridali k nemu ďalšie suroviny: ryžová múka 450 g, olej 350 g, trstinový cukor 350 g, vaječná melanž 200 g, mlieko 200 g. Všetky suroviny sme zmiešali a vzniknutou zmesou sme plnili košíčky na výrobu muffinov približne do 1/3. Piekli sme ich 41 minút pri teplote 180 °C.

Bezlepkové kváskové kreky

Štartér na výrobu bezlepkových krekov sme pripravili zmiešaním 90 g vytvoreného materského kvásku s 200 g vody a príslušnou múkou tak, aby sme mali 3 druhy štartéra. Pridaná múka bola pohánková 200 g, kukuričná 200 g, ryžová 200 g.

Suroviny sme spolu premiešali a zmes sme prikryli potravinovou fóliou. Pri izbovej teplote 22 °C sme ho nechali kvasiť 12 hodín. Po dvanástich hodinách sme ku 240 g štartéra pridali 250 g pohánkovej múky, 80 g kyslej pochúťkovej smotany, 50 g vody, 40 g sezamu a 5 g soli. Vymiesené cesto sme nechali odpočívať pod potravinárskou fóliou 2 hodiny pri izbovej

teplote 22 °C. Následne sme vzniknuté cesto vyvalkali na hrúbku asi 2 mm a rozkrájali na obdĺžniky s veľkosťou 5x10 cm. Obdĺžniky sme poukladali na plech vystlaný papierom na pečenie. Každý kúsok sme prešli dierovacím valčekom. Na plechu sme ich nechali posledný krát vykvasiť po dobu 20 minút, pričom sme ich opäť prikryli fóliou. Po vykvasení sme krekry piekli pri teplote 200 °C 10 minút.

Na porovnanie sme upiekli chlieb, muffiny a krekry aj zo štandardných lepkových surovín, ktoré sa bežne na prípravu takýchto výrobkov používajú. Tie slúžili ako kontrolné vzorky.

Chlieb - kontrolná vzorka

Ako kontrolnú vzorku chleba sme pripravili chlieb pšenično-ražný. Použili sa nasledujúce suroviny: pšeničná múka T-650 3200 g (80 %), ražná múka T-930 800 g (20 %), celozrnný ražný kvas 320 g, voda 2600 g, droždie 80 g, soľ 80 g, zlepšujúci prípravok Natursoft 40 g (pšeničná vláknina mikrogranulovaná, ražná múka, pšeničný vitálny glutén, enzýmy, múku upravujúca látka: E300).

Suroviny sme zmiešali pomocou prístroja 6 minút pomaly a 4 minúty rýchlo. Po vymiesení cesta sme skontrolovali jeho teplotu teplomerom, kde sme namerali 29 °C, čo bolo vyhovujúce pre začiatok odpočívania. Vzniknuté cesto sme nechali odpočívať zakryté šatkou 30 minút. Po pol hodine sme cesto rozdelili na rovnaké časti o hmotnosti približne 800 g, ručne sme vypracovali bochníky a položili ich do ošatiek, ktoré sme dali do kysiarne na 45 minút. V kysiarne bola teplota 35 °C a relatívna vlhkosť vzduchu 75 %. Po 45 minútach sme vybrali bochníky z kysiarne a z ošatiek sme ich vyklopili na pečiaci pás. Nasledovalo pečenie chleba. Prvým krokom bolo zaparenie bochníkov. Po začiatočnom zaparení sa chlieb piekol pri teplote 250 °C 5 minút. Následne sme otvorili klapku na odvetranie a teplotu sme znížili na 210 °C, pri ktorej sa chlieb piekol 45 minút. Vzniknuté bochníky chleba mali objem približne 750 g.

Muffiny - kontrolná vzorka

Na muffiny ako kontrolnú vzorku sme použili nasledovné suroviny: pšeničná múka T-650 350 g, trstinový cukor 350 g, olej 350 g, vaječná melanž 200 g, mlieko 200 g, kukuričný škrob 100 g, kypriaci prášok 3 g.

Rovnako ako u bezlepkových muffinov sme najskôr všetky suroviny zmiešali a vytvorili riedke cesto. Cesto sme preniesli do plniaceho vrečka a ním sme naplnili pripravené košíčky do približne 1/3. Muffiny sme piekli pri teplote 185 °C 38 minút.

Krekry - kontrolná vzorka

Na výrobu kontrolnej vzorky krekrov sme potrebovali nasledujúce suroviny: pšeničná múka T-512 2000 g, voda 800 g, margarín 480 g, smotana 200 g, droždie 50 g, soľ 40 g, zlepšujúci prípravok Natursoft 6 g (pšeničná vláknina mikrogranulovaná, ražná múka, pšeničný vitálny glutén, enzýmy, múku upravujúca látka: E300), sezam na posyp.

Všetky tieto suroviny sme spolu zmiešali pomocou prístroja 6 minút pomaly a následne 4 minúty na rýchly program. Cesto sme po dôkladnom zmiešaní vyvalkali na stroji do hrúbky 2 mm a nakrájali sme ho na obdĺžniky s rozmermi 5x10 cm. Každý kúsok sme prešli dierovacím valčekom, aby sme predišli nafúknutiu cesta. Poukladané obdĺžniky sme nechali na plechu vystlaným papierom na pečenie vykvasiť 30 minút. Po vykvasení sme ich ovlažili vodou a posypali sezamom. Krekry sme piekli pri teplote 230 °C po dobu 21 minút.

Metodika

Vyvinuté výrobky boli testované texturometricky a na potenciálnu prítomnosť lepku pre potvrdenie označenia výrobkov „bezgluténový“.

Detekcia obsahu gluténu vo výrobkoch

Detekciu obsahu gluténu vo výrobkoch sme vykonali pomocou testu na prítomnosť lepku – Reveal® 3-D .

Analýza textúry výrobkov

Pri všetkých výrobkoch sme analyzovali ich textúru. Textúra chleba a muffinov bola stanovená na texturometri TA.XT Plus, vyjadrená ako tuhosť striedky. Na analýzu sa použila 36 mm guľová sonda s rádiusom (P/36R). Výsledky boli vyjadrené ako (N) = maximum sily potrebnej na stlačenie striedky výrobku.

Na analýzu krekov bola použitá sonda HDP/BSK, ktorou sa testovala ich krehkosť resp. lámavosť.

Pri analýze chleba sa použili 2 bochníky z každého typu chleba, ktoré sa priečne krájali, čím sa získali rovnomerné rezy. Pri analýze muffinov a krekov sa použili celé výrobky. Bolo vykonaných 5 opakovaní, ktoré sa spriemerovali. Následne sa vypočítala smerodajná odchýlka v programe Excel a výsledky sa spracovali do grafov.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Kvások je zdravšou alternatívou droždia (Mančíková, 2017). Jeho použitie je podľa Rizzella et al. (2016) jednou z najslubnejších technológií vo vývoji bezlepkového chleba. Používa sa už od staroveku na spracovanie pšeničného a ražného chleba a v súčasnosti je upravený na výrobu bezlepkových výrobkov. Technika je založená na kvasení chleba zmesou múky a vody, ktorá je fermentovaná mliečnymi baktériami a kvasinkami, ktoré môžu zlepšiť kvalitu a nutričnú hodnotu potravín.

Z mikrobiologického hľadiska je kvások považovaný za špecifický ekosystém, v ktorom sa nachádzajú kvasinky a baktérie mliečneho kvasenia, využívané na výrobu pečiva. Dodáva chlebu charakteristickú kyslú chuť, arómu a objem (De Vuyst et al., 2017).

Yu et al. (2019) uvádzajú, že baktérie mliečneho kvasenia a kvasinky sú nevyhnutné pre zmyslové, štrukturálne, výživové a skladovacie vlastnosti kváskového chleba. Pridaním kvásku do cesta sa zlepšuje objem, textúra, chuť, výživová hodnota a senzorické vlastnosti fermentovaných produktov. Kvások má pozitívny vplyv aj na predĺženie skladovateľnosti výrobkov spomalením procesu starnutia a brzdením rastu vláknitých mikroskopických húb.

Počas vzniku kvásku prebieha pre telo prospešná pomalá fermentácia. Jej produktom sú látky, ktoré si človek väčšinou nedokáže sám vytvárať a preto ich musí prijímať potravou. Patria sem hlavne probiotiká, bielkoviny a aminokyseliny (Mančíková, 2017).

Nami vyvinutý ryžový kvas bol bielej farby, pohánkový mal jemný hnedý odtieň a kukuričný bol sfarbený do žltá.

Pri výrobe bezlepkových výrobkov sú najčastejšie využívanými obilninami ryža a kukurica (Lasa et al., 2017). Najvhodnejšou surovinou pre pekárenské aplikácie je ryžová múka, a to vďaka jej nenápadnej chuti, bielej farbe, stráviteľnosti a hypoalergénnym vlastnostiam. Jej ďalšími výhodami sú nízky obsah bielkovín a sodíka, prítomnosť ľahko stráviteľných sacharidov. V prípade ryže je pomer albumín : globulín : prolamin : glutelín jedinečný medzi obilninami, má vysokú koncentráciu glutelínov a nízku koncentráciu prolaminov (Rosell et al., 2014).

Pohánka je známa svojou vysokou výživovou hodnotou. Tá je v jej zrne obsiahnutá z dôvodu vysokého obsahu vitamínu B1 a B2, lyzínu, bielkovín s vyváženým zložením aminokyselín, fytosterolov, rozpustných sacharidov, tiamínu a iných výživných látok. Táto obilnina je tiež bohatá na antioxidantné zlúčeniny, ako sú flavonoidy, fenolové kyseliny, tokoferoly (Zieliński et al., 2019). Pohánková múka obsahuje tiež vysoké množstvo zinku a draslíka (Mančíková, 2017). Pozitívnu je jej antioxidantná aktivita, ako aj hypotenzívne,

antispazmodické, hypocholesterolemické, hypoglykemické, protinádorové, protizápalové a antiglykačné účinky (Zieliński et al., 2019).

Kukurica obsahuje významné množstvo bioaktívnych zlúčenín. Všetky druhy kukurice sú bohaté na vlákninu, vitamíny, minerálne látky, fenolové kyseliny a flavonoidy, rastlinné steroly a ďalšie fytochemikálie (lignín). Kukurica poskytuje širokú škálu fytochemikálií (karotenoidy), vitamínov (tiamín, riboflavín, niacín, pyridoxín, folát, kyselina L-askorbová, vitamín E a vitamín K), minerálnych látok (vápnik, horčík, fosfor, draslík, sodík a zinok) a rezistentných škrobov. Vďaka fytochemikáliám má najvyššiu celkovú antioxidačnú aktivitu medzi zrnami ako sú ryža, pšenica a ovos (Siyuan et al., 2018). Kukuričná múka obsahuje v porovnaní s inými obilninami viac vitamínu A. Dodáva pečivu farbu a pridáva sa do výrobkov, kde je potrebná vysoká súdržnosť (Mančíková, 2017). Podľa Lasa et al. (2017) pri výrobe chleba z kukuričnej múky získava výsledný produkt vhodný objem.

Kontrola obsahu gluténu vo vyvinutých výrobkoch

Hlavnou potravinou, ktorou človek prijíma do tela lepok, je chlieb (Muir et al., 2019). Podľa Výnosu č. 2657/2004-100 základné suroviny na výrobu chleba sú múka, droždie a voda.

Výroba bezlepkových chlebov môže predstavovať výzvu vzhľadom na zásadnú úlohu lepku pri ich výrobe. Lepok je základný proteín vytvárajúci štruktúru, zaisťuje viskoelasticitu cesta, má schopnosť zadržiavať plyn a prispieva ku vzniku dobrej štruktúry výsledného upečeného výrobku (Alvarez-Jubete et al., 2010).

Glutén je základný bielkovinový materiál, ktorý prispieva nielen k vzhľadu a štruktúre ale aj spotrebiteľskej prijateľnosti mnohých pekárenských výrobkov. Preto najväčšou výzvou pre vedcov a pekárov v oblasti potravín v rámci bezlepkových výrobkov je pravdepodobne výroba vysokokvalitného bezlepkového chleba (Arendt, 2008).

Vyvinuté bezlepkové vzorky chleba, muffinov a krekov, ktoré sme pripravili z bezlepkových kváskov a múky sme podrobili testu na obsah gluténu. Pri žiadnej zo vzoriek sme nezistili pozitívny obsah gluténu nad detekčný limit 20 mg.kg⁻¹.

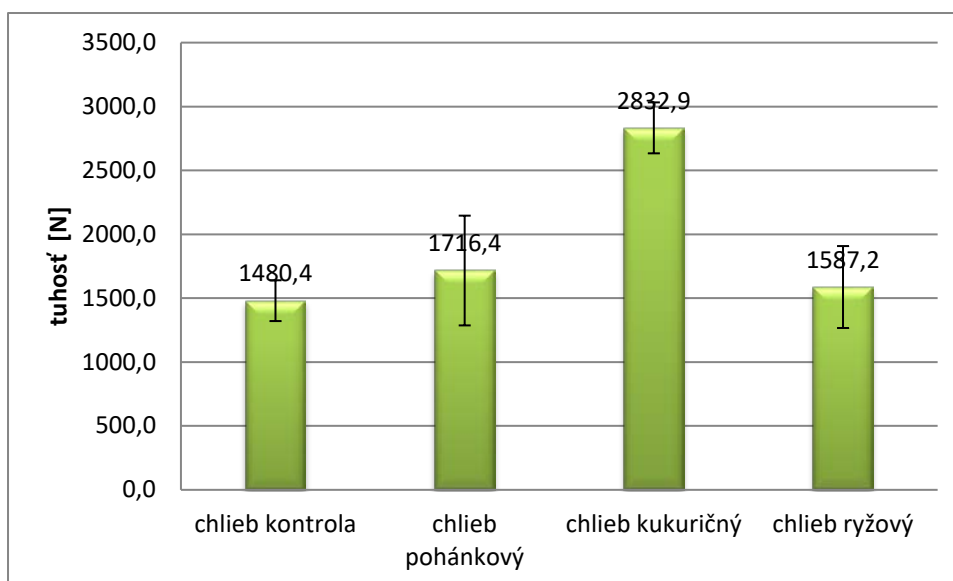
Obsah gluténu bol vo všetkých výrobkoch negatívny hlavne vďaka použitým bezlepkovým surovinám a prídavným látkam, ktoré neboli kontaminované lepkom krížovou kontamináciou, ale taktiež vďaka dôkladnému vykonaniu čistenia a dezinfekcie pracovnej dosky a nástrojov pred začatím prípravy cesta a pečenia.

Krížová kontaminácia sa môže podľa Ryana (2017) vyskytnúť v celom dodávateľskom reťazci vo všetkých procesoch počas zberu, balenia, prepravy, spracovania, manipulácie, distribúcie aj v obchodnom reťazci. Hlavnou príčinou sú predovšetkým nevhodné alebo chýbajúce hygienické postupy, regulácia teploty alebo zahrnutie nevhodných zložiek. Bakteriálna, chemická a fyzikálna kontaminácia môže mať vplyv na bezpečnosť a kvalitu potravín, čo má za následok vznik ohnisk nebezpečenstiev. Preto sú dôležité povinné preventívne kontroly potenciálnych kontaminantov a zdrojov krížovej kontaminácie.

Overenie dôsledného vyčistenia pracovnej dosky zaistil test prostredia krížovej kontaminácie gluténom, ktorý sa v prostredí mohol nachádzať zo surovín alebo potravín obsahujúcich lepok. Tento test bol v našom prípade negatívny, vďaka čomu sa mohol začať proces prípravy bezlepkových výrobkov.

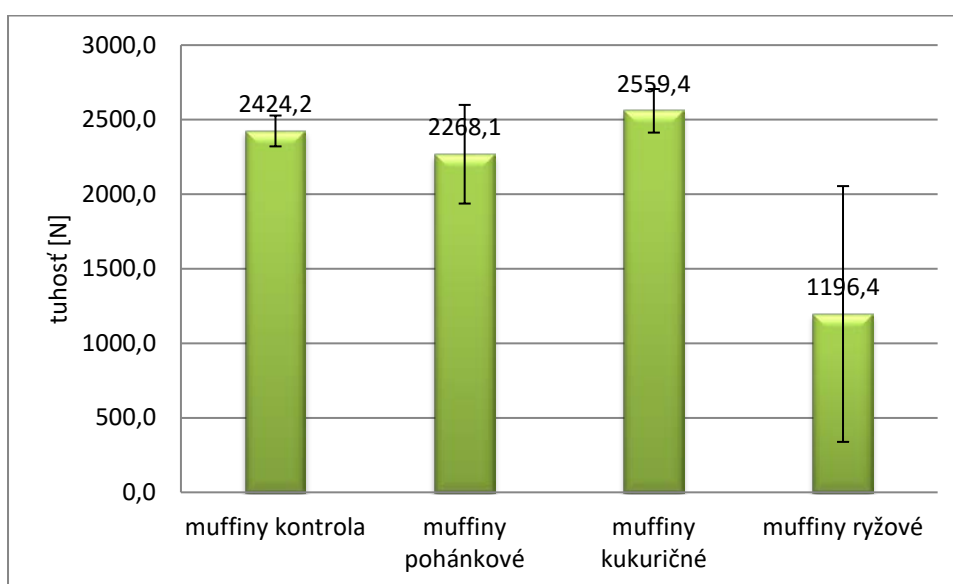
Vyhodnotenie analýzy textúry vyvinutých výrobkov

Texturometrickou analýzou chleba sa zistili rozdiely v tuhosti jednotlivých vzoriek (graf 1). Tuhosť pohánkového (1716,4 N) a ryžového (1587,2 N) chleba bola porovnateľná s kontrolnou vzorkou (1480,4 N). Výnimkou bol kukuričný chlieb, kde bola zistená tuhosť výrazne vyššia (2832,9 N) v porovnaní s ostatnými vzorkami chleba.



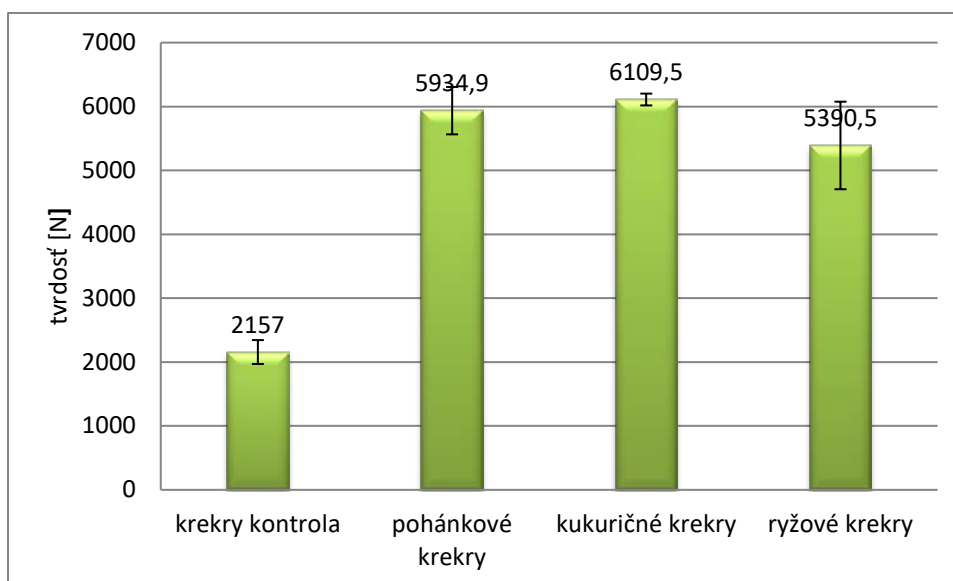
Graf 1 Tuhosť striedky chleba [N]

Ďalšími hodnotenými vzorkami boli muffiny (graf 2). Tuhosť striedky pohánkových (2268,1 N) a kukuričných (2559,4 N) muffinov bola podobná hodnote kontrolnej vzorky muffinov (2424,2 N). Ryžové muffiny preukázali najnižšiu tuhosť (1196,4 N).



Graf 2 Tuhosť striedky muffinov [N]

Pri hodnotení tvrdosti krekov (graf 3) mali vyvinuté bezlepkové výrobky oveľa vyššiu tvrdosť v porovnaní s kontrolnou vzorkou (2157 N). Pohánkové kreky dosiahli hodnotu 5934,9 N a ryžové kreky 5390,5 N, pričom najvyššie hodnoty boli opäť zistené pri kekroch vyrobených z kukuričnej múky (6109,5 N).



Graf 3 Tvrdosť krekrov [N]

Štúdia Dapčević Hadnađeva et al. (2013) dokázala, že zmiešanie ryžovej a pohánkovej múky vedie k zníženiu tvrdosti sušienok v porovnaní so sušienkami vyrobenými z čisto ryžovej múky. Cesto je mäkkšie a viskóznejšie a poskytne mäkkšie a krehkejšie sušienky ako cesto pripravené z čisto ryžovej múky. Podľa tejto štúdie môžeme odporučiť výrobu krekrov kombinovaním viacerých múk, ktoré spolu vytvárajú vhodné vlastnosti cesta na ich výrobu. Tým by došlo k zníženiu tvrdosti výsledného produktu a zvýšeniu akceptácie z hľadiska konzumentov.

Podľa zistení z texturometrickej analýzy môžeme skonštatovať, že vzorky chleba aj muffinov boli v tuhosti podobné kontrolnej vzorke, okrem kukuričného chleba a ryžových maffinov. Na výrobu kukuričného chleba ako aj bezlepkových krekrov by bolo vhodnejšie používať kombináciu viacerých múk, ktorými sa podľa Dapčević Hadnađeva et al. (2013) dokáže znížiť tuhosť cesta a vytvárajú sa mäkkšie a krehkejšie výrobky.

Štúdia Gambuša et al. (2009) zameraná na čiastočnú substitúciu kukuričnej múky pohánkovou múkou pri výrobe koláčov a sušienok ukázala, že alternatívne produkty mali lepšiu kvalitu a výživovú hodnotu ako kontroly vykonávané len s kukuričnou múkou. Výrobky vyrobené z pseudoobilnín mali vyšší obsah aminokyselín, vlákniny, lipidov, polynenasýtených mastných kyselín, ako aj zvýšenú hladinu horčíka, zinku, mangánu a medi. Okrem toho všetky výrobky mali vysoký stupeň akceptácie zo strany spotrebiteľov.

ZÁVER

Vyvinuli sme bezlepkové kvasy z vybraných druhov bezlepkových múk, a to z kukuričnej, ryžovej a pohánkovej múky. Vyvinuté kvasy sme následne skúšobne aplikovali do vybraných pekárskych výrobkov - chlieb, muffiny a kekry.

Výrobky sa hodnotili texturometricky. Podľa zistení môžeme skonštatovať, že vzorky chleba boli v tuhosti podobné kontrolnej vzorke, okrem kukuričného chleba, kde bola zistená tuhosť výrazne vyššia v porovnaní s ostatnými vzorkami chleba, čo nie je žiadúce.

Pri hodnotení tvrdosti krekrov mali vyvinuté bezlepkové výrobky oveľa vyššiu tvrdosť v porovnaní s kontrolnou vzorkou. Najvyššie hodnoty boli zistené pri krekroch vyrobených z kukuričnej múky. Vysoká tuhosť krekrov by z hľadiska textúry nevyhovovala. Na výrobu kukuričného kváskového chleba ako aj bezlepkových kváskových krekrov by bolo vhodnejšie použiť kombináciu viacerých múk, ktoré dokážu znížiť tuhosť cesta a vytvoriť mäkkšie a krehkejšie výrobky.

V muffínoch bola tuhosť podobná hodnote kontrolnej vzorky, pričom ryžové muffiny preukázali najnižšiu tuhosť.

Použitie bezlepkových kváskov do vybraných bezlepkových výrobkov je vhodné z hľadiska texturometrických vlastností vyvinutých bezlepkových výrobkov a ich trvanlivosti. Bezlepkové výrobky vyvinuté za pomoci kvásku a vybraných druhov múk sú vhodnou alternatívou pre osoby trpiace celiakiou.

LITERATÚRA

- Alvarez-Jubete, L. – Auty, M. – Arendt, E. K. – Gallagher, E. 2010. Baking properties and microstructure of pseudocereal flours in gluten-free bread formulations. In *European Food Research and Technology* [online], vol. 230, no. 3, p. 437-445, [cit. 2021-01-29]. ISSN 1438-2385. doi: [10.1007/s00217-009-1184-z](https://doi.org/10.1007/s00217-009-1184-z).
- Arendt, E. - Dal Bello, F. 2008. Gluten-free breads. In *Gluten-Free Cereal Products and Beverages* [online], pp. 289-319 [cit. 2021-01-29]. ISBN 978-0-12-373739-7. Dostupné na: <https://doi.org/10.1016/B978-012373739-7.50015-0>.
- Dapčević Hadnađev, T.R. - Torbica, A.M. - Hadnađev, M.S. 2013. Influence of Buckwheat Flour and Carboxymethyl Cellulose on Rheological Behaviour and Baking Performance of Gluten-Free Cookie Dough. In *Food and Bioprocess Technology*. [online], vol. 6, p. 1770–1781, ISSN 1935-5149. Dostupné na: <https://doi.org/10.1007/s11947-012-0841-6>.
- De Vuyst, L. – Van Kerrebroeck, S. – Leroy, F. 2017. Microbial Ecology and Process Technology of Sourdough Fermentation. In *Advances in Applied Microbiology* [online], vol. 100, pp. 49 - 160 [cit. 2021-01-07]. ISSN 0065-2164. doi: [10.1016/bs.aambs.2017.02.003](https://doi.org/10.1016/bs.aambs.2017.02.003).
- Gambuś, H. – Gambuś, F. – Pastuszka, D. et al. 2009. Quality of gluten-free supplemented cakes and biscuits. In *International Journal of Food Sciences and Nutrition* [online], vol. 60, no. 4, pp. 31 - 50 [cit. 2021-01-28]. ISSN 1465-3478. doi: [10.1080/09637480802375523](https://doi.org/10.1080/09637480802375523).
- Gobbetti, M. – Pontonio, E. – Filannino, P. et al. 2018. How to improve the gluten-free diet: The state of the art from a food science perspective. In *Food Research International* [online], vol. 110, pp. 22-32 [cit. 2021-01-28]. ISSN 0963-9969. doi: [10.1016/j.foodres.2017.04.010](https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.04.010).
- Lebwohl, B. et al. 2018. Coeliac disease. In *The Lancet* [online], vol. 391, no. 10115, pp. 70 - 81 [cit. 2018-10-12]. ISSN: 0140-6736. Dostupné na internete : [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)31796-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)31796-8).
- Lasa, A. – del Pilar Fernández-Gil, M. – Ángeles Bustamante, M. - Miranda, J. 2017. Nutritional and Sensorial Aspects of Gluten-Free Products. In *Nutritional and Analytical Approaches of Gluten-Free Diet in Celiac Disease* [online], pp. 59 - 78 [cit. 2021-01-28]. ISBN 978-3-319-53342-1. doi: [10.1007/978-3-319-53342-1](https://doi.org/10.1007/978-3-319-53342-1).
- Mančíková, L. 2017. *Kvások*. 1. vyd. Bratislava : NOXI s. r. o. 160 s. ISBN 978-80-8111-467-0.
- Muir, J. G. – Varney, J. E. – Ajamian, M. – Gibson, P. R. 2019. Gluten-free and low-FODMAP sourdoughs for patients with coeliac disease and irritable bowel syndrome: A clinical perspective. In *International Journal of Food Microbiology* [online], vol. 290, pp. 237-246 [cit. 2021-02-01]. ISSN 0168-1605. doi: [10.1016/j.ijfoodmicro.2018.10.016](https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.10.016).
- NARIADENIE KOMISIE (ES) č. 41/2009 z 20. januára 2009 o zložení a označovaní potravín vhodných pre osoby trpiace neznášanlivosťou gluténu.
- Rizzello, C. G. – Montemurro, M. – Gobbetti, M. 2016. Characterization of the Bread Made with Durum Wheat Semolina Rendered Gluten Free by Sourdough Biotechnology in Comparison with Commercial Gluten-Free Products. In *Journal of Food Science* [online], vol. 81, no. 9, pp. H2263-H2272 [cit. 2021-01-29]. ISSN 1750-3841. doi: [10.1111/1750-3841.13410](https://doi.org/10.1111/1750-3841.13410).
- Rosell, C. M. – Sousa C. – Barro, F. et al. 2014. Cereals for developing gluten-free products and analytical tools for gluten detection. In *Journal of Cereal Science* [online], vol. 59, no. 3, pp. 354 - 364 [cit. 2021-01-25]. ISSN 0733-5210. doi: [10.1016/j.jcs.2013.10.001](https://doi.org/10.1016/j.jcs.2013.10.001).
- Ryan, J. M. 2017. Chapter 6 – Preventing cross-contamination through the supply chain. In *Validating Preventive Food Safety and Quality Controls* [online], pp. 171 - 206 [cit. 2021-01-31]. ISBN 978-0-12-810994-6. Dostupné na: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-810994-6.00006-7>.
- Singh, P. et al. 2018. Global Prevalence of Celiac Disease: Systematic Review and Meta-analysis. In *Clinical Gastroenterology and Hepatology* [online], vol. 16, no. 6, pp. 823 - 836 [cit. 2019-02-09]. ISSN: 1542-3565. Dostupné na internete : <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2017.06.037>.
- Siyuan, S – Tong, L. – RiuHai, L. 2018. Corn phytochemicals and their health benefits. In *Food Science and Human Wellness* [online], vol. 7, no. 3, pp. 185 - 195 [cit. 2021-02-04]. ISSN 2213-4530. Dostupné na: <https://doi.org/10.1016/j.fshw.2018.09.003>.
- Vici, G. – Belli, L. – Biondi, M – Polzonetti, V. 2016. Gluten free diet and nutrient deficiencies: A review. In *Clinical Nutrition* [online], vol. 35, no. 6, pp. 1236-1241 [cit. 2021-02-02]. ISSN 0261-5614. doi: [10.1016/j.clnu.2016.05.002](https://doi.org/10.1016/j.clnu.2016.05.002).

VÝNOS Ministerstva pôdohospodárstva Slovenskej republiky a Ministerstva zdravotníctva Slovenskej republiky z 21. októbra 2004 č. 2657/2004-100, ktorým sa vydáva hlava Potravinového kódexu Slovenskej republiky upravujúca jedlé obilie a výrobky z obilia.

Yu Y, Wang L, Qian H, Zhang H, Li Y, Wu G, Qi X, Xu M, Rao Z. 2019. Effect of selected strains on physical and organoleptic properties of breads. In *Food Chemistry* [online], vol. 276, pp. 547 - 553 [cit. 2021-01-26]. ISSN 0308-8146. doi: 10.1016/j.foodchem.2018.10.048.

Zieliński, H. – Szawara-Nowak, D. – Baczek, N. – Wronkowska, M. 2019. Effect of liquid-state fermentation on the antioxidant and functional properties of raw and roasted buckwheat flours. In *Food Chemistry* [online], vol. 271, pp. 291 - 297 [cit. 2021-01-22]. ISSN 0308-8146. doi: 10.1016/j.foodchem.2018.07.182.

Pod'akovanie: Výskum bol realizovaný s podporou projektov 'Kultúrne dedičstvo regiónov' č. PPI/APM/2018/1/00010/U/001 a KEPA projektu č. 017 SPU-4/2019

Kontaktná adresa: Martina Fikselová, doc., Ing., PhD., KHBP, FBP, SPU, Tr. A. Hlinku 2, Nitra, 949 76

ÚČINOK PODÁVANIA XANTOHUMOLU V KRMIVE NA RAST, JATOČNÚ VÝŤAŽNOSŤ, OXIDAČNÚ STABILITU A BIOCHÉMIU KRVI U JAPONSKÝCH PREPELÍC THE EFFECT OF ADMINISTRATION OF XANTHOTHUMOL IN DIET ON THE GROWTH PERFORMANCE, CARCASS COMPOSITION, OXIDATION STABILITY OF MEAT AND BLOOD BIOCHEMISTRY IN JAPANESE QUAILS

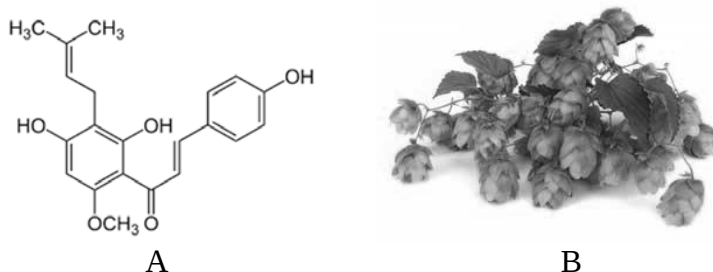
Zuzana Lacková, František Zigo, Zuzana Farkašová

Abstract: In the study we monitored the effect of xanthohumol administered in feed on growth, carcass yield, oxidative stability of fat in meat, as well as its effect on selected biochemical parameters in the blood of Japanese quails. As part of our study, we did not find significant differences in the weight of valuable parts of the body as well as in their percentage. Supplementation of feed with xanthohumol positively affected the protein content of the valuable parts of the Japanese quail carcass ($P < 0.05$). The water, fat and ash content of valuable parts of the carcass was not affected by supplementation. The supplementation of feed with xanthohumol did not affect the pH value of the meat. The oxidation processes of fats during refrigeration storage were most pronounced in the control group, since supplementation of feed with xanthohumol reduced oxidation processes in meat ($P < 0.05$). The addition of xanthohumol in feed positively influenced biochemical parameters such as total proteins (TP) and albumin ($P < 0.05$). When monitoring enzymatic activity, we found a decrease in aspartate aminotransferase (AST) levels ($P < 0.05$).

Keywords: Japanese quail, blood biochemistry, carcass composition, oxidation stability

ÚVOD

Chmeľ obyčajný obsahuje mnohé látky s priaznivým účinkom na telo a zdravotný stav človeka. Chmeľove hlávky obsahujú pomerne veľké množstvo xanthohumolu (Obrázok 1), v sušine chmeľu je ho 0,2 – 1,1 hm. % (Hofta et al., 2004). Xanthohumol patriaci medzi polyfenoly, je známy svojimi antibakteriálnymi, antimykotickými a antioxidačnými účinkami (Stevens a Page, 2004; Liu et al., 2015). V posledných rokoch sa neustále zvyšuje záujem o xanthohumol pre jeho účinok podporujúci zdravie a imunitu konzumentov. Rôzne organické látky pridávané v krmive hydiny predstavujú nielen vhodný zdroj energie, ale aj pozitívne vplyvajú nielen na rast a kvalitu mäsa (Gerhauser a Frank, 2005).



Obrázok 1 Vzorec xanthohumolu (A) a chmeľové hlávky (B)

Zdroj: <http://fis.org/xanthohumol/>

Vyhodnotenie hematologického a biochemického profilu prepelíc nám poskytuje užitočné informácie o ich zdravotnom stave, je vhodné pre odlišenie zdravých jedincov od tých chorých (aj so subklinickým priebehom ochorenia) (Agina et al. 2017). Hematologický a biochemický profil je ovplyvnený vekom (Ayub et al., 2012; Abou-Kassem et al., 2018), pohlavím (Scholtz et al., 2009; Abou-Kassem et al., 2018), diétou, napr. s prídavkom antioxidantov (Mousa et al., 2017), s prídavkom minerálov (Aksu et al., 2011), ochorením a ošetrovaním rôznych prípravkov (Nazifi a Asasi, 2001; Sokól et al., 2015).

V práci sme sledovali účinok xantohumolu na rast, jatočnú výťažnosť, oxidačnú stabilitu tuku v mäsa, ako aj jeho vplyv na vybrané biochemické parametre v krvi japonských prepelíc.

MATERIÁL A METODIKA

Do sledovania bolo zaradených 40 japonských prepelíc plemena Faraon (Farma Malá Ida s.r.o., SR), ktoré boli rozdelené do dvoch skupín po 20 jedincov, experimentálna skupina mala krmivo suplementované s prídavkom xantohumolu, druhá bola kontrolná, kŕmená len kŕmnom zmesou. Obe skupiny boli kŕmené kŕmnom zmesou 1557– kompletná kŕmna zmes pre prepelice MINI vo veľkosti granúl 1 – 3 mm (výrobca De Heus a.s., CZ). XA bol experimentálnej skupine v krmive podávaný do veku 60 dní. So suplementáciou sa začalo u prepelíc vo veku 8 dní. V priebehu pokusu mali prepelice prístup ku krmivu a vode *ad libitum*. Po ukončení suplementácie boli prepelice po omráčení vykŕvené (Marcinčák et al., 2018). Jatočná výťažnosť bola stanovená ako percentuálne vyjadrenie hmotnosti jatočne opracovaného tela k hmotnosti živých japonských prepelíc.

V sledovaní bol použitý chmeľový extrakt obsahujúci 75 % xantohumolu. Tento extrakt bol pre zlepšenie jeho rozpustnosti vo vode a biologickej dostupnosti (EP171766458.4) spracovaný pri vyššej teplote pomocou KOLLIDON VA64. Použitý extrudát obsahoval 10 % xanthohumolového extraktu.

Stanovenie vlhkosti, celkového popola a celkového obsahu bielkovín vo vzorkách sa uskutočňovalo podľa Gajdoša et al. (2015). Hodnota pH sa určila priamym zavedením sondy pH metra (inoLab pH 720, WTW vybaveného elektródou Ingold Messtechnik AG, Udorf, Švajčiarsko) do prsnej svaloviny. Obsah proteínu vo vzorkách sa stanovil pomocou analyzátora Kjeldahl 1030 (Tecator Co., Hoganas, Švédsko). Oxidácia lipidov vo vzorkách prsnej svaloviny sa merala ako TBARS podľa Marcinčák et al. (2004) a meraná spektrofotometricky pri 532 nm (Helios γ , v. 4.6, Thermo spectronic, UK). Vzorky svalstva sa vákuovo zabalili do polyetylénových sáčkov a skladovali sa pri teplote 4°C počas 7 dní. Koncentrácia TBARS sa vyjadrila ako miligramy malondialdehydu (MDA) na kilogram svaloviny. Pred analýzou boli vzorky prsnej svaloviny v oboch skupinách homogeizované.

Čas medzi vybratím prepelíc z klieťok a odberom krvi bol 20 sekúnd. Krvné vzorky sa centrifugovali pri 2500 x g počas 10 minút. Stanovenie glukózy (GLU), cholesterolu (CHOL) a celkového proteínu (TP) boli vykonávané pomocou automatického analyzátora Unicel DxC 880i (Beckman Coulter, USA) s použitím komerčných súprav Labtest podľa metód opísaných Duncan et al. (1994). Stanovenie aspartátaminotransferázy (AST), alaníntransaminázy (ALT a α -glutamyltransferázy (α -GMT) bolo založené na meraní absorbancie. Koncentrácia týchto enzýmov bola stanovená spektrofotometricky (Tietz, 1995). Pre všetky spektrofotometrické metódy bol použitý biochemický analyzátor Cobas C111 (Roche Diagnostics Ltd., Basel, Švajčiarsko).

Štatistické spracovanie a vyhodnotenie výsledkov sa uskutočnilo v programe Microsoft Excel. Výsledky sú vyjadrené ako stredná hodnota (M) a štandardná odchýlka (SD). Významnosť rozdielov v stredných hodnotách medzi suplementovanou a kontrolnou skupinou bola hodnotená t-testom na hladine významnosti $P < 0,05$.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Výsledky Olubamiwa et al. (1999) poukazujú na to, že prepeličie mäso a vajcia majú vysokú kvalitu bielkovín, vysokú biologickú hodnotu a nízky obsah kalórií. Podľa Babangida a Ubosi (2005) má japonská prepelica potenciál slúžiť ako vynikajúci a cenovo dostupný zdroj živočíšnych bielkovín.

Tabuľka 1 Hmotnosť cenných častí tela - prsnej a stehennej svaloviny

Sledované parametre	Jednotky	XN-krmivo	Kontrola
		M±SD	M±SD
Hmotnosť prsnej svaloviny s kosťou	g	76,47±5,97	71,67±5,19
Hmotnosť prsnej svaloviny bez kosti	g	58,33±7,26	54,27±5,44
Hmotnosť stehennej svaloviny s kosťou	g	44,67±3,94	43,47±5,14
Hmotnosť stehennej svaloviny bez kosti	g	32,67±2,29	31,73±3,51

Popis: XN – xantohumol, M – stredná hodnota, SD – štandardná odchýlka

Percentuálne vyjadrenie mäsa u japonskej prepelice je pomerne vysoké. Prsná svalovina s kosťou dosahuje 37,3 - 38,7 % z celkovej hmotnosti opracovaného jatočného tela, stehenná svalovina 22,7 - 24,6 % a telo, krk a krídla spolu 35,9 - 37,8 % (Panda a Singh, 1990). V rámci nášho skúmania sme nezistili signifikantné rozdiely v hmotnosti cenných častí tela (prsnej a stehennej svaloviny) (Tabuľka 1). Pri posúdení percentuálneho vyjadrenia prsnej a stehennej svaloviny s kosťou sme zistili podobné výsledky, naopak pri posúdení percentuálneho vyjadrenia sledovaných svalových partií bez kosti sme získali oproti Panda a Singh (1990) o niečo nižšie hodnoty (Tabuľka 2).

Tabuľka 2 Percentuálne vyjadrenie hmotnosti cenných častí tela - prsnej a stehennej svaloviny s kosťou a bez kosti k hmotnosti jatočného tela

Sledované parametre	Jednotky	XN-krmivo	Kontrola
		M±SD	M±SD
Prsná svalovina s kosťou	%	40,26±4,77	39,31±4,12
Prsná svalovina bez kosti	%	30,71±4,74	29,77±3,68
Stehenná svalovina s kosťou	%	23,52±2,82	23,84±3,14
Stehenná svalovina bez kosti	%	17,20±2,12	17,41±2,25

Popis: XN – xantohumol, M – stredná hodnota, SD – štandardná odchýlka

Tabuľka 3 Vplyv suplementácie xantohumolom na pH a jednotlivé zložky mäsa

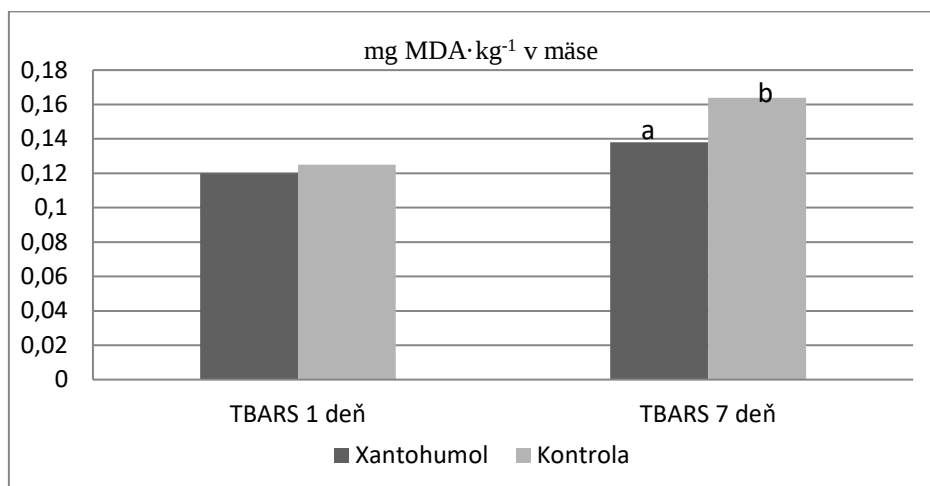
Sledované parametre	Jednotky	XN v krmive	Kontrola
		M±SD	M±SD
pH		6.01 ± 0.08	6.07 ± 0.06
Vlhkosť	%	71.13 ± 0.93	72.14 ± 1.16
Proteín	%	23.87 ± 0.89 ^a	20.79 ± 1.08 ^b
Tuk	%	2.64 ± 0.15	2.57 ± 0.17
Popoloviny	%	2.48 ± 0.012	2.40 ± 0.09

Popis: XN – xantohumol, M – stredná hodnota, SD – štandardná odchýlka, ^{a, b} rozdielne písmená sú v riadku pri hladine významnosti P < 0,05

Choudhary a Mahadevan (1986) zistili obsah proteínov 23 % v prsnej a 18,7 % v stehennej svalovine. V porovnaní obsahu proteínov v mäse sme zistili štatisticky významné rozdiely na hladine P > 0,05 (Tabuľka 3). Obsah vody, tukov a popolovín v prsnej a stehennej svalovine nebol xantohumolom ovplyvnený.

Antioxidanty hrajú dôležitú úlohu v eliminácii reaktívnych foriem kyslíka (ROS) a iných radikálov. Niektoré štúdie poukazujú na to, že antioxidanty pridané do krmiva nielen hydiny (Kennedy et al., 2005), ale aj iných druhov zvierat (Lahučký et al., 2005) bránia oxidácii tukov. Podľa Sahina et al. (2003) prídavok vitamínu C a kyseliny listovej pozitívne ovplyvnili rast japonských prepelíc. Taktiež v štúdiu od Pompeua (2018) bol preukázaný pozitívny účinok vitamínu E na celkový rast, kvalitu mäsa a imunitnú odozvu zvierat.

Medzi dôležité faktory ovplyvňujúce kvalitu mäsa po porážke patria oxidačné procesy. Proces zrenia je energeticky náročný proces, využívajúci degradáciu glykogénu v svalovine, vznik kyseliny mliečnej a následné zníženie pH. Pokles pH má veľký vplyv na rôzne chemické a biochemické procesy v mäse (Simpson, 2012). Xantohumol vplyv na hodnotu pH mäsa nemal. Dôležitým ukazovateľom kvality tukov, mäsa a mäsových výrobkov sú polynасыtené mastné kyseliny. Zoxidované tuky menia farbu, chuť, vôňu, štruktúru a dokonca aj výživnú hodnotu potravín (Tkáčová a Angelovičová, 2013). Výsledky stanovenia TBARS, ktoré sa vyjadruje ako množstvo malondialdehydu (MDA) ako hlavného rozkladného produktu polynасыtených mastných kyselín, sú znázornené na obrázku 2. Pri experimentálnej skupine sme po siedmich dňoch chladiarenského skladovania zistili nižšie hodnoty TBARS v svalovine v porovnaní s kontrolnou skupinou ($P < 0,05$).



Obrázok 2 Vplyv xantohumolu na oxidačnú stabilitu mäsa

Popis: TBARS – reaktívne látky kyseliny tiobarbiturovej, MDA – malondialdehyd, ^{a, b} rozdielne písmená sú v riadku pri hladine významnosti $P < 0,05$

Výsledky biochemického vyšetrenia krvi sú uvedené v tabuľke 4. Sokól et al. (2015) vo svojej práci zistil hodnoty TP, albumínu, CHOL a ALT vo fyziologickom rozpätí, okrem aktivity AST, ktorá bola v rámci skúmaných skupín prepelíc nižšia. V experimentálnej skupine sme v porovnaní s kontrolnou skupinou zaznamenali významný pokles aktivity AST ($P < 0,05$). Hodnoty TP a albumínu sa medzi skupinami významne líšili, ale zostali v referenčných rozsahoch. Doplnok xantohumolu pozitívne ovplyvnil hodnoty TP, albumínu, globulínu a CHOL. Na druhej strane xantohumol negatívne ovplyvnilo hodnoty AST, ALT a γ -GMT.

Tabuľka 4 Vplyv xantohumolu na vybrané biochemické parametre krvi japonských prepelíc

Sledované parametre	Jednotky	XA v krmive	Kontrola
		M $\pm$ SD	M $\pm$ SD
TP	g.l ⁻¹	34.5 $\pm$ 2.7 ^a	30.3 $\pm$ 2.3 ^b
Albumíny	g.l ⁻¹	13.2 $\pm$ 1.1 ^a	11.2 $\pm$ 0.87 ^b

Globulíny	g.l ⁻¹	21.3 ± 3.3	19.1 ± 3.5
GLU	mmol.l ⁻¹	15.81 ± 1.66	16.30 ± 1.92
Cholesterol	mmol.l ⁻¹	4.68 ± 0.81	4.35 ± 0.72
AST	μkat.l ⁻¹	3.94 ± 0.72 ^a	4.90 ± 0.76 ^b
ALT	μkat.l ⁻¹	0.05 ± 0.01	0.06 ± 0.01
γ-GMT	μkat.l ⁻¹	0.01 ± 0.01	0.02 ± 0.02

Popis: TP – celkové bielkoviny, GLU – glukóza, AST – aspartátaminotransferáza, ALT – Alanínaminotransferáza, γ-GMT – γ-Glutamyltransferáza, XA – xantohumol, M – stredná hodnota, SD – štandardná odchýlka, ^{a, b} rozdielne písmená sú v riadku pri hladine významnosti P<0,05

ZÁVER

Xanthohumol nemal vplyv na hmotnosť, percentuálne vyjadrenie hodnotných častí tela (prsnej a stehennej svaloviny), pH mäsa, obsah vody, tuku a popolovín. Obsah proteínov v prsnej a stehennej svalovine japonských prepelíc bol xantohumolom pozitívne ovplyvnený (P<0,05). Oxidačné procesy tukov počas chladiarenského skladovania boli pri kontrolnej skupine najvýraznejšie, nakoľko suplementácia krmiva xantohumolom znížila oxidačné procesy v mäse (P<0,05). Vybrané biochemické parametre krvi boli taktiež xantohumolom ovplyvnené, ako TP a albumín (P<0,05). Pri sledovaní enzymatickej aktivity sme zistili pokles hladín AST (P<0,05).

LITERATÚRA

- Abou-Kassem, D. E., El-Kholy, M. S., Alagawany, M., Laudadio, V., Tufarelli, V. 2019. Age and sex-related differences in performance, carcass traits, hemato-biochemical parameters, and meat quality in Japanese quails. In *Poultry Science*, [online], vol. 98, no. 4, pp. 1684-1691. [cit. 2021-02-10]. ISSN: 0032-5791. Dostupné na: <https://doi.org/10.3382/ps/pey543>
- Agina, O. A., Ezema, W. S., Iwuoha, E. M. 2017. The Haematology and Serum Biochemistry Profile of Adult Japanese Quail (*Coturnix coturnix japonica*). In *Notulae Scienta Biologicae*. [online], vol. 9, no. 1. pp. 67-72. [cit. 2021-02-05]. ISSN 2067-3264. Dostupné na: <https://doi.org/10.15835/nsb919928>
- Aksu, T., Aksu, M. I., Yoruk, M. A a Karaoglu, M. 2011. Effects of organically-complexed minerals on meat quality in chickens. In *British Poultry Science*, [online], vol 52, no. 5, pp. 558-563. [cit. 2021-02-10]. ISSN 1466-1799. Dostupné na: <http://dx.doi.org/10.1080/00071668.2011.606800>
- Ayub Ali, M., Hmar, L., Inaotombi Devi, L., Prava, M., Lallianchunga, M.C., Tolengkomba, T.C. 2012. Effect of age on the haematological and biochemical profile of Japanese quails (*Coturnix coturnix japonica*). In *International Multidisciplinary Research Journal*, [online], vol. 2, no. 8, pp. 32-35. [cit. 2021-02-06]. ISSN: 2231-6302. Dostupné na: <https://updatepublishing.com/journal/index.php/imrj/article/view/2698>
- Babangida, S., Ubosi, C.O. 2005. Effects of varying dietary protein levels in the performance of laying Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*) in a semi-arid environment. In *Nigerian Journal of Animal Production*. [online], vol. 33, no. 1, pp. 45-52. [cit. 2021-02-10]. ISSN 0331-2062. Dostupné na: <https://doi.org/10.51791/njap.v33i1.1494>
- Choudhary, M., Mahadevan, T. 1986. Influence of age, storage and type of cuts on the composition of quail meat. In *Indian Poultry Science*, vol. 21, no. 3, pp. 252-254.
- Duncan, J. R., Prasse, K. W., Mahaffey, E. A. (Eds) 1994. Veterinary laboratory medicine: clinical pathology, 3rd edition, USA, Iowa State University Press; Ames, Iowa. pp. 300. ISBN 9780813819174.
- Gerhauser, C., Frank, N. 2005. Xanthohumol, a new all-rounder? In *Molecular Nutrition and Food Research*, [online], vol. 49, pp. 821-823. [cit. 2021-02-05]. ISSN 1613-4133. Dostupné na: <https://doi.org/10.1002/mnfr.200590033>
- Hořta, P., Dostál, P., Basařová, G. 2004. Xanthohumol- chmelová priskyřice nebo polyfenol? In *Chemické Listy*. [online], vol. 98, pp. 825-830. [cit. 2021-02-05]. ISSN 1213-7103. Dostupné na: <http://www.chemicke-listy.cz/ojs3/index.php/chemicke-listy/article/view/2112/2112>
- Kennedy O.B., Stewart-Knox B.J., Mitchell P.C., Thurnham D.I. 2005. Vitamin E supplementation, cereal feed type and consumer sensory perceptions of poultry meat quality. In *British Journal of Nutrition*, [online], vol. 93, no. 3, pp. 333-338. [cit. 2021-02-05]. ISSN 1475-2662. Dostupné na: <https://doi.org/10.1079/BJN20041336>
- Lahučký, R., Bahelka, I., Novotná, K., Vařicková, K. 2005. Effect of dietary vitamin E and vitamin C supplementation on the level of α-tocopherol and L-ascorbic acid in muscle and on the antioxidative status and

- meat quality of pigs. In *Czech Journal of Animal Science*. [online], vol. 50, pp. 175-184. [cit. 2021-02-05]. ISSN 1805-9309. Dostupné na: <https://doi.org/10.17221/4012-CJAS>
- Liu, M., Hansen, P. E., Wang, G., Qiu, L., Dong, J., Yin, H., et al. 2015. Pharmacological profile of xanthohumol, a prenylated flavonoid from hops (*Humulus lupulus*). In *Molecules*, [online], vol. 20, no. 1, p. 754–779. [cit. 2021-02-06]. ISSN 1420-3049. Dostupné na: <https://doi.org/10.3390/molecules20010754>
- Marcinčák, S., Sokol, J., Bystrický, P., Popelka, P., Turek, P., Bhide, M., Máté, D. 2004. Determination of lipid oxidation level in broiler meat by liquid chromatography. In *Journal of AOAC International*, [online], vol. 87, no. 5, pp. 1148-1152. [cit. 2021-02-17]. ISSN 1060-3271. Dostupné na: <https://doi.org/10.1093/jaoac/87.5.1148>
- Marcinčák, M., 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*, [online], vol. 2018, Article ID 2609548, pp. 8. [cit. 2021-02-05]. ISSN 2314-6133. Dostupné na: <https://doi.org/10.1155/2018/2609548>
- Mousa, S. A., Abdel-Raheem, S. M., Abdel-Raheem H. A., Sadeek, A. L. S. 2017. Effect of Dietary Fat Sources and Antioxidant Types on Growth Performance and Carcass Quality of Japanese Quail. In *International Journal of Poultry Science*. [online], vol. 16, no. 11, pp. 443-450. [cit. 2021-02-06]. ISSN 1994-7992. Dostupné na: <https://doi.org/10.3923/ijps.217.443.450>
- Nazifi, S., Asasi, K. 2001. Haematological and serum biochemical studies on Japanese quails (*Coturnix coturnix japonica*) fed different levels of furazolidone. In *Revue de Médecine Veterinaire*, [online], vol. 152, no. 10, pp. 705-708. [cit. 2021-02-05]. ISSN 2258-0646. Dostupné na: https://www.revmedvet.com/2001/RMV152_705_708.pdf
- Olubamiwa, O., Haruna, E.S., Musa, U., Akinwole, T. O. Combin, L. H., Longe, G. O. 1999. Effect of different energy levels of cocoa based diets on the productive performance of Japanese quail. In *Nigerian Journal of Animal Production*. vol. 26, pp. 88-92. ISSN 0331-2062.
- Panda, B., Singh, R. P. (1990). Developments in processing quail meat and eggs. In *World's Poultry Science Journal*, [online], vol. 46, no. 3, pp. 219–234. [cit. 2021-02-05]. ISSN 1743-4777. Dostupné na: <https://doi.org/10.1079/WPS19900022>
- Pompeu, M. A., Cavalcanti, L. F. L., Toral, F. L. B. 2018. Effect of vitamin E supplementation on growth performance, meat quality, and immune response of male broiler chickens: A meta analysis. In *Livestock science*. [online], vol. 208, pp. 5-13. [cit. 2021-02-05]. ISSN 1871-1413. Dostupné na: <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2017.11.021>
- Sahin, H., Ondercin, M., Sahin, N., Gursu, M. F., Kucuk, O. 2003. Dietary vitamin C and folic acid supplementation ameliorates the detrimental effects of heat stress in Japanese quail. In *Journal Nutrition*, [online], vol. 133, no. 6, pp. 1882-1886. [cit. 2021-02-05]. ISSN 1541-6100. Dostupné na: <https://doi.org/10.1093/jn/133.6.1882>
- Scholtz, N., Halle, I., Flachowsky, G., Sauerwein, H. 2009. Serum chemistry reference values in adult Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*) including sex-related differences. In *Poultry Science*. [online], vol. 88, no. 6, pp. 1186-1190. [cit. 2021-02-07]. ISSN 0032-5791. Dostupné na: <https://doi.org/10.3382/ps.2008-00546>
- Simpson, B. K. 2012. Food Biochemistry and Food processing. 2th ed. Iowa: Blackwell Publishing, pp. 896, ISBN 978-0-8138-0874-1.
- Sokół, R., Gesek, M., Raś-Noryńska, M., Michalczyk, M., Koziątek, S. 2015. Biochemical parameters in Japanese quails *Coturnix coturnix japonica* infected with coccidia and treated with Toltrazuril. In *Polish Journal of Veterinary Sciences*. [online], vol. 18, no. 1, pp. 79–82. [cit. 2021-02-05]. ISSN 1505-1773. Dostupné na: <https://doi.org/10.1515/pjvs-2015-0010>
- Stevens, J. F. a Page, J. E. 2004. Xanthohumol and related prenylflavonoids from hops and beer: to your good health!. In *Phytochemistry* [online], vol. 65, pp. 1317-1330. [cit. 2021-02-05]. ISSN 0031-9422. Dostupné na: <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2004.04.025>
- Tietz N.W. 1995. Clinical guide to laboratory tests, (3rd edn) WB Saunders Company: Philadelphia. pp. 1096. ISBN 9780721650357
- Tkáčová, J., Angelovičová, M. 2013. Aetheroleum and fat oxidation of chicken meat. *Potravinárstvo*. [online], vol. 7, no. 1, pp. 76-79. [cit. 2021-02-05]. ISSN 1337-0960. Dostupné na: <https://doi.org/10.5219/267>
- Xanthohumol. [citované dňa 6.2.2021], dostupné na: <http://fis.org/xanthohumol/>

Pod'akovanie: Realizácia experimentu bola finančne podporená grantom KEGA č. 006UVLF-4/2020.

Kontaktná adresa/Contact address: Zuzana Lacková, MVDr., PhD., Katedra výživy a chovu zvierat, Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, Komenského 73, 041 81 Košice, Tel.: +421915984580; Email: zuzana.lackova@uvlf.sk

MIKROBIÁLNE FYLÁ ZASTÚPENÉ V OVČOM HRUDKOVOM SYRE

MICROBIAL PHYLA DETECTED IN EWES' MILK CHEESE

Andrea Lauková, Lenka Micenková, Valentína Focková, Monika Pogány Simonová, Martin Tomáška, Miroslav Kološta

Abstract: Samples from 54 traditional Slovak ewes' milk lump cheeses were used for microbial analysis using sequencing method. The phylum Firmicutes was dominated (60.9%) followed with the phylum *Proteobacteria* (38.2%) and in small amount of the phylum *Actinobacteria* (0.38%) and phylum *Bacteroidetes* (0.35%). Among the most frequently detected genera in the framework of the phylum Firmicutes were found *Streptococcus* (41.2%), *Lactococcus* (8.5%), *Fructobacillus* (3.9%), *Enterococcus* (2.3%) and *Staphylococcus* (1.6%). Detected representatives of the phylum *Proteobacteria* were allotted in the same class *Gammaproteobacteria* and in two orders *Pseudomonales* and *Enterobacteriales*. They were allotted in the family *Pseudomonaceae*, *Moraxellaceae* and *Enterobacteriaceae* and in seven genera, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Enterobacter*, *Moraxella*, *Ewingella*, *Escherichia-Shigella* and *Pantoea*. In the case of the phylum *Bacteroidetes*, classes *Flavobacteria* and *Actinobacteria* were detected with orders *Flavobacteriales* and *Micrococcales/Actinomycetales* and the family *Flavobacteriaceae* and *Microbacteriaceae* with two genera *Chrysobacterium* and *Curtobacterium* detected in cheeses. This study is a fundamental contribution in knowledge regarding the microbiome of ewes' milk lump cheese.

Keywords: phylum, ewe, milk lump cheese, microbiota, sequencing

INTRODUCTION

Nowadays, consumers increasingly demand traditional/local products, among which those made from ewes' milk belong. Products made from ewes' milk are even suitable for people suffering from lactose intolerance. Regarding the ewes' milk lump cheese, lactose is mostly removed into the whey during processing, which means that such cheese consumption should be safe for lactose-intolerant persons.

Many European cheeses are still produced traditionally from raw or heat-treated milk with or without the use of natural undefined starters in farms (Vandera et al., 2018); e. g. local Slovak ewes' milk lump cheese. It is a traditional cheese produced from unpasteurized ewes' milk without any added culture (Uhrín et al., 2002). However, the microbiota in ewes' milk comes from various sources (Lauková et al., 2020a). For consumers and producers as well is important to know probable microbiota occurrence in the products which can influence their character and consumption. Only limited information exists regarding the characterization of bacteria detected in ewes' lump cheeses.

Recent progressive identification methods e.g. new generation sequencing allow to identify microbiome in cheese samples more detail; from individual phyla up to genera and species representatives as well. Microbiota described in ewes' milk lump cheeses using this method has been not reported yet. Therefore, in this study representative phyla in ewes' milk lump cheeses will be referred evaluating sequencing analysis. It is original and knowledge spreading information in basic microbiology and dairy processing.

MATERIAL AND METHODS

Cheese samples (54) were diluted 5 fold with molecular grade water and homogenized by vortexing with Zirconia beads 2.3 mm (BioSpec, USA) A volume of 260 µl of homogenized sample was then used for DNA isolation (DNeasy PowerLyzer Power Soil kit, Qiagen, Germany) according to the manufacturers' instruction. Isolated DNA was used as a template in

PCR reaction targeting the hypervariable V4 region of the bacterial 16S rRNA gene (16S Metagenomic sequencing Library Preparation protocol; Illumina, USA). The PCR detection protocol was as follows: 95°C 3 min; 95°C 30 s, 55°C 30 s, 72°C 30 s, 25 cycles; 72°C 5 min. PCR clean-up was performed with Agencourt AMPure XP beads (Beckman Coulter Genomics) and concentration was measured with Qubit[®] ds DNA HS Assay kit (Invitrogen[™], USA). Based on the concentration values, samples with different inner tags were equimolarly pooled and used as a template for second PCR with Nextera XT indexes (Illumina, USA). The prepared library was checked with a High sensitivity D5000 Screen tape (Agilent Technologies, USA) and with Illumina-LightCycler 480 qPCR MasterMix (Roche, USA). The library was diluted to a final concentration of 8 pM and 20% of PhiX DNA (Illumina, USA) was added. Sequencing was performed with the Miseq reagent kit V3 using a MiSeq 2000 instrument according to the manufacturer's instruction (Illumina, USA).

Sequencing data were analysed by using the fastq-join method within the join-pairs.py command in QIIME 1.9.1. Taxonomy was assigned to each operational taxonomic unit based on SILVA 123 reference database.

RESULTS AND DISCUSSION

The phylum *Firmicutes* was dominated in traditional ewes' milk lump cheeses (60.9%). The high occurrence percentage reached also phylum *Proteobacteria* (38.2%). The other phyla were detected in small amount: phylum *Actinobacteria* formed 0.38% and phylum *Bacteroidetes* reached amount 0.35%. Among the most frequently detected genera in the framework of the phylum *Firmicutes* were found the genera *Streptococcus* (41.2%), *Lactococcus* (8.5%), *Fructobacillus* (3.9%), *Enterococcus* (2.3%) and *Staphylococcus* (1.6%). Representatives of these genera are Gram-positive bacteria. Among those 5 genera, 4 belong in the same class *Bacilli*, in the same order *Lactobacillales* (*Lactococcus*, *Streptococcus*, *Fructobacillus*, *Enterococcus*). The genus *Streptococcus* is allotted in the family *Streptococcaceae* as well as the genus *Lactococcus*. The genus *Fructobacillus* belongs in the family *Leuconostocaceae*. The genus *Enterococcus* is from the family *Enterococcaceae*. Finally, the genus *Staphylococcus* belongs in class *Bacilli*, but in order *Bacillales* and in the family *Staphylococcaceae* (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2009; Holzapfel and Wood, 2014; Coates-Brown et al, 2018). Detected representatives of the phylum *Proteobacteria* were allotted in the same class *Gammaproteobacteria* and in two orders *Pseudomonales* and *Enterobacteriales*. They were allotted in three families such as *Pseudomonaceae*, *Moraxellaceae* and *Enterobacteriaceae* and even in seven genera such as *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Enterobacter*, *Moraxella*, *Ewingella*, *Escherichia-Shigella* and *Pantoea*. In the case of the phylum *Bacteroidetes*, classes *Flavobacteria* and *Actinobacteria* were detected with orders *Flavobacteriales* and *Micrococcales/Actinomycetales* and families *Flavobacteriaceae* and *Microbacteriaceae* detecting in cheeses two genera *Chrysobacterium* and *Curtobacterium* (Chase et al., 2016). Although those lastly named bacteria were detected in really very small amount. Those genera can be indicated as contaminant bacteria which can come in a product from external conditions (hygiene of animals, conditions in breeding, external factors-temperature, season, etc. (De Leon et al., 2020). The author mentioned found contaminant staphylococci carrying enterotoxin-encoding genes in goat milk dairy plants. Even meticillin.-resistant staphylococci were isolated from cheese produced in German farm-dairies (Zinke et al., 2012).

It is interesting that using the standard microbiological method and MALDI-TOF mass spectrometry as well, the most detected were different staphylococcal species (Lauková et al., 2020a); genus *Staphylococcus* belongs in the phylum *Firmicutes* which was dominated. Seventeen staphylococcal strains were identified from ewes' milk lump cheeses taxonomically belonging in five staphylococcal species and three clusters (*Staphylococcus aureus*, *S. xylosus*,

S. equorum, *S. succinus*, and *S. simulans*, Lauková et al. 2020a). The most prevalent and abundant taxa found in cow teat and carton milk reported by Parente et al. (2020) belonging in the phyla *Firmicutes*, *Actinobacteria* and *Bacteroidetes*. As it can be seen it is very similar to our findings although in ewes' milk. Parente et al. (2020) even found in mastitis cow milk genera such as *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Escherichia-Shigella*, *Lactobacillus* and *Corynebacterium*.

In ewes' milk and products from it also enterococci were detected (Rivas et al. 2012, Lauková et al., 2001; 2020b; Strateva et al., 2015). However, some of those strains showed antibacterial potential via bacteriocins which can be used to reduce contaminant microbiota from safety aspect view regarding milk or dairy products processing and consumers as well (Strateva et al., 2015; Lauková et al., 2019). E.g. contaminate staphylococci in ewes' milk lump cheese were inhibited using lantibiotic bacteriocins, gallidermin and nisin as well as with enterocins with inhibition activity up to 102 400 AU/ml; Lauková et al. 2020a). Antibacterial potential of *E. mundtii* from raw goat milk presented also Lauková et al. (2020c). This study is a fundamental contribution in knowledge regarding the microbiom of ewes' milk lump cheese and it also showed potential to protect/reduce contaminant bacteria using bacteriocins.

CONCLUSION

In 54 samples from traditional Slovak ewes' milk lump cheeses, microbiome was analysed using sequencing method. The phylum *Firmicutes* was dominated followed with the phylum *Proteobacteria*, *Actinobacteria* and *Bacteroidetes*. Among the most frequently detected genera of the phylum *Firmicutes* were *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Fructobacillus*, *Enterococcus* and *Staphylococcus*. Detected representatives of the phylum *Proteobacteria* were allotted in the same class *Gammaproteobacteria* and in order *Pseudomonales* and *Enterobacteriales*. They were allotted in the family *Pseudomonaceae*, *Moraxellaceae* and *Enterobacteriaceae* and involved the genera, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Enterobacter*, *Moraxella*, *Ewingella*, *Escherichia-Shigella* and *Pantoea*. In the case of the phylum *Bacteroidetes*, the genera *Chrysobacterium* and *Curtobacterium* were detected in cheeses belonging in classes *Flavobacteria* and *Actinobacteria*, in order *Flavobacteriales* and *Micrococcales/Actinomycetales* and in the family *Flavobacteriaceae* and *Microbacteriaceae*.

REFERENCES

- Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 2009. vol. 3, The Firmicutes, Springer Dordrecht, Heidelberg London, New York. Vos, P., Garrity, G., Jones, P., Krieg, N.P., Ludwig, W., Rainer, F. A., Schleifer, K.H., Whitmann, W. ISBN:978-0-387-95041-9, doi:10.100/b92997
- Coates-Brown, R., Moran, J. C., Pongchaikul, P., Ddarby, A. C., Horsburgh, M. J. 2018. Comparative genomics of *Staphylococcus* reveals determinants of speciation and diversification of antimicrobial defence. In *Frontiers of Microbiology*, vol. 19, pp. 2753, doi:10.3389/fmicb.2018.02753
- De Leon, C. M. C. G., Sousa, F. G. C., Saraiva, M. M. S., Givisiez, P. E. N., Silva, N. M. V., Viera, R. F. C., Oliveira, C. J. B. 2020. Equipment contact surfaces as sources of *Staphylococcus* carrying enterotoxin-encoding genes in goat milk dairy plants. In *International Dairy Journal*, vol. 111, pp. 104827, <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2020.104827>
- Holzappel, W. H., Wood, B. J. B. 2014. In *Lactic acid bacteria: Biodiversity and Taxonomy*, eds. ISBN 9781444333831, doi:10.1002/97811186855252
- Chase, A. B., Arevalo, P., Polz, M. F., Berlemont, R., Martiny, J. B. H. 2016. Evidence for Ecological flexibility in the cosmopolitan genus *Curtobacterium*. In *Frontiers in Microbiology*, vol. 7, pp.1874, doi:10.3389/fmicb.2016.01874
- Lauková, A., Czikková, S. 2001. Antagonistic effect of enterocin CCM4231 from *Enterococcus faecium* on „bryndza“, a traditional Slovak dairy product from sheep milk. In *Microbiological Research*, vol. 156, pp. 31-34.
- Lauková, A., Strompfová, V., Tomáška, M., Kološta, M. 2019. Occurrence of enterocin genes in enterococci from Slovak milk product žinčica. In *Scientia Agriculturae Bohemica*, vol.50, pp. 197-202.doi.10.2487/sab-2019-0027
- Lauková, A., Pogány Simonová, M., Focková, V., Kološta, M., Tomáška, M., Dvorožňáková, E. 2020a. Susceptibility to bacteriocins in biofilm-forming, variable staphylococci isolated from local Slovak ewes' milk lump cheeses. In *Foods*, vol. 9, no. 9, ID 1335 (12 pages), open access, doi:10.3390/foods909135

- Lauková, A., Kandričáková, A., Bino, E., Tomáška, M., Kološta, M., Kmet', V., Stropfová, V. 2020b. Some safety aspects of enterococci isolated from Slovak lactic acid dairy product „žinčica“. In *Folia Microbiologica*, vol. 65, pp. 79-85. <https://doi.org/10.1007/s12223-019-00703-5>
- Lauková, A., Focková, V., Pogány Simonová, M. 2020c. *Enterococcus mundtii* isolated from Slovak raw goat milk and its bacteriocinogenic potential. In *International Journal of Environmental Research and Public Health*, vol. 17, pp. 9504, doi:10.3390/ijerph17249504
- Parente, E., Ricciardi, A., Zotta, T. 2020. The microbiota of dairy milk: A review. In *International Dairy Journal*, vol. 107, pp. 104714, <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2020.104714>
- Rivas, F. P., Castro, M. P., Vallejo, M., Marguet, E., Campos, C. A. 2012. Antibacterial potential of *Enterococcus faecium* strains from ewe's milk and cheese. In *LWT-Food Science and Technology*, vol. 46, pp. 428-436. doi:10.1016/j.lwt.2011.12.005
- Strateva, T., Dimov, S.G., Atanasova, D., Petkova, V., Savov, E., Mitov, I. 2015. Molecular genetic study of potentially bacteriocinogenic clinical and dairy *Enterococcus* spp. isolates from Bulgaria. In *Annals in Microbiology*, doi:10.1007/s13213-015-1120-3
- Uhrín, V., Lauková, A., Jančová, A., Plintovič, V. 2002. Mlieko a mliečna žľaza (in Slovak) Milk and mammary gland. Eds. Publ. No. 92, *Faculty of Natural Sciences of the University Constantinus Philosophus*, Nitra, p.5-167. ISBN 80-8050-511-X
- Vandera, E., Tsirke, G., Kokouri, A., Koukkou, A. I., Samelis, J. 2018. Approaches for enhancing in situ detection of enterocins genes in thermized milk and selective isolation of enterocin-producing *Enterococcus faecium* from Baird-Parker agar. In *International Journal of Food Microbiology*, vol. 81, pp.23-31, <https://doi.org/10.1016/j.jfoodmicro.2018.05.020>
- Zinke, C., Winter, M., Mohr, E., Kroemker, V. 2012. Occurrence of methicillin –resistant *Staphylococcus aureus* in cheese produced in german farm-dairies. In *Advances in Microbiology*, vol. 2, pp. 629-633. doi: 10.4236/aim.2012.24082

Acknowledgments: This work has been supported by the Slovak Research and Development Agency under the contract no. APVV-17-0028 and partially it has been also supported by the RECETOX research Infrastructure (project of the Ministry of Education of the Czech Republic LM2015051). We are grateful Mrs. Dana Melišová for her skillful laboratory work.

Contact address: Andrea Lauková, MVDr., CSc. Institute of Animal Physiology, Centre of Biosciences of the Slovak Academy of Sciences, Šoltésvej 4-6, 040 01 Košice, Slovakia, laukova@saske.sk; Lenka Micenková, RNDr. PhD, Masaryk University, Faculty of Science, Research Centre for Toxic Compounds in the environment (RECETOX), Kamenice 753/5, Pavillion A29, 625 00 Brno, Czech Republic, micenkova@recetox.muni.cz; Valentína Focková, Mgr., Institute of Animal Physiology, Centre of Biosciences of the Slovak Academy of Sciences, Šoltésvej 4-6, 040 01 Košice, Slovakia, fockova@saske.sk; Monika Pogány Simonová, MVDr., PhD, Institute of Animal Physiology, Centre of Biosciences of the Slovak Academy of Sciences, Šoltésvej 4-6, 040 01 Košice, Slovakia, simonova@saske.sk; Martin Tomáška, Ing., PhD, Research Dairy Institute, a.s. Dlhá 95, 010 01 Žilina, Slovakia, tomaska@vumza.sk; Miroslav Kološta, Ing. PhD, Research Dairy Institute, a.s. Dlhá 95, 010 01 Žilina, Slovakia, kolosta@vumza.sk

SLEDOVANIE VYBRANÝCH PARAMETROV MIKROBIOLOGICKEJ KVALITY BRAVČOVÝCH KLOBÁS OD RÔZNYCH DOMÁCICH PRODUCENTOV

MONITORING OF SELECTED MICROBIOLOGICAL PARAMETERS OF QUALITY IN PORK SAUSAGE FROM DIFFERENT DOMESTIC PRODUCERS

Eubomír Lopašovský, Lucia Zeleňáková, Simona Kunová, Silvia Jakabová

Abstract: The aim of the work was to analyze selected parameters of hygienic quality of smoked pork sausages from various domestic producers from eastern Slovakia. We examined 10 samples, in which the following microorganisms were monitored: coliform bacteria, total number of microorganisms, yeasts and fibrous microscopic fungi. The samples were different in terms of quantity and quality of basic raw materials used, amount of spices and edible salt. The technological procedure was chosen by the producers themselves, mainly on the basis of the tastes typical for the regions. All samples were treated with a cold smoke. From a microbiological point of view, it is important to note that none of the samples contained coliform bacteria, which indicates a good hygiene conditions in the production of sausages. The total number of microorganisms was ranging between 3.41 and 4.03 log KTJ.g⁻¹, the number of yeasts was found in the range from 2.19 to 2.39 log KTJ.g⁻¹ and the number of fibrous microscopic fungi was between 1.32 and 2.46 log KTJ.g⁻¹. The achieved values are comparable with the results of authors dealing with similar issues.

Key words: traditional pork sausages, microbiological quality, food safety, total viable count, coliform bacteria, yeasts, filamentous micro fungi

ÚVOD

Klobásou sa rozumie mäsový výrobok z jemne homogenizovaného mäsového diela alebo zo zrnitého mäsového diela alebo spojky a vložky plnený do technologického obalu s priemerom najviac 40 mm (Vyhláška č. 83/2016 Z. z. MPRV SR). Čerstvé bravčové klobásy sú zložené hlavne zo svaloviny a variabilného množstva tuku. Surovina je viac či menej hrubo zomletá, zmiešaná s rôznymi prísadami, ako sú soľ, ale aj rôzne konzervačné prísady a arómy v závislosti od miestnych zvykov a tradícií (Ingr, 2011). Klobásová zmes je plnená do prírodných čriev a hotové výrobky sa musia uchovávať v chladiarenských podmienkach, kým nie sú spotrebované. Čerstvé klobásy viac podliehajú skaze ako párky a majú skladovateľnosť niekoľko dní, ak sú skladované pri chladiarenských teplotách, najmä v neprítomnosti konzervačných prísad – domáce zabíjačkové klobásy. V dôsledku vysokého obsahu tuku a vody a nedostatočného tepelného opracovania je takýto produkt veľmi náchylný na mikrobiálnu kontamináciu a oxidáciu tukov (Dostálová et al., 2014).

Znižovanie počtu mikroorganizmov a zabráneniu ich rozmnožovaniu sa dosahuje údením, ale aj solením. Solenie je proces pridávania soliach zmesí do zomletého mäsa, kedy po dôkladnom premiešaní vzniká mäsové dielo pripravené na plnenie do prírodných čriev. Najčastejšie sa používajú dusičnanová soľ a soľ dusitanová, známa ako rýchlosoľ. Takto solená klobásová zmes má príjemnú arómu bez nežiaducich pachov (Koch et al., 2014). Proces údenia bol odjakživa využívaný na zaistenie trvanlivosti mäsového výrobku, jeho špecifických vlastností, ale aj konzistencie a eliminácie jednotlivých druhov mikroorganizmov nachádzajúcich sa v surovom mäse (Tomat et al., 2015).

Opatrenia v rámci kontroly bezpečnosti potravín, resp. surovín, sa musia zavádzať od prvovýroby až po konzumenta, ktorý je posledným článkom potravinového reťazca. Prísne dodržiavanie noriem spracovania, legislatívnych predpisov v oblasti kvality a bezpečnosti ako aj ich dôsledné dodržiavanie je základným predpokladom účinného predchádzania znehodnocovaniu mäsa a chorôb prenášaných potravinami (Zdolec, 2017). Vysoká úroveň osobnej hygieny ľudí prichádzajúcich do styku s potravinami, vybavenia a zariadení, spracovateľov mäsa a domáceho prostredia je hlavným krokom pri poskytovaní bezpečného, zdravého, atraktívneho a chutného mäsa a mäsových výrobkov (Lonergan et al., 2018).

Z hľadiska chemického zloženia je mäso pre mikroorganizmy vhodnou živnou pôdou, a preto rýchlo podlieha kazeniu výsledkom čoho je množstvo alimentárnych ochorení. Pokiaľ by sme chceli predĺžiť trvanlivosť mäsa a výrobkov z neho, je potrebné zabrániť mikrobiálnej kontaminácii. Dochádza k nej už pri primárnom spracovaní mäsa (Zdolec, 2017). Mikroorganizmy majú na mäse veľmi dobré podmienky pre svoj rast a činnosť, a preto sa dobre rozmnožujú a účinkom svojich enzýmov (proteolytických, lipolytických, sacharolytických a i.) spôsobujú kazenie. Činnosťou týchto enzýmov vznikajú produkty, ktoré môžu ohroziť zdravie konzumenta. Aj keď mikrobiálnu populáciu nedokážeme úplne zlikvidovať, je potrebné ju eliminovať na čo najmenšie prípustné množstvo (Lonergan et al., 2018).

Medzi najčastejšie gramnegatívne rody vyskytujúce sa na mäse patria najmä: *Aeromonas*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Citrobacter*, *Escherichia* a iné. Z grampozitívnych rodov spôsobujú kontamináciu mäsa predovšetkým rody *Bacillus*, *Micrococcus*, *Lactobacillus* a iné. Kontamináciu mäsových výrobkov môžu spôsobovať i niektoré patogénne mikroorganizmy, a to najmä *Campylobacter jejuni*, *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, ale aj *Staphylococcus aureus* a veľmi nebezpečný sérotyp *E. coli* O157:H7. Väčšina týchto mikroorganizmov môže prežívať pri nízkych teplotách i dlhšiu dobu (Mor-Mur, Yuste, 2010). *Yersinia enterocolitica* a *Listeria monocytogenes* rastú i pri nízkych teplotách, a preto predstavujú veľké nebezpečenstvo vzniku ochorení z potravín, a to konzumáciou najmä nedostatočne tepelne opracovaných mäsových výrobkov (Bajpai et al., 2012).

Indikátory hygieny a trvanlivosti sú chápané ako mikroorganizmy a ich metabolické produkty, ktorých prítomnosť v určitých potravinách na určitých úrovniach sa môže použiť na posúdenie kvality výrobku, ale aj jeho trvanlivosti. Tieto indikátory však musia spĺňať určité kritériá. Mali by byť prítomné a zistiteľné vo všetkých potravinách, ktorých kvalita alebo aj nedostatok sa má zistiť a posúdiť a ich rast a počet by mal byť priamoúmerný kvalite výrobku. Vo všeobecnosti je známe, že tie najspoločnejšie ukazovatele kvality výrobkov majú tendenciu byť špecifické pre daný výrobok (Moonlight, 2019).

Koliformné baktérie patria svojou prítomnosťou medzi základné kritériá určujúce hygienu výroby potravín. Patria medzi gramnegatívne a ich vhodným prostredím sú najmä exkrementy živočíchov, pôda, vegetácia, ale aj vodné prostredie. Nie sú však hlavnou príčinou chorôb. To, že sa vyskytujú v potravinách, poukazuje hlavne na výskyt aj ostatných patogénnych druhov mikroorganizmov (Sillankorva et al., 2012). Dokážu rásť za aeróbnych, ale aj anaeróbnych podmienok na klasických živných pôdach. Ich spoločným znakom je fermentácia laktózy za súčasnej tvorby plynu. Sledujú sa ako dôležitý indikátor znečistenia a hodnotenia kvality pracovného prostredia pri výrobe potravín (Tomat et al., 2015). *E. coli* je bežným zástupcom črevnej mikrobioty konzumenta, ale ak je súčasťou aj prostredia potravinárskej prevádzky, tu zohráva významnú funkciu ako dôležitý indikátor úrovne čistoty (Porter, 2018).

Kvasinky a mikroskopické vláknité huby tolerujú prostredie, v ktorom je, na rozdiel od baktérií, menšie množstvo vody. Existujú mikroorganizmy, ktoré v latentnom stave a prežívajú na potravinách s nižším obsahom vody a po spätnej rehydratácii sú schopné rásť (Driehuis, 2013). Ich

hlavnou činnosťou je skvasovať jednoduché cukry – monosacharidy na etanol a CO₂. Môžu však rozkladať aj kyseliny, dusíkaté látky, tuky, ale aj bielkoviny, ako základnú zložku mäsa a mäsových výrobkov (Kopecká et al., 2012). Hoci sú prospešné v potravinárskom priemysle v oblastiach, akými sú výroba vín, pivovarníctvo, pečenie chleba a i., za určitých podmienok však pôsobia ako potenciálne kaziace mikroorganizmy v potravinách, najmä spracovaných, konzervovaných a chladených. V mäse a mäsových výrobkoch sa môžu vyskytovať niektoré patogénne kvasinky, ktoré predstavujú problémy s bezpečnosťou potravín (Fung, 2014). Zo spracovaného mäsa boli izolované kvasinky *Debaryomyces hansenii* a *kloeckeri*. Okrem rodu *Debaryomyces* boli identifikované aj rody *Candida*, *Trichosporon*, *Rhodotorula* a *Cryptococcus*. Kazenie potravín je v konečnom dôsledku spôsobené ich enzymatickou činnosťou, v dôsledku čoho dochádza k zmene organoleptických vlastností hotového výrobku (Kopecká et al., 2012).

Mikroskopické vlákňité huby vytvárajú povlaky na potravinách pozostávajúce z jednotlivých kolónií (Driehuis, 2013). Najčastejšie ide o rody *Penicillium* a *Aspergillus* na povrchoch údených a neúdených mäsových výrobkov. Na skladovaných mäsových výrobkoch dokážu spôsobovať vážne škody, ktoré sa prejavujú zmenou organoleptických vlastností, no predovšetkým vytváraním mykotoxínov. Avšak prítomnosť týchto mikroorganizmov nemusí vždy podmieňovať tvorbu mykotoxínov (Pipová, Jevinová, 2011).

Cieľom práce bolo analyzovať vybrané parametre mikrobiologickej kvality údených bravčových klobás pochádzajúcich od rôznych domácich výrobcov z východného Slovenska.

METODIKA PRÁCE

V zmysle stanoveného cieľa sme sa zamerali na analýzu 10 vzoriek domácich údených bravčových klobás, ktoré pochádzali z rôznych domácností na východnom Slovensku. Vzorky boli rozdielne z hľadiska kvantity i kvality použitých základných surovín, množstva korenín a jedlej soli. Podiel bravčového mäsa a korenín bol v každej vzorke iný a to najmä preto, že si domáci výrobca výrobný postup volí sám, predovšetkým na základe chutí typických pre daný región. Všetky vzorky boli vyúdené studeným dymom.

Vzorky klobás sme analyzovali postupne, a to v závislosti od dostupnosti. Keďže pochádzali z domácich zabíjačiek, analyzovali sme ich postupne v priebehu dvoch mesiacov. Na prípravu vzoriek na laboratórne vyšetrenie sme použili systém desiatkového riedenia. Z každej vzorky klobásy sme odobrali 5 g, ktoré sme premiestnili do vreciek na homogenizáciu s obsahom 45 ml sterilného fyziologického roztoku (riedenie 10⁻¹). Čas trvania homogenizácie bol asi 20 minút. Z toho riedenia sme pripravili riedenia 10⁻² a 10⁻³. Predmetom stanovenia boli vybrané mikrobiologické ukazovatele hygienickej kvality: počet koliformných baktérií, kvasiniek, mikroskopických vlákňitých húb a celkový počet mikroorganizmov (CPM). Príslušnými riedeniami sme inokulovali živné pôdy vždy po dve Petriho misky, pričom sme zistené počty mikroorganizmov porovnávali s požiadavkami Potravinového kódexu SR a s vedeckými prácami zameranými na danú problematiku.

Stanovenie koliformných baktérií sme robili podľa STN ISO 4832 : 2009. Ako kultivačné médium sme použili agarové médium s kryštálovou violetou, neutrálnou červenou, žlčovými soľami a laktózou (VČŽL), použili sme triedenia 10⁻¹ a 10⁻².

Stanovenie vlákňitých mikroskopických húb a kvasiniek sme robili podľa STN ISO 21527-2 : 2010, ako kultivačné médium sme použili DG18 agar (agar s dichlóranom a 18 % glycerolu), použili sme triedenia 10⁻¹ a 10⁻².

Stanovenie celkového počtu mikroorganizmov (STN ISO 4833-1 : 2014) – pri tomto stanovení sme použili PCA (Plate Count Agar) agarové médium. Pri očkovaní Petriho misiek na CPM sme použili triedenia 10^{-2} a 10^{-3} .

VÝSLEDKY PRÁCE A DISKUSIA

Kvalita z pohľadu mikrobiológie je daná množstvom mikroorganizmov, ktoré sú prítomné v potravinách. V prípade, ak mikrobiologické zaťaženie dosiahne určitú hranicu, takáto potravina je považovaná za skazenú a nie je vhodná na konzumáciu spotrebiteľmi (Kameník et al., 2018).

Koliformné baktérie sú dôležitými mikrobiologickými a sanitačnými indikátormi, ktoré zdôrazňujú význam hygieny pri spracovaní a manipulácii s výrobkami. Ich prítomnosť v niektorých prípadoch poukazuje na nesprávne tepelné opracovanie mäsových výrobkov. V klobásach, ktoré sme analyzovali, koliformné baktérie neboli detegované, čo poukazuje na dodržiavanej hygieny pri výrobe výrobkov, osobnej hygieny i na čistotu technologických zariadení používaných pri výrobe. Fratamico et al. (2015) napriek tomu uvádzajú, že vzhľadom na ich schopnosť prispôbovať sa vonkajším podmienkam, nemôže byť ich výskyt v potravinách vždy jednoznačne chápaný ako dôsledok priameho znečistenia fekáliami. Scheinberg et al. (2017) zistili nízke hladiny koliformných baktérií v mäsových výrobkoch vyrobených z bravčového mäsa, získaných z trhov poľnohospodárov, čo naznačuje že trhoví predajcovia domácich produktov sú v rámci bezpečnosti na dobrej úrovni.

Tab. 1 Počty kvasiniek vo vzorkách domácich údených klobás

Vzorka	log KTJ.g ⁻¹			
	$\bar{x}$	x_{min}	x_{max}	s_x
1	ND	ND	ND	-
2	2,19	2,17	2,20	0,01
3	ND	ND	ND	-
4	2,39	2,36	2,41	0,03
5	ND	ND	ND	-
6	ND	ND	ND	-
7	ND	ND	ND	-
8	ND	ND	ND	-
9	2,22	2,20	2,24	0,02
10	ND	ND	ND	-

Pozn.: ND – nedetekovateľné množstvo

Biasino et al. (2017) konštatujú, že s úrovňou kontaminácie mäsových výrobkov sa významne spája spôsob zabíjania zvierat. Mikrobiálna kvalita čreva použitého na výrobu domácich klobás je veľakrát ovplyvnená spracovaním, prepravou, ale aj skladovaním konečného výrobku. Honish et al. (2017) vo výskumnej štúdii zaznamenali, že koliformné baktérie sa celosvetovo rozširujú medzi ošipánymi a tie môžu dlhodobo vylučovať baktérie a tým vzniká horizontálny prenos medzi ošipánymi a inými druhmi hospodárskych zvierat. Chevallier et al. (2006) sledovali vplyv teplôt spracovateľského zariadenia v zmysle zimného a jarného obdobia na hygienickú kvalitu klobás. Populácie *Pseudomonas* a Coliforms počítané zo surovín na jar vychádzali priaznivejšie v

porovnaní s výsledkami počítania zaznamenanými v zime. Zatiaľ čo populácia *Pseudomonas* v konečnom produkte významne poklesla, populácia Coliforms zostala vyššia. *Staphylococcus aureus* bol na jar nezistený; v zime však jeho populácia bola na úrovni cca $2.5 \log_{10}$ c.f.u.g⁻¹ v konečnom produkte.

Najvyšší počet kvasiniek bol zistený vo vzorke č. 4, kde priemer bol $2,39 \log$ KTJ.g⁻¹ a najnižšia hodnota bola vo vzorke č. 2, kde priemer bol $2,19 \log$ KTJ.g⁻¹. Vo vzorke č. 9 boli priemerné počty $2,22 \log$ KTJ.g⁻¹. Ostatné vzorky obsahovali nedetekovateľné množstvá kvasiniek.

Výsledky štúdie mikrobiologickej kvality domácej údenej klobásky Plavsicu et al. (2015) poukazujú na výskyt kvasiniek v počte $1,0 \cdot 10^7$ KTJ.g⁻¹. Výsledky naznačili, že drobní výrobcovia takýchto druhov mäsových výrobkov by mali zabezpečiť vyššiu kvalitu svojich výrobkov. Chevallier et al. (2006) preukázali výskyt kvasiniek v počte $1,0 \cdot 10^4$ KTJ.g⁻¹ v konečnom produkte. Rozdiely v teplotách pri domácom spracovaní zaznamenané v zime a na jar výrazne ovplyvnili hygienickú kvalitu surovín. Zarei et al. (2017) skúmali rôzne mikrobiologické ukazovatele domácich klobás krájaných pomocou nožov a iných zariadení v domácnostiach. Zistili, že sa prítomnosť kvasiniek v samotnom výrobku po nakrájaní zvýšila o 40 %. Takáto kontaminácia vzorky naznačuje zlý hygienický stav krájacích nástrojov, nedostatočné umývanie rúk, zlé čistenie nástrojov, ale aj ich nesprávne používanie. Autori poukazujú na to, že dôležitú úlohu pri zabezpečovaní bezpečnosti a kvality mäsových výrobkov, určených na priamu spotrebu, zohrávajú najmä účinné čistenie a hygiena pri výrobe. Podľa práce Asefa et al. (2010) bol rast kvasiniek účinne inhibovaný pri údení klobás. Elsharawy et al. (2018) tvrdia, že kvasinky rastú oveľa pomalšie ako väčšina baktérií a ich rast je obmedzený metabolickými látkami, ktoré produkujú prítomné baktérie. Kvasinky nezohrávajú až tak veľkú úlohu v kazení, pretože predstavujú len malú časť celkovej populácie, avšak pri masívnej kontaminácii klobás môže dôjsť k ohrozeniu zdravia.

Tab. 2 Počty mikroskopických vláknitých húb vo vzorkách domácich údených klobás

Vzorka	log KTJ.g ⁻¹			
	x	x _{min}	x _{max}	s _x
1	ND	ND	ND	-
2	2,49	2,40	2,51	0,05
3	ND	ND	ND	-
4	ND	ND	ND	-
5	1,4	1,36	1,43	0,03
6	2,31	2,27	2,34	0,14
7	ND	ND	ND	-
8	ND	ND	ND	-
9	ND	ND	ND	-
10	1,32	1,28	1,36	0,04

Pozn.: ND – nedetekovateľné množstvo

Pokiaľ ide o mikroskopické vláknité huby, vzorka č. 2 obsahovala $2,46 \log$ KTJ.g⁻¹ týchto mikroorganizmov, vzorka č. 5 menej a to $1,4 \log$ KTJ.g⁻¹. Vo vzorke č. 6 sme zistili $2,31 \log$ KTJ.g⁻¹ a vzorke č. 10 to bolo $1,32 \log$ KTJ.g⁻¹. V ostatných vzorkách neboli detegované mikroskopické vláknité huby.

Výsledky štúdie autorov Güngör, Gököglü (2010) poukazujú na to, že korenie bolo primárnym zdrojom kontaminácie domácich klobás a ruky ľudí prichádzajúcich do styku s mäsom a zariadeniami boli zistené ako zdroj sekundárnej kontaminácie. Zistené počty mikroorganizmov však neboli na úrovni, ktorá by ohrozovala zdravie človeka. V súčasnosti sa do popredia dostáva otázka toxicity metabolitov, vznikajúcich v podmienkach výroby mäsových výrobkov, pretože domáce podmienky pre rozvoj týchto metabolitov na povrchu výrobkov sú veľmi vhodné (Iacumin et al., 2009). Podľa Montanha et al. (2018) počty mikroskopických vláknitých húb slúžia ako indikátor hygienickej kvality priestorov určených na spracovanie potravín, pretože môžu rýchlo rásť na zvyškoch potravín, ktoré sú prilnuté na povrchy, čo predstavuje možný zdroj kontaminácie. Vzorky odobrané z domácich klobás preukazovali priemerné hodnoty výskytu mikroskopických vláknitých húb $2,5 \cdot 10^1$ KTJ.g⁻¹. Dôležitým faktorom kontaminácie je aj vzduch, ktorý je hlavný zdroj spór vláknitých mikroskopických húb kontaminujúcich mäsové výrobky (Asefa et al., 2010). Niektoré druhy mikroskopických vláknitých húb môžu produkovať mykotoxíny, napr. aflatoxíny a ochratoxíny, a to najmä v sušených mäsach. Kontaminácia výrobkov sa môže vyskytnúť v rôznych miestach výrobného reťazca (Montanha et al., 2018).

Tab. 3 Celkové počty mikroorganizmov vo vzorkách domácich údených klobás

Vzorka	log KTJ.g ⁻¹			
	X	X _{min}	X _{max}	S _x
1	4,03	3,98	4,08	0,05
2	3,51	3,40	3,61	0,11
3	3,63	3,56	3,70	0,07
4	3,41	3,37	3,44	0,03
5	4,02	3,95	4,08	0,06
6	3,97	3,90	4,04	0,07
7	3,65	3,58	3,71	0,06
8	3,71	3,60	3,81	0,11
9	3,65	3,56	3,74	0,09
10	3,99	3,87	4,11	0,12

Najnižšia hodnota CPM boli zistená vo vzorke č. 4: 3,41 log KTJ.g⁻¹, naopak, najvyššia bola vo vzorke č. 1 (4,03 log KTJ.g⁻¹).

Celkový počet mikroorganizmov je jedným z najdôležitejších indexov hodnotenia hygienickej kvality a bezpečnosti mäsa a výrobkov z neho. Je to kvantitatívna hygienická forma na určenie podmienok procesu výroby a miery kontaminácie mäsa (Huang et al., 2016). Vo štúdií Sachindra et al. (2016) sa uvádza, že v bravčovej klobáse bol celkový počet mikroorganizmov $4,91 \cdot 10^3$ KTJ.g⁻¹. Podmienky výroby mäsových výrobkov nie vždy vyhovujú určitým mikroorganizmom z hľadiska fyziológie, preto je hodnota celkového počtu skôr orientačná, ale jej stanovenie je veľmi dôležité preto, aby sme zistili úroveň mikrobiálnej čistoty daného výrobku (Huang et al., 2016). Stanovenie celkového počtu mikroorganizmov je bežne odporúčaná mikrobiologická metóda na odhadnutie trvanlivosti mäsa. Güngör, Gököglü (2010) uvádzajú, že celkové počty mikroorganizmov varenej klobásy, kde bolo pôsobenie teploty 75 °C minimálne 10 minút, sú výrazne nižšie ako pred tepelnou úpravou.

ZÁVER

V práci sme sa zaoberali problematikou bezpečnosti domácich údených bravčových klobás z rôznych podmienok výroby. Klobásy mali rôzne zloženie a rôzny pomer korenín, odlišnosti boli i v technologickom spôsobe výroby.

Pri hodnotení mikrobiologickej kvality domácich klobás sme sa zamerali na tieto parametre:

Koliformné baktérie – ich prítomnosť vo vzorkách klobás bola nedetekovateľná, čo je veľmi pozitívne, nakoľko klobásy vyrobené v domácich podmienkach nepodliehajú kontrole a úroveň hygieny je v princípe nižšia oproti komerčne vyrobeným produktom.

Kvasinky – počty týchto mikroorganizmov sa vo vzorkách vyskytovali v rozmedzí 2,19 do 2,39 log KTJ.⁻¹. Hoci prítomnosť kvasiniek bola vo všetkých vzorkách klobás nedetekovateľná, netreba tento faktor určite podceňovať, pretože výrazne indikujú úroveň hygieny počas spracovania.

Mikroskopické vláknité huby – výskyt mikroskopických vláknitých húb bol zaznamenaný v štyroch vzorkách, pričom hodnoty sa pohybovali od 1,32 do 2,46 log KTJ.g⁻¹. Mikroskopické vláknité huby sa do produktu mohli dostať prostredníctvom koreninových prísad, nedostatočnou hygienou pri procese výroby, vzduchom, ale aj inými činiteľmi. Ich prítomnosť je nežiaduca najmä kvôli možnej produkcii mykotoxínov, ktoré môžu mať karcinogénne a mutagénne účinky na zdravie konzumenta.

Celkový počet mikroorganizmov – vo všeobecnosti výsledky našich analýz potvrdzujú vysoké zastúpenie CPM vo všetkých analyzovaných vzorkách klobás (od 3,41 log KTJ.g⁻¹ do 4,03 log KTJ.g⁻¹). Je potrebné podotknúť, že v zmysle Nariadenia komisie (ES) č. 1441/2007, ktorým sa ustanovujú mikrobiologické kritériá pre mäso a výrobky z neho, stanovenie CPM a ďalších skupín nami sledovaných mikroorganizmov nie je pre mäkké mäsové výrobky striktné určené. Podniky zaoberajúce sa výrobou mäsových výrobkov nie sú viazané legislatívnymi predpismi v oblasti definovania mikrobiologických požiadaviek na mäsové výrobky, preto sa riadia vlastnými podnikovými normami. Výrobcovia takisto uvádzajú niekoľko ďalších vlastností a kritérií kvality výrobkov, ktoré sú uvedené v špecifikácii príslušného výrobku.

Domáce mäsové výrobky sú z pohľadu kvality na dobrej úrovni a mnohí spotrebitelia ich preferujú napriek vysokej konkurencieschopnosti komerčne vyrábaných výrobkov. Je však potrebné, aby aj domáci výrobca bol oboznámený s dôležitosťou bezpečnosti potravín a dodržiavania hygieny pri práci, aby sa v konečnom dôsledku predchádzalo ochoreniam z potravín. Základnou prevenciou je prísne dodržiavanie osobnej hygieny, ako aj hygieny priestorov, čistenie a dezinfekcia technologických zariadení, pomôcok a pracovných plôch. Súbežne s vykonávaním pracovného postupu je potrebné vykonávať priebežné čistenie plôch, odstraňovanie nečistôt pomocou rozličných kefiek, dôkladné umývanie plôch a technologických pomôcok, najskôr vlažnou vodou, potom horúcou a taktiež oplachovanie nástrojov horúcou vodou, pretože tá pôsobí baktericídne.

LITERATÚRA

- Asefa, D., Kure, C., Gjerde, R., Omer, M., Langsrud, S., Nesbakken, T., Skaar, I. 2010. Fungal growth pattern, sources and factors of mould contamination in a dry-cured meat production facility. In *International Journal of Food Microbiology*, vol. 140, pp. 131-135. ISSN 0168-1605. Dostupné na: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.04.008>.
- Bajpai, V., Baek, K., Kang, S. 2012. Control of *Salmonella* in foods by using essential oils. In *Journal of Food research International*, vol. 45, pp. 722 - 734. ISSN 0963 - 9969. Dostupné na: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.04.052>.
- Biasino, W., Zutter, L., Van Damme, I. 2017. Association between slaughter practices and the distribution of *Salmonella*, *esbl/ampc*-producing *Escherichia coli* and hygiene indicator bacteria on pig carcasses after slaughter. In *12th International Symposium on the Epidemiology and Control of Biological, Chemical and Physical Hazards in Pigs and Pork - Proceedings Book*, Foz do Iguaçu, August 21-24, 2017. pp. 230 - 232. Dostupné na internete: <https://lib.dr.iastate.edu/cgi/viewcontent.cgi?article=2326&context=safepork>

- Dostálová, J., Kadlec, P. 2014. Potravinárske zloženie: technológia potravín. B.m: Ostrava: Key publishing. pp. 426 ISBN 978-80-7418-208-2.
- Driehuis, F. 2013. Silage and the safety and quality of dairy foods: a review. In *Journal of Agricultural and Food Science*, vol. 22, pp. 16 - 34. ISSN 1795-1895. Dostupné na: <https://doi.org/10.23986/afsci.6699>
- Elsharawy, T., Ahmad, M., Abdelrahman, A. 2018. Quality Assessment of Nutritional Value and Safety of Different Meat. In *Journal of Food: Microbiology, Safety & Hygiene*, vol. 13. ISSN 2476-2059. Dostupné na: 10.4172/2476-2059.1000132.
- Fratamico, M., Tseng, M., Manzinger, D., Funk, A. 2015. Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC) in swine: prevalence over the finishing period and characteristics of the STEC isolates. In *Journal of Epidemiology and Infections*, vol. 143. ISSN 1078-2230. Dostupné na: <https://doi.org/10.1017/S0950268814001095>.
- Güngör, E., Gököglü, N. 2010. Determination of microbial contamination sources at a Frankfurter sausage processing line. In *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, vol. 34, no. 1, pp. 53-59. ISSN 1303-6181. Dostupné na: <https://doi.org/10.3906/vet-0805-28>.
- Honish, L., Punja, N., Nunn, S. 2017. *Escherichia coli* O157:H7 Infections associated with contaminated pork products. CDC: Alberta, vol. 43, pp. 21 - 24. Dostupné na: <https://www.cdc.gov/mmwr/volumes/65/wr/mm6552a5.htm#contribAff>.
- Huang, L., Zhao, J., Chen, Q., Zhang, Y. 2016. Rapid detection of total viable count (TVC) in pork meat by hyperspectral imaging. In *Journal of Food Research International*, vol. 154. ISSN 0963-9969. Dostupné na: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.08.011>.
- Chevallier, I., Ammor, S., Laguet, A., Labayle, S., Castanet, V., Dufour, E., Talon, R. 2006. Microbial ecology of a small-scale facility producing traditional dry sausage. In *Journal of Food Control* vol. 17., no. 6, pp. 446-453. ISSN 0956-7135. Dostupné na: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2005.02.005>.
- Iacumin, L., Chiesa, L., Boscolo, D., Manzano, M., Cantoni, C., Orlic, S., & Comi, G. 2009. Moulds and ochratoxin A on surfaces of artisanal and industrial dry sausages. In *Food Microbiology*, vol. 26, no. 1, pp. 65 - 70. ISSN 0740-0020. Dostupné na: <https://doi.org/10.1016/j.fm.2008.07.006>.
- Ingr, I. 2011. Produkce a zpracování masa. 2 vyd. B.m.: Mendelova univerzita. ISBN 978-80-7375-510-2.
- Kameník, J., Saláková, A., Hulánková, R., Dušková, M., Bořilová, G., Šedo, O., Staruch, L. 2018. Selected characteristics of dry fermented sausages prepared with quick-dry-slice (QDS process) technology and their comparison with traditional products. In *Journal of Food Processing and Preservation*, vol. 42, no. 1, pp. 1. ISSN: 0145-8892. DOI: 10.1111/jfpp.13314.
- Koch, A., Vestergaard, Ch., Aslyng, M. 2014. The effect of salt reduction on sensory quality and microbial growth in hotdog sausages, bacon, ham and salami. In *Journal of Meat Science*, vol. 96, pp. 47 - 57. ISSN 0309-1740. Dostupné na: <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2013.06.004>.
- Kopecká, J., Matoulková, D., Nemec, M. 2012. Kvasinky a jejich využití. In *Kvasný Průmysl*, vol. 58, no. 11–12, pp. 326–335. ISSN 2570-8619. Dostupné na internete: https://www.researchgate.net/profile/Dagmar-Matoulkova/publication/307796771_Yeast_and_its_uses/links/57daea1477e/Yeast-and-its-uses.pdf
- Loneragan, S., Topel, D., Marple, D. 2018. Meat microbiology and safety. In *The Science of Animal Growth and Meat Technology*, USA: Elsevier, 2. vyd., pp. 183 - 204. ISBN 9780128152775. Dostupné na: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815277-5.00012-3>.
- Montanha, F., Anater, A., Burchard, J. 2018. Mycotoxins in dry cured meats: A review. In *Journal of Food and Chemical Toxicology*, vol. 111, pp. 494 - 502. ISSN 0278-6915. Dostupné na: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2017.12.008>.
- Moonlight, B. 2019. Hygiene management. In *Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition, Swanson's Handbook of Technical and Quality Management for the Food Manufacturing Sector*, 1. vydanie. USA: Academic Press. ISBN 978.178-24227-5-4. Dostupné na: <https://doi.org/10.1016/B978-1-78242-275-4.00012>.
- Mor-Mur, M., Yuste, J., 2010. Emerging bacterial pathogens in meat and poultry. Emerging bacterial pathogens in meat and poultry: an overview. In *Food and Bioprocess Technology*, vol. 3, no.1, pp. 24 - 35. ISSN 1935-5149. Dostupné na: <https://doi.org/10.1007/s11947-009-0189-8>
- Pipová, M., Jevinová, P. 2011. Mikrobiológia krmív a potravín. 1. vyd., Bratislava: Malé centrum, 528 s. ISBN 80-967064-9-7.
- Plavšić, D., Okanović, D., Gubić, J., Njezić, Z. 2015. Microbiological and chemical evaluation of dried smoked meat product. In *Journal of Food science*, vol. 5, pp. 239 - 242. ISSN 1338-0230. Dostupné na: <https://core.ac.uk/download/pdf/81202818.pdf>.
- Porter, K., Quilliam, R., Reanex, S., Oliver, M. 2018. High resolution characterisation of *E. coli* proliferation profiles in livestock faeces. In *Journal of Waste Management*, vol. 87, pp. 537-545. ISSN 0956-053X. Dostupné na: <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2019.02.037>.

Scheinberg, J., Dudley, E., Campbell, J., Roberts, B. 2017. Prevalence and Phylogenetic Characterization of *Escherichia coli* and Hygiene Indicator Bacteria Isolated from Leafy Green produce, beef and pork obtained from farmers markets in Pennsylvania In *Journal of Food protection*, vol. 80, pp. 237-244. ISSN 2234 – 246X. Dostupné na: <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-16-282>.

Sillankorva, S. M., Oliveira, H., Azeredo, J. 2012. Bacteriophages and Their Role in Food Safety. In *Journal of Microbiology*, vol. 12, pp. 1 - 13. ISSN 1687-9198. Dostupné na: <https://doi.org/10.1155/2012/863945>

STN ISO 4832: 2009 (56 0085). Mikrobiológia potravín a krmív. Horizontálna metóda na stanovenie počtu koliformných baktérií. Metóda počítania kolónií.

STN ISO 21527-2: 2010 (56 0087). Mikrobiológia potravín a krmív. Horizontálna metóda na stanovenie počtu kvasiniek a plesní Časť 2: Metóda počítania kolónií vo výrobkoch s aktivitou vody menšou ako 0,95 alebo rovnajúcou sa 0,95.

STN EN ISO 4833-1: 2014 (56 0083). Mikrobiológia potravinárskeho reťazca. Horizontálna metóda na stanovenie počtu mikroorganizmov Časť 1 Metóda počítania kolónií kultivovaných pri 30 °C zalievaním inokula.

Tomat, D., Balague, C., Casabonne, C., Verdini, R., Quiberoni, A. 2015. Resistance of foodborne pathogen coliphages to thermal and physicochemical treatments applied in food manufacture. In *Journal of Innovative Food Science & Emerging Technologies*, vol. 30, pp. 184-191. ISSN 1466-8564. Dostupné na: <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2015.04.010>.

Vyhláška č. 309/2015 Ministerstva pôdohospodárstva a rozvoja vidieka SR o pochutinách, jedlej soli, dehydrovaných pokrmoch, polievkových prípravkoch a o ochucovadlách.

Vyhláška č. 83/2016 Z. z. Ministerstva pôdohospodárstva a rozvoja vidieka Slovenskej republiky o mäsových výrobkoch.

Zarei, S., Ehrampoush, M., Mazloomi, M., Hemmati, S., Hajimohammadi, B., Dehghan, A. 2017. Microbiological Quality of Sausage during Slicing at Food Retail Stores in Shiraz, Iran. In *International Journal of Nutrition Sciences*, vol. 2, pp. 24 - 35. ISSN 2538-2829. Dostupné na: <https://doi.org/10.1005/s11657-009-0659-7>.

Zdolec, N. 2017. Fermented meat products: health product. USA: CRC Press, 572 p. ISBN 978-1-4978-3304-5. Dostupné na: https://www.researchgate.net/profile/Nevijo_Zdolec/publication/308634049_Antimicrobial_Resistance_of_Lactic_Acid_Bacteria_in_Fermented_Meat_Products/links

Podakovanie: Práca bola podporená projektom KEGA č. 017SPU-4/2019 „Inovácia obsahovej štruktúry a e-learning v študijných programoch Bezpečnosť a kontrola potravín a Potraviny a technológie v gastronómii“.

Kontaktná adresa : MVDr. Ľubomír Lopašovský, PhD., Katedra hygieny a bezpečnosti potravín, FBP, SPU v Nitre, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra. E – mail: lubomir.lopasovsky@uniag.sk

doc. Ing. Lucia Zeleňáková, PhD., Katedra hygieny a bezpečnosti potravín, FBP, SPU v Nitre, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra. E – mail: lucia.zelenakova@uniag.sk

doc. Ing. Simona Kunová, PhD., Katedra hygieny a bezpečnosti potravín, FBP, SPU v Nitre, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra. E – mail: simona.kunova@uniag.sk

PaedDr. Silvia Jakabová, PhD., Centrum BioFood, FBP, SPU v Nitre, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra. E – mail: silvia.jakabova@uniag.sk

STANOVENÍ KVALITATIVNÍCH PARAMETRŮ JABLEČNÉHO MOŠTU ODRŮDY 'GOLDEN DELICIOUS' POMOCÍ DVOU TYPŮ NEAR INFRARED SPEKTROMETRŮ DETERMINATION OF QUALITY PARAMETERS OF APPLE JUICE OF VARIETY 'GOLDEN DELICIOUS' USING TWO TYPES OF NEAR INFRARED SPECTROMETERS

Martina Marečková, Veronika Danková, Lubor Zelený, Pavol Suran

Abstract: Soluble solid content (SSC) and moisture prediction using near infrared spectroscopy was carried out with juice of apple variety 'Golden Delicious' harvested in six different locations in Czech Republic during the years 2018 to 2020. Near infrared spectroscopy (NIRS) using both a laboratory spectrometer Antaris II and a handheld MicroPhazir spectrometer were used to create calibration models to each quality parameter. Four individual calibration models were designed using samples harvested in season 2018. We tested 114 samples with NIRS Antaris II and 71 samples with MicroPhazir. We also develop internal cross validation using these samples. Total 50 samples from seasons 2019 and 2020 were used to external cross validation. The highest coefficient of determination of calibration $R^2 = 0.995$ and ratio of prediction to deviation RPD = 3.751 were found for soluble solid content prediction using spectrometer Antaris II. All our results exhibited R^2 and RPD exceeding 0.90 and 2.3, respectively, thus confirming good prediction of SSC and moisture using the near infrared spectroscopy.

Keywords: near infrared, soluble solid content, moisture, apple juice, PLS

INTRODUCTION

It is necessary to use high-quality input raw materials to obtain high-quality product in food industry. Quality and full-value fruit is required by the industry, fruit growers, as well as consumers (De Oliveira et al., 2014; Escribano et al., 2017). Quality of fruits is defined by parameters including its size, colour, flesh firmness, taste, soluble solid content, and acidity (Bureau et al., 2009; Escribano et al., 2017). These parameters are related to harvest at optimal degree of maturity that is also necessary for good postharvest fruit storage that keeps the fruit in good quality (Travers et al., 2014). Geographical location with specific climatic conditions as well as growing and environmental conditions, pedoclimatic parameters, and agronomic methods of cultivation have a strong effect on nutritional quality, content of bioactive components, and other parameters of apples (Viljevac Vuletić et al., 2017; Giangroeco et al., 2016). For fruit producing industry is necessary to manufacture products with the consistent quality and parameters. The most important quality parameters used for the evaluation of apple juice comprise the soluble solid content (SSC), titratable acidity, sugars, organic acids, dry matter, colour, and taste. Fruit or fruit product dry matter (DM) content is composed of carbohydrate, soluble solids content (sugars), and insoluble solids content (starch and structural carbohydrates).

Apples are one of the most popular fruits across the world. Thus, apple products are equally very popular. Determination of their quality parameters is typically carried out using the classical destructive methods. The disadvantages of them include often difficult sample preparation, time-consuming measurement, request for expensive chemicals, and considerable amount of manual laboratory labour. Another significant disadvantage is only a small number of samples that can be analysed per batch, although fruit and vegetable batches are usually large. This is why rapid and non-destructive analytical methods such as optical spectroscopy have to be developed (Bureau et al., 2009; de Oliveira et al., 2014; Escribano et al., 2017;

Gomez et al., 2006; Hou et al., 2018; Lu, 2001; Moller et al., 2013; Pissard et al., 2012; Travers et al., 2014; Vittayapadung et al., 2008; Wang et al., 2017).

Non-destructive fast analytical technique near infrared spectroscopy (NIRS) enables measurement numerous parameters of quality of fruit and vegetable as well as their products and is used in the food industry (Bureau et al., 2009; de Oliveira et al., 2014; Vittayapadung et al., 2008). NIRS usually covers wavelengths between 800-2,500 nm that equal wave numbers 12,500-4,000 cm^{-1} (Vittayapadung et al., 2008). Water strongly absorbs in the NIR region. Therefore, it is well suited for samples with both high water (>80%), and carbohydrates contents, i.e. for fruit or especially for fruit juice. Near infrared radiation interacts with C-H, C-O, N-H bonds in sugars and acids as well as O-H bond in the water (de Oliveira et al., 2014; Travers et al., 2014; Zhang et al., 2019). NIRS have already been used in previous studies for prediction of characteristic as soluble solid content (Fan et al., 2019; Manickavasagan et al., 2014; Özdemir et al., 2019), titratable acidity (Bureau et al., 2009; Liu and Ying 2005), dry matter (Travers et al., 2014; Zhang et al., 2019), firmness and ripeness (Hou et al., 2018; Lebot et al., 2013; Vittayapadung et al., 2008), sugar and water content (Pissard et al., 2012), botanical species and geographical origin of apples (Bizjak Bat et al., 2012), season effect, cultivars of sour cherries (Viljevac Vuletić et al., 2017), and maturity (Li et al., 2018). NIRS was also used for determination of parameters of fruit and vegetable species such as onions, peaches, mandarins, apples (Liu and Ying, 2004), tomatoes (Shao et al., 2007), cherries, plums, kiwi (Bureau et al., 2009), sweet cherries (Escribano et al., 2017), pear (Travers et al., 2014), and many others. In other words, NIRS is usually used only for fresh fruit and vegetable. However, use of NIRS for prediction of quality parameters of fruit juice is scarce (Zhu et al., 2010).

The NIR spectra enable insight in the physical and chemical composition of fruits as the result of scattering and absorption processes. Acquired spectral data are then analysed via multivariate regression techniques combined with chemometrics. It is necessary to create individual precise and large calibration model, for each parameter. Then, NIRS allows simultaneous measurements of many parameters (de Oliveira et al., 2014; Escribano et al., 2017; Fan et al., 2019; Liu and Ying, 2004; Pissard et al., 2012; Shao et al., 2007; Vittayapadung et al., 2008; Wang et al., 2017).

Development of a handheld device caused expansion of NIR spectroscopy. Its portability makes measurements possible everywhere in field or orchard as well as in production, supply, and delivery chains. The accuracy of the measurement can deteriorate as result of the miniaturization of the instrument for example due to reduced spectral resolution, narrower range of wavelengths, and worse signal-to-noise ratio. Still, these devices offer portable counterpart to more complex conventional benchtop instruments (Escribano et al., 2017; Mayr et al., 2021).

Well known example of globally produced apple is variety 'Golden Delicious'. The aim of the project was to describe the possibility of using NIR spectroscopy to determination soluble solids content and moisture of apple juice made from this cultivar originating from six different orchards in Czech Republic harvested across three seasons. Our results cover fresh made apple juice collected during three seasons and measured continuously during storage. We aimed at the development of calibration models from data collected for each quality parameter using two different NIR spectrometers laboratory NIRS Antaris II and handheld NIRS MicroPhazir. The robustness of each model using internal- and external-cross validations was a compared.

MATERIAL AND METHODOLOGY

Plant material

Variety 'Golden Delicious' was chosen as model variety because it is very popular for fresh consuming as well as for food production as juice, puree, or baby food. The apples were first harvested in our experiment during autumn 2018 at the optimal degree of maturation from

six different locations in the Czech Republic. These locations covered various geographical and climatic areas from experimental orchard in Holovousy and production orchards in Drahoraz, Velké Bílovice, Synkov, Klapý, and Soběnice. Typically, the harvest occurred from ten different trees in orchards at defined intervals. About 30 kg apples were harvested from the trees in each location. After the harvest, half of the apples were stored in cold storage in normal atmosphere (temperature 2°C, relative humidity 85%) and second half under ultra-low oxygen (ULO) conditions (temperature 1.5°C, relative humidity 99%, 2% oxygen in the atmosphere).

The same steps were used for apples harvested in 2019 and 2020. These samples were used to external validation of calibration models created from samples harvested in season 2018.

Sample preparation

The first stage of experiments concerned apples immediately after harvest. Next, five apples were typically collected from each type of storage and analysed each two months. Apples recovered from storage were washed in water, cut to smaller pieces, and with skin and core processed in kitchen juicer Sencor to obtain fresh apple juice. The juicer was washed with water between processing each sample. One aliquot from each sample was used without any adjustments and included the puree. While the second aliquot was filtered through a sieve to get pure juice. The last samples were retrieved from classical atmosphere storage after 240 days of storage. In contrast, samples were retrieved from ULO storage also after 300 days of storage.

NIRS measurements and classical analysis

Puree and juice were placed in cuvette with glass bottom and placed on measurement window of spectrometers. In sample covering measurement window was placed special mirror reflecting the light beam back in the detector. Laboratory NIRS Antaris II (Thermo Fisher Scientific Inc., Madison, USA) with software Omnic for Antaris was used for the measurement juice and puree first, followed by measurement carried out using the handheld NIRS MicroPhazir (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA). Each sample was measured three times using Antaris II and an average spectrum was obtained. Ten measurements were carried out using MicroPhazir to get an average spectrum and the results were processed in Excel.

After NIRS measurements soluble solids content (SSC) was determined using a digital refractometer ORF 45BM (°Brix, Kern & Sohn GmbH Germany). Finally, percent of moisture content of purees and juices was measured in drying scales (MB25 by OHAUS, USA) via heating in air at 105 °C to constant weight.

NIRS spectra and statistical analysis

Spectra, values of soluble solid content, and moisture content were paired for the Antaris II instrument software TQ Analyst (Thermo Fisher Scientific Inc., Madison, USA) with algorithm Partial Least Squares (PLS) and spectrum modification using 1st derivation together with Norris derivation filter. Results not fitting in the scheme were excluded from the calibration file using diagnostics Spectrum Outlier, Leverage and Principal Component Scores.

Spectra obtained from measurements by handheld NIRS MicroPhazir and values were paired by data processing using the Method Generator software and the PLS algorithm. Micro-electro-mechanical system (MEMS) selected wavelength. The essential optical scanning element of this MEMS enables rotation of miniature gratings using a comb drive (Mayr et al., 2021).

Results from 2018 harvest were used to compile calibration models for both parameters and both NIRS. Each calibration model was defined by the following parameters: coefficient of calibration determination (R^2_{cal}), coefficient of cross-validation determination (internal)(R^2_{cross}), the ratio of prediction to deviation (RPD), Root Mean Squared Error of Calibration, and Root Mean Squared Error of Cross Validation. Juices made from apples from season 2019 acquired from later storage and those shortly stored from season 2020 were used to external cross validation.

RESULTS AND DISCUSSION

Literature provides several examples of NIRS applied for prediction of internal quality of fruit and, in particular, apples. However, reports describing use NIRS for prediction of quality parameters of a juice, especially of that made from apples, are scarce. Quick, easy, and affordable near infrared spectroscopy appears to be a very useful analytical method enabling analysis of numerous samples in a short of period of time, typically minutes, and determination of several sample quality parameters in a single step. Available NIR spectrometers feature individual parameters including their applicable spectral range. For example, FT-NIRS Antaris II used in our study has a spectral range of 12,000-3,800 cm^{-1} (833-2,632 nm). NIRS MicroPhazir has a narrower spectral range of 6,270-4,172 cm^{-1} (1595-2397 nm). We used best fitting spectral ranges for each individual quality parameter we determined. Thus, we used four individual spectral ranges of the Antaris II instrument (11,999-7,285; 7,089-6,601; 6,271-6,461; 4,886-4,100 cm^{-1}) for the prediction of soluble solid content by NIRS. With MicroPhazir, we used entire spectral range 6,270-4,172 cm^{-1} . For details see Table 1. Wlodarska et al. (2018) suggested for apple juice SSC as best ranges 9,406-7,498 and 6,224-5,350 cm^{-1} . Zhu et al. (2010) used in their work quite narrow spectral range, 900-1,350 nm for prediction SSC in apple juice.

Moisture was predicted from NIRS Antaris II results acquired in four ranges: 11,999-7,324; 7,077-6,682; 6,360-5,408 and 4,791-4,060 cm^{-1} while MicroPhazir was used again in the entire range 6,270-4,172 cm^{-1} . To the best of our knowledge, no literature was found concerning prediction of moisture in apple juice. Using Antaris II, each sample was scanned three times to get 64 spectra each time and an average spectrum that was used for calibration was created automatically. MicroPhazir scanned each sample ten times and an average spectrum was obtained after processing the data in Excel. Figure 1 exemplifies three spectra from Antaris II. The most prominent band of water since fruit juice contains large percentage of water (Shafiee and Minaei, 2018). The largest band is observed in spectrum of juice obtained immediately after harvest, because those samples contain most water.

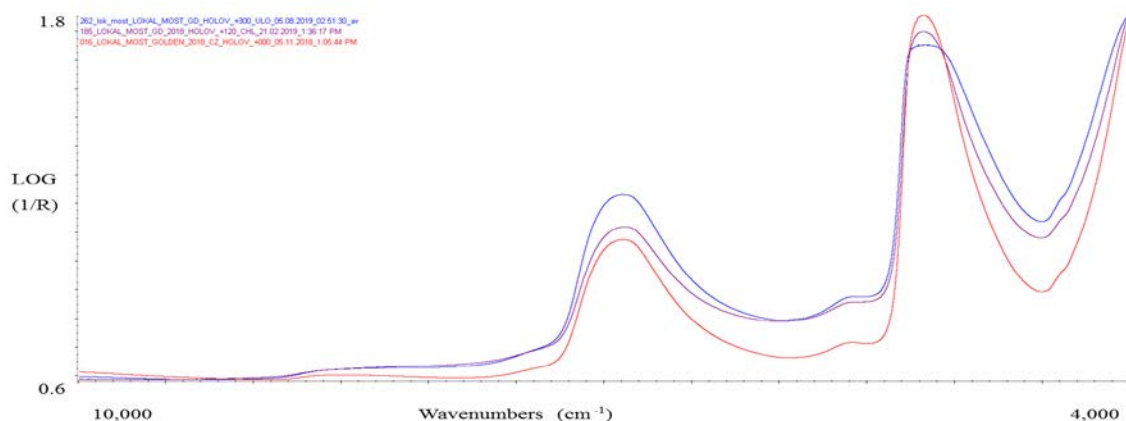


Figure 1 Spectra resulting from averaging of 64 scans for apple juice measured immediately after harvest (red line), after 120 days of storage in normal atmosphere (violet line), and after 300 days of storage in ULO conditions (blue line)

Since large fruit such as apple can exhibit significant differences (Pissard et al., 2012), in contrast, apple juices have more uniform content and the number of samples can be smaller. We used 112 samples for calibration model predicting soluble solid content and 114 samples for predicting moisture by NIRS Antaris II. Using NIRS MicroPhazir, we analysed 71 juice samples to calibrate both parameters. This difference in numbers of samples is due to the long time for which MicroPhazir has to be serviced. For the external cross-validation of both NIRS, we used 50 different samples obtained in different seasons.

Table 1 shows the main characteristics of partial least squares (PLS) model. PLS defines the latent variables (LV, factors from diagnostic Press) based on the covariance between the spectral data and the component of interest. The most common statistic term is coefficient of determination of calibration (R^2_{cal}) that indicates the goodness-of-fit of data set and acquires values between 0 and 1 (ideal) (Özdemir et al., 2018). All our calibration models exceeded value 0.9 of coefficient of determination of calibration R^2 thus showing good results. Better models were created using both NIRS for prediction of soluble solid content than moisture. The best model features $R^2_{cal} = 0.995$ for SSC and NIRS Antaris II. On the contrary, the least accurate model with $R^2_{cal} = 0.907$ predict moisture while using MicroPhazir. However, even this result is still good. Wlodarska et al. (2018) determined $R^2_{cal} = 0.987$ for prediction SSC in apple juice after measuring 30 samples. Their results are similar to ours, despite the use of smaller number of samples. Zhu et al. (2010) presented $R^2_{cal} = 0.9827$ for prediction SSC in fresh apple juices also using only 30 samples.

Second important statistic term is the ratio of prediction to deviation defines as RPD = SD/RMSEP or RPD = SD/RMSECV where SD is the standard deviation, RMSEP is the root mean squared error of prediction, and RMSECV is the root mean squared error of cross-validation (internal). RPD has been used for several years in NIR studies concerning agricultural products and shows accuracy of prediction models. All our four models have RPD higher than 2.3. Authors usually defined three categories RPD values. However, each author sets different range of values for each category. First category means not reliable model that cannot be used for further prediction and RPD is usually smaller than 1.5 or 2 depending on authors. Second level represents semi-qualitative prediction with RPD in range 1.5 to 2.5. The third category is typically characterized with RPD values 2.5 to 3 or even higher and represents models with good or excellent prediction accuracy (Hou et al. 2018; Nicolai et al., 2007; Özdemir et al. 2018; Wang et al. 2017). Three out of four of our models fit in the second level of prediction accuracy. However, SSC prediction from results obtained with NIRS Antaris II indicates excellent prediction ability.

RMSECV value and R^2_{cross} are parameters of internal cross validation. The validation dataset originates from the same set of samples as calibration data set. This internal cross validation is called leave-one-out cross validation, i.e. one sample is removed from the dataset and the calibration model is constructed from the remaining subset. The removed sample is then used to calculate the reduction residual. This process is repeated until each sample is the one left out. (de Oliveira et al., 2014; Fan et al., 2019; Vittayapadung et al., 2008; Zhang et al., 2019).

Table 1 Selected parameters characterizing methods applied for determination of soluble solids content and moisture using Antaris II and Microphazir NIRS instruments.

Season 2018	Soluble solid content [°Brix] SSC		Moisture [%]	
	Antaris II	MicroPhazir	Antaris II	MicroPhazir
R^2_{cal}	0.995	0.912	0.950	0.907
RPD	3.751	2.475	2.469	2.302
RMSEC	0.174	0.515	0.601	0.595
R^2_{cross}	0.964	0.835	0.914	0.811
RMSECV	0.451	0.707	0.781	0.852
Number of used factors (PRESS)	13	5	8	6
Measurement Location / Range	cm ⁻¹	6,270-4,172*	11,999-7,285; 7,089-6,601; 6,271-5,461; 4,886-4,100	11,999-7,324; 7,077-6,682; 6,360-5,408; 4,791-4,060
			6,270-4,172*	6,270-4,172*
Measurement Location / Range	nm	1,595-2,397	833-1,373; 1,411-1,515; 1,595-1,821; 2,047-2,439*	833-1,365; 1,413-1,497; 1,575-1,849; 2,087-2,463*
			1,595-2,397	1,595-2,397
Number of used spectra	112	71	114	71

R^2_{cal} – Coefficient of determination of calibration; RPD - the ratio of prediction to deviation; RMSEC - Root Mean Squared Error of Calibration; R^2_{cross} – Coefficient of determination of cross validation (internal) RMSECV - Root Mean Squared Error of Cross-Validation

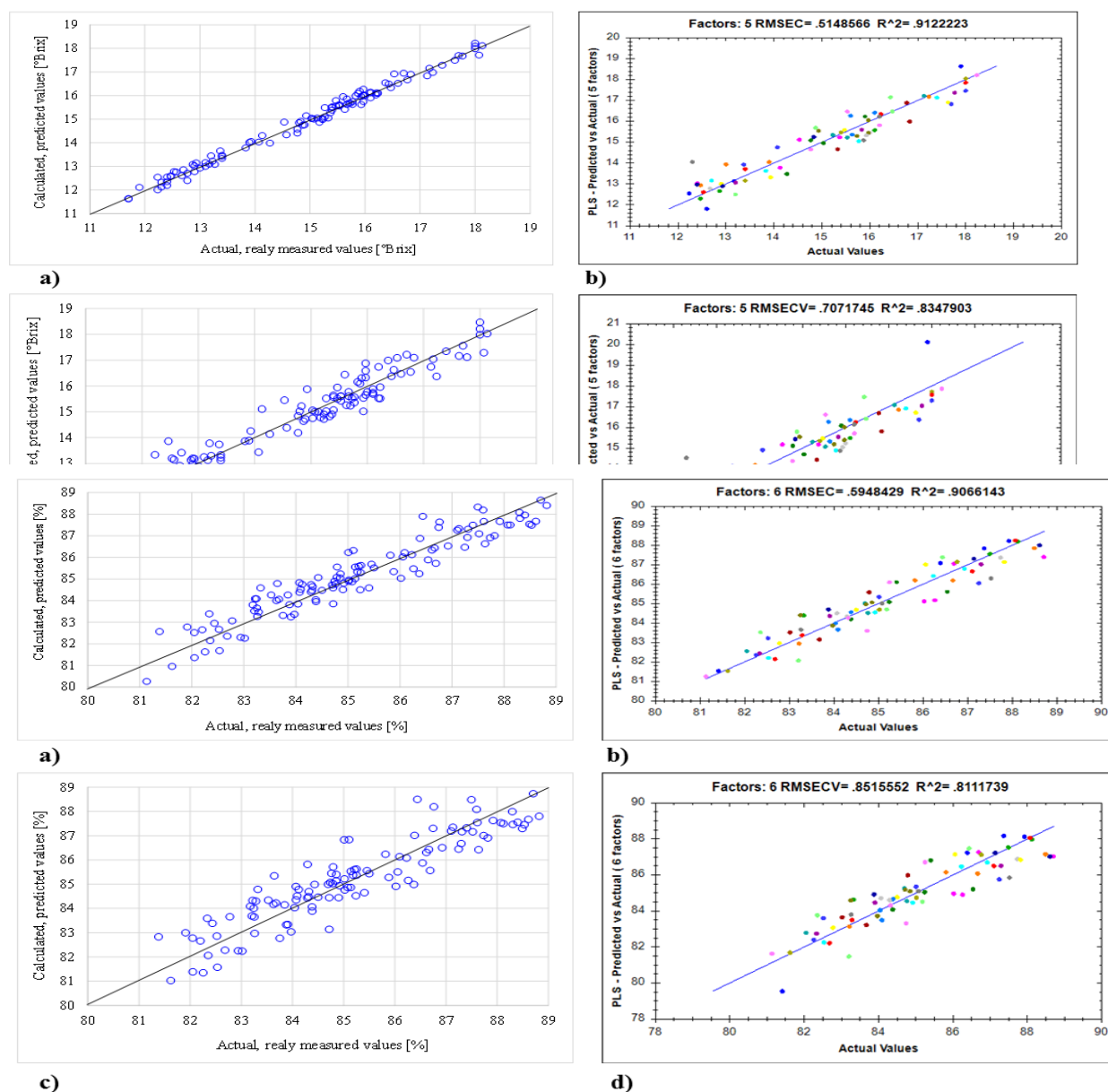


Figure 3 Characteristic of calibration models for prediction of moisture: calibration model of Antaris II (a), calibration model of MicroPhazir (b), internal-cross validation model of Antaris II (c), and internal-cross validation model of MicroPhazir (d)

Seasons 2019, 2020		Antaris II	MicroPhazir	Antaris II	MicroPhazir
Average standard deviation [%]		2.790	5.496	0.851	1.018
Average		0.362	0.713	0.740	0.886
Standard deviation [°Brix] / [%]	Min	0.020	0.037	0.027	0.007
	Max	1.040	1.697	2.467	3.060

values of moisture are less accurate than prediction SSC using both NIRS instruments.

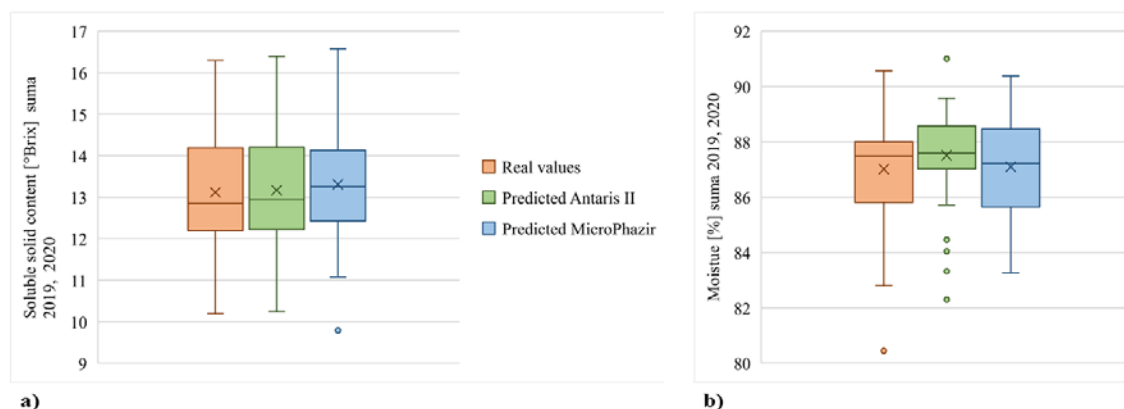


Figure 4 Boxplots of soluble solid content (a) and moisture (b) found for the real samples measured with classical methods using refractometer and drying scales, and predicted values from results provided by both NIRS instruments.

Analytical method that enables numerous possible applications. While use for determination of quality parameters of apples is well known, the prediction of parameters of apple juice, specifically moisture content, is less extended. Our study shows good applicability of NIRS for prediction of soluble solid content and moisture in fresh apple juices and demonstrates it with the apple variety ‘Golden Delicious’. Best result were obtained with calibration model for prediction of SSC using NIRS Antaris II instrument with $R^2_{cal} = 0.995$ and RPD = 3.751. The external cross validation was also good.

REFERENCES

- Bizjak Bat K., Vildrih R., Nečemer M., Mozetič Vodopivec B., Mulič I., Kump P., Ogrinc N. 2012. Characterization of Slovenian Apples with Respect to Their Botanical and Geographical Origin and Agricultural Production Practice. In *Food Technology and Biotechnology*, vol. 50, pp. 107-116. ISSN 1330-9862. <https://pdfs.semanticscholar.org/a6cd/42fc7b8670664ffb69786e67b5e443edd2f7.pdf>
- Bureau, S., Ruiz, D., Reich, M., Gouble, B., Bertrand, D., Audergon, J. M., Renard, C. M. G. C. 2009. Rapid and non-destructive analysis of apricot fruit quality using FT-near-infrared spectroscopy. In *Food Chemistry*, vol. 113, pp. 1323–1328. ISSN 0308-8146. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.08.066>
- De Oliveira, G. A., Bureau, S., Renard, C. M. G. C., Pereira-Netto, A.B., De Castilhos, F. 2014. Comparison of NIRS approach for prediction of internal quality traits in three fruit species. In *Food Chemistry*, vol. 143, pp. 223–230. ISSN 0308-8146. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.07.122>
- Escribano, S., Biasi, W. V., Lerud, R., Slaughter, D. C. and Mitcham, E. J. 2017. Non-destructive prediction of soluble solids and dry matter content using NIR spectroscopy and its relationship with sensory quality in sweet cherries. In *Postharvest Biology and Technology*, vol. 128, pp. 112–120. ISSN 0925-5214. <http://dx.doi.org/10.1016/j.postharvbio.2017.01.016>
- Fan, S., Li, J., Xia, Y., Tian, X., Guo, Z., Huang, W. 2019. Long-term evaluation of soluble solids content of apples with biological variability by using near-infrared spectroscopy and calibration transfer method. In *Postharvest Biology and Technology*, vol. 151, pp. 79–87. ISSN 0925-5214. <https://dx.doi.org/10.1016/j.postharvbio.2019.02.001>
- Giangrieco I., Proietti S., Moscatello S., Tuppo L., Battistelli A., La Cara F., Tamburrini M., Famiani F., Ciardiello M. A. 2016. Influence of Geographical Location of Orchards on Green Kiwifruit Bioactive Components. In *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 64, pp. 9172-9179. ISSN 0021-8561. DOI: 10.1021/acs.jafc.6b03930
- Gomez, A. H., He, Y., Pereira, A. G. 2006. Non-destructive measurement of acidity, soluble solids and firmness of Satsuma mandarin using Vis/NIR spectroscopy techniques. In *Journal of Food Engineering*, vol. 77, pp. 313-319. ISSN 0260-8774. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2005.06.036>
- Hou, J., Zhang, Y., Sun, Y., Xu, N., Leng, Y. 2018. Prediction of firmness and pH for ‘Golden Delicious’ apple based on elasticity index from modal analysis. In *Journal of Food Science*, vol. 83, pp. 661–669. ISSN 0022-1147. <https://dx.doi.org/10.1111/1750-3841.14071>
- Lebot, V., Malapa, R., Jung, M. 2013. Use of NIRs for the rapid prediction of total N, minerals and starch in tropical root and tuber crops. In *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, vol. 41, pp. 144–153. ISSN 0114-0671. <https://dx.doi.org/10.1080/01140671.2013.798335>

- Li, X., Wei, Y., Xu, J., Feng, X., Wu, F., Zhou, R., Jin, J., Xu, K., Yu, X., He, Y. 2018. SSC and pH for sweet assessment and maturity classification of harvested cherry fruit based on NIR hyperspectral imaging technology. In *Postharvest Biology and Technology*, vol. 143, pp. 112–118. ISSN 0925-5214. <http://dx.doi.org/10.1016/j.postharvbio.2018.05.003>
- Liu, Y. and Ying, Y. 2004. Measurement of sugar content in Fuji apples by FT-NIR spectroscopy. In *Journal of Zhejiang University Science*, vol. 5, pp. 651–655. ISSN 1673-565X. <http://dx.doi.org/10.1007/bf02840975>
- Liu, Y., Ying, Y. 2005. Use of FT-NIR spectrometry in non-invasive measurements of internal quality of 'Fuji' apples. In *Postharvest Biology and Technology*, vol. 1, pp. 65–71. ISSN 0925-5214. <http://dx.doi.org/10.1016/j.postharvbio.2005.02.013>
- Lu, R. 2001. Predicting firmness and sugar content of sweet cherries using near infrared diffuse reflectance spectroscopy. In *Transactions of the ASAE*, vol. 44, pp. 1265-1271. ISSN 0001-2351. DOI: 10.13031/2013.6421
- Manickavasagan, A., Ganeshmoorthy, K., Claereboudt, M. R., Al -Yahyai, R., Khriji, L. 2014. Non-destructive measurement of total soluble solid (TSS) content of dates using near infrared (NIR) imaging. In *Emirates Journal of Food and Agriculture*, vol. 26, pp. 970–976. ISSN 2079-052X. <https://doi.org/10.9755/ejfa.v26i11.18102>
- Mayer, S., Schmelzer, J., Kirchler, C. G., Pezzei, C.K., Beć, K. B., Grabska, J., Huck, C. W. 2021. Theae nigræ folium: Comparing the analytical performance of benchtop and handheld near-infrared spectrometers. In *Talanta*, vol. 221, pp. 8. ISSN 0039-9140. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2020.121165>
- Moller, S., Travers, S., Bertram, H. C., Bertelsen, M. G. 2013. Prediction of postharvest dry matter, soluble solids content, firmness and acidity in apples (cv. Elshof) using NMR and NIR spectroscopy: a comparative study. In *European Food Research and Technology*, vol. 23, pp. 1021-1024. ISSN 1438-2377. <https://doi.org/10.9755/ejfa.v26i11.18102>
- Nicolai, B. M., Beullens, K., Bobelyn, E., Peirs, A., Saeys, W., Theron, K. I., Lammertyn, J. 2007. Non-destructive measurement of fruit and vegetable quality by means of NIR spectroscopy: A review. In *Postharvest Biology and Technology*, vol. 46, pp. 99–118. ISSN 0925-5214. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2007.06.024>
- Özdemir, I.S., Bureau, S., Öztürk, B., Seyhan, F. 2019. Effect of cultivar and season on the robustness of PLS models for soluble solid content prediction in apricots using FT-NIRS. In *Journal of Food Science and Technology*, vol. 56, pp. 330–339. ISSN 0022-1155. <https://doi.org/10.1007/s13197-018-3493-3>
- Özdemir, I. S., Öztürk, B., Celik, B., Saritepe, Y., Aksoy, H. 2018. Rapid, simultaneous and non-destructive assessment of the moisture, water activity, firmness and SO₂ content of the intact sulphured-dried apricots using FT-NIRS and chemometrics. In *Talanta*, vol. 186, pp. 467–472. ISSN 0039-9140. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.05.007>
- Pissard, A., Beaten, V., Romnée, J., M., Dupont, P., Mouteau, A., Lateur, M. 2012. Classical and NIR measurements of the quality and nutritional parameters of apples: a methodological study of intra-fruit variability. In *Biotechnology, Agronomy, Sociology and Environment*, vol. 16, pp. 294-306. ISSN 1370-6233. <https://popups.uliege.be/1780-4507/index.php?id=8782&lang=en>
- Shafiee, S., Minaei, S. 2018. Combined data mining/NIR spectroscopy for purity assessment on lime juice. In *Infrared Physics and Technology*, vol. 91, pp. 193-199. ISSN 1350-4495. <https://doi.org/10.1016/j.infrared.2018.04.012>
- Shao, Y., He, Y., Gómez, E. H., Pereira, A. H., Qiu, Z., Zhang, Y. 2007. Visible/near infrared spectrometric technique for nondestructive assessment of tomato 'Heatwave' (*Lycopersicum esculentum*) quality characteristics. In *Journal of Food Engineering*, vol. 81, pp. 672-678. ISSN 0260-8774. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2006.12.026>
- Travers, S., Bertelsen, M. G., Petersen, K. K., Kucheryavskiy, S. V. 2014. Predicting pear (cv. Clara Frijs) dry matter and soluble solids content with near infrared spectroscopy. In *LWT – Food Science and Technology*, vol. 59, pp. 1107-1113. ISSN 0023-6438. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.04.048>
- Viljevac, M. V., Dugalić, K., Mihaljević, I., Tomaš, V., Vuković, D., Zdunić, Z., Puškar, B., Jurković, Z. 2017. Season, location and cultivar influence on bioactive compounds of sour cherry fruits. In *Plant, Soil and Environment*, vol. 63, pp. 389-395. ISSN 1214-1178. <https://doi.org/10.17221/472/2017-PSE>
- Vittayapadung, S., Jiewen, Z., Quansheng, Ch., Chuaviroj, R. 2008. Application of FT-NIR spectroscopy to the measurement of fruit firmness of 'Fuji' apples. In *Maejo International Journal of Science and Technology*, vol. 2, pp. 13-23. ISSN 1905-7873.
- Wang, J., Wang, J., Chen, Z., Han, D. 2017. Development of multi-cultivar models for predicting the soluble solid content and firmness of European pear (*Pyrus communis* L.) using portable vis-NIR spectroscopy. In *Postharvest Biology and Technology*, vol. 129, pp. 143–151. ISSN 0925-5214. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2017.03.012>
- Wlodarska, K., Khmelinskii, I., Sikorska, E. 2018. Evaluation of Quality Parameters of Apple Juices using Near-Infrared Spectroscopy and Chemometrics. In *Journal of Spectroscopy*, vol. 2018, pp. 8. ISSN 2314-4920. <https://doi.org/10.1155/2018/5191283>

Zhang, Y., Nock, J. F., Shoffe, Y. A., Watkins, C. B. 2019. Non-destructive prediction of soluble solids and dry matter contents in eight apple cultivars using near-infrared spectroscopy. In *Postharvest Biology and Technology*, vol. 151, pp. 111–118. ISSN 0925-5214. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2019.01.009>

Zhu, D., Ji, B., Quing, Z., Wang, C., Zude, M. 2010. The Detection of Quality Deterioration of Apple Juice by Near Infrared and Fluorescence Spectroscopy. In *IFIP ADVANCES IN INFORMATION AND COMMUNICATION TECHNOLOGY*, vol. 346, pp. 84-91. ISSN 1868-4238. DOI 10.1007/978-3-642-18354-6_12

Acknowledgments: Support of this research by Ministry of Agriculture of the Czech Republic through the grant DKRVO 1521 is gratefully acknowledged.

Contact address:

Contact address: Martina Marečková, Ing. : Department of Genetics and Breeding, Research and Breeding Institute of Pomology Holovousy Ltd., Holovousy 129, 508 01 Hořice, Czech Republic

Department of Biology, University of Hradec Kralove, Faculty of Natural Sciences, Rokitanskeho 62, 500 03 Hradec Králové, Czech Republic

Veronika Danková, Ing.: Department of Genetics and Breeding, Research and Breeding Institute of Pomology Holovousy Ltd., Holovousy 129, 508 01 Hořice, Czech Republic

Lubor Zelený, Ing.: Department of Genetics and Breeding, Research and Breeding Institute of Pomology Holovousy Ltd., Holovousy 129, 508 01 Hořice, Czech Republic

Pavol Suran, Ing.: Department of Genetics and Breeding, Research and Breeding Institute of Pomology Holovousy Ltd., Holovousy 129, 508 01 Hořice, Czech Republic

MYKOCENÓZA JAČMEŇA SLOVENSKEHO PÔVODU SO ZAMERANÍM NA ZÁSTUPCOV RODU *FUSARIUM* MYCOCENOSIS OF SLOVAK BARLEY WITH A FOCUS ON REPRESENTATIVES OF THE GENUS *FUSARIUM*

Zuzana Mašková, Dana Tančinová, Zuzana Barboráková, Miriam Solgajová

Abstract: The aim of the presented study was to analyse the endogenous mycobiota of barley grains, focusing on the occurrence of toxicologically important genus *Fusarium*. A total of 11 samples of Slovak origin were analysed and the method of direct placing of superficially sterilized grains on the agar plates with DRBC (Dichloran Rose-Bengal Chloramphenicol Agar) and DCPA (Dichloran Chloramphenicol Peptone Agar) was used. Species identification of *Fusarium* isolates was performed on SNA (Synthetic Nutrient agar) and PDA (Potato Dextrose Agar) nutrient media. A total of 14 genera of filamentous micromycetes were detected in the monitored samples. The *Fusarium* genus occurred with an isolation frequency (Fr) of 82%. The average relative density (RD) of *Fusarium* spp. was 14.7%, while the variability in individual positively tested samples was 0.9 - 26.1%. In the study, we detected a total of 13 *Fusarium* species - *F. avenaceum*, *F. crookwellense*, *F. culmorum*, *F. equiseti*, *F. fujikuroi*, *F. graminearum*, *F. incarnatum*, *F. oxysporum*, *F. poae*, *F. proliferatum*, *F. sporotrichioides*, *F. subglutinans* and *F. tricinctum*. The highest RD we recorded in *F. proliferatum*, *F. avenaceum* and *F. sporotrichioides*.

Keywords: barley, cereal, *Fusarium*, grain, *Hordeum vulgare*, mycocenosis

ÚVOD

Zrná obilnín sú celosvetovo najdôležitejšou potravinárskou komoditou a v mnohých kultúrach predstavujú až 80 % stravy (Butscher et al., 2015). Jačmeň patrí spolu s pšenicou k najstarším obilninám. Je to veľmi dôležitá krmna, sladovnícka, potravinárska a farmaceutická plodina. V súčasnosti sú približne 2/3 úrody využívané ako krmivo, 1/3 je určená na sladovnícke účely a 2 % sa využívajú priamo ako potrava (Gómez-Caravaca et al., 2014). V potravinárstve sa využíva na výrobu krúp, kávových náhradiek, liehu a sladových výťažkov. V sladovniach sa zrná už po stáročia spracováva na slad a ten sa v pivovaroch používa na výrobu piva (Hicks et al., 2014). Jačmeň, odpady zo sladovní a pivovarov aj zelená hmota slúžia aj ako krmivo pre hospodárske zvieratá. I napriek tomu, že sa relatívne málo jačmeňa využíva priamo na potravu, pre jeho nutričnú hodnotu sa po celom svete obnovil záujem o jačmennú múku a krúpy ako zložky pre výrobu funkčných potravín (cestoviny, pekárske výrobky) (Gómez-Caravaca et al., 2014).

Pri výbere vhodných obilnín je dôležité prihliadať na ich mikrobiologickú kvalitu a s tým súvisiacu ich bezpečnosť. Obilniny sú počas rastu, zberu a skladovania kontaminované širokou škálou baktérií, kvasiniek a mikroskopických vláknitých húb. Úroveň kontaminácie v poľných podmienkach je ovplyvnená predovšetkým klimatickými vplyvmi počas obdobia dozrievania a zberu obilnín (Magan et Aldred, 2006). Poľné mikroskopické huby, inak označované ako tzv. hygrofilné huby, majú vyššie nároky na aktivitu vody substrátu a obyčajne nie sú schopné rásť pri hodnotách pod 0,90 (Williams et al., 2006). Kontaminácia vláknitými mikromycétami môže ovplyvniť zastúpenie sacharidov a bielkovín, ktoré sú nevyhnutné pre zachovanie pekárenskej a sladovníckej kvality zrna (Magan et Aldred, 2006). Môžu zapríčiniť zatuchnutie obilnín a následne aj ich menej efektívne klíčenie, čo je v prípade jačmeňa dôležitá vlastnosť z pohľadu produkcie amyláz potrebných na uvoľnenie jednoduchých cukrov pri výrobe piva (Williams et al., 2006). Navyše, počas rastu môžu mnohé vláknité mikromycéty za určitých podmienok produkovať rôzne toxické metabolity, nazývané mykotoxíny (Nwakanma et Unachukwu, 2017). Do dnešnej doby bolo identifikovaných viac

ako 300 mykotoxínov. Z nich sa približne 20 môže frekventovane vyskytovať vo významných a bezpečnosť ohrozujúcich množstvách v potravinách alebo krmivách (Botana et Sainz, 2015). Približne 5 – 10 % svetových dodávok potravín sa ročne stráca z dôvodu prítomnosti mikroskopických vláknitých húb alebo samotných mykotoxínov (Yang et al., 2017).

Medzi najvýznamnejších zástupcov poľných mikromycét patria druhy rodu *Fusarium* (Sainz et al., 2015). Vlhké počasie počas dozrievania môže mať za následok značné infekcie druhmi tohto rodu, pokles úrody a kvality zrna a môže mať za následok kontamináciu trichotecénmi, ktoré môžu vstupovať do potravinového reťazca (Magan et Aldred, 2006). Okrem trichotecénov sú fuzária schopné produkovať zearalenón, fumonizíny a iné menej známe toxíny, ako sú fuzaproliferín, enniatíny, beauvericín, moniliformín a modifikované formy známych toxínov (Sainz et al., 2015).

Vzhľadom na veľký význam rodu *Fusarium* v súvislosti s obilninami a jeho toxínogénny potenciál, bolo cieľom predkladanej štúdie monitorovať mykologický profil vzoriek jačmeňa slovenského pôvodu s bližším zameraním sa skrining výskytu zástupcov rodu *Fusarium*.

MATERIÁL A METODIKA

Predkladaná štúdia sa zaoberala mykologickými analýzami jačmenných zŕn slovenského pôvodu. Predmetom záujmu bola vnútorná mykocenóza zŕn, so zameraním najmä na aktuálny výskyt zástupcov toxikologicky významného rodu *Fusarium*.

V rámci štúdie bolo celkovo analyzovaných 11 vzoriek jačmeňa (*Hordeum vulgare*), ktoré boli dopestované v rôznych lokalitách Slovenska (Tabuľka 1) v rokoch 2018 a 2019. Vzorky zŕn boli odobraté z uskladnených obilnín do papierových vreciek a až do samotných analýz boli uchovávané v chlade.

Tabuľka 1 Charakteristika mykologicky analyzovaných vzoriek zŕn jačmeňa slovenského pôvodu

Č.	Kraj	Lokalita	Účel využitia	Rok
1.	Nitriansky	Mojmírovce	sladovnícky	2018
2.	Nitriansky	Veľký Lapáš	bez určenia	
3.	Trnavský	Kátlovce	sladovnícky	
4.	Banskobystrický	Hrochoť	chovateľský	
5.	Banskobystrický	Lučenec	osivo (morené)	
6.	Nitriansky	Oponice	bez určenia	2019
7.	Nitriansky	Dvory nad Žitavou	bez určenia	
8.	Prešovský	neznáma	bez určenia	
9.	Nitriansky	Lefantovce	potravinársky	
10.	Nitriansky	Krušovce	bez určenia	
11.	Nitriansky	Preseľany	bez určenia	

Na rozbor endogénnej mykobioty obilných zŕn sme využili metódu priameho ukladania povrchovo vysterylizovaných zŕn na agarové platne (Samson et al., 2002a). Viac ako 200 kusov zŕn bez viditeľného poškodenia z každej vzorky bolo po dobu 2 minút sterilizovaných roztokom chlóraminu (5 g chlóraminu a 10 cm³ destilovanej vody). Následne boli zrná trikrát po sebe prepláchnuté sterilnou destilovanou vodou a vysušené na sterilnom filtračnom papieri. Presne 100 zŕn z každej vzorky bolo uložených na platne s DRBC (agar s dichlóranom, chloramfenikolom a bengálskou červenou) a 100 zŕn na platne s DCPA (agar s dichlóranom, chloramfenikolom a peptónom) (Samson et al., 2002b). Kultivácia platní prebiehala v tme pri teplote 25 ± 1°C po dobu 5 až 7 dní.

Po kultivácii nasledovala identifikácia vyrastených vláknitých mikromycét do jednotlivých rodov. Identifikáciu sme vykonávali pomocou viacerých uznávaných identifikačných kľúčov a publikácií (deHoog et al., 2000; Pitt et Hocking, 1999; Samson et al., 2002a) na základe dôležitých mikroskopických a makroskopických znakov. Pre druhovú identifikáciu zástupcov rodu *Fusarium* boli jednotlivé izoláty preočkované na živné médiá SNA – syntetický nutričný agar (Nirenberg, 1976) a PDA – zemiakovo-dextrózový agar (Pitt et Hocking, 2009). SNA bol použitý ako nosná živná pôda pri druhovej identifikácii. Na povrch stuhnutej živnej pôdy bol uložený sterilný filtračný papier o približnej veľkosti 2 x 2 cm, ktorý slúžil na podporu sporulácie naočkovaných kmeňov, prípadne na sledovanie produkcie pigmentov. Platne s PDA slúžili na diferenciáciu kmeňov na základe pigmentácie. Izolované mikromycéty boli 7 až 10 dní kultivované na uvedených živných pôdach na prirodzenom svetle pri izbovej teplote. Identifikácia izolátov rodu *Fusarium* prebiehala za pomoci uznávaných mykologických publikácií: Leslie et Summerell (2006), Samson et al., (2002a), Burgess et al. (1988), Nelson et al., (1983). Pri vyhodnocovaní mikroskopických znakov fuzárií boli pozorované mikroskopické preparáty v laktofenole, Melzerovom roztoku alebo v roztoku kyseliny mliečnej s bavlníkovou modrou (Tančinová et al., 2012). Doplnkovou metódou pri identifikácii bolo tiež mikroskopické pozorovanie rastu jednotlivých štruktúr *in vivo* v Petriho miskách. Na mikroskopii boli použité laboratórne mikroskopy Olympus CX21FS1 a Olympus BX51TF so systémom Olympus Nomarski DIC pre vyšší kontrast.

Získané výsledky boli vyhodnotené a vyjadrené percentuálnymi hodnotami frekvencie výskytu (Fr) a relatívnej denzity (RD) na rodovej a druhovej úrovni. Frekvencia výskytu je definovaná ako percentuálny podiel vzoriek, v ktorých sa daný druh alebo rod vyskytol najmenej jedenkrát. Relatívna denzita je definovaná ako percentuálny podiel izolátov daného druhu alebo rodu, vyskytujúcich sa v analyzovanej vzorke (Guatam et al., 2009). Uvedené veličiny boli vypočítané podľa nasledovných vzorcov (González et al., 1996):

$$\text{Fr (\%)} = (\text{ns} / \text{N}) \cdot 100$$

$$\text{RD (\%)} = (\text{ni} / \text{Ni}) \cdot 100$$

kde ns = počet vzoriek, v ktorých bol rod alebo druh detegovaný; N = celkový počet vzoriek; ni = počet izolátov rodu alebo druhu; Ni = celkový počet detegovaných izolátov.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

V rámci predkladanej štúdie bolo z 11 vzoriek jačmenných zŕn vyizolovaných celkom 14 rodov mikroskopických vláknitých húb, čo na živnom médiu DRBC predstavovalo 1140 mikromycét. Prehľad izolovaných rodov poskytuje Tabuľka 2. Izoláty, ktoré z dôvodu chýbajúcich identifikačných znakov nebolo možné bližšie identifikovať, sme označili ako *Mycelium sterillum*.

S najvyššou priemernou relatívnou denzitou (RD) bol zaznamenaný výskyt zástupcov rodov *Alternaria* (40,6 %), *Aspergillus* (17,4 %), *Rhizopus* (15,5 %) a *Fusarium* (14,7 %). Zástupcovia ostatných rodov sa vyskytovali s priemernou RD v rozsahu 0,2 – 4,6 %. RD fuzárií v jednotlivých vzorkách bola pomerne variabilná – v pozitívnych vzorkách sa pohybovala v rozpätí 0,9 – 26,1 %. Najchudobnejšiu mykocenózu sme zaznamenali vo vzorke č. 5 (odroda KWS Tenor, lokalita Lučenec), čo sme v skutočnosti aj očakávali, nakoľko sa jednalo o morené osivo (moridlo Vitavax Royal). Zaujímavým zistením bolo, že rod *Alternaria* si ako jediný v tejto vzorke zachoval svoju vitalitu a dosahoval relatívne podobný počet, ako v ostatných vzorkách.

Tabuľka 2 Prehľad izolovaných rodov mikroskopických vláknitých húb a počty izolátov zo zrn jačmeňa slovenského pôvodu (živná pôda DRBC)

Rod	Počet izolátov v jednotlivých vzorkách											
	rok 2018					rok 2019						Σ
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	
<i>Alternaria</i>	58	85	7	44	44	7	14	38	84	79	3	463
<i>Arthrimum</i>	-	2	-	-	-	-	1	-	-	-	-	3
<i>Aspergillus</i>	-	-	5	-	-	15	4	43	-	47	84	198
<i>Bipolaris</i>	28	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	28
<i>Cladosporium</i>	-	-	-	-	-	-	4	2	2	-	-	8
<i>Epicoccum</i>	-	-	-	-	1	-	1	9	3	1	-	15
<i>Fusarium</i>	37	25	20	14	-	-	2	37	11	21	1	168
<i>Harzia</i>	-	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3
<i>Mucor</i>	2	4	-	-	-	-	1	-	-	1	-	8
<i>Mycelim sterilium</i>	-	-	-	2	-	1	4	-	3	-	-	10
<i>Penicillium</i>	4	5	2	9	-	8	12	5	5	-	2	52
<i>Rhizopus</i>	19	25	53	12	-	7	12	8	3	11	27	177
<i>Scopulariopsis</i>	-	-	-	-	-	-	2	-	-	-	-	2
<i>Sordaria</i>	2	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	3
<i>Ulocladium</i>	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2
Σ	150	151	88	81	45	38	57	142	111	160	117	1140

Z pohľadu frekvencie výskytu (Fr) sa najvýznamnejšou hubou kolonizujúcou jačmenné zrná ukázal rod *Alternaria*, ktorého zástupcovia boli izolovaní zo všetkých analyzovaných vzoriek (100 %). Celkom 91 % vzoriek bolo kolonizovaných zygomycétami z rodu *Rhizopus*, 82 % vzoriek hubami z rodov *Fusarium* a *Penicillium*, 73 % vzoriek mikromycétami z rodu *Aspergillus* a ostatné rody boli menej frekventované a boli izolované z menej ako polovice vzoriek.

Rod *Alternaria* všeobecne patrí medzi najbežnejšie rody detegované v obilninách, čo sa jednoznačne ukázalo aj vo vzorkách v našej štúdií, a to tak na počte izolátov, ako aj na frekvencii ich výskytu. Autori Chelkowski et Grabarkiewicz-Szczesna (1991) a Moss (1991) uvádzajú, že v mnohých európskych krajinách mierneho pásma dosahuje kontaminácia obilia hubami z rodov *Alternaria* a *Fusarium* v čase zberu 100 %. Navyše uvádzajú, že k ich postupnému odumieraniu dochádza vtedy, ak vlhkosť substrátu nepresiahne dlhšiu dobu 12 – 13 % (aktivita vody, $a_w = 0,65$). *Alternaria* spp. boli dominantnými druhmi aj na vzorkách jačmenného zrna dopestovaného v Litve, po ktorých nasledovali *Drechslera sorokiniana*, *Fusarium* spp. a *Cladosporium herbarum* (Krasauskas, 2017). V každom prípade musíme navyše brať na vedomie, že s prebiehajúcimi zmenami podnebia sa v dôsledku adaptácie hubových patogénov na zmenené podmienky očakáva nárast rizika výskytu mykotoxikogénnych húb a mykotoxínov (Geisen et al., 2017; Medina et al., 2017).

Vzhľadom na to, že zrná jačmeňa môžeme využívať i na sladovnícke účely, mali by sme brať do úvahy aj ďalší dôležitý fakt, a to, že podmienky sladovania môžu byť priaznivé pre rozvoj húb, ktoré sa tam dostávajú prostredníctvom jačmenných zrn. Podľa štúdií Krasauskas (2017) boli počas technologických procesov sladovania evidentné zmeny v abundancii húb v obilí. Pokiaľ ide o mikrobiálnu aktivitu a bezpečnosť, máčanie jačmeňa je najdôležitejším krokom pri sladovaní. Aj keď sú niektoré mikroorganizmy odplavené spolu s máčajúcou vodou, počet životaschopných jedincov sa podstatne zvyšuje. Krasauskas (2017) navyše konštatuje, že počas máčania bol pozorovaný predovšetkým intenzívny nárast fuzárií. Scott (1996) a Briggs

et McGuinness (1993) uvádzajú, že k rastu mikromycét môže dôjsť aj počas klíčenia, tiež so sprievodným zvýšením hladiny mykotoxínov.

V našej štúdií sme upriamili pozornosť hlavne na poľné mikroskopické huby rodu *Fusarium*. Na zachytenie fuzárií zo skúmaného materiálu sme okrem živného média DRBC použili aj DCPA, čo je selektívne médium vyvinuté práve na izoláciu druhov rodu *Fusarium* (a niektorých iných hyfomycét) z cereálií. Fuzária sa na tomto médiu vyznačujú dobrou produkciou konidií, čo umožňuje rýchlu identifikáciu na úrovni rodu (Andrews et Pitt, 1986). Na uvedenom médiu sme sa venovali výlučne zástupcom rodu *Fusarium*, ktorí kolonizovali v priemere 26 % analyzovaných zŕn. Podiel osídlených zŕn sa v jednotlivých pozitívnych vzorkách pohyboval medzi 1 – 62 %, čo relatívne korelovalo s výsledkami na živnom médiu DRBC. Vyrastené fuzária sme preočkovali na identifikačné médiá a výsledky mykologických identifikácií uvádzame v Tabuľke 3, a to sumárne pre obidve použité médiá.

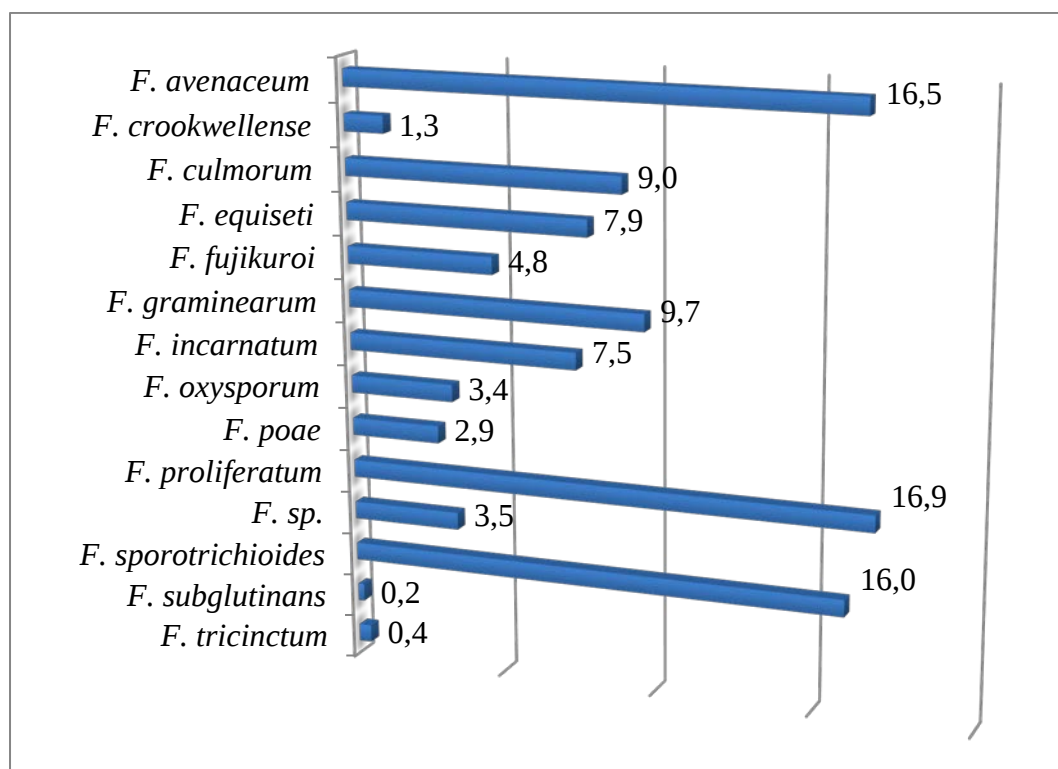
Tabuľka 3 Prehľad izolovaných druhov rodu *Fusarium* a počty izolátov zo zŕn jačmeňa slovenského pôvodu (súhrn izolátov zo živných médií DRBC a DCPA)

Druhy rodu <i>Fusarium</i>	Počet izolátov v jednotlivých vzorkách												Σ
	rok 2018					rok 2019							
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11		
<i>F. avenaceum</i>	13	-	-	22	-	1	1	31	-	7	-	75	
<i>F. crookwellense</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	6	-	-	6	
<i>F. culmorum</i>	-	-	-	1	-	-	-	25	-	15	-	41	
<i>F. equiseti</i>	1	33	-	-	-	-	-	2	-	-	-	36	
<i>F. fujikuroi</i>	1	-	18	-	-	-	-	3	-	-	-	22	
<i>F. graminearum</i>	25	-	-	-	-	-	-	5	-	14	-	44	
<i>F. incarnatum</i>	12	5	14	2	-	-	-	-	-	-	1	34	
<i>F. oxysporum</i>	13	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	15	
<i>F. poae</i>	8	-	-	-	-	-	-	4	1	-	-	13	
<i>F. proliferatum</i>	-	2	47	-	2	-	1	19	5	-	1	77	
<i>F. sp.</i>	1	5	-	8	-	-	-	2	-	-	-	16	
<i>F. sporotrichioides</i>	26	24	-	4	-	-	-	4	10	5	-	73	
<i>F. subglutinans</i>	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	1	
<i>F. tricinctum</i>	-	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-	2	
Σ	100	69	82	39	2	1	2	95	22	41	2	455	

V sledovaných vzorkách sme zaznamenali celkom 13 druhov rodu *Fusarium* - *F. avenaceum*, *F. crookwellense*, *F. culmorum*, *F. equiseti*, *F. fujikuroi* (predtým označované ako *F. verticillioides* alebo *F. moniliforme*), *F. graminearum*, *F. incarnatum* (predtým označované ako *F. semitectum*), *F. oxysporum*, *F. poae*, *F. proliferatum*, *F. sporotrichioides*, *F. subglutinans* a *F. tricinctum*. S najvyššou Fr sme zaznamenali druhy *F. proliferatum* (64 %), *F. avenaceum* (55 %), *F. sporotrichioides* (55 %) a *F. semitectum* (45 %). RD jednotlivých druhov v rámci rodu *Fusarium* znázorňuje Obrázok 1. Celkovo najväčší počet izolátov bol zaznamenaný v rámci druhov *F. proliferatum* (z dôvodu vysokého počtu izolátov v jednej zo vzoriek), *F. avenaceum* a *F. sporotrichioides*.

Podľa autora Flannigan (2003) môžu byť zrná jačmeňa veľmi ovplyvnené zástupcami rodu *Fusarium*, primárne druhom *F. graminearum*. Za ďalšie významné druhy na jačmeni autor považuje *F. culmorum*, *F. poae* a *F. avenaceum*. V staršej štúdií, ktorá prebiehala na našom pracovisku (Mašková et al., 2011), sme zaznamenali podobné výsledky, kde sme ako najfrekvencovanejšie druhy rodu *Fusarium* na obilninách slovenského pôvodu zaznamenali *F. avenaceum*, *F. graminearum* a *F. poae*. V danej štúdií uvedené druhy preukázali (podľa toxikologickej špecifity) schopnosť produkovať trichotecény (deoxynivalenol,

diacetoxyscirpenol, fusarenón X, HT-2 toxín, monoacetoxyscirpenol, neosolaniol, nivalenol, T-2 toxín), fumonizíny, zearalenóny, moniliformín a zriedka spomínané toxíny ako aurofuzarín, beauvericín, enniatíny, ekvisetín a chlamydosporol. Produkciu mnohých uvedených mykotoxínov uvádzajú aj ďalší autori, ako sú Munkvold (2017), Neme et Mohammed (2017), Mostrom (2016), Pleadin et al. (2019). Výskyt zearalenónu, deoxynivalenolu a T-2 toxínu v sladovníckom jačmeni zaznamenali i v Českej republike, no uvádzajú, že koncentrácie testovaných toxínov v žiadnej vzorke neprekročili povolené limity Európskej únie (Svoboda et al., 2019). Thrane (2014) konštatuje, že rod *Fusarium* je spájaný s produkciou mykotoxínov predovšetkým na obilninách mierneho pásma.



Obrázok 1 Relatívna denzita (%) izolovaných druhov v rámci rodu *Fusarium* zo zŕn jačmeňa slovenského pôvodu

V našej štúdii sa v prípade vzoriek č. 1 a 3 jednalo o sladovnícky jačmeň. V 1. vzorke (odroda Odyssey, lokalita Mojmirovce) sa fuzárie vyskytovali s pomerne vysokou RD (24,7 %). Zaznamenali sme v nej tiež vyššiu druhovú variabilitu (8 identifikovaných druhov) a dominovali druhy *F. sporotrichioides* a *F. graminearum*. Tieto druhy sú považované za potenciálnych producentov mnohých toxínov, ako napríklad T-2 toxínu, HT-2 toxínu a *F. graminearum* je významným producentom deoxynivalenolu (DON), prípadne zearalenónu (Weidenböner, 2001). V 2. vzorke (odroda Kangoo, lokalita Kátlovce) sme zaznamenali RD fuzárií na hodnote 22,7 %, identifikovali sme celkom 5 druhov, s veľmi frekventovaným zastúpením druhu *F. proliferatum*. Tento druh je potenciálnym producentom fumonizínov, enniatínov, prípadne moniliformínu (Weidenböner, 2001). Vďaka svojej tepelnej stabilite sa mnohé toxíny môžu prenášať cez proces sladovania, fermentácie i pasterizácie, až do konečného produktu – piva. Mykotoxín, ktorý podľa autora Scott (1996) najlepšie odoláva procesu varenia piva, je DON. Tento toxín môže dokonca zvyšovať svoje hladiny počas rmutovania. Môže to byť spôsobené uvoľnením ďalšieho DON z konjugátov (tzv. maskované formy toxínov). Neboli zaznamenané žiadne straty tohto toxínu pri varení mladiny alebo počas

fermentácie, a teda je tu možný jeho značný prenos do hotového piva. Podobné maskované formy mykotoxínov predstavujú nové výskumné trendy (Freire et Sant'Ana, 2018). Zearalenón sa počas fermentácie pravdepodobne vo veľkej miere konvertuje na 3-zearalenol a fumonizíny odolávajú fermentácii, ale ich osud v priebehu celého procesu výroby piva nebol preskúmaný Scott (1996).

ZÁVER

Bezpečnosť potravín nepochybne súvisí so zložitou sieťou rôznych faktorov, spomedzi ktorých má veľký význam práve výskyt vláknitých mikromycét a ich metabolitov. Predkladaná štúdia poukázala na pomerne vysokú frekvenciu výskytu zástupcov rodu *Fusarium* na jačmenných zrnách slovenského pôvodu. Svojou činnosťou môžu vplývať nielen na bezpečnosť suroviny, ale môžu vyvolávať aj technologické problémy v procese výroby produktov, ako je napríklad pivo. Mykotoxíny, ktoré produkujú, sa vzhľadom na vysokú tepelnú stabilitu môžu dostávať až do finálnych produktov a ohrozovať tak ich bezpečnosť. Preto je včasné zistenie mikroskopických húb na obilninách rozhodujúce, aby sa predišlo možným zdravotným rizikám a technologickým problémom. V súčasnej dobe veľmi diskutované zmeny podnebia majú významný vplyv na zastúpenie mikromycét a ich produkciu toxických metabolitov. S odstupom niekoľkých rokov môžeme pozorovať zmeny vo variabilite mykocenózy obilnín, ale i v schopnosti produkcie niektorých nežiaducich metabolitov. Preto považujeme za veľmi dôležité neustále sledovanie mykotickej kontaminácie obilnín a výskum v oblasti prevencie a zmierňovania kontaminácie mykotoxínmi.

LITERATÚRA

- Andrews, S., Pitt, J. I. 1986. Selective medium for isolation of *Fusarium* species and dematiaceous hyphomycetes from cereals. In *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 51, no. 6, pp. 1235–1238.
- Botana, L. M., Sainz, M. J. 2015. *Climate Change and Mycotoxins*. Berlin: De Gruyter. 185 p. ISBN 978-3-11-033305-3.
- Briggs, D. E., McGuinness, G. 1993. Microbes and barley grains. In *Journal of the Institute of Brewing*, vol. 99, pp. 249–55, 1993.
- Burgess, L. W., Liddel, C. M., Summerell, B. A. 1988. *Laboratory manual for Fusarium research*. Sydney: University of Sydney. 156 p. ISBN 0-949269-556-5.
- Butscher, D., Schlup, T., Roth, C., Müller-Fischer, N., Gantenbein-Demarchi, C., Rudolf von Rohr, P. 2015. Inactivation of microorganisms on granular materials: Reduction of *Bacillus amyloliquefaciens* endospores on wheat grains in a low pressure plasma circulating fluidized bed reactor. In *Journal of Food Engineering*, vol. 159, pp. 48–56. doi:10.1016/j.jfoodeng.2015.03.009.
- Chelkowski, J., Grabarkiewicz-Szcesna, J. 1991. *Alternaria* and their metabolites in cereal grain. In Chelkowski, J., editor. *Cereal grain. Mycotoxins, fungi and quality in drying and storage*. Amsterdam: Elsevier. pp. 67–76.
- Flannigan, B. 2003. The microbiota of barley and malt. In Priest, F. G., Campbell, I., editors. *Brewing microbiology*. 3rd edition. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers, pp.113–80.
- Freire, L., Sant'Ana, A. S. 2018. Modified mycotoxins: An updated review on their formation, detection, occurrence, and toxic effects. In *Food and Chemical Toxicology*, vol. 111, pp. 189–205.
- Geisen, R., Touhami, N., Schmidt-Heydt, M. 2017. Mycotoxins as adaptation factors to food related environments. In *Current Opinion in Food Science*, vol. 17, pp.1–8.
- Gómez-Caravaca, A. M., Verardo, V., Berardinelli, A., Marconi, E., Caboni, M. F. 2014. A chemometric approach to determine the phenolic compounds in different barley samples by two different stationary phases: A comparison between C18 and pentafluorophenyl core shell columns. In *Journal of Chromatography A*, vol. 1355, pp. 134–142. doi:10.1016/j.chroma.2014.06.007
- González, H. H. L., Pacin, A., Resnik, S. L., Martinez, E. J. 1996. Deoxynivalenol and contaminant mycoflora in freshly harvested Argentinian wheat in 1993. In *Mycopathologia*, vol. 135, no. 2, pp. 129–134. ISSN 0301-486X.
- Guatam, A. K., Sharma, S., Bhadauria, R. 2009. Detection of toxigenic fungi and mycotoxins in medicinally important powdered herbal drugs. In *The Internet Journal of Microbiology*, vol. 7, no. 2. ISSN 1937-8289.
- Hicks, K. B., Montanti, J., Nghiem, N., P. 2014. Chapter 11 - Use of Barley Grain and Straw for Biofuels and Other Industrial Uses. In Shewry, R., Ullrich, S. E. 2014. *Barley: Chemistry and Technology, Second Edition*. Woodhead Publishing and AACC International Press. 322 p. ISBN 978-1-891127-79-3.
- deHoog, G. S., Guarro, J., Gené, J., Figueras, M. J. 2000. *Atlas of Clinical Fungi*. Utrecht: Centraalbureau voor Schimmecultures. ISBN 90-70351-43-9.

- Krasauskas, A. 2017. Fungi in malting barley grain and malt production. In *Biologija*, vol. 63, no.3. doi:10.6001/biologija.v63i3.3583
- Leslie, J. F., Summerell, B. A. 2006. *The Fusarium Laboratory Manual*. Australia: Blackwell Publishing, 2006. 388 p. ISBN 978-0-8138-1919-8.
- Magan, N., Aldred, D. 2006. Managing microbial spoilage in cereal and baking products. In *Blackburn, C. W. 2006. Food Spoilage Microorganisms*. Cambridge: Woodhead Publishing Limited, 712 p. ISBN 978-1-85573-966-6. doi:10.1201/9781439824573.ch8
- Mašková, Z., Tančinová, D., Barboráková, Z., Mokřý, M. 2011. Frequent species of field fungi on wheat and their potential production of toxic metabolites. In *Potravinárstvo*, vol. 5, no. 1, pp. 43–50. ISSN 1337-0960. Dostupné na: doi:10.5219/108
- Medina, A., Akbar, A., Baazeem, A., Rodriguez, A., Magan, M. 2017. Climate change, food security and mycotoxins: Do we know enough? In *Fungal Biology Reviews*, vol. 31, pp. 143–154.
- Moss, M. 1991. Mycology of cereal grain and cereal products. In *Chelkowski, J. editor. Cereal grain. Mycotoxins, fungi and quality in drying and storage*. Amsterdam: Elsevier, 1991.
- Mostrom, M. 2016. Mycotoxins: Classification. In *Encyclopaedia of Food and Health*. B. m.: Elsevier, pp. 29–34. ISBN 9780123849533. Dostupné na: doi:10.1016/B978-0-12-384947-2.00478-5
- Munkvold, G. P. 2017. *Fusarium Species and Their Associated Mycotoxins*. In *Moretti, A., Susca, A., ed. Mycotoxigenic Fungi: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*. New York, NY: Springer New York, Methods in Molecular Biology, pp. 60–105. ISBN 978-1-4939-6707-0. Dostupné na: doi:10.1007/978-1-4939-6707-0
- Neme, K., Mohammed, A. 2017. Mycotoxin occurrence in grains and the role of postharvest management as a mitigation strategies. A review. In *Food Control*, vol. 78, pp. 412–425. ISSN 09567135. Dostupné na: doi:10.1016/j.foodcont.2017.03.012
- Nirenberg, H. I. 1976. Untersuchngen über die morphologische und biologische Differenzierung in der *Fusarium*-sektion *Liseola*. In *Mitteilung aus der Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft*, vol. 169, pp. 1–117.
- Nelson, P. E., Toussoun, T. A., Marasas, W. F. O. 1983. *Fusarium species. An Illustrated Manual for Identification*. USA: The Pennsylvania State University, 193 p. ISBN 0-271-00349-9.
- Nwakanma, Ch., Unachukwu, M. 2017. Molds. In *Bevilacqua, A., Corbo, M. R., Sinigaglia, M. 2017. The Microbiological Quality of Food. Foodborne Spoilers*. Cambridge: Woodhead Publishing. 310 p. ISBN 978-0-08-100502-6.
- Pitt, J. I., Hocking, A. D. 1999. *Fungi and food spoilage*. 2. vyd. Maryland: Aspen publication. ISBN ISBN 0-8342-1306-0.
- Pitt, J. I., Hocking, A. D. 2009. *Fungi and Food spoilage*. 3. vyd. New York: Springer, 2009. 519 p. e-ISBN 978-0-378-92207-2.
- Pleadin, J., Frece, J., Markov, K. 2019. Mycotoxins in food and feed. In *Advances in Food and Nutrition Research*. 1. vyd. B.m. : Elsevier Inc., pp. 297–345. ISBN 9780128171714. Dostupné na: doi:10.1016/bs.afnr.2019.02.007
- Sainz, M. J., Alfonso, A., Botana, L. M. 2015. 8 Considerations about international mycotoxin legislation, food security, and climate change. In *Botana, L. M., Sainz, M. J. 2015. Climate Change and Mycotoxins*. Berlin : De Gruyter. 185 p. ISBN 978-3-11-033305-3. doi:10.1515/9783110333619-010
- Samson, R. A., Hoekstra, E. S., Frisvad, J. C., Filtenborg, O. 2002a. *Introduction to Food - and Airborne Fungi*. 6. vyd. Utrecht: Centraalbureau voor Schimmelcultures. 282 p. ISBN ISBN 90-70351-42-0.
- Samson, R. A., Hoekstra, E. S., Lund, F., Filtenborg, O., Frisvad, J. C. 2002b. Methods for the detection, isolation and characterization of food-borne fungi. In *Introduction to Food- and Airborne Fungi (Eds.: R. A. Samson, E. S. Hoekstra, J. C. Frisvad and O. Filtenborg)*. 6. vyd. Utrecht: Centraalbureau voor Schimmecultures, pp. 283–297. ISBN 90-70351-42-0.
- Scott, P. M. 1996. Mycotoxins Transmitted into Beer from Contaminated Grains During Brewing. In *Journal of AOAC INTERNATIONAL*, vol. 79, no. 4, pp. 875–882. doi:10.1093/JAOAC/79.4.875
- Svoboda, Z., Mikulíková, R., Benešová, K., Běláková, S. 2019. The occurrence of the selected *Fusarium* mycotoxins in Czech malting barley, harvested in 2012–2017. In *Czech Journal of Food Sciences*, vol. 37, no. 6, pp. 439–445. doi:10.17221/317/2018-cjfs.
- Tančinová, D., Mašková, Z., Felšociová, S., Dovičičová, M., Barboráková, Z. 2012. *Úvod do potravinárskej mykológie. Kľúč na identifikáciu potravinársky významných vláknitých mikroskopických húb*. Nitra: Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre, 286 p., ISBN 978-80-552-0753-7.
- Thrane, U. 2014. *Fusarium*. In *Encyclopaedia of Food Microbiology*. B. m.: Elsevier, pp. 76–81. ISBN 9780123847331. Dostupné na: doi:10.1016/B978-0-12-384730-0.00141-5
- Weidenbörner, M. 2001. *Encyclopaedia of Food Mycotoxins*. Springer: London, 294 p. ISBN 3540675566.
- Williams, A. P., Williams, Neaves. 2006. Other types of spoilage moulds. In *Blackburn, C. W. 2006. Food Spoilage Microorganisms*. Cambridge: Woodhead Publishing Limited, 712 p. ISBN 978-1-85573-966-6.

Yang, W., Li, D., Mariga, A. M. 2017. Spoilage Microorganisms in Cereal Products. In Wang, Y., Zhang, W., Fu, L. 2017. *Food Spoilage Microorganisms. Ecology and Control*. Boca Raton: CRC Press. 191 p. ISBN-13: 978-1-4987-4458-4.

PodĎakovanie: Štúdiá prebiehala s finančnou podporou projektov VEGA No. 1/0517/21 a GA SPU 40/2019. 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.

Kontaktná adresa: Zuzana Mašková Ing. PhD., Katedra mikrobiológie, Fakulta biotechnológie a potravinárstva, Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra

ANTIMIKROBIÁLNA REZISTENCIA BAKTÉRIÍ *STAPHYLOCOCCUS CHROMOGENES* IZOLOVANÝCH ZO SYROV

ANTIMICROBIAL RESISTANCE OF BACTERIA *STAPHYLOCOCCUS CHROMOGENES* ISOLATED FROM SHEEP AND GOAT CHEESES

Ivana Regecová, Jana Výrostková, František Zigo, Monika Pipová, Pavlina Jevinová, Soňa Demjanová

Abstract: *S. chromogenes* commonly causes intramammary infections. However, its occurrence and antimicrobial resistance in dairy products made from unpasteurized sheep's and goat's milk have been little studied. Therefore, the aim of this study was to determine the prevalence of this species in samples of sheep and goat cheeses. Isolates were identified by polymerase chain reaction and matrix assisted laser desorption / ionization-time-of-flight mass spectrometry. A total of 130 staphylococcal isolates were identified. Of these, 12% were subsequently identified as *S. chromogenes*. Antimicrobial resistance of the identified isolates was determined using the agar dilution method against penicillin, ceftaroline, teicoplanin, gentamicin, erythromycin, tetracycline and ofloxacin. The highest resistance was detected mainly to penicillin (100%) and tetracycline (75%). The highest sensitivity was confirmed for gentamicin (63%). Intermediate sensitivity to teicoplanin (63%), ceftaroline (25%), gentamicin (25%), erythromycin (25%) and ofloxacin (13%) was also confirmed. Our study shows that the tested strains (75%) were resistant to more than one antibiotic at a time. Resistance to two antibiotics simultaneously was most often detected (38%). Multi-resistance to three (25%) and to four antibiotics simultaneously (13%) was also confirmed.

Keywords: antimicrobial resistance, cheese, MALDI-TOF, PCR, *Staphylococcus chromogenes*

ÚVOD

Jednou z najstarších fermentovaných potravín je syr (Franke et al., 2019). Syry sa veľmi líšia textúrami, arómami, vizuálnymi úpravami a príchutami, ktoré sa pripisujú aktivite mikroorganizmov prítomných v procese výroby syra (Montel et al., 2014). Okrem prospešnej mikrobioty sú v syroch prítomné aj nežiaduce mikroorganizmy. Medzi ne zaradujeme aj baktérie rodu *Staphylococcus* sp., ktoré sú hlavným pôvodcom mastitíd s vyššou prevalenciou v prípadoch klinických a subklinických prejavov. V poslednom období je, okrem *S. aureus*, pri mastitídach často detegovaný aj druh *S. chromogenes* (Bergonier et al., 2003; Fagundes et al., 2010; Contreras et al., 2007; Vanderhaeghen et al., 2015). Prítomnosť antimikrobiálnej rezistencie sa nedávno potvrdila práve u tohto druhu, čo predstavuje narastajúci problém, takže zhromažďovanie informácií o jeho rezistencii je z epidemiologického hľadiska veľmi dôležité. Obzvlášť vážne riziko je spojené s multirezistentnými kmeňmi a ich rezistenciou na viac ako jedno antibiotikum (Regecová et al., 2014). Keďže stupeň rezistencie na rôzne antibiotiká sa pri druhu *S. chromogenes* a ďalších druhoch stafylokokov líši, je dôležitá práve ich presná identifikácia. Tradičné metódy používané na identifikáciu a klasifikáciu baktérií, sú v súčasnosti doplnené sekvenciou analýzy malých podjednotiek rRNA metódami PCR (Bencúrová et al., 2013). Je však potrebné skrátiť čas analýzy pri druhovej identifikácii stafylokokov bez akejkoľvek predchádzajúcej znalosti genetických cieľov. Jednou z takýchto metód je MALDI-TOF MS (matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry). Mnoho štúdií uvádza rýchly, nákladovo efektívny a presný výkon systémov MALDI-TOF MS (Croxatto et al., 2012; Clark et al., 2013).

Na základe vyššie uvedeného je cieľom našej štúdie zistiť prítomnosť *Staphylococcus chromogenes* pomocou PCR a MALDI – TOF MS v ovčích a kozích syroch vyrobených na farmách na Slovensku a následne detegovať antimikrobiálnu rezistenciu u tohto druhu.

MATERIÁL A METODIKA

Stafylokoky sa izolovali zo vzoriek syra (10 vzoriek ovčieho syra a 10 vzoriek kozieho syra) odobratých v období od mája do septembra 2020. Syry sa vyrábali z nepasterizovaného mlieka bez pridania štartovacej kultúry a zreli 30 dní. Z testovaných vzoriek bola podľa ISO 6887-5: 2010 pripravená základná suspenzia a desaťnásobné riedenia. Izoláty stafylokokokov boli následne izolované zo skúmaných vzoriek podľa ISO 6888-1: 1999. Po izolácii sa jednotlivé kmene identifikovali pomocou PCR a MALDI-TOF MS.

Celková genómová DNA bola izolovaná podľa Hein et al., (2005). Získaný supernatant sa použil ako zdroj DNA v PCR reakciách podľa Strommenger et al., (2003). Identifikácia izolátov druhu *S. chromogenes* sa uskutočnila pomocou MALDI-TOF MS podľa štandardného protokolu Bruker Daltonics (2008).

Identifikované izoláty *S. chromogenes* sa podrobili testovaniu na citlivosť voči antibiotikám agarovou dilučnou metódou (ADM) podľa postupu opísaného v dokumente CLSI M100-S30: 2020. Na stanovenie minimálnych inhibičných koncentrácií (MIC) sa použili testovacie platne s konečnou koncentráciou antibiotík: Penicilín (PEN) 0,12; 0,25; 0,5 mg.l⁻¹; Ceftarolín (KF) 0,5; 1,0; 2,0; 4,0; 8,0 mg.l⁻¹; Teikoplanín (TEC) 4,0; 8,0; 16,0; 32,0; 64,0 mg.l⁻¹; Gentamicín (GN) 2,0; 4,0; 8,0; 16,0; 32,0; 64,0 mg.l⁻¹; Erytromycín (E) 0,25; 0,5; 1,0; 2,0; 4,0; 8,0; 16,0 mg.l⁻¹; Tetracyklín (TE) 2,0; 4,0; 8,0; 16,0; 32,0 mg.l⁻¹; Ofloxacín (OFX) 0,5; 1,0; 2,0; 4,0; 8,0 mg.l⁻¹.

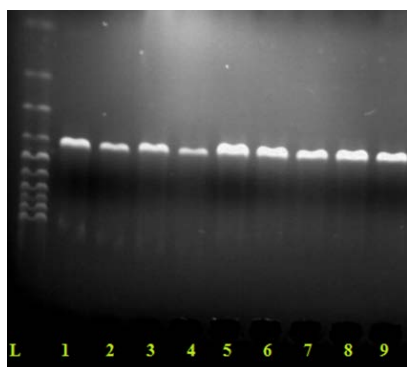
Referenčný kmeň *S. aureus* CCM 4223 (Česká zbierka mikroorganizmov, Brno, Česká republika) bol v tejto štúdii použitý ako pozitívna kontrola pre rodovú identifikáciu pomocou PCR a pre ADM.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Mikrobiologickým kultivačným vyšetrením jednotlivých vzoriek syrov a následnou identifikáciou izolátov metódou PCR sme detegovali 130 izolátov *Staphylococcus* spp. (Obr. 1). Prítomnosť stafylokokokov vo vzorkách syrov potvrdil aj Alves et al., (2018). Z celkového počtu 64 hodnotených vzoriek, identifikovali v 33 vzorkách prítomnosť stafylokokokov pomocou fenotypových testov a detegovaním prítomnosti špecifickej sekvencie pre rod *Staphylococcus*, 16S rRNA.

V našej štúdii sme následne uskutočnili identifikáciu druhu *S. chromogenes* (16 izolátov) metódou MALDI-TOF MS. Tento druh predstavoval 12 % zo všetkých izolovaných stafylokokokových kmeňov. Prítomnosť izolátov *S. chromogenes* (0,5 % zo 431 izolátov) v syroch z oviec a kôz potvrdili aj Coton et al., (2010).

Pretože výrobky z kozieho a ovčieho mlieka sú dobrým substrátom pre rast rezistentných stafylokokokov, skúmali sme tiež identifikované izoláty z hľadiska ich odolnosti voči vybraným antibiotikám. Konkrétne, pri nami identifikovaných izolátoch *S. chromogenes*, sa detegovala veľmi častá rezistencia na penicilín (100 %; 16 izolátov), erytromycín (63 %; 10 izolátov) a tetracyklín (75 %; 12 izolátov). Vysoká citlivosť 63 % bola pri tomto druhu zaznamenaná najmä na gentamicín.



Obrázok 1 Identifikácia izolátov *Staphylococcus* spp. pomocou PCR metódy (420 bp)
L – 100 bp ladder; **Dráha 1** – referenčné kmene CCM 4223 *S. aureus*;
Dráhy 2,3,4,5,6,7,8,9– izoláty *Staphylococcus* spp.

Rezistenciu voči β -laktamovým antibiotikám pri stafylokokových izolátoch povrdil aj Sampimon (2009), ktorý zistil, že rezistencia na penicilín bola pri *S. chromogenes* 18 %. Podobné podiely rezistencie voči β -laktamovým antibiotikám pri *S. chromogenes* (18 %) bola tiež hlásená v americkej štúdii (Sawant et al., 2009). Persson-Waller et al., (2011) vo svojej štúdii tiež vykonávali detekciu rezistencie pri druhu *S. chromogenes* (33 %) voči β -laktamovým antibiotikám. Rezistenciu voči erythromycínu detekovali pri *S. chromogenes* aj Lüthje et al., (2006). Zároveň pri týchto izolátoch potvrdili aj rezistenciu voči tetracyklínu.

Tabuľka 1 Počet citlivých (C), intermediárne citlivých (I) a rezistentných (R) izolátov *Staphylococcus chromogenes*

		Antibiotiká							
			PEN	KF	TEC	GN	E	TE	OFX
<i>S. chromogenes</i>	(n = 16)	C	0	8	6	10	2	4	10
		I	0	4	10	4	4	0	2
		R	16	4	0	2	10	12	4

n-počet izolátov, PEN-penicilín, KF-Ceftarolín, TEC-Teikoplanín, GN-Gentamicín, E-Erytromycín, TE-Tetracyklín, OFX-Ofloxacin

Pri vyšetrovaní izolátov *S. chromogenes*, sa potvrdila aj multirezistencia a to v 75 % zo všetkých testovaných izolátov. Z toho najčastejšie bola detegovaná rezistencia voči dvom antibiotikám súčasne a to pri 2 izolátoch voči PEN-TET a pri 4 izolátoch voči PEN-E. Potvrdená bola aj multirezistencia voči trom antibiotikám súčasne a to pri 4 kmeňoch voči PEN-E-TE. Detekovaná bola aj multirezistencia pri 2 kmeňoch voči štyrom antibiotikám súčasne (PEN-TE-KF-OFX). Nunes et al., (2015), z 19 kmeňov u 14 koaguláza-negatívnych stafylokokov (vrátane *S. chromogenes*) preukázali multirezistenciu. Boli rezistentné na β -laktámy a na vankomycín, čo zodpovedá 73 % celkových identifikovaných izolátov, zatiaľ čo 9 izolátov (64 %) vykazovalo rezistenciu na tetracyklín a gentamicín, 8 izolátov (57 %) bolo rezistentných na neomycín, erytromycín a chloramfenikol. Multirezistencia izolátov *S. chromogenes*, detegovaná v našej štúdii, je v súlade s predchádzajúcimi štúdiami, ktoré uvádzali prítomnosť rezistentných a multirezistentných stafylokokových kmeňov v surovom mlieku a mliečnych výrobkoch (Thomas et al., 2006).

Naše výsledky podporuje štúdia autorov Seng et al., (2016), ktorí uvádzali až 80 % rezistenciu na niekoľko druhov antibiotík pri izolátoch stafylokokov. V štúdii Hleba et al., (2015) je tiež uvedená prítomnosť multirezistentných baktérií v mlieku a mliečnych výrobkoch.

ZÁVER

Naša štúdia potvrdila prítomnosť rezistentných, multirezistentných kmeňov *S. chromogenes* v ovčích a kozích syroch vyrobených z nepasterizovaného mlieka na Slovensku. Výsledky práce poukazujú na čoraz častejší výskyt rezistentných koaguláza-negatívnych stafylokokov v kozích a ovčích mliečnych výrobkoch, čo poukazuje na ich stále väčší význam v hygiene potravín. Preto je potrebné podrobne skúmať mechanizmy vývoja a transferu determinantov rezistencie, racionálne užívanie antibiotík, vývoj nových účinnejších antibiotík a tiež pravidelné plošné monitorovanie už existujúcej rezistencie na antibiotiká.

LITERATÚRA

- Alves, V. F., Niño-Arias, F. C., Pitondo-Silva, A., Araújo Frazílio, D., Oliveira Gonçalves, L., Toubas, L. C., De Martinis, E. C. P. 2018. Molecular characterisation of *Staphylococcus aureus* from some artisanal Brazilian dairies. In *International Dairy Journal*, vol. 85, p. 247-253. [cit. 2021-01-15]. ISSN: 0958-6946. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2018.06.008>
- Bencúrová, E., Bhide, M., Dolinská, S., Hreško, S., Mlynárčik, P., Mucha, R., Pulzová, L. 2013. *Nové trendy vo využívaní bioinformatických analýz v genomike a proteomike*. KOŠICE: Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, 172 p. ISBN 978-80-8077-321-2.
- Bergonier, D., Crémoux, R., Rupp, R., Lagriffoul, G., Erthelot, X. 2003. Mastitis of dairy small ruminants. In *Veterinary Research*, vol. 34, no. 5, p. 689-716. [cit. 2021-01-14]. ISSN: 0928-4249. <https://doi.org/10.1051/vetres:2003030>
- Bruker Daltonics, MALDI Biotyper 2.0. 2008. *Software for microorganism identification and classification user manual*. USA: Bruker Scientific LLC.
- Clark, A. E., Kaleta, E. J., Arora, A., Wolk, D. M. 2013. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry: a fundamental shift in the routine practice of clinical microbiology. In *Clinical Microbiology Reviews*, vol. 26, no. 3, p. 547-603. [cit. 2021-01-22]. ISSN: 1098-6618. <http://doi.org/10.1128/cmr.00072-12>
- CLSI document M100 – S30: 2020. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Thirtieth informational supplement. Wayne, PA, USA: Clinical and Laboratory Standards Institute.
- Contreras, A., Sierra, D., Sánchez, A., Corrales, J.C., Marco, J. C., Paape, M. J., Gonzalo, C. 2007. Mastitis in small ruminants. *Small Ruminant Research*, vol. 68, no. 1-2, p.145-153. [cit. 2021-01-14]. ISSN: 0921-4488. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2006.09.011>
- Coton, E., Desmonts, M. H., Leroy, S., Coton, M., Jamet, E., Christeans, S., Donnio, P. Y., Lebert, I., Talon, R. 2010. Biodiversity of coagulase-negative staphylococci in French cheeses, dry fermented sausages, processing environments and clinical samples. In *International Journal of Food Microbiology*, vol. 137, no. 2–3, p. 221-229. [cit. 2021-01-22]. ISSN: 0168-1605. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.11.023>
- Croxatto, A., Prod'hom, G., Greub, G. 2012. Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. In *FEMS Microbiology Reviews*, vol. 36, no. 2, p. 380-407. [cit. 2021-01-24]. ISSN: 1574-6976. <http://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00298.x>
- Fagundes, H., Barches, L., Filho N. A., Menezes Ferreira, M. L., Fernandes Oliveira C. A. 2010. Occurrence of *Staphylococcus aureus* in raw milk produced in dairy farms in Sao Paulo Stat, Brazil. In *Brazilian Journal of Microbiology*, vol. 41, no. 2, p. 376-380. [cit. 2021-01-10]. ISSN: 1517-8382. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822010000200018>
- Franke, G., Cwiková, O. 2019. Biogenic amines in smear ripened cheeses. In *Potravinárstvo Slovak Journal of Food Sciences*, vol. 13, no. 1, p. 378-384. [cit. 2021-01-18]. ISSN: 1337-0960. <https://doi.org/10.5219/1105>
- Hein, I., Jorgensen, H. J., Loncarevic, S., Wagner, M. 2005. Quantification of *Staphylococcus aureus* in unpasteurised bovine and caprine milk by real-time PCR. In *Research in Microbiology*, vol. 156, no. 4, p. 554-563. [cit. 2021-01-14]. ISSN: 0923-2508. <http://doi.org/10.1016/j.resmic.2005.01.003>
- Hleba, L., Petrová, J., Kántor, A., Cubon, J., Kačániová, M. 2015. Antibiotic resistance in *Enterobacteriaceae* strains isolated from chicken and milk samples. In *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, vol. 4, special no. 1, p. 19-22. [cit. 2021-01-14]. ISSN: 1338-5178. <http://doi.org/10.15414/jmbfs.2015.4.special1.19-22>
- 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. Bratislava: Slovak Standards Institute.
- 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. Bratislava: Slovak Standards Institute.
- Lüthje, P., Schwartz, S. 2006. Antimicrobial resistance of coagulase-negative staphylococci from bovine subclinical mastitis with particular reference to macrolide–lincosamide resistance phenotypes and genotypes. In

- The Journal of antimicrobial chemotherapy*, vol. 57, no. 5, p. 966-969. [cit. 2021-01-24]. ISSN: 1460-2091. <https://doi.org/10.1093/jac/dkl061>
- Montel, M. C., Buchin, S., Mallet, A., Delbes-Paus, C., Vuitton, D. A., Desmases, N., Berthier, F. 2014. Traditional cheeses: rich and diverse microbiota with associated benefits. In *International Journal of Food Microbiology*, vol. 177, p. 136-154. [cit. 2021-01-24]. ISSN: 0168-1605. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.02.019>
- Nunes, R. S. C., Del Aguila, E. M., Paschoalin, V. M. F. 2015. Safety evaluation of the coagulase-negative staphylococci microbiota of salami: Superantigenic Toxin Production and antimicrobial resistance. In *BioMed Research International*, vol. 2015, p.1-17. [cit. 2021-01-29]. ISSN: 2314-6133. <https://doi.org/10.1155/2015/483548>
- Persson-Waller, K., Aspán, A., Nyman, A., Persson, Y., Grönlund Andersson U. 2011. CNS species and antimicrobial resistance in clinical and subclinical bovine mastitis. In *Veterinary Microbiology*, vol. 152, no 1–2, p. 112-116. [cit. 2021-01-30]. ISSN: 0378-1135. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2011.04.006>
- Regecová, I., Pipová, M., Jevinová, P., Kmet', V., Výrostková, J., Sopková, D. 2014. Antimicrobial resistance of coagulase-negative species of staphylococci isolated from the meat of wild pheasants (*Phasianus Colchicus*). In *Italian Journal of Animal Science*, vol. 13, no. 3, p. 3476. [cit. 2021-01-14]. ISSN: 1828-051X. <https://doi.org/10.4081/ijas.2014.3476>
- Sampimon, O.C. 2009. *Coagulase-negative staphylococci mastitis in Dutch dairy herds*. Thesis. Deventer, The Netherlands: Dutch Animal Health Service (GD).
- Sawant, A. A., Gillespie, B. E., Oliver, S. P. 2009. Antimicrobial susceptibility of coagulase-negative *Staphylococcus* species isolated from bovine milk. In *Veterinary Microbiology*, vol. 134, no. 1-2, p. 73-81. [cit. 2021-01-24]. ISSN: 0378-1135. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2008.09.006>
- Seng, P., Boushab, B. M., Romain, F., Gouriet, F., Bruder, N., Martin, C., Papazian, L. 2016. Emerging role of *Raoultella ornithinolytica* in human infections: a series of cases and review of the literature. In *International Journal of Infectious Diseases*, vol. 45, p. 65-71. [cit. 2021-02-1]. ISSN: 1201-9712. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2016.02.014>
- Strommenger, B., Kettlitz, C., Werner, G., Witte, W. 2003. Multiplex PCR assay for simultaneous detection of nine clinically relevant antibiotic resistance genes in *Staphylococcus aureus*. In *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 41, no. 9, p. 4089-4094. [cit. 2021-02-16]. ISSN: 1098-660X. <https://doi.org/10.1128/JCM.41.9.4089-4094.2003>
- Thomas, D. Y., Jarraud, S., Lemerrier B., Cozon, G., Echasserieau, K., Etienne, J., Gougeon, M. L., Lina, G., Vandenesch, F. 2006. Staphylococcal enterotoxin-like toxins U2 and V, two new staphylococcal superantigens arising from recombination within the enterotoxin gene cluster. In *Infection and Immunity*, vol. 74, no. 8, pp. 4724–4734. [cit. 2021-01-18]. ISSN: 1098-5522. <https://doi.org/10.1128/IAI.00132-06>
- Vanderhaeghen, W., Piepers, S., Leroy F., Van Coillie, E., Haesebrouck F., De Vlieghe S. 2015. Identification, typing, ecology and epidemiology of coagulase negative staphylococci associated with ruminants. In *The Veterinary Journal*, vol. 203, no. 1, p. 44-51. [cit. 2021-01-14]. ISSN: 1090-0233. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2014.11.001>

Pod'akovanie: Táto práca bola podporená grantom APVV no. SK-PL18-0088, KEGA no. 006UVLF-4-2020, VEGA no. 1-0529-19.

Kontaktná adresa: Ivana Regecová, Jana Výrostková, František Zigo, Monika Pipová, Pavlina Jevinová, Soňa Demjanová, Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, Komenského 73, 041 81 Košice

THE IMPORTANCE OF MONITORING THE QUALITY OF DRINKING WATER TO FARMS FOR PRIMARY MILK PRODUCTION

Nad'a Sasáková, Tatiana Hrušková, Zuzana Bujdošová, Mária Vargová, Katarína Veszelits Laktičová, Ján Kachnič, František Zigo

Abstract: The monitoring of drinking water on farm with individual supply from the wells was focused on examination of the selected microbiological and physicochemical parameters. In samples were determined colony forming units (CFU) of *E. coli*, coliform bacteria, enterococci and bacteria cultivated at 22 °C and 37 °C. Microbiological results of samples collected from the well were generally satisfactory. Physico-chemical examination of all monitored water sources was focused on determination the values of pH, electrical conductivity, dissolved oxygen, ammonium ions, nitrites, nitrates and chlorides and of chemical oxygen demand (COD_{Mn}) and Ca²⁺ + Mg²⁺. The results showed that water quality corresponded with set limits. On other side, due to unfavourable bacteriological results obtained, disinfection of water was performed using Chloramine T. Only disinfected water could be used for watering of animals (complying with the national limit for residual active chlorine of 0.3 mg/l and for other related processes. The weather (precipitation) evidently affected the quality of water on all three farms and was associated with some risk to animals consuming this water.

Keywords: water, quality, bacteria, disinfection, safety

INTRODUCTION

Drinking water safety is judged on the basis of national standards or international guidelines. The most important of these are the WHO Guidelines for Drinking-Water Quality. On the basis of the Regulation of the Government of the SR No. 368/2007 Coll., which amends and supplements the Regulation of the Government of the SR No. 322/2003 Coll. on protection of farm animals, all sources of water used for watering of animals must comply with requirements for water intended for human consumption. Requirements for the quality of water used for human consumption are set out in the Regulation of the Government of the SR No. 247/2017 Coll., amending No. 354/2006 Coll., which specifies methods for the control of the quality of water used for human consumption and meets the criteria set by European Union regulations and WHO recommendations.

According to the data published on the Ministry of Interior of the Slovak Republic website, in 2018 approximately 88.3% of Slovak population was connected to public water supply. On farm not connected to public water supply, they use their own wells, often with uncontrolled or unknown quality, which may not comply with the requirements of the Slovak Republic Government Decree No. 247/2017 Coll., which amends and supplements the requirements for water intended for human consumption and for inspection of water intended for human consumption. This water is frequently objectionable, especially in terms of microbiological indicators which indicate general or faecal pollution, exceeds the physico-chemical limits (nitrates, nitrites, ammonium ions, iron, manganese, suspended substances) or limits for heavy metals.

More complex determination of the quality of water sources involves at least 28 parameters, that consist on minimum drinking water analysis including microbiological and biological, physical and chemical parameters of quality, as specified in paragraphs a) and b) of the Annex to the Governmental Decree No. 354/2006 Coll. of the Act No. 247/2017.

Water from the individual source is used for personal consumption, as well as for cooking and drinking, for personal hygiene, watering crops grown, watering livestock. Any pollution of the source used for such purposes can have a negative impact on the quality of health of bred animals, food production, growing plants, and thus on the whole food chain.

Water containing xenobiotics, due to their cumulative nature, can also have a negative effect on the health of consumers.

There are a number of possible sources of manmade contaminants, some of which are more important for health and food production than others. These fall into the categories of point and diffuse sources. Point sources are discharges from industrial premises and sewage treatment works and as such are more readily identifiable and controlled; run-offs from agricultural land and from hard surfaces, such as roads, are not so obvious, or easily controlled.

Many infectious diseases of animals and humans are transmitted by water contaminated with human and animal excrement (waterborne diseases). Polluted drinking water may be important source of pathogenic bacteria, viruses and parasites (protozoa, parasite eggs) capable of surviving for different periods, and raise the health risk for many people throughout the world. In order to eliminate the risk related to disease transfer, drinking water intended for mass consumption is treated and disinfected before use.

Water from individual source have to be monitored for microbiological and physico-chemical parameters, which indicate all potential organic pollution originating from animal excrement, natural and artificial fertilisers, storage of waste, and others (Sasakova, et al., 2013).

According to the **WHO (2011)** *Escherichia coli* are the only true indicator of faecal contamination; they are exclusively of intestinal origin and are found in faeces. Their presence indicates mostly fresh faecal contamination and thus points to serious shortcomings in protection of the specific water source, treatment of water and its hygienic safety.

In our study we focused on the monitoring of the quality of drinking water from a well, an individual water source serving for the water supply for farm animal watering on three farms.

MATERIAL AND METODOLOGY

Samples of drinking water were collected from the wells on three farms located in hilly area in the part of the eastern Slovakia. Microbiological and physico-chemical analyses were performed to determine the quality of water on the investigated farms.

Farm No. 1 focuses on the rearing and fattening of cattle (230 Slovak-spotted cattle), including calf section and milk-producing dairy cows. Drinking water is supplied from five water wells on this farm in close proximity, each with a capacity of about 8000 Litres per day. The depth of wells ranges between 6 m to 11 m. Water from these wells is pumped to a common tank from which it is supplied to animals and used for other related operations.

Farm No. 2 is involved in the breeding of sheep and Tsigai and Slovak-spotted breed cattle. It uses two water storage reservoirs for water, one is old (OR) that supplied by a well 8 m deep and one new (NR) supplied by two new wells of depths of 21 m and 23 m, each with a capacity of about 150 000 Litres per day.

On Farm No. 3 are 100 dairy cows together with other categories of young cattle, in total coming to 700 animals. The water originates from a well located on this farm, about 20 m deep, with a capacity of about 90 000 Litres per day. Samples of water were taken from a tap.

Microbiological examination was carried out according to the Regulation of the government of the SR 247/2017 Coll. It included determination of colony forming units (CFU) of bacteria cultivated at 22°C and 37°C, according to STN EN ISO 6222, coliform bacteria (CB), and *E. coli* according to STN EN ISO 9308-1, and enterococci (EC) according to STN EN ISO 7899-2.

A pour-plate method was used for determination of the number of BC22 and BC37 bacterial colonies growing in nutrient agar medium after aerobic incubation. The number of colony forming units (CFU) per ml of sample were counted after incubation at 22 °C and

37 °C, respectively. The limit value for BC22 in Slovakia is 200 CFU/ml and for BC37 the limit is 20 CFU/ml (STN EN ISO 6222).

Endo agar (HiMedia, India) was used as cultivating medium for coliform bacteria (CB) and *E. coli*. After incubation for 24 hours at 37 °C or 43 °C, respectively, the characteristic colonies were counted. When no colonies were present, the incubation was prolonged for another 24 hours (Grant, 1997). The lactose test was used for confirmation of coliform bacteria. According to the WHO (2008) *E. coli* or thermotolerant coliform bacteria must not be detected in any 100-ml sample. Also, total coliform bacteria must not be detectable in any 100-ml sample (WHO 1996).

Physico-chemical examination was focused on sensorial evaluation of water (colour, odour, turbidity) that was carried out on site and verified in a laboratory after water transfer. Temperature of water, measured at sampling, ranged between 4 and 12 °C.

Physical examination of water quality was performed in our laboratory and included analyses of pH, electrical conductivity, and saturation with dissolved oxygen. Chemical qualitative analysis involved detection of ammonium ions, nitrites, nitrates and chlorides using colour reactions. If the presence of the tested substance was confirmed, the respective parameter was determined quantitatively. Determination of chemical oxygen demand (COD_{Mn}) and the sum of calcium and magnesium were performed.

The pH was determined according to STN ISO 10523 [39] (pH-meter HACH, WATERPROF pH Tester 30). Conductivity was measured using a conductometer WTW InoLab Cond 720.

Quantitative determination of nitrates was carried out directly in samples using an ion-selective nitrate electrode WTW (InoLab pH/ION 735P). Chlorides were determined according to STN ISO 9297 by titration. Determination of Ca²⁺ + Mg²⁺ were performed also by titration, according to Horáková et al. (2003). Dissolved oxygen was determined electrochemically using a HACH oxygen probe LDO HQ Series Portable Meters and chemical oxygen demand by oxidation with KMnO₄, according to STN EN ISO 8467.

Statistical analysis. The results are presented as a mean ± SD of three sampling sites from the farms: Farm No. 1: *n* = 7, Farm No. 2 and 3: *n* = 5. Statistical analysis was carried out by one-way analysis of variance (ANOVA) using *post hoc* Tukey multiple comparison test (the Prism 3 software program).

RESULTS AND DISCUSSION

The good quality of drinking water intended for human consumption and for the watering of animals is essential for their health, for safety food production, and for the prevention of food chain contamination (EC Regulations, 2007).

All groundwater sources (well) have to be treated before using. Treatment is the process of converting raw water from a sub-surface source into a potable form that is suitable for drinking and other domestic and production uses. The method of treatment will depend on the pollution or contaminants involved (Ojo, et al., 2012). The raw water is treated by using filtration, coagulation, sedimentation, floatation and other processes and continue with disinfection. The disinfection of water serves as the final measure against the spread of disease and should be carried out when necessary. Disinfection with active chlorine remains the most frequently used method. Although the harmful by-products associated with some disinfection methods have stimulated scientists to look for new methods, or to combine several technologies in order to resolve this problem (Badawy, et al. 2012).

The results of the physico-chemical monthly examinations of water (mean ± SEM) on Farms No. 1, 2 and 3 are presented in Table 1. All examined parameters corresponded to the standard on all investigated farms and obtained higher levels did not indicate significant pollution with faeces.

Some physico-chemical parameters serve as indicators of faecal or environmental contamination of water sources, mainly chemical oxygene demand showing the concentration of organic substances presented in water source.

One of the most important parameters for the monitoring of the pollution of ground waters is ammonium nitrogen (N-NH_4^+), which represents an intermediate or final product of the microbiological decomposition of organic matter. The assessment of groundwater quality and its variation in an agricultural area conducted by Bonton et al. (2010) indicated high spatial and temporal variations in nitrate concentrations ranging from 6 to 125 mg NO_3^-/l .

Table 1 Physico-chemical analyses of drinking water on farms

Parameters	Farm No. 1 (n = 7)	Farm No. 2 (n = 5)	Farm No. 3 (n = 5)
pH	7.1 ± 0.2^a	7.2 ± 0.4^a	7.2 ± 0.5^a
O ₂ saturation (%)	67 ± 15^a	87 ± 6^b	89 ± 14^b
Conductivity (mS/m)	98 ± 2^a	110 ± 10^a	51 ± 15^b
Cl ⁻ (mg/l)	18 ± 6^a	62 ± 4^b	18 ± 6^a
NO ₃ ⁻ (mg/l)	15 ± 7^a	73 ± 11^b	34 ± 14^c
COD _{Mn} (mg/l)	1.1 ± 0.2^a	1.8 ± 1.1^a	0.5 ± 0.3^{ab}
Ca ²⁺ + Mg ²⁺ (mmol/l)	5.3 ± 0.2^a	5.6 ± 0.3^a	2.7 ± 1.0^b

ANOVA post-hoc Tukey test. Results are expressed as mean $\pm$ standard deviation, significant differences ($P < 0.05$) are indicated by different alphabetic superscripts (a, b, c).

Very serious were the results of bacteriological examination. Because our evaluations concerned water that should comply with the limits for drinking water, we compared our results with the benchmark set by the relevant legislation (WHO 1996, 2008; EC Regulations 2007; Regulation of the Government of the SR No. 247/2017 Coll.).

The level of bacterial contamination differed according to wells and weather. Total coliform (TC) bacteria that serve as an indicator of potential faecal contamination were recovered from 100 ml of water from all wells over the examination period, occasionally in very high numbers exceeded limits. Moreover, *E.coli* considering a proof of faecal contamination, were also detected in all wells at least at one sampling. This was particularly serious finding because it is related to considerable risk of spreading of diseases through animal or human faeces. Chlorine-based compounds are the only major disinfectants harbouring lasting residual properties that ensure continual protection against microbial regrowth (Macler and Pontius, 1997).

The chlorination was conducted using a 0.1% solution of Chloramine T (sodium tosylchloramid; sodium salt of N-chloro-4-methylbenzene-1-sulfonamide), so that the water could be used for watering of animals (complying with the national limit for residual active chlorine of 0.3 mg/l) and for other related processes. The dosage recommended by the manufacturer is 10 g per 1000 litres of water (this presumes maximum pollution of water). A further criterion was that the microbiological quality of the water would prevent transmission of water-borne diseases (Michalus and Bratska 2000; Ashbolt 2004).

The control sampling and their analysis showed efficient effect of disinfection using Chloramine T. The results obtained after disinfection from all three sources complied with the limits for drinking water in all selected parameters.

Bacteriological finding provides picture of the immediate quality of water. It serves as the most sensitive indicator of faecal pollution. Macler and Merkle (2000) implied that all

persons who drink water from ground sources that were not subjected to hygiene control or were not subsequently disinfected run the risk of infection with pathogenic microorganisms.

Wells that serve as sources of drinking water for individual supply and mass supply should comply with the hygiene principles and regulations. In order to protect water in wells from bacteriological, chemical and hydrological point of view it is necessary to inspect the immediate surroundings of the wells for potential sources of pollution, such as septic tanks, sewage pipelines, storage of liquid fuels, animal houses and dung heaps, before starting to draw water from such wells.

A major groundwater pathogen occurrence study supported by the American Water Works Association (AWWA) Research Foundation and the U.S. Environmental Protection Agency (EPA), found that about 60 % of vulnerable wells and about half of wells initially considered not vulnerable were positive for one or more indicators of faecal contamination in tests for total coliform bacteria, *E. coli*, coliphage and human viruses.

CONCLUSION

Physico-chemical analyses of drinking water from three investigated farms showed that the water source provided water of better quality than from microbiological point of view. The doses of Chloramine T were used for disinfection of water on the investigated farms. Results of microbiological examination after chlorination was efficient and disinfected water was used for supplying. Obtained results also indicated that weather (precipitation) most likely affected the quality of water on all three farms and was associated with some risk to animals consuming this water, as indicated by the presence of total coliform bacteria in examined samples. Our results obtained did not indicate pollution of water with organic waste (animal or human). This complex issue always requires additional, more detailed investigations.

REFERENCES

- Ashbolt, J. N. 2004. Microbial contamination of drinking water and disease outcomes in developing regions. In *Toxicology* [online], vol. 198, pp 229–238. [cit. 2021-01-27]. ISSN: 0300-483X. Dostupné na: doi:10.1016/j.tox.2004.01.030
- Badawy, M. I., Gad-Allah, T. A., Ali, E. M. M., Yoon, Y. 2012: Minimization of the formation of disinfection by-products. In *Chemosphere* [online], vol. 89, pp 235–240. [cit. 2021-01-27]. ISSN: 0045-6535. Dostupné na doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.04.025
- Bonton, A., Rouleau, A., Bouchard, CH., Rodriguez, J. M. 2010. Assessment of groundwater quality and its variations in the capture zone of a pumping well in an agricultural area. In *Agricultural Water Management* [online], vol. 97, pp 824–834. [cit. 2021-01-27]. ISSN: 0378-3774. Dostupné na: doi.org/10.1016/j.agwat.2010.01.009.
- EC Regulations. 2007. European Communities (Drinking Water) Regulations, Statutory Instruments, No.106.
- EHFS – Environmental Health Fact Sheet. 2013. The Effect of pH on Disinfection in Aquatic Facilities. No. 473.
- Grant, M. 1997. A new membrane filtration medium for simultaneous detection and enumeration of *Escherichia coli* and total coliforms. In *Applied Environmental Microbiology* [online], vol. 63, pp 3526–3530. [cit. 2021-01-27]. ISSN: 1098-5336. Dostupné na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC168658/pdf/633526.pdf>
- Horáková, M. a kol. 2003. *Analytika vody* VŠCHT Praha (2. vydání). 335 s. ISBN 978-80-7080-520-6.
- Macler AB, Pontius WF (1997): Groundwater Disinfection: Chlorine's role in public health. In *Journal American Water Works Association*, [online], vol.4. [cit. 2021-01-25]. ISSN:1551-8833. Dostupné na doi.org/10.1002/j.1551-8833.1997.tb08156.x
- Macler, B.,A, Merkle, J.,C. 2000. Current knowledge on groundwater microbial pathogens and their control In *Hydrogeol. J.* [online], vol. 8 pp 29-40. [cit. 2021-01-25]. ISSN: 1435-0157. Dostupné na doi.org/10.1007/PL00010972.
- Michalus, M., Bratská, Z. 2000. Zdravotno-hygienické požiadavky na pitnú vodu z hľadiska súčasných predpisov v Slovenskej republike. In *Podzemná voda*. [online], roč. 6, č. 2, s. 59-66 [cit. 2021-01-25]. ISSN 1335-1052. Dostupné na http://www.sah-podzemnavoda.sk/cms/e107_plugins/content/content.php?content.439
- Ojo, I. O., Otieno, O. A. F., Ochieng, M. G. 2012. Groundwater: Characteristics, qualities, pollutions and treatments: An overview. In *International Journal of Water Resources and Environmental Engineering* [online], vol. 4, pp 162–170. [cit. 2021-01-25]. ISSN 1991-637X. Dostupné na <http://hdl.handle.net/10321/801>.

NARIADENIE VLÁDY SR č. 368/2007 Z. z., čiastka 162, s. 2670 [online]. [cit. 2020-12-01]. Dostupné na www.zbierka.sk.

NARIADENIE VLÁDY SR č. 269/2010. Z. z., čiastka 106, s. 2186-2288 [online]. [cit. 2020-12-01]. Dostupné na www.zbierka.sk.

NARIADENIE VLÁDY SR č. 496/2010 Z. z., ktorým sa mení a dopĺňa nariadenie vlády Slovenskej republiky č. 354/2006 Z. z., ktorým sa ustanovujú požiadavky na vodu určenú na ľudskú spotrebu a kontrolu kvality vody určenej na ľudskú spotrebu, čiastka 188, s. 4207-4225. [cit. 2020-12-01]. Dostupné na www.zbierka.sk.

Sasakova, N., Veselitz-Lakticova, K., Hromada, R., Chvojka, D., Koscco, J., Ondrasovic, M. 2013. Contamination of individual sources of drinking water located in environmentally polluted Central Spis Region (Slovakia). In *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences* [online], vol. 3, pp 262–265. [cit. 2021-01-25]. ISSN 1805-9392. Dostupné na doi org/10.17221/8818-VETMED.

STN EN ISO 5814: 2013. (75 7463) Kvalita vody. Stanovenie rozpusteného kyslíka. Elektrochemická metóda.

STN EN ISO 6222: 1999. Kvalita vody. Stanovenie kultivovateľných mikroorganizmov. Počítanie kolónií po očkovaní do kultivačného živného agarového média.

STN EN ISO 7393-3: 2001. Kvalita vody. Stanovenie voľného chlóru a celkového chlóru. Časť 3: Jodometrická titračná metóda na stanovenie celkového chlóru (ISO 7393-3:1990).

STN EN ISO 7899-2: 2003. Kvalita vody. Stanovenie črevných enterokokov. Časť 2: Metóda membránovej filtrácie.

STN EN ISO 8467: 2000. Kvalita vody. Stanovenie chemickej spotreby kyslíka manganistanom.

STN EN ISO 9308-1: 2000. Kvalita vody. Stanovenie *Escherichia coli* a koliformných baktérií. Časť 1: Metóda membránovej filtrácie.

STN EN ISO 9308-1: 2014. Kvalita vody. Stanovenie *Escherichia coli* a koliformných baktérií. Časť 1: Metóda membránovej filtrácie pre vody s nízkou koncentráciou sprievodnej bakteriálnej mikroflóry.

STN ISO 7150-1: 1995. Kvalita vody. Stanovenie amónnych iónov. 1. časť: Manuálna spektrometrická metóda.

STN ISO 9297: 2000. Kvalita vody. Stanovenie chloridov. Argentometrické stanovenie s chrómanovým indikátorom (Mohrova metóda).

STN EN ISO 10523: 2010. (75 7371) Kvalita vody. Stanovenie pH.

WHO. 1996. *Guidelines for drinking-water quality. Health criteria and other supporting information*. 2nd ed. Vol.2, Geneva. p. 990. [online]. [cit. 2021-01-25]. ISBN: 92 4 154480 5 Dostupné na https://www.who.int/water_sanitation_health/publications/gdwq2-vol2/en/

WHO. 2008. *Guidelines for Drinking-water Quality* 3rd ed. Vol.1. Recommendations, Geneva.p. 668. [online]. [cit. 2021-01-25]. ISBN: 978 92 4 154761 1. Dostupné na https://www.who.int/water_sanitation_health/publications/gdwq3rev/en/

WHO. 2011. Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) Fact sheet No. 125. [online], [cit. 2021-01-25]. Dostupné na <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/e-coli>.

Acknowledgments: The study was supported by the Slovak grants KEGA no. 001UVLF-4/2020, APVV no. SK-PL18-0088 and VEGA no. 1-0529-19.

Contact address: Nad'a Sasáková, DVM, assoc. prof., PhD, Department of public veterinary medicine and welfare, University of veterinary medicine and pharmacy, Komenského 73, 040 48 Košice, Slovakia

TECHNOLOGICKÉ ZPRACOVÁNÍ JEDLÉHO HMYZU TECHNOLOGICAL PROCESSING OF EDIBLE INSECTS

Petra Škvorová, Lenka Kouřimská, Rudolf Ševčík

Abstract: The growth of the world's population will require the production of vast amounts of food. However, due to the limited area of pastures, it will be very difficult to meet this need with conventional food sources. This can lead to food shortages, especially of animal origin. It will therefore be necessary to look for new sources of animal protein, such as insects, which have a high nutritional value. However, the nutritional value depends on the breeding conditions, the developmental stage and the technological modification. In this work, the nutritional characteristics of samples *Tenebrio molitor* that were dried in a tumble dryer and samples that were dried by lyophilisation were compared.

Keywords: *Tenebrio molitor*, entomophagy, nutritional values, drying

ÚVOD

Konzumace hmyzu se nazývá entomofágie. Již od roku 2003 Organizace pro výživu a zemědělství (FAO) uznává potenciál užívání jedlého hmyzu pro potraviny a krmiva a podporuje řadu témat souvisejících s jedlým hmyzem. Hmyz je konzumován v různých vývojových stádiích (larvy, kukly i dospělci). Od 1. 1. 2018 je v EU použitelné nařízení Evropského parlamentu a Rady (EU) 2015/2283 o nových potravinách, které jasně definuje hmyz a výrobky z hmyzu jako novou potravinu ve smyslu tohoto nařízení. Hmyz a hmyzí produkty totiž nebyly tradiční součástí jídelníčku obyvatel EU před 15. 5. 1997 a splňují tím definici nové potraviny (Mishyna et al. 2020). Ministerstvo zemědělství v České republice s ohledem na stávající vědecké poznatky doporučilo chovat k lidské spotřebě zatím pouze následující druhy hmyzu: *Tenebrio molitor* – potěmník moučný, *Alphitobius diaperinus* – potěmník stájový, *Acheta domestica* – cvrček domácí, *Grylodes sigillatus* – cvrček krátkokřídlý a *Gryllus assimilis* – cvrček banánový (Ministerstvo zemědělství 2018). Prvním druhem jedlého hmyzu, který Evropský úřad pro bezpečnost potravin (EFSA) shledal bezpečným pro využití v potravinářském průmyslu je *Tenebrio molitor* (Turck et al. 2021).

Do budoucna je předpokládán nárůst světové populace a konzumace hmyzu se může jevit jako možné zajištění nového zdroje živočišných bílkovin. Navíc může být hmyz krmem potravou, kterou člověk nedokáže zkonzumovat, některé druhy dokonce dokáže recyklovat i živočišný odpad (Van Huis et al. 2013; De Castro et al. 2018). Další nespornou výhodou, je také to, že hmyz má rychlý životní cyklus a dobrou schopnost reprodukce (Kulma et al. 2019).

Hmyz je po celém světě konzumován třemi miliardami lidí v Asii, Africe a jižní Americe. V západních zemích ovšem není konzumace hmyzu běžná a jsou vůči ní stále určité předsudky. Jedlý hmyz se velice často označuje za potravinu budoucnosti nejen kvůli pozitivnímu ekologickému vlivu, ale také pro příznivé složení jeho nutrientů. Ovšem v západních zemích zatím nepatří mezi preferovanou a běžně konzumovatelnou potravinu (Kulma et al. 2019). Hmyz je stále častěji prosazován jako maso budoucnosti, což je vysvětlováno dobrou udržitelností jeho produkce. Zatímco skutečné dopady na životní prostředí a míra konverze krmiv se liší podle druhu hmyzu a použitých chovatelských metod, zjišťuje se, že chov hmyzu vyžaduje menší přísun krmiva, vody a půdy k produkci ekvivalentního množství bílkovin oproti tradičním hospodářským zvířatům (van Broekhoven et al. 2015; Shelomi 2016; Mancini et al. 2019).

Chemické složení hmyzu může záviset na faktorech vnějšího prostředí, jako například vliv ročního období nebo technologický postup v chovu (Oonincx et al. 2015), i faktorech vnitřních jako je vývojové stádium či pohlaví jedince (Kulma et al. 2019).

Možnosti technologické úpravy jedlého hmyzu

Z bezpečnostního hlediska se obecně nedoporučuje konzumace hmyzu za syrového stavu (Ramos-Elorduy 1997). Pokud dochází ke konzumaci hmyzu vcelku, tak nejčastější úpravou bývá smažení, pečení, dušení a vaření (Yong et al. 2010). Další možností konzumace je ve skryté formě, kdy je hmyz nadrcen na jemný prášek (moučku), který se pak přidává do pečiva, dortů, proteinových tyčinek, těstovin, párků, pizzy a dalších běžně známých produktů. Moučka nemá specifickou chuť, po přidání do potravin ovšem vylepší výživovou hodnotu, ovšem na chuti to nelze poznat. Samozřejmě ovšem záleží na poměru jednotlivých složek (Verbeke 2015).

Usmrcení hmyzu pro následnou kulinární úpravu by mělo být v každém případě humánní, tedy co nejrychlejší. Usmrcení během jedné vteřiny proběhne například vhozením živého hmyzu do vroucí vody nebo do rozpáleného oleje (Houser 2011). Pro lepší manipulaci s velmi pohyblivým hmyzem ho můžeme na pár minut umístit do ledničky. Inaktivujeme tím určitá nervová centra a hmyz bude méně pohyblivý. Čerstvost vstupní suroviny a práce s živým hmyzem v kuchyni je důležitá, protože rozkladné procesy nastupují velmi rychle. Proto se hmyz usmrcujeme vždy těsně před jeho samotnou přípravou (Borkovcová et al. 2009).

Je zřejmé, že každá technologie má vliv specifický vliv na nutriční i senzorické vlastnosti (Kouřimská & Adámková, 2016).

Vaření

Vaření může především sloužit k rychlému usmrcení hmyzu. K dalším metodám využívaných k usmrcování hmyzu patří zmrazení nebo usmrcení horkou párou. Vaření je nejzákladnější, a navíc velmi jednoduchá kuchyňská úprava (Ramos-Elorduy 1997, Ministerstvo zemědělství 2018). Tento způsob opracování má však za následek odstranění nutričně cenných látek hmyzu, proto by se mělo provádět co nejkratší dobu v řádu několika sekund (Borkovcová et al. 2009).

Smažení

Smažení a fritování se uvádí jako hlavní způsob přípravy některých druhů housenek, používá se však i pro kobylinky a cvrčky. Chuť se velice často přirovnává k pražené kukuřici. Jde asi o nejpoblíbenější formu přípravy hmyzu. Příprava je velice snadná a jednoduchá. Pokrm, ale většinou neslouží jako hlavní jídlo, často se jedná pouze o pochoutku (Ramos-Elorduy 1997).

Mražení

Jde o asi nejrozšířenější způsob konzervace hmyzu. Po rozmrazení je zapotřebí ho co nejrychleji zpracovat. Doba zpracovatelnosti se totiž velmi rychle zkracuje. Neefektivnější je ihned po vyndání z mrazničky dát hmyz rovnou na pánev (Brouk na talíři 2015).

Sušení je nutné provádět co nejrychleji. Vhodné je sušení v horkovzdušné troubě, kdy nutriční ztráty nejsou moc velké. Správně usušený hmyz by měl mít zlatavou nebo světle hnědou barvu a měl by jít snadno rozdrtit v prstech. Připravenou mouku můžeme přidávat do různých pokrmů a vylepšit tak tím jejich nutriční kvalitu. Mouka v suchém prostředí vydrží několik týdnů, jedná se tak o vhodný způsob uchovávání hmyzu (Borkovcová et al. 2009).

Sušení

Sušení je nejpoužívanější technologií pro zvýšení trvanlivosti potravin. Techniky sušení sahají od tradičních metod (například pražení a sušení na slunci) až po moderní metody (například lyofilizace či sušení pomocí mikrovln). Sušení má za cíl snížit celkový obsah vody a prodloužit trvanlivost potraviny (Grabowski & Klein 2017).

Lyofilizace je proces sušení mrazem, kdy teplota během 48 hodin klesne cca na -50 °C. Hmyz je po této úpravě velmi křupavý, takže je velmi podobný sušenkám nebo preclíkům (Elorduy 1998). Lyofilizace je navíc označována za metodu, při níž lze dosáhnout nejlepších vlastností upravené suroviny, ovšem problémem jsou vysoké provozní náklady. Vzhledem k použité nízké teploty při úpravě a výslednému poklesu vlhkosti se mikrobiologická degradace

do značné míry zastaví, čímž se získá vysoce kvalitní konečný produkt s dlouhou trvanlivostí. Takto upravený produkt je velmi vhodný pro další výzkum, ale v průmyslovém měřítku je vysoce nákladný. U produktů s vysokým obsahem tuku by však mohla být podporována oxidace lipidů a mohlo by docházet k poklesu rozpustnosti bílkovin (Caparros Megido et al. 2017; Zhang et al. 2017).

MATERIÁL A METODIKA

Vzorky

Byly použity larvy potemníka moučného (*Tenebrio molitor*). Larvy byly celou dobu krmeny substrátem tvořeným směsí strouhanky a pšeničných otrub. Každodenně jim bylo poskytováno vlhké krmení ve formě salátových listů, jablek, okurek a mrkve. Aby se předešlo plesnivění substrátu, zbytky této potravy byly ze substrátu vždy odstraněny. Sklizeň byla provedena, když bylo pozorováno začínající kuklení larev (v substrátu nalezeno alespoň 20 kukel). Sklizené larvy byly usmrceny mrazem a drženy v chladu až do začátku technologického zpracování.

Technologické zpracování

Byla použita bubnová sušička a lyofilizátor. Sušení v bubnové sušičce probíhalo v laboratořích Vysoké školy chemicko-technologické v Praze. Jednalo se o jednoválcovou sušárnu (Gouda) o délce válce 1 m, na který byla nanášena suspenze z moučných červů (červ:voda - 2:1). Sušička byla ohřívána parou, pracovní tlak se pohyboval v rozmezí 5-8 bar a tlak páry byl 2 bary. Teplota na povrchu válce byla 128 °C a rychlost otáčení válce 2 otáčky za minutu. Po vysušení byl produkt seškrabáván ze sušičky pomocí nože z odolné oceli.

Druhá část vzorků byla upravena lyofilizací. Zde nebylo zapotřebí tvorby suspenze. Larvy červů byly přímo vloženy do přístroje SCANVAC. Vkládány byly zmrazené na -70 °C. Vzorky byly lyofilizovány po 72 hodin, při 1–5 milibarech, teplotě 25 °C a 200 otáčkách za minutu.

Laboratorní stanovení nutričních hodnot

Sušina

Sušina byla stanovena dle nařízení komise (ES) č. 152/2009. Stanovení sušiny proběhlo na základě dvou navážek od každého vzorku po 5 g do předem vysušených hliníkových misek, které se následně vložily na 4 hodiny do sušárny (Memmert) vyhřáté na 103 °C. Po vysušení se misky nechaly vychladnout v exsikátoru a následně byly zváženy.

Popeloviny

Byly stanoveny dle nařízení komise (ES) č. 152/2009. Vzorky v porcelánové misce byly vloženy do muflové pece na 550 °C a spáleny. Po zvážení byl dopočítán obsah popelovin.

Tuk dle Soxhleta

Obsah tuku byl stanoven dle Soxhleta (Soxhlet 1879). Stanovení tuku bylo prováděno pomocí Soxhletova extraktoru za pomoci petroletheru. Extrakce trvala přibližně 100 minut. Následně byl dopočítán procentuální obsah tuku.

Dusíkaté látky dle Kjeldahla

Obsah dusíkatých látek (tedy včetně nebílkovinného dusíku, který je vázán převážně v chitinu) byl stanoven metodou dle Kjeldahla (ISO 1871:2009). Do zkumavky bylo naváženo přibližně 0,2 g vzorku. Do zkumavky byla přidána 1 tableta oxidu titaničitého, 10 ml kyseliny sírové a 10 ml peroxidu vodíku. Zkumavky byly vloženy do topného hnízda (420 °C) na 1 h. Po vychladnutí bylo ke vzorku přidáno 10 ml destilované vody a vzorky byly vloženy do přístroje Kjeltec TM 2400 analyzátor. Následně byl dopočítán procentuální obsah dusíkatých látek prepočítavacím koeficientem 6,25.

VÝSLEDKY A DISKUSE

Vzorek s označením A byl odebrán z vnitřní strany sušícího bubnu a vzorek B byl odebrán z kraje sušárny, kde sušárna nesušila dokonale a zůstával tam tak vyšší obsah vody. Vzorek L byl ošetřen lyofilizací. Nutriční hodnoty jednotlivých vzorků jsou vidět v tabulce jedna. Sušina u vzorků je uvedena již v technologicky upravených vzorcích.

Tabulka jedna – nutriční charakteristiky bubnového sušení

	Vyjádřeno v %	Vyjádřeno v % na sušinu		
	Sušina	Popeloviny	Bílkoviny	Tuk
A	95,65 ± 0,03	4,59 ± 0,01	63,55 ± 0,26	25,3 ± 0,07
B	83,8 ± 0,06	4,12 ± 0,02	62,64 ± 0,36	27,5 ± 0,04
L	82,47 ± 0,14	4,64 ± 0,76	63,87 ± 2,56	28,18 ± 2,03

U vzorku B (vzorek z okraje sušícího bubnu) je v porovnání se vzorkem A vyšší obsah tuku. Lze usuzovat, že na kraji sušícího bubnu, kde nebyla tak vysoká teplota, nedocházelo k vytavení tuku z produktu.

Oproti bubnovému sušení jsou nutriční hodnoty u lyofilizovaných vzorků vyšší. Důvodem může být to, že u bubnového sušení je nutné připravit suspenzi a může tedy dojít k degradaci živin již při přípravě samotné. Také při bubnovém sušení jsou vzorky vystaveny vysoké teplotě, k tomu při lyofilizaci nedochází.

U vzorku A bylo dosaženo nejvyšší sušiny v ošetřeném produktu oproti vzorkům B a L, tento fakt byl ovšem vykoupen tmavší barvou a také hořkou chutí, což naznačuje vysoký obsah produktů Maillardovy reakce.

Výrobky sušené v bubnové sušárně jsou nutričně srovnatelné s výrobky sušenými mrazem, ale mají nižší provozní náklady. Fombong et al. (2017); Lautenschläger et al. (2017) a Kröncke et al. (2018) konstatují, že larvy sušené v sušárně mají vysokou rozpustnost bílkovin a nižší úroveň oxidace lipidů oproti lyofilizaci. Na možnosti zvýšené oxidace u lyofilizace poukazuje studie, kterou provedli Caparros Megido et al. (2017). Ovšem Purschke et al. (2017) uvádí že, sušení při vysokých teplotách způsobuje výrazné ztmavnutí vzorků, a to v důsledku Maillardových reakcí a také může docházet k většímu rozsahu tvarových změn. Zvýšený výskyt Maillardovy reakce pak s sebou nese sníženou využitelnost bílkovin.

ZÁVĚR

Nutriční, senzorické i tvarové vlastnosti produktu lze ovlivnit zvolenou technologií úpravy. Lyofilizace nám za vyšší náklady poskytne v ošetřené potravíně menší množství produktů Maillardovy reakce, tedy lepší nutriční využitelnost bílkovin a také nám zajistí, že hmyz si udrží svůj původní tvar. Bubnové sušení nám poskytne za nižší náklady produkty s lepší oxidační stabilitou, ovšem s nižší nutriční využitelností bílkovin. Volba technologie sušení by proto měla brát v úvahu zamýšlené využití hmyzu a formu, ve které bude konzumován.

LITERATURA

- Borkovcová, M. a kolektiv. 2009. Kuchyně hmyzem zpestřená. 1.vyd. Brno: LYNX, 135s. ISBN 978-80-86787-37-4.
- Brouk na talíři: Trvanlivost hmyzu: Jak hmyzí jídlo uchovat? [online], 2015. Web: Brouk na talíři [cit. 2020-10-17]. Dostupné z: <http://www.brouknataliri.cz/trvanlivost-hmyzu-susenimrazeni/>
- Caparros Megido R., Desmedt S., Blecker C., Béra F., Haubruge É., Alabi T., Francis F. 2017. Microbiological Load of Edible Insects Found in Belgium. *Insects* 8.

- de Castro R. J. S., Ohara A., dos Santos Aguilar J. G., Fontenele Domingues M. A. 2018. Nutritional, functional and biological properties of insect proteins: Processes for obtaining, consumption and future challenges. *Trends in Food Science & Technology* 76: 82-89.
- Elorduy, J. R. 1998. Hmyz na talíři. Praha: Volvox Globator, 130. ISBN 80-7207-193-9
- Evropská komise. 2009. Nařízení Komise (ES) č. 152/2009 ze dne 27. ledna 2009, kterým se stanoví metody odběru vzorků a laboratorního zkoušení pro úřední kontrolu krmiv, 1-54, Úřední věstník Evropské unie. Brusel.
- Fombong F., Van Der Borght M., Vanden Broeck J. 2017. Influence of Freeze-Drying and Oven-Drying Post Blanching on the Nutrient Composition of the Edible Insect *Ruspolia differens*. *Insects* 8.
- Grabowski N. T., Klein G. 2017. Microbiology of processed edible insect products – Results of a preliminary survey. *International Journal of Food Microbiology* 243:103-107.
- Houser, P. 2011. Hmyz se dá jíst, a to nejen jako exotická kuriozita. [online]. [cit. 2011- 1-11]. Dostupné z [www: http://scienceworld.cz/biologie/hmyz-se-da-jist-a-tonejen-jakoexoticka-kuriozita-6029](http://scienceworld.cz/biologie/hmyz-se-da-jist-a-tonejen-jakoexoticka-kuriozita-6029)
- ISO 1871:2009. 2009. Food and feed products. General guidelines for the determination of nitrogen by the Kjeldahl method. ISO, Geneva.
- Kouřimská L., Adámková A. 2016. Nutritional and sensory quality of edible insects. *NFS Journal* 4:22-26.
- Kröncke N., Bösch V., Woyzichowski J., Demtröder S., Benning R. 2018. Comparison of suitable drying processes for mealworms (*Tenebrio molitor*). *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 50:20-25.
- Kulma M., Kouřimská L., Plachý V., Božik M., Adámková A., Vrabec V. 2019. Effect of sex on the nutritional value of house cricket, *Acheta domestica* L. *Food Chemistry* 272: 267-272.
- Lautenschläger T., Neinhuis C., Kikongo E., Henle T., Förster A. 2017. Impact of different preparations on the nutritional value of the edible caterpillar *Imbrasia epimethea* from northern Angola. *European Food Research and Technology* 243: 769-778.
- Mancini S., Moruzzo R., Riccioli F., Paci G. 2019. European consumers' readiness to adopt insects as food. A review. *Food Research International* 122: 661–678.
- Ministerstvo zemědělství ČR. 2018. Zásady správné zemědělské a výrobní praxe produkce hmyzu určeného pro lidskou spotřebu. Available from http://eagri.cz/public/web/file/576458/Zasady_produkce_hmyzu_4__2_.pdf.
- Mishyna M., Chen J., Benjamin O. 2020. Sensory attributes of edible insects and insect-based foods – Future outlooks for enhancing consumer appeal. *Trends in Food Science & Technology* 95:141-148.
- Oonincx D. G. A. B., van Broekhoven S., van Huis A., van Loon J. J. A., Papadopoulos NT. 2015. Feed Conversion, Survival and Development, and Composition of Four Insect Species on Diets Composed of Food By-Products. *PLOS ONE* 10.
- Purschke B., Stegmann T., Schreiner M., Jäger H. 2017. Pilot-scale supercritical CO₂ extraction of edible insect oil from *Tenebrio molitor* L. larvae - Influence of extraction conditions on kinetics, defatting performance and compositional properties. *European Journal of Lipid Science and Technology* 119.
- Ramos-Elorduy, J., 1997: Insects: A sustainable source of food. *Ecology of food and Nutrition* 36 (2-4): 247–276.
- Shelomi M. 2016. The meat of affliction: Insects and the future of food as seen in Expo 2015. *Trends in Food Science & Technology* 56: 175-179.
- Soxhlet, F. 1879. Die gewichtsanalytische Bestimmung des Milchfettes. *Dingler's Polytechnisches Journal*. 232: 461-465.
- Turck D., et al. 2021. Safety of dried yellow mealworm (*Tenebrio molitor* larva) as a novel food pursuant to Regulation (EU) 2015/2283. *EFSA Journal* 19.
- Van Broekhoven S., Oonincx D. G. A. B., van Huis A., van Loon JJA. 2015. Growth performance and feed conversion efficiency of three edible mealworm species (Coleoptera: *Tenebrionidae*) on diets composed of organic by-products. *Journal of Insect Physiology* 73: 1–10.
- Van Huis A., Van Itterbeeck J., Klunder H., Mertens E., Halloran A., Vantomme P. 2013. Edible insects: Future prospects for food and feed security. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Rome. Available from <http://www.fao.org/3/i3253e/i3253e.pdf>.
- Verbeke W. 2015. Profiling consumers who are ready to adopt insects as a meat substitute in a Western society. *Food Quality and Preferences* 39:147-155.
- Yong HI, Kim TK, Kim HW, Choi YS. 2019. Edible Insects as a Protein Source: A Review of Public Perception, Processing Technology, and Research Trends. *Food Science of Animal Resources* 39:521-540.
- Zhang M., Chen H., Mujumdar A. S., Tang J., Miao S., Wang Y. 2017. Recent developments in high-quality drying of vegetables, fruits, and aquatic products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 57:1239-1255.

Poděkování: METROFOOD: Tato práce vznikla za podpory výzkumné infrastruktury METROFOOD-CZ (projekt MŠMT číslo LM2018100).

Kontaktní adresa: Ing. Petra Škvorová, Katedra mikrobiologie výživy a dietetiky, Fakulta agrobiologie potravinových a přírodních zdrojů, Česká zemědělská univerzita v Praze, Kamýcká 129, 165 00 Praha-Suchbát

DETERMINATION OF HYGIENIC LEVEL OF SLAUGHTERHOUSE BY ATP METHOD AND BY MICROBIOLOGICAL CONTROL OF EFFECTIVENESS OF DISINFECTION

Mária Vargová, Katarína Veszelits Laktičová, Nad'a Sasáková, František Zigo

Abstract: Hygiene of slaughterhouse is one of the key factors in producing hygienically flawless products. The aim of study was to evaluate the microorganisms (total count of bacteria, coliform bacteria and moulds) in the slaughterhouse before and during process and after disinfection by disinfectant FINK FC 21 and determination of the overall biological contamination by the ATP method. Swabs ($n = 25$) were taken from individual surfaces of technological equipment and auxiliary equipment. By comparing the condition before and after application the disinfectant we observed a statistically significant decrease of microorganisms - TCB ($p < 0.001$), CB ($p < 0.05$) and M ($p < 0.05$); by comparing the condition during slaughter and after disinfection we observed statistically significant incidence of TCB ($p < 0.001$), CB ($p < 0.001$) and M ($p < 0.001$); statistically significant differences were also observed when comparing the condition before and during process, TCB ($p < 0.05$), CB ($p > 0.05$) and M ($p < 0.001$). Results from ATP method in RLU (relative luminescence units) were within numerical tolerance with the recommended limits given by the manufacturer.

Keywords: microbiological control, ATP method, control of sanitation, bioluminescence, slaughterhouse

INTRODUCTION

The food industry plays an important role in preventing food-borne diseases. Food hygiene is an essential part of maintaining product safety (Cwиковá, Holický, 2008). The General Principles of food hygiene cover hygiene practices from primary production through to final consumption, highlighting the key hygiene controls at each stage. Food contamination can occur at any stage of production, storage and distribution (McBain et al., 2000). Food industry sanitation is a fundamental need for good manufacturing practice and the development of critical control point risk analysis (HACCP) as well as part of all food safety standards.

Insufficient cleaning, disinfection of all surfaces and formation of biofilm are the main causes of their occurrence (Čapla et al., 2009). Flawless hygienic production conditions are ensured by sanitation. Basic elements of a comprehensive sanitation activity are cleaning and disinfection (Leps et al., 2013). Sanitation is a complex of activities providing hygienic and anti-epidemiological care for food and hygiene in their processing. Examination by classical microbiological methods in terms of the speed of delivery of results do not meet the requirements of practice, which requires as soon as possible evaluation of the effectiveness of sanitation and the state of production hygiene (Vojtaššák, 2003). The most serious shortcomings in the use of classical examination methods are mainly time-consuming examinations, economically expensive laboratory equipment, the need for professional training personnel, the risk of secondary contamination which may lead to false positive results. In addition, the result of the laboratory examination is known after two days, sometimes after more days, at the time when production is stopped and the product may be contaminated. The most objective indicator of hygiene and sanitation levels in food processing areas is the detection of microbial contamination, which makes it possible to evaluate the effectiveness of the disinfectant used, as well as the effectiveness of mechanical cleansing, which significantly affects the effectiveness of sanitation, and take the necessary measures to improve hygiene (Gibson et al., 1999).

The ATP method is based on the determination of adenosine triphosphate (ATP), which is found in bacteria, fungi and other microorganisms as well as in all substances of plant and animal origin, including food and their residues. The determination of ATP is suitable for rapid verification of the effectiveness of sanitation in practical conditions and is comparable to conventional microbiological methods determination of the total number of microorganisms (Ukuku, Pilizota and Sapers, 2001). The reaction takes only a few seconds, the amount of light generated can be objectively quantified using a luminometer instrument, which is very sensitive and is able to capture and measure even a very small amount of light generated. The great advantage of this method is the high sensitivity and reproducible results within 2 minutes (Costa, Andrade and Soares, 2006).

MATERIAL AND METODOLOGY

Microbiological swabs (n = 25) were processed by classical microbiological method before and during process slaughter and after disinfection by disinfectant FINK FC 21. The swabs were taken from area of 10 cm² and subsequently were transferred to 10 ml of sterile saline solution, the suspension was inoculated on nutrient agars in amount 0.1 ml. Plates were incubated in thermostat, after incubation, the grown colonies were evaluated. For the determination of coliform bacteria, total count of bacteria and moulds, the procedure according to the applicable ISO standards (ISO Standard 18593-2004; ISO Standard 4832-2006; ISO Standard 21527-2008) was used. The numbers studied microorganisms were expressed in CFU (colony forming units). Endo agar was used to determine the number of coliform microorganisms at 37 °C for 24 hours. Meat Peptone agar was used to determine the total count of bacteria at 37 °C for 24 hours. To determine the number of moulds, Sabouraud agar was used for 3 - 5 days at room temperature (Ondrašovič et al, 1993).

FINK FC 21 was used at 2 % concentration with a 20 minutes exposure time, heated to 50 °C, applied by spraying. The disinfectant contains potassium hydroxide 5 – 10 %, sodium hypochlorite 2.5 – 5 % and non-ionic surfactants 0.5 - 2.5 %. FINK FC 21 with active chlorine.

ATP swab (n = 25) were taken before, during process and after disinfection from same surfaces of technological equipment and auxiliary equipment as microbiological swabs. The resulting ATP values before and during process as well as after disinfection represent the average values from the measured values, which were within numerical tolerance with the recommended limits set by the manufacturer: Acceptable < 1 000 RLU; Borderline = 1 001 - 1999 RLU; Unacceptable > 2 000 RLU. The resulting ATP value before slaughter process (590 RLU) represents the average value of all measured values before the process. During the process, ATP value reached the highest value (1987 RLU) and after disinfection, RLU value decreased to the lowest value (280 RLU). ATP swab were taken from area 100 cm² with special 3M Clean-Trace™ sampling pens, which are part of the UNI-LITE NG system, which was used to determine ATP. This system consists of a portable luminometer, which is used to evaluate the emitted light generated in the reaction chamber and the sampling pen (Figure 1) supplied by the manufacturer. The swab was made in a horizontal plane from side to side and then in the vertical plane (<https://www.hygiene.com/snapshot-food-and-beverage.html>).

RESULTS AND DISCUSSION

Occurrence of microorganisms on evaluated surfaces before, during the process and after disinfection by the disinfectant FINK FC 21 is shown in the Table 1. By comparing the condition before and after application the tested disinfectant, we observed a statistically significant decrease in the prevalence of the surfaces microorganisms - TCB (p < 0.001), coliform bacteria (p < 0.05) and moulds (p < 0.05) which implies that the disinfectant was effective against all analysed microorganisms (Tab. 1). There was a statistically significant incidence of TCB (p < 0.001), coliform bacteria (p < 0.001) and moulds (p < 0.001) when

comparing condition during slaughter and after disinfection. Statistically significant differences were also observed when comparing the condition before and during process, TCB ($p < 0.05$), coliform bacteria ($p > 0.05$) and moulds ($p < 0.001$).

Hygiene of slaughterhouse is one of the key factors in producing hygienically flawless products (Štefkovičová et al., 2007). The slaughterhouse is the establishment used for the slaughter of animals, whose meat is intended for human consumption. According to Regulation (EC) No. 853/2004, food business operators are obliged to ensure that slaughterhouse structures, arrangements and equipment comply the requirements of (EC) No. 853/2004. Slaughterhouses must be equipped with devices for disinfecting of tools with hot water with a temperature of at least 82 °C or an alternative system having equivalent effect.

Sanitation is the process of providing adequately hygienic conditions to ensure a safe, wholesome product fit for human consumption and covers hygienic precautions regarding personal hygiene, process hygiene and cleaning and disinfection (Langsrud et al., 2003). The most objective indicator of hygiene and sanitation levels in food processing areas is the detection of microbial contamination, which makes it possible to evaluate the effectiveness of the disinfectant used, as well as the effectiveness of mechanical cleansing, which significantly affects the effectiveness of sanitation, and take the necessary measures to improve hygiene (Gibson et al., 1999). The goal of disinfection is to destroy microorganisms, this does not mean killing all microorganisms, but reducing the number to a level that is not normally harmful to health (Wirtanen and Salo, 2003). Thorough cleaning must be performed before applying disinfection. Cleaning of premises and technological equipment in food production is a crucial part of hygiene and has an immediate impact on the disinfection result (Dunsmore et al., 1981). The hygienic condition of individual areas and food processing facilities plays an important role in microbial food contamination, which directly affects food quality and consequently consumer health (Razim et al., 2016). The issue of microbial contamination in the slaughterhouse premises was processed by several authors (Hinrichson 2010; Bouvet et al., 2002; Nowak et al., 2007). The main source of microorganisms contaminating the surface of the meat in the slaughterhouse premises is the aerosol generated by rinsing floors or equipment with pressurized water. Microbial contamination of the environment in relation to the possible transfer of pathogens to foodstuffs in handling raw materials is an undeniable fact (Evancho et al., 2001). This is why it is necessary to take care of thorough sanitation and thus ensure satisfactory hygienic conditions. The issue of disinfection is currently extremely topical. Numerous diseases caused by resistant types of microorganisms, multidrug-resistant bacteria, viruses, fungi as well as diseases caused by prions represent a very serious problem for consumer health and are attributed to lack of sanitation, including poor hygiene and equipment contamination or environment (Koo et al., 2013). Food industry sanitation is a fundamental need for good manufacturing practice and the development of critical control point risk analysis (HACCP) as well as part of all food safety standards.

In view of the increasing resistance of microorganisms to the chemicals used in the environment, in agricultural production as well as in the food processing industry, the continuous development of new multi-substance based disinfectants is needed (Štefkovičová et al., 2007). Disinfection, which is defined as a reduction in the number of microorganisms in the environment to a level that does not endanger food safety, is carried out as part of plant technology practices (Wirtanen and Salo 2003). Proper selection of disinfectants, given the potential for microbial contamination of the environment, minimizes contamination of the final product, increases durability and reduces the risk of food-borne disease (Ondrašovič et al., 2013). The most effective chemical disinfectants include those with a strong oxidative effect. Their efficacy affects practically the entire range of medically important pathogens not including spores (Štefkovičová et al., 2007). Organic and inorganic active chlorine compounds such as chloramines, or sodium hypochlorite are among the most effective disinfectants. The

active ingredient of these compounds is chlorine, which reacts with water to form a strong oxidizing agent, hypochlorous acid (HOCl). This action inactivates enzymes and proteins in which it oxidizes thiols molecules and blocks DNA synthesis in cells by chlorination of nucleotides. Except for active action on DNA, reactions with ribosome proteins also occur by oxidation of amine or imine compounds to produce chloramines which are thought to have a depot effect. It leads to oxidation of sulphhydryl groups of proteins to form disulphides. This is manifested by the formation of granules in the cytoplasm having a homogeneous structure. Other changes are accompanied by cell wall loosening and rupture (Payment, 1999). Chlorine preparations can be classified as a very good disinfectant oxidant that is effective as bactericidal, fungicidal, mycobactericidal and sporicidal agents with minimal activity in the resistance development process (Rodgers et al., 2001). The disadvantage of chlorine preparations is their high corrosively and rapid decrease in activity in the environment of contaminating organic substances (Gorner, Valík, 2004). With amino acids and proteins, compounds can be formed, e.g. chloramines, which, although slower, they can act as disinfectants (Payment, 1999).

Statistical analysis of significance indicates a statistically significant incidence of surfaces microorganisms before the slaughter, during process and after disinfection using the evaluated FINK FC 21 disinfectant at slaughterhouse premises. Obviously, the correct choice of disinfectant, concentration, method of application, exposure time is an important component for maintaining hygienic cleanliness in food operations. Control of efficiency of disinfection is very important as it serves to verify the effectiveness of disinfection procedures and has an irreplaceable role in assessing proper sanitation. Physical and chemical methods are suitable to evaluate the properties of disinfectants, while microbiological control being the most objective method. We can assume that disinfection is successful with proper adherence to the disinfectant composition, its prescribed concentration, temperature and exposure time.

Table 1 Occurrence of the microorganisms on monitored surfaces in the slaughterhouse before slaughter process, during the process and after disinfection by the disinfectant FINK FC 21

	before process (n = 25)			during process (n = 25)			after disinfection (n = 25)		
	TCB	CB	M	TCB	CB	M	TCB	CB	M
	(CFU)	(CFU)	(CFU)	(CFU)	(CFU)	(CFU)	(CFU)	(CFU)	(CFU)
M	7.44	1.08	1.12	50.64	1.76	4.12	4.12	0.08	0.48
SD	20.03	2.72	1.74	57.11	4.13	4.18	15.36	0.27	0.83
Min	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Max	100	12	5	210	19	11	75	1	3
Median	2	0	0	17	0	2	0	0	0

Note: M – mean, SD – standard deviation, Min – minimum, Max – maximum, TCB – total count of bacteria, CB – coliform bacteria, M – moulds, CFU - colony forming units

The determination of ATP is suitable for rapid verification of the effectiveness of sanitation in practical conditions and is comparable to conventional microbiological methods determination of the total number of microorganisms (Ukuku, Pilizota and Sapers, 2001). The classic microbiological control in the food industry is time-consuming and the results are after finishing production process and it represents problem in food processing plant. This is the reason why are the modern rapid methods are more often use in the practical condition. One of these methods is method based of bioluminescence, we can know the results till two minutes. The ATP method determines the overall biological contamination of the environment (Costa et al., 2006). The ATP method detected organic matter at different technological equipments. The value of RLU (RLU = 590) was before slaughter process, the highest level of RLU (RLU =

1987) was during slaughter process and the lowest value of RLU was after disinfection (RLU = 280). After reading and interpreting the obtained results, we can state that the results were within numerical tolerance with the recommended limits given by the manufacturer.

Efficiency of disinfection was assessed based on sampling and evaluation using a conventional sterile microbiological method and a rapid method using ATP. On the evaluated surfaces during the process were found the highest number of CFU of total count of bacteria, coliform and moulds, as same as the highest value RLU. The lowest number of CFU of total count of bacteria, coliform and moulds as same as the lowest value RLU were found after disinfection. Based on the obtained results we can concluded a direct relationship between numbers of microorganisms obtained by microbiological swabs and values obtained by ATP swabs.



Figure 1 The HY-LITE NG system from Biotrace and procedure for taking surface ATP sample

CONCLUSION

According to our results from microbiological control and ATP method we can conclude, that disinfectant FINK FC 21 was effective in all monitored groups of microorganisms, which was confirmed by statistical analysis. Results from ATP method also confirmed the efficacy of disinfectant FINK FC 21 in the monitored slaughterhouse. With the use of ATP bioluminescence, we obtained results can on-site within 2 minutes of sampling as opposed to microbiological methods which we prepared in the laboratory and we had to wait for results for at least 24 - 48 hours. Based on our results we can conclude that ATP bioluminescence has the potential to be a useful tool to evaluate the effectiveness of cleaning procedures and our results also confirm a direct relationship between numbers of microorganisms obtained by microbiological swabs and values obtained by ATP swabs.

REFERENCES

- Bouvet, J. M., Montet, P., Rossel, R., Le Roux, A., Bavai, C., Ray-Gueniot, S., Mazuy, C., Atrache, V., Vernozy-Rozand, C. 2002. Effects of slaughter processes on pig carcass contamination by verotoxin-producing *Escherichia coli* and *E. coli* O157:H7. *International Journal of Food Microbiology*, vol. 77, p. 1-2. <http://europepmc.org/article/MED/12076043>
- Čapla, J., Zajac, P., Golian, J., Victoris, V. 2009. Tvorba biofilmov na povrchoch z nerezovej ocele v potravinárskom priemysle. *Potravinárstvo*, vol. 3, no.1, https://www.potravinarstvo.com/dokumenty/potravinarstvo_no1_2009.pdf
- Costa, P. D., Andrade, N. J., Soares, N. F. F., Passos, F. J. V., Brandão, S. C. C. 2006. ATP-bioluminescence assay as an alternative for hygiene-monitoring procedures of stainless steel milk contact surfaces. *Brazilian Journal of Microbiology*, vol. 37, p. 345-349. Dostupné na: <https://doi.org/10.1590/S1517-83822006000300026>
- Cwиковá, O., Holický, V. 2008. Hodnocení úrovně hygieny a účinnosti sanitace v potravinářském podniku. Bezpečnost a kontrola potravin. (Evaluation of the level of hygiene and efficiency of sanitation in a food company. Food safety and control). In Proceeding of International Conference. Nitra, p. 5-8, ISBN 976-80-552-0027-9.
- Dunsmore, D. G., Twomex, A., Whittlestone, W. G., Morgan, H. W. 1981. Design and performance of systems for cleaning product contact surfaces of food equipment: a review. *Journal of Food Protection*, vol. 44, p. 220-240. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30836495>
- Dunsmore, D. G., Twomex, A., Whittlestone, W. G., Morgan, H. W. 1981. Design and performance of systems for cleaning product contact surfaces of food equipment: a review. *Journal of Food Protection*, vol. 44, p. 220-240. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30836495>

- Evancho, G. M., Sveum, W. H., Moberg, L. J., Frank, J. F. 2001. *Microbiological monitoring of the food processing environment*. In: Downes FP and Ito K (ed), Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods, 4th ed. American Public Health Association., Washington, D.C. p. 25-35.
- Gibson, H., Taylor, J. H., Hall, K. E., Holah, J. T. 1999. Effectiveness of cleaning techniques used in the food industry in terms of the removal of bacterial biofilms. *Journal of Applied Microbiology*, vol. 87, p. 41-48. Dostupné na: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.1999.00790.x>
- Görner, F., Valík, L. 2004. Risk analysis in terms of HACCP and predictive microbiology. *Food Research Bulletin*, vol. 37, no. 2, p. 71-82. [bpy-1998-2-071-082-gorner.pdf](https://doi.org/10.1016/j.foodres.2004.07.002)
- Hinrichsen, L. 2010. Manufacturing technology in the Danish pig slaughter industry. *Meat Science*, vol. 84, no. 2, p. 271-275. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20374785>
- ISO 18593: 2004. Microbiology of food and animal feeding stuffs: Horizontal methods for sampling techniques from surfaces using contact plates. International Standard Organisation.
- ISO 21527: 2008. Microbiology of food and animal feeding stuffs: Horizontal method for the enumeration of yeasts and moulds. International Standard Organisation.
- ISO 4832: 2006. Microbiology of food and animal feeding stuffs: Horizontal method for the enumeration of coliforms. International Standard Organisation.
- Koo, O. K., Martin, E. M., Story, R., Lindsay, D., Ricke, S. C., Crandall, P.G. 2013. Comparison of cleaning fabrics for bacterial removal from food-contact surfaces. *Food Control*, vol. 30, no. 1, p. 292-297. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.06.008>
- Langsrud, S., Sidhu, M. S., Heir, E., Holck, A. L. 2003. Bacterial disinfectant resistance - a challenge for the food industry. *International Biodeterioration & Biodegradation*, vol. 51, no. 4, p. 283-290. https://www.researchgate.net/publication/223728310_Bacterial_disinfectant_resistance_-_A_challenge_for_the_food_industry
- Leps, J., Einschütz, K., Langkabel, N., Fries, R. 2013. Efficacy of knife disinfection techniques in meat processing. *Meat Science*, vol. 95, no. 2, p. 185-189.
- McBain, A., Allison, D. G., Gilbert, P. 2000. Population dynamics in bacterial biofilms. In: Community and Co-operation in Biofilms. *Society for General Microbiology*, Reading. p. 257-278.
- Nowak, B., Von Müffling, T., Chaunchom, S., Hartung, J. 2007. Salmonella contamination in pigs at slaughter and on the farm. A field study using an antibody ELISA test and a PCR technique. *International Journal of Food Microbiology*, vol. 115, p. 3. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0168160507000189>
- Ondrašovič, M., Ondrašovičová, O., Para, L., Kočíšová, A. 1993. Praktické cvičenia z veterinárnej starostlivosti o životné prostredie (Practical exercises in veterinary care for the environment). Košice: Magnus. 153 p. ISBN-10: 80-85569-26-4.
- Ondrašovič, M., Ondrašovičová, O., Sasáková, N., Hromada, R., Veszelits Laktičová, K., Venglovský, J., Gregová, G., Chvojka, D., Koščo, J. 2013. Ochrana životného prostredia a verejného zdravia (Protection of the environment and public health). Košice: UVLF Publisher, 272 p. ISBN-978-80-8077-430-1.
- Payment, P. 1999. Poor efficacy of residual chlorine disinfectant in drinking water to inactivate waterborne pathogens in distribution system. *Canadian Journal of Microbiology*, vol. 45, no. 8, p. 709-715. <https://ehp.niehs.nih.gov/doi/full/10.1289/ehp.1306912>
- Razim, A., Hayat, A., Madiha, F., Nomanc, M. 2016. Detection and enumeration of Enteric bacteria associated with food handlers and surfaces of food manufacturing industry located in Hub city, Pakistan. *World Scientific News*. vol. 49, no. 2, p. 192-203. <https://www.researchgate.net/publication/303802450>
- Rodgers, J. D., McCullagh, J. J., McNamee, P. T., Smyth, J. A., Ball, H. J. 2001. An investigation into the efficacy of hatchery disinfectants against strains of Staphylococcus aureus associated with the poultry industry. *Veterinary Microbiology*, vol. 82, no. 2, p. 131-140. <https://europemc.org/article/med/11423204>
- Štefkovičová, M., Buchancová, J., Bustínová, J., Cziganýiová, A., Čižnár, I., Hudečková, H. 2007. *Disinfection and sterilization theory and practice II*. Žilina: Vrana Publisher, 164 p. ISBN 978-80-968248-3-0.
- Ukuku, D. O., Pilizota, V., Sapers, G. M. 2001. Bioluminescence ATP assay for estimating total plate counts of surface microflora of whole cantaloupe and determining efficacy of washing treatments. *Journal of Food Protection*, vol. 64, p. 813-819. Dostupné na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11403131>
- Vojtaššák, J. 2003. Hygiene control with Lightning MVP detector. *Meat*, vol. 14, no. 5, p. 33-35.
- Wirtanen, G., Salo, S. 2003. Disinfection in Food Processing – Efficacy Testing of Disinfectants. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, vol. 293, no. 2, p. 293-306. <https://www.researchgate.net/publication/226600015>
- Acknowledgments:** This work was supported by Slovak grant KEGA no. 004-UVLF4-2020.

Contact address: DVM. Mária Vargová, PhD., University of Veterinary Medicine and Pharmacy, Department of Public Veterinary Medicine and Animal Welfare, Komenského 73, 041 81 Košice, Slovakia,

PLYTVANIE POTRAVINAMI A SPOTREBITEĽSKÉ SPRÁVANIE FOOD WASTE AND CONSUMER BEHAVIOR

Tomáš Vlčko, Jozef Golian, Kristína Zimanová, Jozef Čapla

Abstract: Food waste is a global problem with an impact on the social, economic and environmental spheres. An estimated one third of global food production is thrown away. On the other hand, about 690 million people suffer from hunger, of which 160 million are acute. Unless the growing trend stops by 2030, this figure will rise to 840 million. In the EU, 88 million tonnes of food are thrown away every year, which is 173 kilograms per person. To improve the situation, all actors in the food chain must work together, from primary production to consumers. We conducted a survey on this topic in the form of an online questionnaire, which focused on consumer behaviour in terms of the reasons for food disposal, knowledge of the issue and attitudes to sorting bio waste. More than 96 % of respondents consider food waste to be a global problem, only about 9% of respondents are convinced that they do not waste food in their household, 70 % of respondents buy more food than they really need due to discounts in supermarkets. We also dealt with several relationships arising from the answers, from the survey we can say, for example, that younger people are more positive about sorting bio waste, gender has no effect on sorting bio waste, or that the smaller the municipality, the more its population is sorted and uses bio waste better and more often.

Keywords: food waste, food lost, bio waste, consumer behaviour.

ÚVOD

V poslednom období sa problematike plytvania potravín a potravinovému odpadu venovala čoraz väčšia pozornosť. Plytvanie potravín je znak neefektívneho globálneho potravinového systému, ktorý má sociálne, ekonomické a environmentálne dôsledky (FAO, 2017). Pre lepšiu orientáciu v problematike je nevyhnutné oboznámenie sa s pojmami ako *Food Loss* (potravinová strata) a *Food Waste* (potravinový odpad), s ktorými sú spojené príslušné indexy uvádzané vo svetových databázach (FAO.org). Potravinová strata poukazuje na pokles množstva v dôsledku rozhodnutí a krokov dodávateľov potravín v reťazci. Empiricky sa týka akejkolvek potraviny, ktorá sa vyhodí, spáli alebo inak zlikviduje v celom potravinovom dodávateľskom reťazci od prvovýroby po úroveň maloobchodu. S týmto pojmom sa spája FLI (food loss index) v preklade *Index potravinových strát*. Celosvetová hodnota FLI za rok 2016 dosiahla 14 % (FAO. org). Potravinový odpad označuje pokles množstva potravín v dôsledku rozhodnutí a prijatých krokov maloobchodníkov, poskytovateľov stravovacích služieb a spotrebiteľov. V tomto prípade je vytvorený FWI (food waste index) v preklade *Index potravinového odpadu* (FAO.org). Potravinový odpad rozdeľujeme do 3 kategórii. Prvou kategóriou je potravinový odpad, ktorému sa dá predísť, predstavujú ho výrobky, ktoré sú v okamihu vyradenia z potravinového reťazca stále vhodné na ľudskú spotrebu, alebo ktoré by boli stále požívateľné, pokiaľ by boli skonsumované včas. Druhou kategóriou je potravinový odpad, ktorému sa dá potenciálne predísť, sem patria potraviny, ktoré sa nekonzumujú kvôli určitým preferenciám spotrebiteľov, alebo sa konzumujú len vtedy, ak sú pripravované určitým kulinárskym spôsobom. Tretou kategóriou je potravinový odpad, ktorému sa nedá predísť, tam zaradíme odpad z potravín, ktorý nie je určený na konzumáciu za normálnych okolností. Patria sem nepoživatelné časti potravín, alebo výrobky, ktoré sú natoľko poškodené, že ich konzumácia nie je možná (MPaRV SR, 2016). Odhaduje sa, že viac ako jedna tretina všetkých potravín vyrobených na svete, nie je skonsumovaná ale premenená na odpad (Huang et al., 2021). Na druhej strane kvôli rastúcemu počtu populácie, zhoršujúcim sa prírodným zdrojom, zvýšenou urbanizáciou a vojnovým konfliktom trpí hladom približne 690 miliónov ľudí, z toho odhadom 160 miliónov akútnym hladom. Pokiaľ sa nezastaví rastúci trend, do roku 2030 toto

číslo stúpne na 840 miliónov. Taktiež sa odhaduje, že 2 miliardy populácie nemali v roku 2019 dostatočne pravidelný prístup k zdravotne bezpečným a výživovo hodnotným potravinám (UN.org). Taký problém o globálnych rozmeroch akým je plytvanie potravinami je potrebné riešiť na medzinárodnej úrovni a zapojiť doň ako jednotlivé štáty, súkromný sektor, občianske združenia, tak aj samotných spotrebiteľov. FAO je popredným aktérom koordinácii globálnych iniciatív, aktivít a projektov v oblasti strát potravín a znižovania potravinového odpadu v partnerstve s agentúrami OSN, medzinárodnými organizáciami, súkromným sektorom a občianskou spoločnosťou (FAO.org). Výskum v oblasti potravinového odpadu naznačuje, že len malá časť celosvetového potravinového odpadu sa vytvára zo strany maloobchodu, v EÚ maloobchod produkuje približne 5 %. Avšak maloobchod zastáva silnú pozíciu na ovplyvňovanie nakladania s potravinovým odpadom v rámci dodávateľského reťazca počnúc prvovýrobou, končiac odberateľským okruhom spotrebiteľov. Viaceré výskumy poukazujú na to, že potravinový odpad často krát vzniká z dôvodov prísnych kvalitatívnych požiadaviek zo strany maloobchodu na dodávateľov týkajúcich sa vzhľadu, veľkosti alebo farby potravín, taktiež sa potravinový odpad tvorí z dôvodov obáv o bezpečnosť potravín, zmatečné označovanie dátumov spotreby a minimálnej trvanlivosti, nedostatočného odborného zaškolenia pracovníkov a silného zastúpenia marketingu vyvolávajúceho potrebu u spotrebiteľov nakúpiť často krát väčšie množstvo potravín, ako v skutočnosti potrebujú (Huang et al., 2021). EÚ sa zaviazala splniť *Cieľ udržateľného rozvoja 12.3* FAO, ktorého zámerom je znížiť do roku 2030 potravinový odpad o polovicu na obyvateľa (Fusions, 2016). V EÚ sa ročne vyhodí 88 miliónov ton potravín, čo predstavuje 173 kilogramov na osobu (MPaRV SR, 2018). S cieľom podporiť dosiahnutie cieľa trvalo udržateľného rozvoja vyzvala Európska Komisia aby sa vytvorila platforma zameraná na predchádzanie potravinovému odpadu. v roku 2016 tak vznikla platforma EÚ *Pre straty a potravinový odpad* (FLW), ktorá združuje inštitúcie EÚ a odbornú verejnosť. Jej cieľom je podporovať všetkých aktérov pri definovaní opatrení potrebných na predchádzanie plytvaniu potravinami (Fusions, 2016).

MATERIÁL A METODIKA

Naša práca je prieskumno-komparatívneho charakteru. Prieskum sme zrealizovali formou štruktúrovaného dotazníka pozostávajúceho z 26 otázok. Otázky boli zamerané na problematiku plytvania potravinami v spojitosti s návykmi a správaním sa spotrebiteľov. Dotazník nebol zameraný na konkrétnu skupinu spotrebiteľov ale na čo najširšie spektrum, tak aby odpovede čo najviac odzrkadlili spotrebiteľské vnímanie problematiky a ich správanie sa v tejto veci.

Tabuľka 1 Charakteristika vzorky respondentov

Otázka	Odpoveď	%
Pohlavie	Muž	24,8
	Žena	75,2
Vek	Menej ako 18 rokov	0,9
	18 – 30 rokov	56,4
	31 – 59 rokov	38,5
	60 a viac rokov	4,1
Pracovné zaradenie	Študent	16,1
	Zamestnaný	63,3
	Živnostník	4,1
	Materská dovolenka	7,3
	Dôchodca	3,7
	Nezamestnaný	5,5
	Potravinu automaticky vyhodím	9,6

Vzdelanie	Základné	1,8
	Stredné bez maturity	1,8
	Stredné s maturitou	26,6
	Vysokoškolské	69,7
Počet osôb v domácnosti	1 - 2	37,6
	3 - 4	51,4
	Viac ako 4	11
Počet detí v domácnosti do 15 rokov	Žiadne	69,3
	1	17,4
	2	12,4
	3 a viac	0,9
Spôsob bývania	Dom so záhradou	43,1
	Dom bez záhrady	3,2
	Byt	53,7
Veľkosť obce/mesta	Do 500 obyvateľov	3,2
	500 – 1 499 obyvateľov	9,6
	1 500 – 2 999 obyvateľov	11,5
	3 000 – 9 999	25,2
	10 000 – 49 999	15,1
	50 000 – 100 000	23,9
	Viac ako 100 000	11,5

Predmetný dotazník sme vykonali online formou pomocou GooGle Workspace. Štatistické spracovanie výsledkov a určenie vzťahov pomocou lineárnej regresie sme zrealizovali použitím Google Workspace a R-studio. Získané odpovede sme porovnávali s dostupnými literárnymi zdrojmi, štatisticky analyzovali a analyzovali vzťahy medzi jednotlivými odpoveďami. Pri stanovených hypotézach sme pracovali na hladine α 0,05. Cieľom bolo získať náhodným výberom respondentov odpovede na otázky týkajúce sa plytvania potravinami a publikovaním tejto práce prispieť ku kontinuite diskusie k tak závažnej otázke, akou je riešenie problému potravinového odpadu a plytvaniu potravinami.

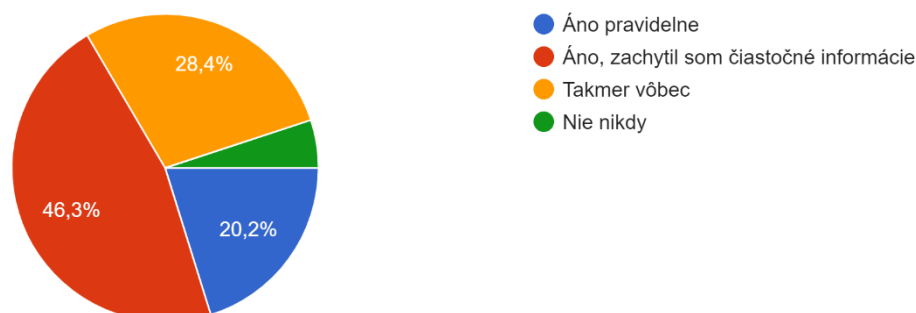
VÝSLEDKY A DISKUSIA

Odpadu z potravín a plytvaniu potravinami sa v súčasnosti venuje značná pozornosť akademikov, zástupcov súkromného sektora a štátnych inštitúcií jednotlivých krajín sveta. Plytvanie potravinami spôsobuje škody na životnom prostredí, finančné straty a tento trend má stúpajúci charakter. Veľká časť potravinového odpadu je tvorená domácnosťami, z toho dôvodu je dôležité pochopenie príčin, prečo k tomuto javu dochádza, s cieľom podniknúť preventívne kroky. Je nevyhnutné skúmať morálne postoje spotrebiteľov, ich znalosti o konzervovaní potravín, stravovacie návyky a návyky súvisiace s nakupovaním. Viaceré štúdie poukazujú na spojitosť práve medzi morálnymi postojmi spotrebiteľov, ich spôsobom stravovania, nakupovaním, znalosťami o spôsoboch správneho uskladňovania potravín a vedomosťami o aktuálnej situácii v oblasti produkcie potravinového odpadu a jeho dôsledkami. Jedným zo spôsobov zníženia produkcie potravinového odpadu domácnosťami je vplyvanie na morálne princípy samotných spotrebiteľov (Aydin, Yildirim, 2021).

Ako prvú otázku sme respondentom položili, či plytvanie potravinami pokladajú za globálny problém; 96,3 % odpovedalo kladne; len 3,7 % vyslovilo opačný názor. Plytvanie potravinami má veľký dopad na ekosystém, nakoľko produkcia potravinového odpadu spôsobuje zbytočné emisie a prispievanie k tvorbe skleníkových plynov. Pokiaľ by sme začlenili emisie spôsobené plytvaním potravín a tvorbou potravinového odpadu do štátu, tento štát by bol tretím najväčším producentom emisii hneď po Číne a USA. Približne 30 % svetovej poľnohospodárskej pôdy je v konečnom dôsledku využívaná len na produkciu potravinového

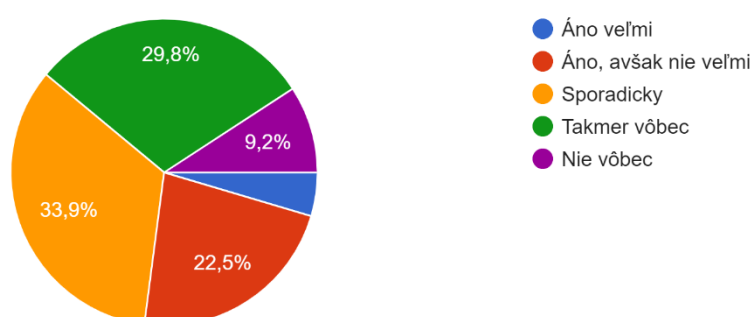
odpadu, pokiaľ sa bavíme o vynaloženej a spotrebovanej energii, tak 38 % z celkovej energie je použitej v potravinovom priemysle na výrobu potravín, ktoré nie sú skonzumované (FAO, 2017).

Obrázok 1 Grafické vyjadrenie odpovedí na otázku „Evidovali ste problematiku plytvania potravinami v médiách?“



Informovanie a edukácia obyvateľstva v problematike plytvania potravinami je nevyhnutná na zlepšenie súčasného stavu. V tejto veci zastáva významnú úlohu mediálny sektor. 29. september bol označený ako Medzinárodný deň povedomia o potravinových stratách a plytvaní potravinami, ktorého cieľom je zvýšiť povedomie u obyvateľstva o tejto problematike (ec.europa.eu; MPaRV, 2020). Výskumy potvrdzujú, že propagácia a tvorba mediálnych kampaní znižuje tvorbu potravinových strát u spotrebiteľov, či už sa jedná o formu letákov, mediálnych vystúpení, kampaní tvárou v tvár alebo informovaním cez internet a sociálne siete. Je predpoklad, že keď sa spotrebiteľia oboznámia s dopadmi tvorby potravinového odpadu na životné prostredie a oboznámia sa s aktivitami a ľuďmi, ktorí svojou činnosťou pomáhajú zredukovať potravinový odpad, tak začnú v istej miere tak konať aj oni sami (Soma, Li, Maclaren, 2020; Young et al., 2017). Respondentom sme nato položili nadväzujúcu otázku, aké množstvo sa podľa ich názoru ročne zlikviduje. Najviac respondentov (35,8 %) zastalo názor, že sa jedná o 1/3 z celkovej produkcie, čo je správny odhad (FAO, 2020). Nasledovali odpovede 1/4 zastúpená 21,6 % respondentami; 1/2 zastúpená 20,2 % respondentami; 16,5 % respondentov sa domnieva, že sa jedná o viac ako 1/2 a najmenej respondentov (6 %) zvolilo odpoveď 1/10 z celkového množstva vyprodukovaných potravín. Žiaden z respondentov neoznačil možnosť „Žiadne“, čo je pozitívom signalizujúcim, že spotrebiteľia na Slovensku si uvedomujú aktuálnu situáciu a viac ako jedna tretina opýtaných má prehľad o aktuálnych číslach.

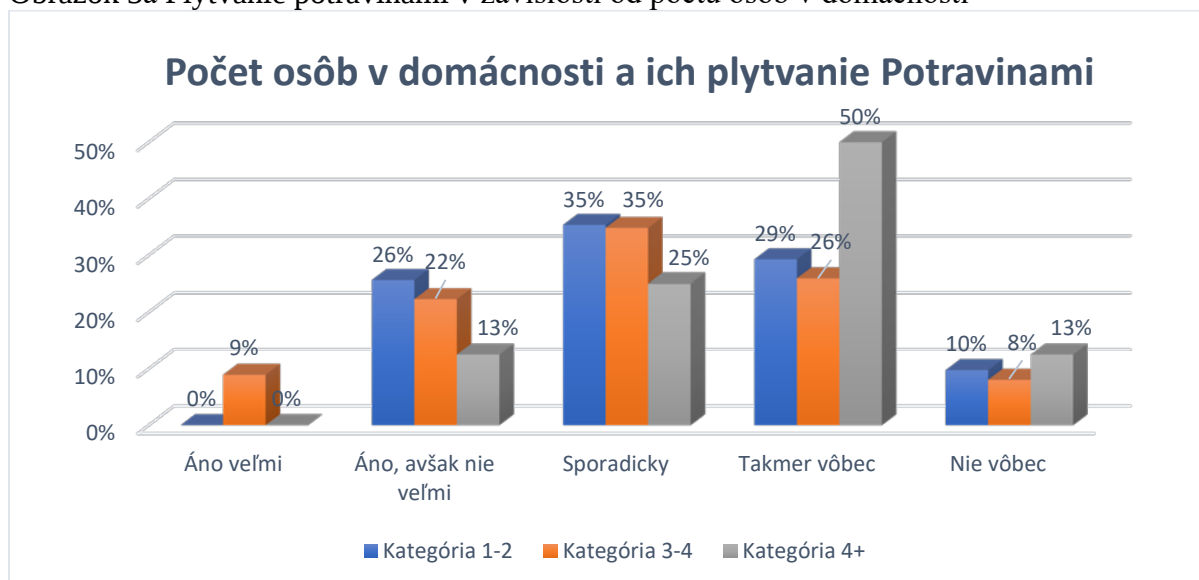
Obrázok 2 Grafické vyjadrenie odpovedí na otázku „Domnievate sa, že vo Vašej domácnosti sa plytvá s potravinami?“



Respondentom sme položili otázku, či sa domnievajú, že sa v ich domácnosti plytvá s potravinami. Len 9,2 % respondentov deklarovalo, že v ich domácnosti sa s potravinami vôbec neplytvá; 4,6 % sa vyslovilo, že plytvajú s potravinami vo veľkej miere, ostatní respondenti odpovedali, že evidujú plytvanie potravinami v ich domácnostiach, avšak buď len sporadicky, nie vo veľkej miere alebo takmer vôbec. Podobný prieskum vykonalo Ministerstvo

pôdohospodárstva a rozvoja vidieka prostredníctvom agentúry A.K.O., kde 23 % opýtaných deklarovalo, že s potravinami plytvajú, viac ako polovica z opýtaných sa v predmetnom prieskume vyslovila, že sa snaží zvyšky potravín využiť pri ďalšom varení, 34 % opýtaných uviedlo, že často krát navaria viac, ako sú schopní skonzumovať a pokrmu sa im neskôr znehodnotia (MPaRV SR, 2018). Massow et al. (2019) poukazuje, že domácnosti produkujú na týždennej báze približne 3 kg odpadu, ktorému sa dá vyhnúť.

Obrázok 3a Plytvanie potravinami v závislosti od počtu osôb v domácnosti



Z vyššie uvedených odpovedí, nás zaujímalo, či medzi počtom osôb a mierou plytvania potravín je určitý vzťah. Pomocou regresnej analýzy sme sa dopracovali k p-hodnote 0,569. Nakoľko p-hodnota je väčšia ako hladina alfa 0,05; neeviduujeme vzťah. Z grafu môžeme vidieť, že 50 % opýtaných, žijúcich v domácnosti o počte osôb viac ako 4 deklarovali minimálne plytvanie potravinami. Na druhej strane 35 % respondentov žijúcich v domácnosti samostatne, alebo s jednou ďalšou osobou odpovedali opačne.

V ďalšej otázke sme sa respondentov pýtali, ako často nakupujú potraviny; 14,7 % vyslovilo, že nakupujú potraviny na dennej báze; 1 krát týždenne nakupuje 21,1 %; najmenej spotrebiteľov nakupuje menej ako 1 krát do týždňa (1,8 %) a naopak najviac spotrebiteľov nakupuje potraviny 2 až 3 krát týždenne (62,4 %). Jedným z odporúčaní FAO pre spotrebiteľov je precízne plánovanie svojich nákupov, tak aby pokryli ich potreby, teda nakúpiť tak často a v takých intenciách, ktoré sú potrebné na uspokojenie výživových potrieb (FAO, 2020).

Obrázok 3b Grafické vyjadrenie odpovedí na otázku „Nakupujete len toľko potravín, koľko potrebujete a ste schopní včas spotrebovať?“



Väčšina respondentov sa vyslovila, že nakupujú viac ako potrebujú z dôvodu výskytu zliav v obchodných reťazcoch, len 29,4 % respondentov odpovedalo, že nakupujú len potrebné množstvo potravín. Evans (2011) vo svojej štúdii poukazuje na fakt, že väčšina spotrebiteľov

nakupuje väčšie množstvo ako je potrebné a takúto prax pokladajú za bežnú rutinu. Rôzne akcie a zľavy na potraviny ako napríklad „pri kúpe dvoch balení dostanete tretie zdarma“ spôsobuje častokrát nákup väčšieho množstva, ktoré spotrebitelia v končenom dôsledku nie sú schopní spotrebovať a takéto dôvody kúpy potravín sa uvádzajú ako významné príčiny zbytočného plytvania potravinami (Williams et al., 2012).

Jedným z ďalších odporúčaní pre spotrebiteľov na zabránenie produkcie nadbytočného potravinového odpadu je nákup aj vizuálne menej priťažlivých kusov ovocia a zeleniny, napr. takých, ktoré sú mierne pomliaždené, alebo majú na sebe viditeľné kozmetické zmeny signalizujúce ich zrelosť (FAO, 2020; de Moraes et al., 2020). Na otázku „v prípade ak vidíte v obchodnej predajni zeleninu/ovocie s vizuálnymi zmenami na povrchu, ako sú napr. hnedé škvrny na banánovej šupke, kúpite také ovocie/zeleninu?“ odpovedalo pozitívne len 7,8 % opýtaných. Viac ako polovica (51,4 %) vyslovila negatívny názor a 40,8 percent opýtaných by zvažovalo nákup takejto potraviny podľa miery a rozsahu povrchových zmien, najmä ak kozmeticky dokonalé potraviny nie sú v danom momente dostupné.

Tabuľka 2 Otázky a odpovede týkajúce sa spotrebiteľského správania sa v súvislosti s dátumom spotreby a dátumom minimálnej trvanlivosti a ich uplynutia ako faktory produkcie potravinového odpadu.

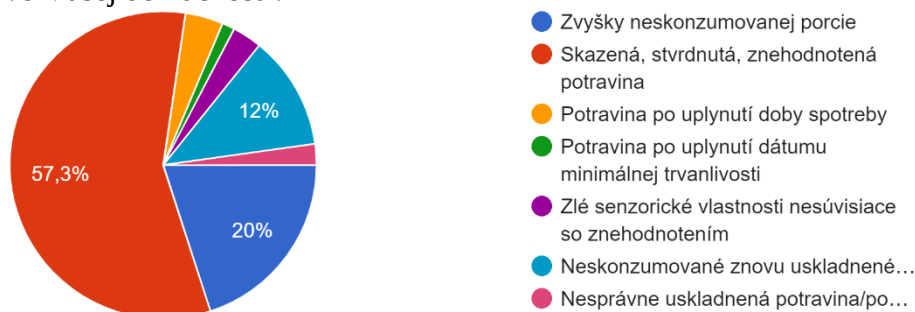
Otázka	Odpoveď	%
Viete aký je rozdiel medzi dátumom spotreby a dátumom minimálnej trvanlivosti?	Áno viem	82,1
	Nie neviem	2,8
	Domnievam sa, že viem, ale nie som si istý	15,1
Kontrolujete pri nakupovaní dátum minimálnej trvanlivosti a dátum spotreby?	Áno	50
	Nie	5
	Občas	39,4
	Kontrolujem dátum spotreby	5,5
	Kontrolujem dátum minimálnej trvanlivosti	0
Pokiaľ doma nájdete potravinu po dátume spotreby, ako sa zachováte?	Potravinu automaticky vyhodím	31,2
	Potravinu skontrolujem, pokiaľ je v poriadku, tak ju využijem	68,8
Pokiaľ doma nájdete potravinu po dátume minimálnej trvanlivosti, ako sa zachováte ?	Potravinu automaticky vyhodím	9,6
	Potravinu skontrolujem, pokiaľ je v poriadku, tak ju využijem	90,4

Jedným z faktorov ovplyvňujúcich mieru vytvárania potravinového odpadu domácnosťami je vedomosť a správne chápanie jednotlivých údajov na obaloch výrobkov. Je dôležité rozlišovať označenie potravín dátumom spotreby a dátumom minimálnej trvanlivosti. Dátum minimálnej trvanlivosti je podľa Nariadenia EÚ č. 1169/2011 o označovaní potravín „dátum, do ktorého si potravina, ak je riadne skladovaná uchováva svoje špecifické vlastnosti“. Naopak potraviny, ktoré z mikrobiologického hľadiska podliehajú rýchlo skaze a z tohto dôvodu môžu predstavovať bezprostredné nebezpečenstvo pre zdravie ľudí sa dátum minimálnej trvanlivosti nahrádza dátumom spotreby. Po uplynutí dátumu spotreby sa považuje potravina za nebezpečnú. Potravinu je často krát bezpečné konzumovať aj krátko po uplynutí dátumu minimálnej trvanlivosti pokiaľ na nej nie sú poznateľné zmeny najmä senzorického hľadiska a takáto potravina bola riadnym spôsobom skladovaná (FAO, 2020). Správne skladovanie potravín v domácnostiach a znalosti s ním spojené vo veľkej miere ovplyvňujú správanie spotrebiteľov v spojitosti s produkciou potravinového odpadu (Aschemann-Witzel, Giménez, Ares, 2018). V Tabuľke 1 môžeme vidieť, že až 82,1 % respondentov sa vyslovilo, že poznajú rozdiel medzi dátumom spotreby a dátumom minimálnej trvanlivosti, avšak podľa zozbieraných dát vidíme, že len 50 % kontroluje toto označenie na potravinách v pravidelných

intervaloch. Pozitívne hodnotené je zistenie, že až 90,4 % respondentov využije potravinu po uplynutí dátumu minimálnej trvanlivosti, ak nejaví známky skazy; 68,8 % využije aj potravinu po uplynutí dátumu spotreby, čo však nemusí byť zdravotne bezpečné, nakoľko takáto potravina je podľa platnej legislatívy braná ako zdraviu nebezpečná.

Plánovanie nákupov, správne uskladňovanie potravín a vhodné spôsoby stravovania sú kľúčové atribúty na zníženie produkcie potravinového odpadu domácnosťami (FAO, 2020). 90,4 % respondentov sa vyslovilo, že pokiaľ navaria väčšie množstvo pokrmu, ktorý nie sú schopní skonzumovať v daný deň, pokrm konzumujú aj ďalšie dni alebo ho zamrazia.

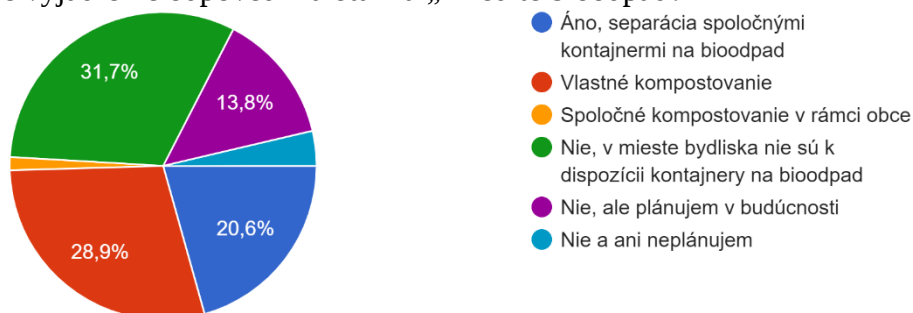
Obrázok 4 Grafické vyjadrenie odpovedí na otázku „Aké sú najčastejšie dôvody vyhodenia potravin/pokrmu vo Vašej domácnosti?”



Dôvodmi produkcie potravinového odpadu domácnosťami sa zaoberali viaceré štúdie, výsledky sú rôzne nakoľko správanie spotrebiteľov závisí od ich socio-ekonomických pomerov, stravovacích návykov, náboženského vierovyznania, znalostí o správnom uskladňovaní potravín, porozumeniu informácii na etiketách a pod. (Abdelradi, 2018; Williams et al., 2012). Medzi najčastejšie dôvody uvádzané v štúdiách patria, potraviny po expirácii, pripravené väčšie množstvo pokrmov, neskonsumované a znovu uskladnené potraviny, poškodené potraviny alebo potraviny pred uplynutím dátumu minimálnej trvanlivosti (Diaz-Ruis, Costa-Front, Gil, 2018). Nami oslovení respondenti za najčastejší dôvod vyhodenia potravín pokladajú skazenú, stvrdnutú alebo inak znehodnotenú potravinu. Takýto dôvod je najčastejší u 57,3 % nami oslovených spotrebiteľov, druhým najčastejším dôvodom, ktorý označilo 20 % respondentov sú zvyšky neskonsumovanej porcie. Tretím najčastejším dôvodom, za ktorý sa vyslovilo 12 % respondentov je neskonsumovaný a znovu uskladnený pokrm/potravina.

Jedným zo spôsobov zlepšenia situácie v oblasti plytvania potravinami a produkcie potravinového odpadu je aplikácia princípov cirkulárnej ekonomiky alebo obehového hospodárstva. Prístup EÚ k nakladaniu s odpadom je v súčasnosti riešený Rámcovou Smernicou o odpade č. 2008/98 ES, ktorá uprednostňuje predchádzanie vzniku odpadu pred opätovným použitím po ktorom nasleduje recyklácia, energetické zhodnotenie a konečné zneškodnenie. Oslovených respondentov sme sa spýtali, akým spôsobom využívajú potravinový odpad; 37,6 % používa zvyšky jedla na skrmovanie domácich zvierat; 17,4 % kompostuje; 11 % sa snaží zvyšky jedla a potravín ďalej spracovať a až 33,9 % respondentov potravinový odpad ďalej nevyužíva.

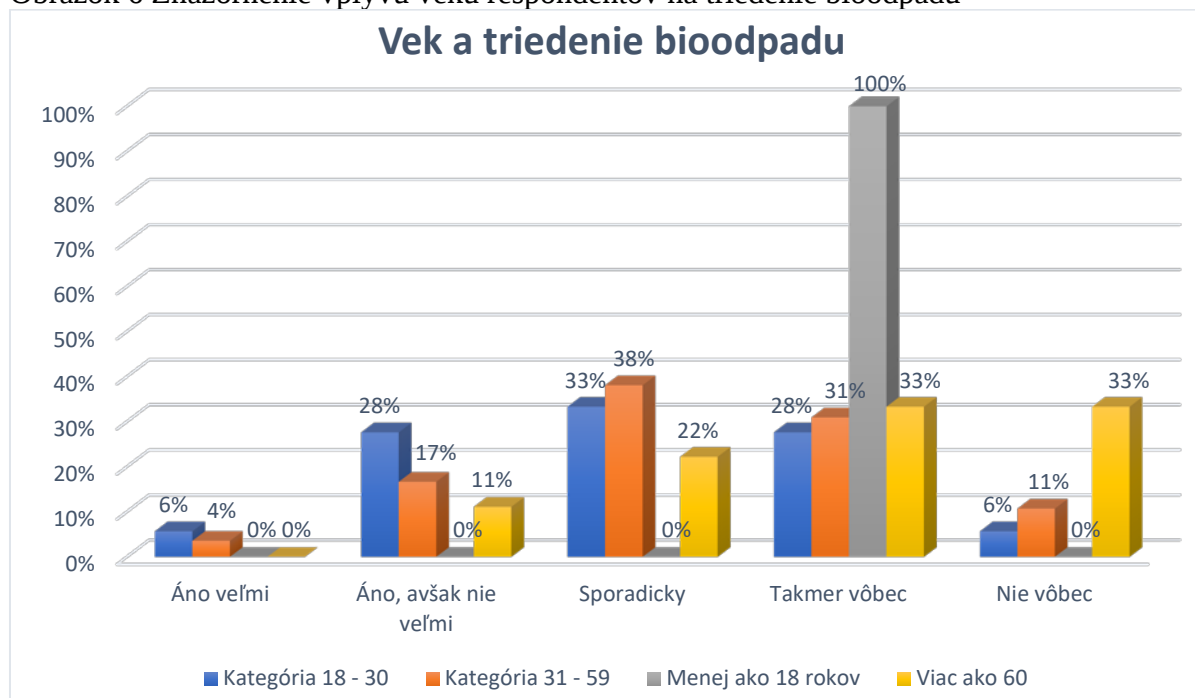
Obrázok 5 Grafické vyjadrenie odpovedí na otázku „Triedite bioodpad?“



Krajiny EÚ využívajú triedenie organického odpadu z domácností, nakoľko táto frakcia odpadu obsahuje vysokú hladinu energie a živín, teda má vysoký potenciál zhodnotenia. Najviac sa využíva spôsob spracovania organického odpadu výrobou bioplynu, aj z tohto dôvodu je EÚ v súčasnosti popredným svetovým producentom bioplynu. Anaeróbna digestcia premieňa odpad na bioplyn a digestát, ktoré sa môžu používať na výrobu elektriny, tepla, paliva a produktov na úpravu pôdy (Sadeleer, Brattebø, Callewaert, 2020). Štúdie Bernstad, Andersson (2015) a Edwards et al. (2017) preukázali, že anaeróbna digestcia má viac environmentálnych výhod ako klasické kompostovanie. Z vyššie uvedeného grafu znázorňujúceho odpovede našich respondentov na otázku, či triedia bioodpad nás najviac zaujala odpoveď zastúpená 31,7 % respondentov a teda, že bioodpad netriedia z dôvodu absencie kontajnerov na bioodpad v mieste ich bydliska. Podľa Zákona č. 79/2015 Z. z. o odpadoch sú obce povinné občanom umožniť triedenie bioodpadu, buď kompostovaním alebo formou zberných nádob.

Otázkami triedenia a využívania bioodpadu sme sa zaoberali hlbšie a to v súvislostiach s vekom respondentov, pohlavím typom bývania a veľkosťou obce/mesta, v ktorom respondenti žijú.

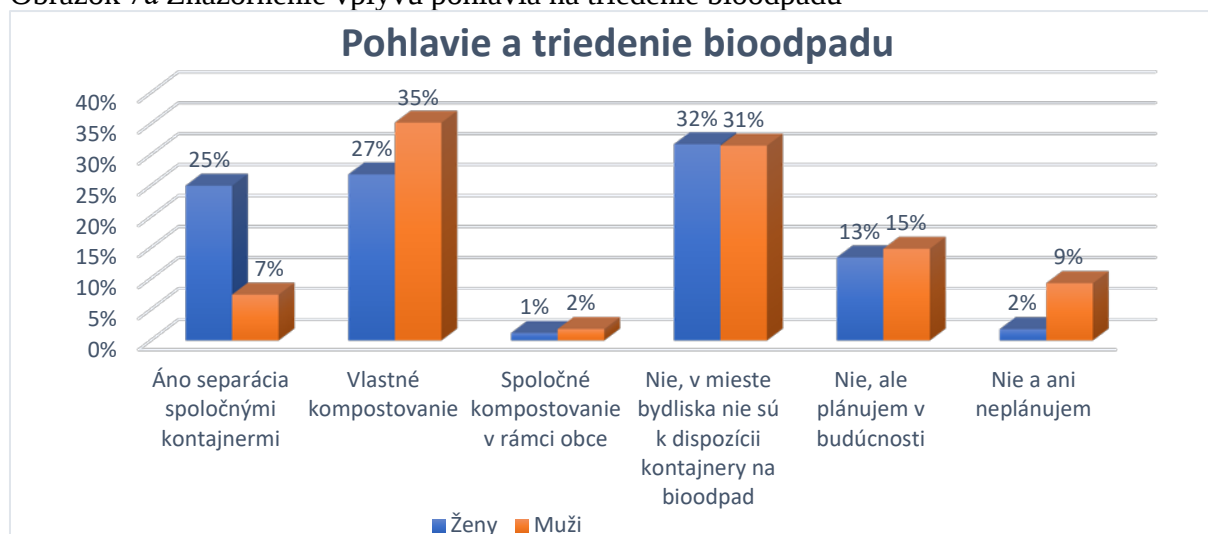
Obrázok 6 Znázornenie vplyvu veku respondentov na triedenie bioodpadu



Stanovili sme hypotézu H0, že vek neovplyvňuje triedenie bioodpadu. Alternatívnou hypotézou H1 bolo zamietnutie H0. P hodnota vyšla menšia ako alfa ($p\text{-value } 0,0014 < \alpha 0,05$), teda sme zamietli hypotézu H0 a prijali H1. Z grafu môžeme evidovať, že mladší respondenti triedia bioodpad častejšie ako starší. Respondentov vo veku menej ako 18 rokov sme nezahrnuli

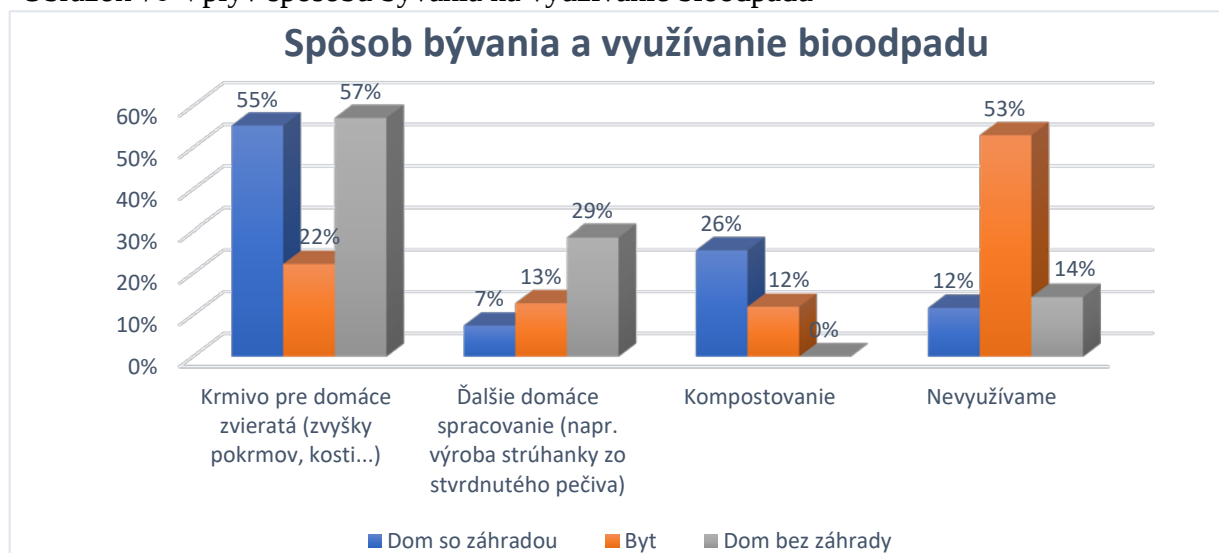
do interpretácie výsledkov, nakoľko sa jednalo len o dvoch respondentov, teda zo štatistického hľadiska ide o odľahlé hodnoty, ktoré sa výrazne líšia od ostatných pozorovaní.

Obrázok 7a Znáznornenie vplyvu pohlavia na triedenie bioodpadu



Skúmali sme demografický vzťah a to pohlavie respondentov a jeho vplyv na postoj k triedeniu bioodpadu. Hypotézy sme stanovili nasledovne. H0: Pohlavie neovplyvňuje triedenie bioodpadu. H1: Zamietnutie H0. P hodnota vyšla väčšia ako alfa ($p\text{-value } 0,615 > \alpha 0,05$), tým pádom zamietame H1 a konštatujeme, že pohlavie u našich respondentov neovplyvňuje ich správanie vo vzťahu k triedeniu bioodpadu. 35 % mužov používa vlastné kompostovanie oproti 27 % žien. Na druhej strane 25 % žien separuje pomocou spoločných kontajnerov oproti 7% mužov. Čo sa týka separovania bioodpadu v blízkosti bydliska, tak obe skupiny odpovedali takmer rovnako. Týmto zisteniami vieme jednoducho vysvetliť, prečo p-hodnota nebola menšia ako level alfa, keďže výsledky sú buď podobné, alebo úplne rozdielne.

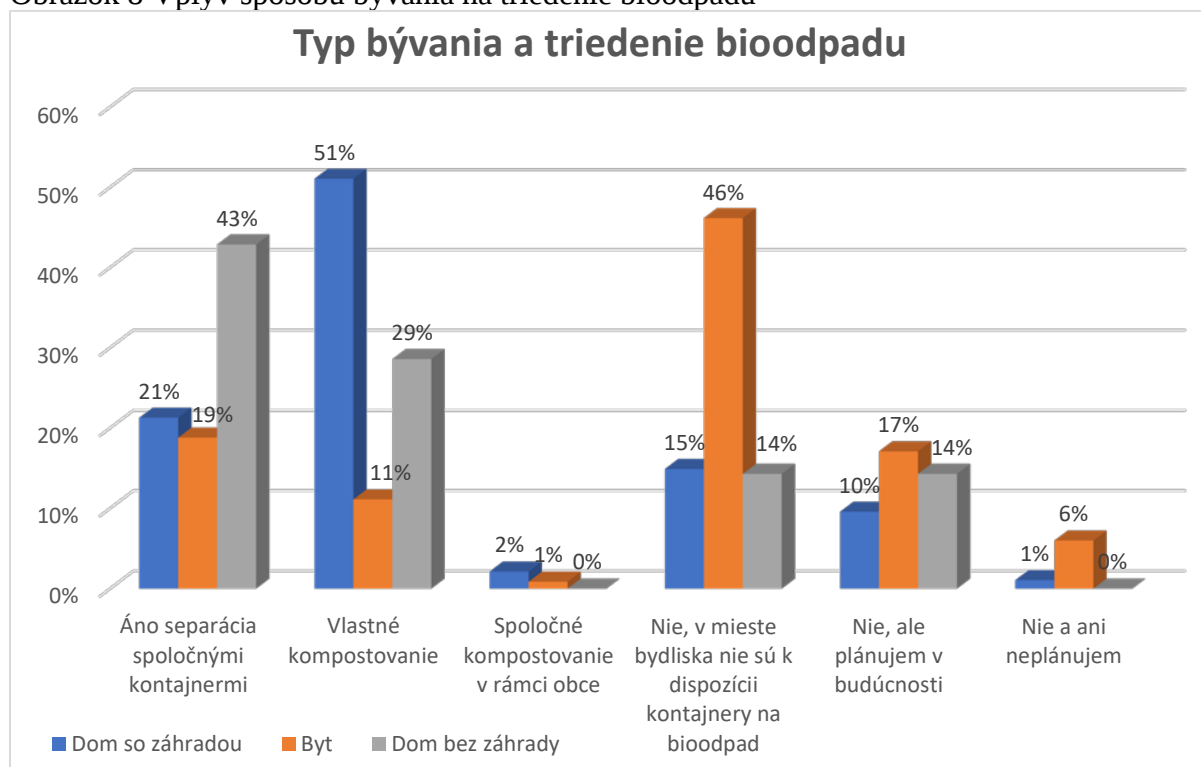
Obrázok 7b Vplyv spôsobu bývania na využívanie bioodpadu



Ďalší vzťah na skúmanie sme určili spôsob bývania a jeho vplyv na využívanie bioodpadu. Použili sme lineárnu regresiu a stanovili nasledovné hypotézy, H0: Spôsob bývania neovplyvňuje využívanie bioodpadu. H1: zamietame H0. Medzi spôsobom bývania a využívaním bioodpadu existuje štatisticky významný vzťah, nakoľko p-hodnota dosiahla 4,7518E-07 a je nižšia ako hladina alfa. Tým pádom akceptujeme alternatívnu hypotézu –

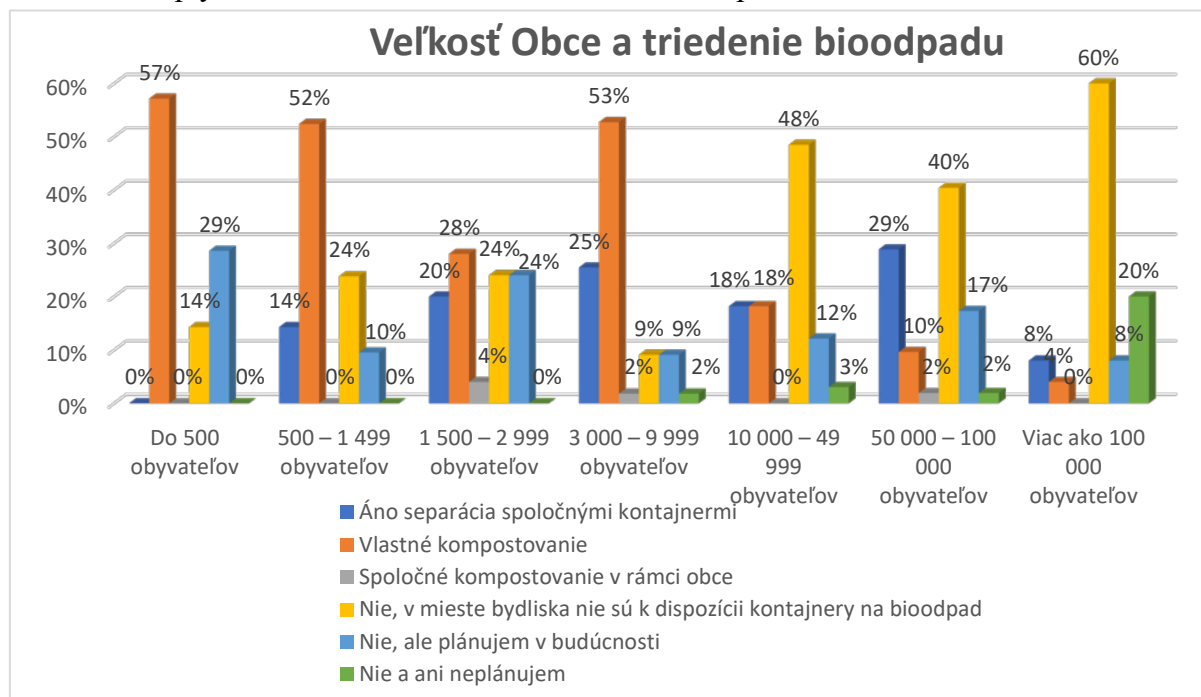
spôsob bývania ovplyvňuje využívanie bioodpadu. Z vyššie uvedeného grafu môžeme konštatovať, že zvyšky jedla najviac využívajú ľudia žijúci v dome so záhradou. Celkovo bývanie v dome má priaznivejší efekt na využívanie bioodpadu v porovnaní s bývaním v byte.

Obrázok 8 Vplyv spôsobu bývania na triedenie bioodpadu



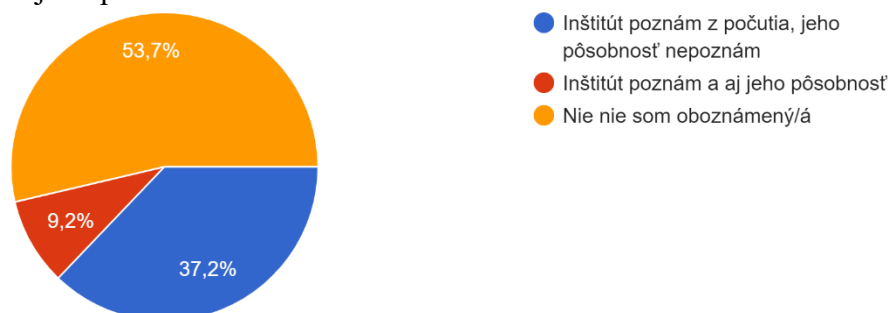
V tomto prípade sme sa zamerali na vzťah medzi spôsobom bývania a postojmi respondentov ku triedeniu bioodpadu. Nulovú hypotézu sme vyslovili nasledovne, osoby žijúce v dome triedia viac bioodpad. Výsledok regresnej analýzy nekoreluje s percentuálnym vyhodnotením. P hodnota dosiahla úroveň 0,0001, teda hypotézu H_0 zamietame. Na druhej strane je evidentné, aj po prvotnom vzhliadnutí grafu, že osoby, v našom prípade respondenti žijúci v dome so záhradou alebo bez triedia bioodpad vo väčšej miere. Tento výsledok regresnej analýzy môže byť spôsobený nedostatočným množstvom dát alebo veľkosťou hodnotiaceho súboru.

Obrázok 9 Vplyv veľkosti obce/mesta na triedenie bioodpadu



Taktiež sme sa zamerali, či veľkosť obce ovplyvňuje správanie sa respondentov vo vzťahu ku triedeniu bioodpadu. Z vyššie uvedeného konštatujeme, že áno. Nulovú hypotézu sme sformulovali nasledovne. H0: Bioodpad sa triedi v rovnakej miere v mestách a obciach, nehladiac na ich veľkosť. H1: Zamietnutie H0. Prijímame alternatívnu hypotézu, nakoľko p-hodnota nám vyšla 0,0005, čo je menšie ako level alfa. Z grafu č. 9 jednoznačne vidíme, že čím menšia obec, tým respondenti triedia odpad lepšie a naopak. V priemere, obec/mesto s počtom obyvateľov do 9 999 využíva hlavne separáciu spoločnými kontajnermi, vlastné kompostovanie a spoločné kompostovanie v rámci obce. Najpoužívanější metóda je vlastné kompostovanie. Od počtu obyvateľov 10 000, respondenti triedia odpad oveľa menej. Hlavným dôvodom je nedostatok kontajnerov na bioodpad v mieste bydliska, čo sme objasnili v grafe č. 8. Taktiež respondenti z väčších miest neprirpisujú veľkú váhu triedeniu bioodpadu.

Obrázok 10 Grafické vyjadrenie odpovedí na otázku „Ste oboznámený/á s inštitútom Potravinová banka a jeho pôsobnosťou?“



Jedným zo spôsobov predchádzania plytvania potravinami je ich darovanie, pokiaľ si je spotrebiteľ vedomý, že množstvo ktoré nakúpil nebude schopný skonzumovať a blíži sa doba expirácie (FAO, 2020). Na takýto účel slúži inštitút potravinovej banky. Potravinová banka Slovenska je občianske združenie s humanitárnym zameraním. Zhromažďuje zadarmo potraviny, skladuje a prideliuje ich humanitárnym alebo charitatívnym organizáciám, ktoré poskytujú potravinovú pomoc ľuďom v núdzi (pbs.sk). Z nášho prieskumu je vidieť, že väčšina opýtaných nepozná predmetný inštitút a ani jeho pôsobnosť, čo by jednoznačne mala napraviť mediálna kampaň. Viac spolupracujú s PBS obchodné reťazce, ktorým Zákon o potravinách č.

152/1995 Z. z. v znení neskorších predpisov umožňuje darovať potraviny aj po uplynutí dátumu minimálnej trvanlivosti (SAMO, 2019).

Záver

Zlepšenie situácie v otázke plytvania potravín a produkcie potravinového odpadu je jedným z priorít OSN ako aj EU, či jednotlivých členských štátov. V nami realizovanom online prieskume sme položili respondentom otázky týkajúce sa ich správania v otázkach plytvania potravinami a triedením bioodpadu. Odpovede sme vyhodnotili percentuálne a skúmali sme vzťahy medzi jednotlivými zisteniami pomocou lineárnej regresie. V práci konštatujeme, že nami oslovení spotrebitelia si uvedomujú závažnosť situácie avšak väčšina z nich je presvedčená, že potravinami sa v ich domácnostiach plytvá v určitej miere, čoho dôvodmi sú nákupy väčšieho množstva potravín a príprava väčšieho množstva pokrmov ako sú schopní skonzumovať. Cirkulárna ekonomika je trendom 21. storočia a má svoje opodstatnenie nie len v priemysle ale aj v samotných domácnostiach. Konštatujeme, že z nášho prieskumu vychádza, že ľudia žijúci prevažne v domoch a v menších mestách využívajú a triedia odpad efektívnejšie a častejšie.

LITERATÚRA

- Abdelradi, F. 2018. Food waste behaviour at the household level: A conceptual framework. In *Waste Management*, vol. 71, pp. 485-493. ISSN: 0956-053X. DOI: 10.1016/j.wasman.2017.10.001
- Aschemann-Witzel, J. – Giménez, A. – Ares, G. 2018. Convenience or price orientation? Consumer characteristics influencing food waste behaviour in the context of an emerging country and the impact on future sustainability of the global food sector. In *Global Environmental Change*, vol. 49, pp. 85-94. ISSN: 0959-3780. DOI: 10.1016/j.gloenvcha.2018.02.002
- Aydin, A. – Yildirim, P. 2021. Understanding food waste behaviour: The role of morals, habits and knowledge. In *Journal of Cleaner Production*, vol. 280, no. 1. ISSN: 0959-6526. DOI: 10.1016/j.jclepro.2020.124250
- Bernstad, A. – Andersson, T. 2015. Food waste minimization from a life-cycle perspective. In *Journal of Environmental Management*, vol. 147, pp. 219-226. ISSN: 0301-4797. DOI: 10.1016/j.jenvman.2014.07.048
- De Moraes, C. et al. 2020. Retail food waste: mapping causes and reduction practices. In *Journal of Cleaner Production*, vol. 256. ISSN: 0959-6526. DOI: 10.1016/j.jclepro.2020.120124
- Díaz-Ruiz, R. – Costa-Front, M. – Gil, J. 2018. Moving ahead from food-related behaviours: an alternative approach to understand household food waste generation. In *Journal of Cleaner Production*, vol. 172, pp. 1140-1151. ISSN: 0959-6526. DOI: 10.1016/j.jclepro.2017.10.148
- Edwards, J. et al. 2017. Anaerobic co-digestion of municipal food waste and sewage sludge: A comparative life cycle assessment in the context of a waste service provision. In *Bio resource Technology*, vol. 223, pp. 237-249. ISSN: 0960-8524. DOI: 10.1016/j.biortech.2016.10.044
- EUROPEAN COMMISSION. *International Day of Awareness of Food Loss and Waste*. https://ec.europa.eu/food/safety/food_waste/international-day_en
- Evans, D. 2011. Blaming the consumer – once again: the social and material contexts of everyday food waste practices in some English households. In *Critical Public Health*, vol. 21, no. 4, pp. 429-440. ISSN: 0958-1596. DOI: 10.1080/09581596.2011.608797
- FAO. 2017. *SAVE FOOD FOR A BETTER CLIMATE*. Rome : FAO. 27 s. ISBN: 978-92-5-109989-6
- FAO. *Ensure sustainable consumption and production patterns*. <http://www.fao.org/sustainable-development-goals/goals/goal-12/en/>
- FAO. *Sustainable Development Goals*. <http://www.fao.org/sustainable-development-goals/indicators/12.3.1/en/>
- FAO. *Food Loss and Food Waste*. <http://www.fao.org/food-loss-and-food-waste/flw-data>
- FAO. 2017. *Save Food For a Better Climate*. Rome : FAO. ISBN: 978-92-5-109989-6
- FAO. 2020. *15 quick tips for reducing food waste and becoming a Food hero*. <http://www.fao.org/fao-stories/article/en/c/1309609/>
- Fusions. 2016. *Estimates of European food waste levels*. Stockholm : European Commission. ISBN: 978-88319-01-2
- Huang, I. et al. 2021. Food waste management. In *Journal of Cleaner Production*, vol. 285. ISSN: 0959-6526. DOI: 10.1016/j.jclepro.2020.125484
- MPaRV. 2016. *Plán predchádzania plytvaniu potravinami*.
- MPaRV. 2018. *Plytvanie potravinami neobchádza ani Slovensko, priemerne každý vyhodí vyše sto kilogramov jedla ročne* [tlačová správa]. <https://www.mpsr.sk/plytvanie-potravinami-neobchadza-ani-slovensko-priemerne-kazdy-vyhodi-vyse-sto-kilogramov-jedla-rocne/52-111--12902>

MPaRV. 2020. *Plytvanie jedlom a potravinami sa každoročne dotýka aj Slovákov*. <https://www.mpsr.sk/aktualne/plytvanie-jedlom-a-potravinami-sa-kazdorocne-dotyka-aj-slovakov/15901/>

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

OSN. *SUSTAINABLE DEVELOPMENT GOALS, Goal2: Zero Hunger*. <https://www.un.org/sustainabledevelopment/hunger/>

Sadeller, I. – Brattebø, H. – Callewaert, P. 2020. Waste prevention, energy recovery or recycling – Directions for household food waste management in light of circular economy policy. In *Resources, Conservation and Recycling*, vol. 160. ISSN: 0921-3449. DOI: 10.1016/j.resconrec.2020.104908

SAMO. 2019. *Darovanie potravín obchodníkmi pre charitu po uplynutí DMT schválili, no platiť bude až od roku 2024*. <https://www.modernyobchod.sk/aktuality/darovanie-potravin-obchodnikmi-pre-charitu-po-uplynuti-dmt-schvalili-no-platiť-bude-az-od-roku-2024/>

Smernica Európskeho parlamentu a Rady 2008/98/ES z 19. novembra 2008 o odpade a o zrušení určitých smerníc

Soma, T – Li, B – Maclaren, V. 2020. Food Waste Reduction: A test of Three Consumer Awareness Interventions. In *Sustainability*, vol. 12, no. 3, pp. 907-926. ISSN: 2071-1050. DOI: 10.3390/su12030907

Williams, H. et al. 2012. Reasons for household food waste with special attention to packaging. In *Journal of Cleaner Production*, vol. 24, pp. 141-148. ISSN: 0959-6526. DOI: 10.1016/j.jclepro.2011.11.044

Young, W. et al. 2017. Can social media be a tool for reducing consumers' food waste? A behaviour change experiment by a UK retailer. In *Resources, Conservation and Recycling*, vol. 117, part B, pp. 195-203. ISSN: 0921-3449. DOI: 10.1016/j.resconrec.2016.10.016

Zákon č. 79/2015 Z. z. o odpadoch a o zmene a doplnení niektorých zákonov

Zákon č. 152/1995 Z. z. o potravinách v znení neskorších predpisov

Pod'akovanie: 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.

Kontaktná adresa: Ing. Tomáš Vlčko, Katedra hygieny a bezpečnosti potravín, Fakulta biotechnológie a potravinárstva, Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre, Trieda A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovensko. E-mail: tomasvlcko01@gmail.com

DETEKCIA DRUHOV RODU *ENTEROCOCCUS*. V SYROCH A ICH ANTIMIKROBIÁLNA REZISTENCIA. DETECTION OF *ENTEROCOCCUS* SPP. AND THEIR ANTIMICROBIAL RESISTANCE IN CHEESES

*Jana Výrostková, Ivana Regecová, František Zigo, Eva Dudriková, Jana Maľová,
Boris Semjon*

Abstract: The aim of our study was to examine the presence of bacteria of genus *Enterococcus* spp. isolated from traditional sheep and goat cheeses and then point out the antimicrobial resistance in a selected part of the border area of Slovakia with Hungary (Slanské vrchy region). After isolation and identification by polymerase chain reaction and mass spectrometry, 110 isolates of *Enterococcus* spp. confirmed *E. faecium* (12), *E. faecalis* (28) and *E. durans* (12). Subsequently, these strains were subjected to antimicrobial resistance to nine antibiotics. The *E. faecalis* strain showed higher resistance than *E. durans* and *E. faecium*. A high percentage of resistance was observed in *E. faecalis* to rifampicin (100%), vancomycin (86%), teicoplanin (71%), erythromycin (71%), minocycline (57%), nitrofurantoin (57%), ciprofloxacin (14%), levofloxacin (14%). *E. durans* showed resistance to rifampicin (100%), teicoplanin (100%), vancomycin (67%), erythromycin (67%), nitrofurantoin (67%), minocycline (33%) and *E. faecium* to vancomycin, teicoplanin, erythromycin (100%). Continuous identification of *Enterococcus* spp. and monitoring of their occurrence and emerging antibiotic resistance is important to avoid potential risks to public health due to contamination of milk and other dairy.

Keywords: *Enterococcus* spp., antimicrobial resistance, antibiotic

ÚVOD

Enterococcus spp. je grampozitívna baktéria nachádzajúca sa v tráviacom trakte zvierat, ľudí ako aj hmyzu (Li et al., 2017). Ich špecifické vlastnosti prežívania pri vyšších teplotách z nich robia potencionálne baktérie v rôznych potravinových systémoch. Niektoré štúdie naznačujú, že enterokoky by mohli mať veľmi dobré využitie pri spracovaní určitých fermentovaných mliečnych výrobkov ako sú syry, a to z dôvodu predĺženia ich trvanlivosti, zlepšenia ich organoleptických vlastností a ovplyvnenia tak výslednej kvality určitých druhov syra (Giraffa, 2003; Ispirli, 2017).

Niektorí autori považujú výskyt enterokokov v potravinách za indikátor nesprávnej výrobnjej praxe a kontaminácie výrobkov, keďže sú bežne prítomné v surovom mlieku, čo zdôrazňuje dôležitosť zamerania pozornosti ako na suroviny používané pri výrobe syra tak aj na prostriedky s ktorými prichádzajú počas výroby do styku (Husein, 2020)

Okrem technologických funkcií enterokokov, môžeme hovoriť o produkcii enterocínov ako súčasť bakteriocínov (Russo et al., 2018), čo vedie k inhibícii určitých patogénov počas fermentácie a obdobia zrecieho procesu syrov. Táto vlastnosť ich zaraďuje medzi probiotické organizmy ale keďže sa môžu vyskytovať v gastrointestinálnom trakte ako aj fermentovaných potravinárskych výrobkov, môžu vykazovať rôzne úrovne rezistencie na antibiotiká, čo je jednou z hlavných obáv týchto izolátov z potravín (Nueno-Palop a Narbad, 2011). Enterokoky sa môžu prispôbiť nepriaznivým podmienkam prostredia. Všeobecne sú známe odolnosťou voči antibiotikám (Arias a Murray, 2012). Stali sa uznávanými ako dôležité hlavné nozokomiálne patogény vďaka svojej prirodzenej rezistencii na niekoľko antimikrobiálnych látok (napr. Penicilín, ampicilín a väčšina cefalosporínov) a schopnosti rýchlo získať virulenciu (Kristich et al., 2014).

Antimikrobiálna rezistencia je kritickým problémom verejného zdravia a dohľad nad rezistentnými kmeňmi z rôznych prostredí je dôležitou súčasťou akejkoľvek národnej stratégie boja proti baktériám rezistentným na antimikrobiálne látky (Tyson et al., 2018).

Väčšina štúdií sa zaoberá prevalenciou antimikrobiálnej rezistencie enterokokov v mliečnych výrobkoch z kravského mlieka, avšak absentujú štúdie o antimikrobiálnej rezistencii enterokokov v mliečnych výrobkoch z ovčích a kozích mliek na úrovni miestnych fariem.

Cieľom našej štúdie bolo zistiť prítomnosť baktérií rodu *Enterococcus* spp. izolovaných z tradičných ovčích a kozích syrov a poukázať na antimikrobiálnu rezistenciu vo vybranej časti pohraničnej oblasti Slovenska s Maďarskom (región Slanské vrchy).

MATERIÁL A METODIKA

Od mája do septembra 2020 sme izolovali kmene enterokokov zo vzoriek ovčích (n = 10) a kozích (n = 10) syrov. Syry sa vyrábali z nepasterizovaného mlieka bez pridania čistých mliekarenských kultúr a zreli 30 dní. Následne bola zo všetkých testovaných vzoriek pripravená základná suspenzia a desatinné zriedenia podľa STN EN ISO 6887-5 (2010). Izoláty enterokokov zo skúmaných vzoriek boli izolované podľa Čanigovej et al. (2012).

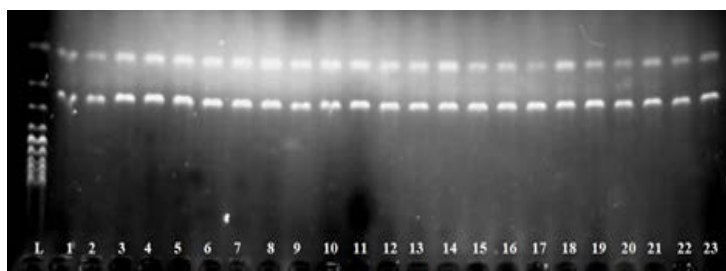
Na prípravu vzoriek na identifikáciu MALDI-TOF-MS sa použil extrakčný postup s použitím etanolu a kyseliny mravčej. Analýza výsledkov sa uskutočňovala na prístroji Ultraflex III a softvéri Flex Analysis, verzia 3.0. Výsledky boli vyhodnotené pomocou softvéru BioTyper, verzia 1.1 (Bruker Daltonics, Massachusetts, USA), kde bola podobnosť medzi hmotnostným spektrom izolátov a referenčným hmotnostným spektrom MALDI-TOF vyjadrená skórovaním. Vzorky boli analyzované v spolupráci s Ústavom fyziológie živočíchov SAV v Košiciach

Celková genómová DNA bola izolovaná z enterokokových kmeňov, ako je opísané v Hein et al., (2005). Na identifikáciu rodu *Enterococcus* sa použila metóda PCR podľa Ke et al., (1999), Martineau et al., 1996. Identifikované kmene *E. faecium*, *E. faecalis* a *E. durans* sa podrobili testovaniu na citlivosť voči antibiotikám agarovou dilučnou metódou (ADM) podľa postupu opísaného v dokumente CLSI M100-S30:2020. Na stanovenie minimálnych inhibičných koncentrácií (MIC) sa použili testovacie platne s konečnou koncentráciou antibiotík: Vankomycín (VAN) 2,0; 4,0; 8,0; 16,0; 32,0; 64,0 mg.l⁻¹; Teikoplanín (TEC) 4,0; 8,0; 16,0; 32,0; 64,0 mg.l⁻¹; Erytromycín (E) 0,5; 1,0; 2,0; 4,0; 8,0; 16,0 mg.l⁻¹; Doxycyklín (DO) 2,0; 4,0; 8,0; 16,0; 32,0 mg.l⁻¹; Minocyklín (MH) 2,0; 4,0; 8,0; 16,0; 32,0 mg.l⁻¹; Ciprofloxacín (CIP) 0,5; 1,0; 2,0; 4,0; 8,0 mg.l⁻¹; Levofloxacín (L) 1,0; 2,0; 4,0; 8,0; 16,0 mg.l⁻¹; Nitrofurantoin (F) 16,0; 32,0; 64,0; 128,0; 256,0 mg.l⁻¹; Rifampicín (RD) 0,5; 1,0; 2,0; 4,0; 8,0 mg.l⁻¹.

Referenčný kmeň *Enterococcus* (*E.*) *faecalis* CCM 4224 (Česká zbierka mikroorganizmov, Brno, Česká republika) bol v tejto štúdií použitý ako referenčný kmeň pre metódu PCR a ADM.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Mikrobiologickým kultivačným vyšetrením jednotlivých vzoriek syrov a následnou identifikáciou izolátov metódou PCR sme získali 110 izolátov *Enterococcus* spp. (Obr. 1).



Obrázok 1 Identifikácia izolátov *Enterococcus* spp. pomocou PCR metódy L – 100 bp ladder; dráha 1 – referenčný kmeň CCM 4224 *E. faecalis* (112 bp) a interná kontrola (241 bp); dráhy 2 až 23 – izolát *Enterococcus* spp.

Následne sme vykonali druhovú identifikáciu 110 vyšetrených izolátov metódou MALDI-TOF MS, identifikovali sme 3 bakteriálne druhy, a to *E. faecium* (12 izolátov), *E. faecalis* (28 izolátov), *E. durans* (12 izolátov). Hodnota skóre identifikovaných kmeňov pre izoláty *E. faecium* sa pohybovala od 2.062 do 2.183, pre *E. faecalis* sa pohybovala medzi 1.992-2.101 a pre *E. durans* sa skóre pohybovalo medzi 2.000-1.220. Hmotnostná spektrometria s laserovou absorpciou / ionizačnou maticou (MALDI-TOF MS) umožnila v poslednom desaťročí rýchlu a presnú identifikáciu mnohých mikroorganizmov. MALDI-TOF MS bola modifikovaná tak, aby identifikovala baktérie, a metóda bola najskôr adaptovaná na kvasinky (Cassagne et al., 2016; Böhme et al., 2016).

Pretože výrobky z kozieho a ovčieho mlieka sú dobrým substrátom pre rast rezistentných baktérií *Enterococcus* spp., pristúpili sme k identifikácii skúmaných izolátov z hľadiska ich odolnosti voči vybraným antibiotikám.

Table 1. Počet rezistentných (R), stredne citlivých (IS) a citlivých (S) druhov *Enterococcus* spp.

ATB	Testované kmene enterokokov								
	<i>E. faecium</i>			<i>E. faecalis</i>			<i>E. durans</i>		
	(n = 12)			(n = 28)			(n = 12)		
	S	IS	R	S	IS	R	S	IS	R
VA	0	0	12	4	0	24	4	0	8
TEC	0	0	12	8	0	20	0	0	12
E	12	0	12	0	8	20	4	0	8
DO	12	0	0	20	8	0	12	0	0
MH	12	0	0	4	8	16	0	8	4
CIP	12	0	0	16	8	4	12	0	0
L	12	0	0	24	0	4	12	0	0
F	8	4	0	8	4	16	0	4	8
RD	12	0	0	0	0	28	0	0	12

Vysvetlivky: VA-vankomycín; TEC-teikoplanín; E-erytromycín; DO-doxycyklín; MH-minocyclín; CIP-ciprofloxacín; L-linezoid; F-nitrofuracion; RD-rifampicín

Z tabuľky 1 vyplýva, že 100 % rezistencia voči vancomycínu, teikoplanínu a erytromycínu bola pozorovaná u *E. faecium*. *E. faecalis* potvrdil 86 % rezistenciu na vancomycín a 71 % rezistenciu na teikoplanín a erytromycín. *E. durans* vykazoval 100 % rezistenciu na teikoplanín a rifampicín, a taktiež 67 % rezistenciu na vancomycín a erytromycín. Vývoj antimikrobiálnej rezistencie predstavuje obrovské problémy pri liečbe postihnutého jedinca. Väčšina izolátov *E. faecium* je dnes rezistentná na ampicilín a vancomycín a vykazuje vysokú rezistenciu na aminoglykozidy, čo sú tri najtradičnejšie najužitočnejšie anti-enterokokové antibiotiká (Arias et al., 2010)

E. faecium a *E. faecalis* môžu predstavovať problém verejného zdravia pre svoju rezistenciu na cefalosporíny, linkozamidy, penicilíny a nízku hladinu aminoglykozidov (Hammad et al., 2015). Enterokoky izolované z mliečnych výrobkov tiež exprimujú podobný génový profil virulencie ako profily spojené s ľudskými infekciami (Gaglio et al., 2016). *E. durans* patrí medzi baktérie citlivé na vancomycín, ampicilín, tetracyklín, chloramfenikol a aminoglykozidy (Russo et al., 2018). Nepretržitá identifikácia *Enterococcus* spp. a

monitorovanie ich výskytu a vznikajúcej rezistencie na antibiotiká je dôležité z dôvodu zabránenia možného rizika pre verejné zdravie v dôsledku kontaminácie mlieka a iných mliečnych výrobkov.

ZÁVER

Naša štúdia poukazuje na prevalenciu antimikrobiálnej rezistencie enterokokov v mliečnych výrobkoch z kozieho a ovčieho mlieka. Prítomnosť rezistentných enterokokov naznačuje riziko šírenia rezistencie na antibiotiká v potravinách živočíšneho pôvodu. Štúdia prispieva k získavaniu poznatkov v nami vybranej oblasti a poukazuje na nedostatok informácií o miestnych štúdiách a výrobkoch z mlieka produkovaných na farmách.

LITERATÚRA

- Arias, C. A., Murray, B. E. 2012. The rise of the *Enterococcus*: beyond vancomycin resistance. In *Nature Reviews Microbiology*, vol. 10, p. 266-278. [cit. 2021-01-14]. ISSN: 1740-1534. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2761>
- Arias, C. A., Contreras, G. A., Murray, B. E. 2010. Management of multidrug-resistant enterococcal infections. In *Clin Microbiol Infect*, vol. 16, p. 555-562. [cit. 2021-01-10]. ISSN: 1473-5644 doi:10.1111/j.1469-0691.2010.03214.x.
- Bruker Daltonics, MALDI Biotyper 2.0. 2008. Software for microorganism identification and classification user manual. USA: Bruker Scientific LLC.
- Böhme, K., Antelo, S. C., Fernández-No, I. C., Quintela-Baluja, M., Barros-Velázquez, J., Cañas, B., Calo-Mata, P. 2016. Chapter 15 - Detection of Foodborne Pathogens Using MALDI-TOF Mass Spectrometry. In Barros-Velázquez, J. 2016. *Antimicrobial Food Packaging*. Academic Press, 676 p. ISBN 978-0-12-800723-5.
- Cassagne, C., Normand, A. C., L'Ollivier, C., Ranque, S., Piarroux, R. 2016. Performance of MALDI-TOF MS platforms for fungal identification. In *Mycoses*, vol. 59, p. 678-690. [cit. 2021-01-10]. ISSN: 1439-0507. <https://doi.org/10.1111/myc.12506>
- CLSI document M100 – S30:2020. *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Thirtieth informational supplement*. Wayne, PA, USA: Clinical and Laboratory Standards Institute.
- Hussein, W. E., Abdelhamid, A. G., Rocha-Mendoza, D., García-Cano, I., Yousef, A. E. 2020. Assessment of safety and probiotic traits of *Enterococcus durans* OSY-EGY, isolated from Egyptian artisanal cheese, using comparative genomics and phenotypic analyses. In *Frontiers in microbiology*, vol. 11. [cit. 2021-01-12]. ISSN: 0894-0282 <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.608314>
- Čanigová, M., Ducková, V., Kročko, M., Račková, J., Bezeková, J. 2012. Enterococci and their ability to form a biofilm. In *Slovak J Food Scie*, vol. 6, no. 2, p. 15-18. [cit. 2021-01-09]. ISSN: 1337-0960. <https://doi.org/10.5219/200>
- Gaglio, R., Couto, N., Marques, C., Lopes, M. D. F. S., Moschetti, G., Pomba, C., Settanni, L. 2016. Evaluation of antimicrobial resistance and virulence of enterococci from equipment surfaces, raw materials, and traditional cheeses. In *Int J Food Microbiol*, vol. 236, p. 107-114. [cit. 2021-01-14]. ISSN: 0168-1605. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.07.020>
- Giraffa, G. 2003. Functionality of enterococci in dairy products. In *Int. J. Food Microbiol*, vol. 88, p. 215–222. [cit. 2021-01-16]. ISSN: 0168-1605. [https://doi.org/10.1016/s0168-1605\(03\)00183-1](https://doi.org/10.1016/s0168-1605(03)00183-1)
- Hammad, A. M., Hassan, H. A., Shimamoto, T. 2015. Prevalence, antibiotic resistance and virulence of *Enterococcus* spp. in Egyptian fresh raw milk cheese. In *Food control*, vol. 50, p. 815-820. [cit. 2021-01-07]. ISSN: 0956-7135. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.10.020>
- Hein I, Jorgensen HJ, Loncarevic S, Wagner M (2005) Quantification of *Staphylococcus aureus* in unpasteurised bovine and caprine milk by real-time PCR. *Res Microbiol*. 156: 554-563. [cit. 2021-01-14] ISSN: 0923-2508 <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2005.01.003>
- 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 ISO 6887-5:2010
- İspirli, H., Demirbaş, F., Dertli, E. 2017. Characterization of functional properties of *Enterococcus* spp. isolated from Turkish white cheese. In *LWT*, vol. 75, p. 358-365. [cit. 2021-01-06]. ISSN: 0023-6438. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.09.010>
- Ke, D. F. J., Picard, F., Martineau, Ch., Ménard, P. H., Roy, M., Ouellette, M. G., Bergeron. 1999. Development of a PCR assay for rapid detection of enterococci. In *Journal of Clinical Microbiology*, p. 3497-3503. [cit. 2021-01-18]. ISSN: 0095-1137. <https://doi.org/10.1128/jcm.37.11.3497-3503.1999>
- Kristich, C. J., L. B. Rice, C. A. Arias. 2014. Enterococcal infection-treatment and antibiotic resistance. In Gilmore, M. S., Clewell, D. B., Ike, Y., Shankar, N. *Enterococci: From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection*. Boston, Massachusetts Eye and Ear Infirmary

- Li, P., Gu, Q., Wang, Y., Yu, Y., Yang, L., Chen, J. V. 2017. Novel vitamin B₁₂-producing *Enterococcus* spp. and preliminary in vitro evaluation of probiotic potentials. In *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 101, p. 6155-6164. [cit. 2021-01-06]. ISSN: 1432-0614. <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8373-7>
- Martineau, F., Picard, F. J., Roy, P. H., Ouellette, M. and Bergeron, M. G. 1996. Species-specific and ubiquitous DNA-based assays for rapid identification of *Staphylococcus epidermidis*. In *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 34, no. 12, p. 2888-2893. [cit. 2021-01-12]. ISSN: 0095-1137.
- Nueno-Palop, C., Narbad, A. 2011. Probiotic assessment of *Enterococcus faecalis* CP58 isolated from human gut. In *International Journal of Food Microbiology*, vol. 145, p. 390-394. [cit. 2021-01-14]. ISSN: 0168-1605. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.12.029>
- Russo, N., Caggia, C., Pino, A., Coque, T. M., Arioli, S., Randazzo, C. L. 2018. *Enterococcus* spp. in ragusano PDO and pecorino siciliano cheese types: a snapshot of their antibiotic resistance distribution. In *Food and Chemical Toxicology*, vol. 120, p. 277-286. [cit. 2021-01-11]. ISSN: 0278-6915. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.07.023>
- Tyson, G. H., Sabo, J. L., Rice-Trujillo, C., Hernandez, J. and McDermott, P. F. 2018. Whole-genome sequencing based characterization of antimicrobial resistance in *Enterococcus*. In *Pathogens and Disease*, vol. 76. [cit. 2021-01-13]. ISSN: 2049-632X. <https://doi.org/10.1093/femspd/fty018>

Pod'akovanie: Táto práca bola podporená grantom APVV no. SK-PL18-0088, KEGA no. 006UVLF-4-2020, VEGA no. 1-0529-19.

Kontaktná adresa: Jana Výrostková, Ivana Regecová, František Zigo, Eva Dudriková, Jana Maľová, Boris Semjon, Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, Komenského 73, 041 81 Košice

HYGIENICKO-EPIDEMIOLOGICKÉ ASPEKTY VÝSKYTU VÍRUSOVÝCH GASTROENTERITÍD NA SLOVENSKU HYGIENE-EPIDEMIOLOGICAL ASPECTS OF VIRAL GASTROENTERITISES OCCURRENCE IN SLOVAKIA

Zeleňáková Lucia

Abstract: The aim of the study was to describe the hygiene-epidemiological aspects of viral gastroenteritis occurrence in Slovakia during the period 2011 – 2020. These epidemiological indicators were analysed and evaluated: total prevalence, age and gender distribution, geographical location and seasonality of infectious disease, factors of transmission, preventive and repressive measures. Viral gastroenteritis's (A08.-) belong to the diseases with the highest morbidity in Slovakia. For the period 2011 – 2020 were reported 67 246 infections in human. The most diseases were reported in 2019 with the number 8996 (165.05 morbidity/100 000 inhabitants). Viral gastroenteritis were usually transmitted in the risk group of people (children in 0 – 4 age, seniors 65< and gypsies) by the faecal-oral way, either through person-to-person contact or ingestion of contaminated food or water. The best prevention is active immunization by vaccines as well as appropriate socio-hygienic conditions for life.

Key words: viruses, gastroenteritis, foodborne diseases, epidemiology, EPIS

ÚVOD

Infekčná choroba predstavuje proces, ktorý sa začína po preniknutí pôvodcu nákazy do organizmu človeka, pokračuje rozmnožovaním pôvodcu a vyvolaním skrytých alebo zjavných prejavov nákazy. Črevné nákazy tvoria rozsiahlu skupinu infekčných chorôb s charakteristickou lokalizáciou infekčného procesu v črevách. Infekcia sa prenáša interhumánnou cestou. Pôvodcovia črevných nákaz opúšťajú organizmus stolicou, prípadne močom, a do ďalšieho organizmu vnikajú ústnou dutinou (URL 1).

Vírusy predstavujú veľkú skupinu obligátne intracelulárne parazitujúcich mikroorganizmov. Sú závislé na hostiteľskej bunke, ktorej energetický metabolizmus a proteosyntézu využívajú pre svoju reprodukciu. Vírusy obsahujú buď len DNA alebo len RNA, ktoré sú nositeľmi celej genetickej informácie (Nováková et al., 2013).

Vírusové črevné ochorenia sú väčšinou krátkodobé infekcie a organizmus infekciu rýchlo prekoná. Avšak môžu byť nebezpečné pre rizikové skupiny so slabou imunitou, ako sú ľudia po transplantácii orgánov, agresívnej liečbe rakoviny, pri zvýšenom užívaní steroidov a imunosupresív či pri syndróme získanej imunitnej nedostatočnosti (HIV / AIDS) (Pezhouh, Yang, 2018).

Inkubačná doba pri vírusových črevných infekciách býva väčšinou krátka (1 – 3 dni). Prejavuje sa vodnatou hnačkou trvajúcou 4 až 7 dní, vracaním a dehydratáciou. Horúčka nie je častá. Trvanie hnačiek pri infekcii norovírusom je spravidla kratšie ako pri infekcii rotavírusmi alebo enterickými adenovírusmi. Typické príznaky sú brušné kŕče, bolesti hlavy, myalgia a prudké zvracanie. Pri rotavírusovej infekcii príznaky závisia aj od vírusovej patogenity a od imunitného stavu hostiteľa. Hlásené boli prípady extraintestinálneho šírenia rotavírusov, čo môže viesť k virémii alebo veľmi zriedkavo k ochoreniu centrálného nervového systému (meningitída). U detí so slabou imunitou sa pozorovali chronické infekcie čriev rotavírusmi, adenovírusmi, norovírusmi, sapovírusmi a astrovírusmi (Desselberger, 2017).

Adenovírusy sú dvojvláknové DNA vírusy. Sérotypy 40 a 41 postihujú gastrointestinálny trakt. Je možné ich identifikovať zo stolice imunologickými technikami. Viróza sa objavuje po celý rok a jediným preukázaným mechanizmom prenosu infekcie je priamy kontakt medzi ľuďmi (Bellido et al., 2011). Adenovírus postihuje hlavne tenké črevo, avšak u pacientov so zníženou imunitou môže postihovať aj hrubé a slepé črevo. Adenovírus môže spôsobiť

lymfoidnú hyperpláziu najmä u pediatrickej populácie. Adenovírusová kolitída je často prehliadaná. V tretine prípadov však bol hlásený spolu s adenovírusmi aj cytomegalovírus (Pezhouh, Yang, 2018).

Rotavírus je guľovitý, segmentovaný, dvojvláknový RNA vírus bez obalu, ktorý je najdôležitejšou príčinou závažnej hnačky u malých detí na celom svete. Prenáša sa fekálno-orálnou cestou, s najväčšou pravdepodobnosťou z človeka na človeka, a hlavnými prenášačmi sú deti a dospelí bez príznakov. Opakované infekcie s rôznymi sérotypmi nie sú nezvyčajné. Infekcia rotavírusom spôsobuje poškodenie absorpčných buniek klku tenkého čreva a deficit hydroláz, čo má za následok stratu tekutín a osmotickú hnačku (Inadomi et al., 2019).

Tab. 1 Frekvencia vírusových pôvodcov črevných infekcií (Desselberger, 2017)

Vírusy, ktoré často spôsobujú črevné infekcie	Vírusy, ktoré menej často spôsobujú črevné infekcie	Vírusy, ktoré spôsobujú hnačky u imunodeficientných ľudí
Rotavírusy (11 – 68 %) Kalicivírusy (norovírusy, sapovírusy) (1 – 13 %) Adenovírusy skupina F (1 – 10 %) Astrovírusy (1 – 5 %)	Kobuvírusy (vrátane Aichi vírusov) Enterovírusy Othoreovírusy Adenovírusy (iné ako skupina F) Torovírusy Koronavírusy (vrátane SARS CoV) Parvovírusy (vrátane bokavírusu)	HIV Cytomegalovírus Herpes simplex vírus Picobirnavírusy Adenovírusy typy 42 – 47

Ďalším známym pôvodcom sú norovírusy, nazývané aj Norwalk vírusy. Niekoľko ich kmeňov môže spôsobovať gastroenteritídu. Existujú milióny prípadov ročne, najmä u dojčiat, malých detí a starších ľudí. Tieto vírusy sú ľahko prenosné a vysoko nákazlivé. Sú známe tým, že spôsobujú rozsiahle infekcie u skupín ľudí v stiesnených priestoroch, napríklad na výletných lodiach. Vírusy sa môžu prenášať priamym kontaktom, dotykom s kontaminovanými povrchmi a kontaminovanými potravinami. Pretože vírus nie je usmrtený dezinfekčnými prostriedkami používanými v štandardných koncentráciách na ničenie baktérií, riziko prenosu zostáva vysoké, a to aj po vyčistení. Príznaky norovírusovej infekcie sú podobné ako pri rotavírusoch, sú to vodnaté hnačky, mierne kŕče a horúčka. Tieto vírusy niekedy spôsobujú prudké zvracanie. Ochorenie je zvyčajne mierne, vyvíja sa 12 až 48 hodín po expozícii a odznie do niekoľkých dní bez liečby. Môže sa však vyskytnúť dehydratácia (Gary, 2016; Parker et al., 2016).

Diagnostika rotavírusových, astrovírusových a enterických adenovírusových infekcií je pomerne ľahká, pretože v akútnej fáze ochorenia sa vytvára a vylučuje veľké množstvo častíc. Stanovenie diagnózy je možné buď pomocou elektrónového mikroskopu a farbenia častíc, pomocou aglutinačných testov alebo pomocou imunologických metód ELISA alebo molekulárnych metód PCR (Desselberger, 2017).

Liečba infekcie obsahuje hlavne orálnu alebo v závažnejších prípadoch intravenóznou rehydratáciu. Inak je liečba symptomatická. Užívanie antidiarík sa u detí neodporúča, aj keď v poslednej dobe sa objavuje sľubný vývoj v používaní liekov s antisekrečnou aktivitou, ako je racecadotril. V klinickom použití neexistujú žiadne špecifické antivírusové chemoterapeutické látky. Vývoj vakcín bol zameraný hlavne na rotavírusy, ktoré sú hlavnou príčinou gastroenteritídy a vysokej detskej úmrtnosti v rozvojových krajinách (Sánchez, Bosch, 2016).

MATERIÁL A METODIKA

V kontexte s uvedeným bolo cieľom práce analyzovať a zhodnotiť epidemiologickú situáciu vo výskyte vírusových črevných infekcií na Slovensku za ostatných 10 rokov. Informácie o hlásených prípadoch týchto ochorení sme získali z epidemiologického informačného systému

EPIS. Medzi konkrétne ukazovatele, ktoré sme v diapazóne rokov 2011 – 2020 analyzovali patrili: celková prevencia a trendy výskytu, distribúcia podľa krajov, vekových skupín, pohlavia, či sezónnosti. Získané údaje sme spracovali a vyhodnotili v tabuľkovej a grafickej podobe. Osobitnú pozornosť sme venovali faktorom prenosu a preventívnym opatreniam.

Podľa Medzinárodnej klasifikácie chorôb patria vírusové črevné infekcie do skupiny črevných infekčných chorôb (A00 – A09), sú označené diagnostickým kódom A08-. Komplexná charakteristika v zmysle klasifikácie je uvedená v tab. 2.

Tab. 2 Klasifikácia črevných vírusových infekcií a iných, bližšie určených črevných infekcií (URL 2)

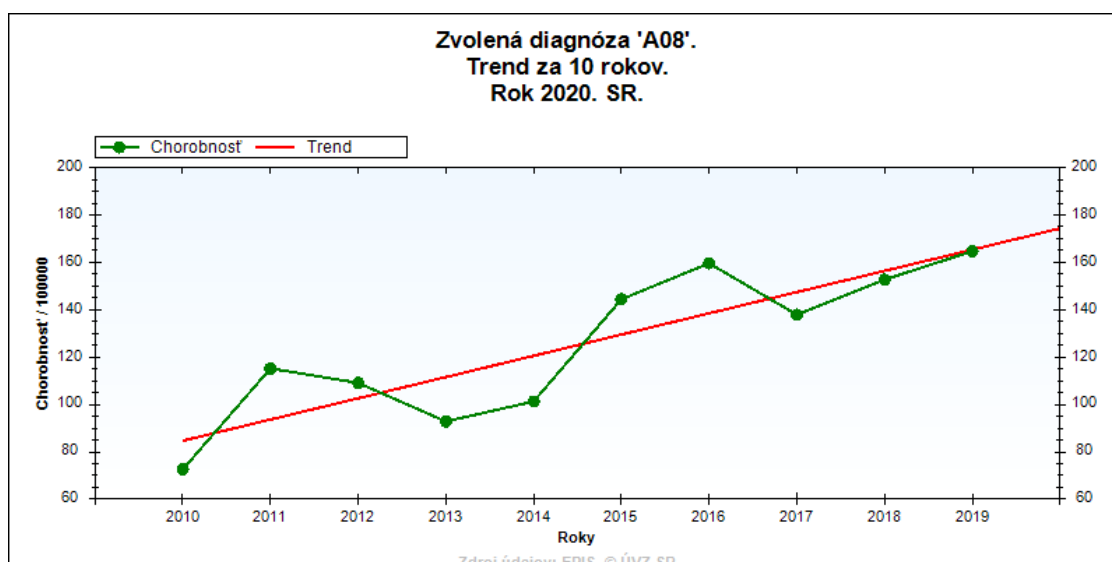
A08.-	Vírusové a iné, bližšie určené črevné infekcie	Nepatrí sem: Chríпка s postihnutím tráviacej trubice
A08.0	Rotavírusová enteritída	
A08.1	Akútna gastroenteritída zapríčinená norovírusom [Norwalk]	
A08.2	Adenovírusová enteritída	
A08.3	Iná vírusová enteritída	
A08.4	Vírusová črevná infekcia, bližšie neurčená	Vírusová: • enteritída, bližšie neurčená • gastroenteritída, enteritída, bližšie neurčená
A08.5	Iné, bližšie určené črevné infekcie	

VÝSLEDKY A DISKUSIA

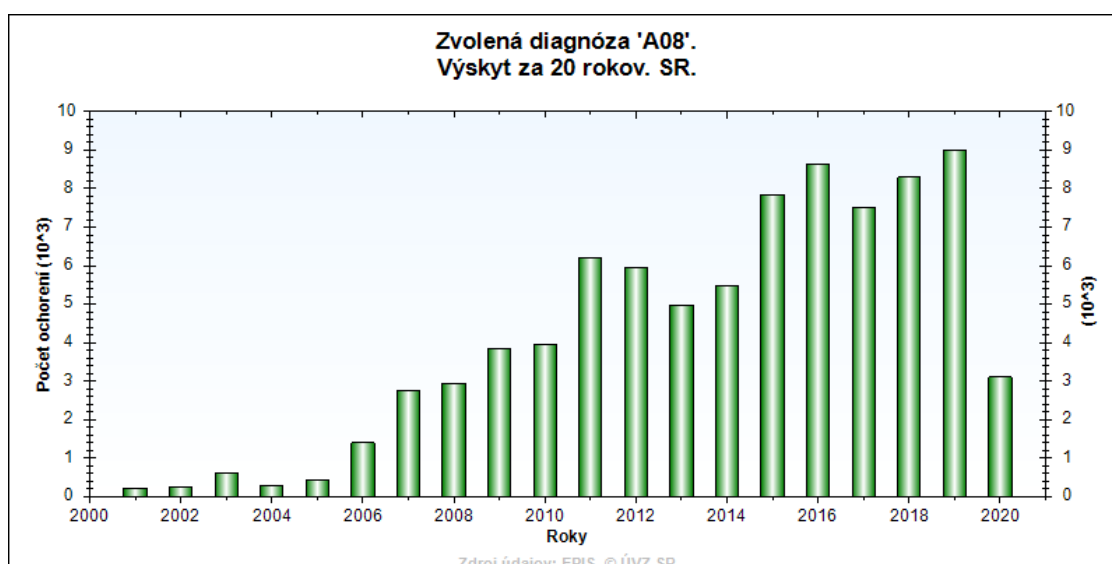
Vírusové gastroenteritídy patria medzi vysoko nákazlivé infekčné ochorenia, väčšina z nich sa prenáša fekálno-orálnou cestou a kontaminovanými potravinami, resp. vodou (Harsányi, 2009).

Vírusové črevné infekcie a iné, bližšie určené črevné infekcie (A08-) patria na Slovensku k ochoreniam s najvyššou chorobnosťou. Za obdobie 2011 – 2020 bolo v SR hlásených spolu 67 246 ochorení, čo nie je nezanedbateľný počet. Naopak, za ostatných 10 ale i 20 rokov majú vírusové gastroenteritídy výrazne stúpajúci trend. Čo je ešte zaujímavejšie, chorobnosť za posledných 20 rokov stúpala takmer o 200 %. Z grafov 1 a 2 zároveň vyplýva, že v rámci chorobnosti sa striedajú obdobia s vysokým nárastom počtu ochorení (2011 – 2012, 2015 – 2016) s obdobiami, kedy je zaznamenaný ich pokles (2013). Skresľujúco pôsobí rok 2020, v ktorom bolo hlásených podstatne menej vírusových gastroenteritíd (1 800 prípadov) oproti iným rokom. Objektívne treba skonštatovať, že toto číslo nezodpovedá reálnej skutočnosti, ale je nepriamo spôsobené pandemickou situáciou vyvolanou respiračným koronavírusom – ochorením Covid 19, ktoré sa stalo prioritou v oblasti ochrany verejného zdravia. Zároveň, nie všetci ľudia exponovaní gastroenteritickými vírusmi boli ošetrení lekárom, prípadne im nebola odobratá vzorka, ktorá by potvrdila pozitivitu a teda neboli hlásení do systému EPIS. Túto povinnosť majú pritom praktickí lekári a nemocnice cez svoje laboratória.

Ak opomenieme tento fakt, trend výskytu vírusových črevných infekcií má naozaj stúpajúci charakter. Príčiny tohto stavu môžeme hľadať na jednej strane v kvalitnejšej diagnostike, na druhej strane vo zvyšujúcej sa odolnosti mikroorganizmov voči podmienkam vonkajšieho prostredia. Dôležitú úlohu zohráva mobilita ľudí, ich zdravotné kompetencie, resp. imunita, sociálno-hygienické podmienky na bývanie, životný štýl, ale aj zmeny stravovacích návykov (konzumácia čerstvého ovocia a zeleniny, morských plodov, rýb či narychlo pripravených jedál).



Graf 1 Trend výskytu vírusových črevných infekcií a iných, bližšie určených črevných infekcií na Slovensku za 10 rokov



Graf 2 Výskyt vírusových črevných infekcií a iných, bližšie určených črevných infekcií za 20 rokov

Tieto vírusové črevné infekcie sa vyskytujú sporadicky i epidemicky v uzavretých skupinách hlavne u detí, napríklad v školských zariadeniach.

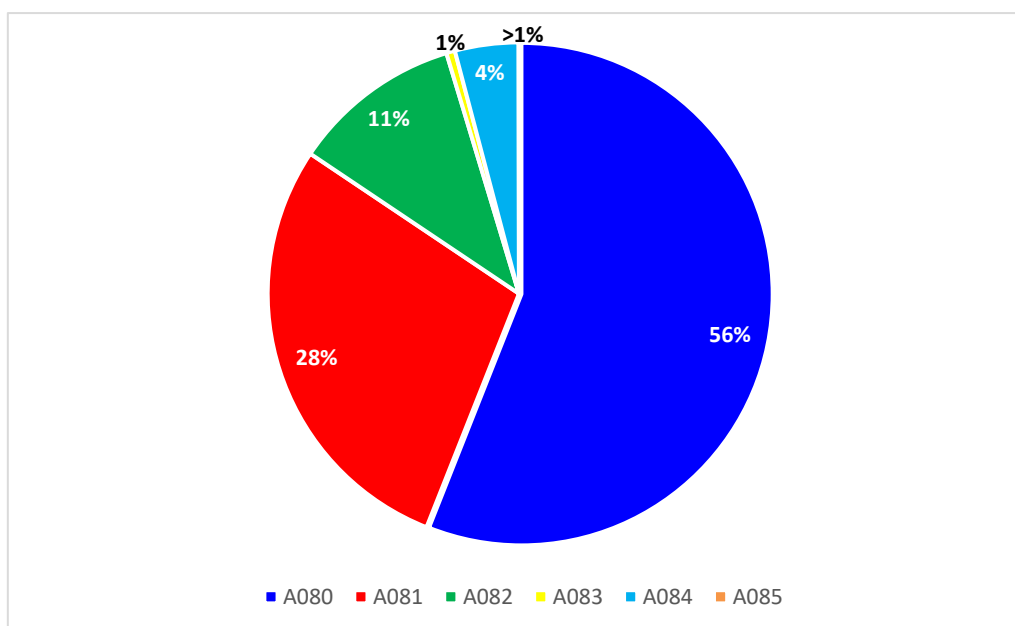
Od roku 2014 počet hlásených prípadov črevných vírusových infekcií kumulatívne stúpa najmä „vďaka“ lokálnym epidémiám vyskytujúcich sa u obyvateľstva s nízkym sociálno-hygienickým štandardom na východnom a strednom Slovensku. Netreba však podceňovať ani riziko importovania nákazy najmä z rizikových krajín, dovolenkových krajín (Chorvátsko, Turecko či Bulharsko). Hoci je počet importovaných nákaz nízky, netreba podceňovať dodržiavanie zásad osobnej hygieny a hygieny stravovania na dovolenkách. Z diagnóz zaradených do A08- najviac dominujú rotavírusové infekcie (tab. 3).

Tab. 3 Importované nákazy črevných vírusových a iných, bližšie určených črevných infekcií (2011 – 2020)

Rok	Ochorenie	Krajina	Počet nakazených	Rok	Ochorenie	Krajina	Počet nakazených
2011	A080	Chorvátsko	2	2017	A080	Taliansko	1
		Bulharsko	3			Chorvátsko	11
2012	A080	Chorvátsko	3			Maroko	3
		Bulharsko	4			Turecko	1
		Španielsko	1			Bulharsko	1
		Turecko	1			Turecko	1
2013	A080	Chorvátsko	13			Grécko	1
		Írsko	1	2018	A080	Bulharsko	4
		Bulharsko	4			Turecko	10
		Turecko	3			Tunisko	2
	A081	Bulharsko	1			Spojené kráľovstvo	1
2014	A080	Chorvátsko	8			Cyprus	1
		Bulharsko	6			Thajsko	1
		Taliansko	3			Chorvátsko	1
		Tunisko	1			Egypt	1
		Turecko	1		A081	Maďarsko	1
	A082	Tunisko	1			Turecko	4
2015	A080	Thajsko	1			Spojené kráľovstvo	1
		Egypt	1			Nemecko	2
		Česko	1			Grécko	1
		Chorvátsko	6		A082	Albánsko	2
		Čierna Hora	1			Bulharsko	1
		Turecko	2	2019	A080	Egypt	2
		Bulharsko	2			Poľsko	2
		Francúzsko	1			Srbsko	1
		Maďarsko	2			Bulharsko	3
	A081	Maďarsko	1			Turecko	6
		Egypt	1			Chorvátsko	8
	A082	Cyprus	1		A081	Poľsko	4
2016	A080	Chorvátsko	5			Chorvátsko	2
		Bulharsko	2			Grécko	3
		Česko	1			Turecko	1
		Taliansko	1		A082	Chorvátsko	1
		Francúzsko	1	2020	A082	Poľsko	1
	A081	Maďarsko	1				
		Česko	1				
	A082	Egypt	1				

Ako vyplýva z grafu 3, najväčší počet črevných vírusových ochorení tvoria rotavírusové enteritídy (A080 – 56 %). Druhé najčastejšie vyskytujúce sa ochorenie je akútna

gastroenteritída zapríčinená norovírusom (A081 – 28 %), za ktorou nasledujú ochorenia vyvolané adenovírusmi (A082 – 11 %). Naopak, iné vírusové enteritídy a iné, bližšie určené črevné infekcie tvoria len 2 % hlásených prípadov v tejto skupine infekčných ochorení (A083 a A085).



Graf 3 Percentuálne zastúpenie črevných vírusových a iných, bližšie určených črevných infekcií (2011 – 2020)

Rotavírusová enteritída je ochorenie akútneho typu, ktoré postihuje tráviaci trakt. Choroba je spôsobená vírusom rotavírus, ktorého je niekoľko typov: A, B a C. Pre ľudský organizmus sú nebezpečné typy A až C. Rotavírusová enteritída sa šíri pri zanedbaní hygieny znečistenými rukami. Najviac sa vyskytuje na jar a na jeseň. Postihuje malé deti vo veku od pol roka do 6 rokov (Parbhoo et al., 2016).

Úmrtnosť je veľmi nízka, ale pri zanedbaní starostlivosti môže byť ochorenie aj fatálne. U malých detí často spôsobuje dehydratáciu, vplyvom čoho môže organizmus dieťaťa upadnúť do šoku (Contzen et al., 2009; Parashar et al., 2006). Očkovanie detí na rotavírus je odporúčané aj na Slovensku.

Keď sa vírus dostane do organizmu, napáda sliznicu tenkého čreva a vyvoláva jej zápal. Inkubačná doba je obvykle 1 až 3 dni, odkedy sa prejavujú prvé príznaky ochorenia. Choroba sa prejavuje silnou a zápachajúcou hnačkou, čo môže viesť k rýchlej a extrémnej dehydratácii. Ďalšími príznakmi sú nevoľnosť, zvracanie, zvýšená teplota až horúčka (Ciarlet a Schödel, 2009).

Môže spôsobiť aj netypické príznaky, ktoré v niektorých prípadoch končia komplikáciami ako zápal pľúc, zápal svalov či zhoršenie vstrebávania živín (Mast et al., 2009).

Akútna gastroenteropatia zapríčinená norovírusom (Norwalk) je infekčné ochorenie, ktorému sa dobre darí najmä v spoločenských zariadeniach alebo tam, kde sa nachádza väčšia skupina ľudí na jednom mieste. Ide o hnačkové ochorenie, ktoré v rámci nebakteriálnych typov hnačiek postihuje až polovicu dospeléj populácie a tretinu detskej, čo v praxi znamená, že spomedzi hnačiek, ktoré nie sú spôsobené baktériami, má akútna gastroenteropatia spôsobená vírusom Norwalk výrazné zastúpenie (URL 3).

Vírus sa prenáša fekálno-orálnou cestou a spôsobuje črevné problémy, hnačky a zvracanie. V niektorých prípadoch bol zaznamenaný aj prenos vzduchom, avšak primárne sa prenáša kontaminovanými potravinami a stolicou (Inadomi et al., 2019).

Adenovírusová enteritída (A082) sa prenáša anaeróbnou cestou, kontaminovanou vodou, potravinami či dotykom. Inkubačná doba je rozdielna, môže to byť 5 dní, ale aj dva týždne. Typický je aj opakovaný charakter, kedy je možná reinfekcia po nejakej dobe (Lin et al., 2019).

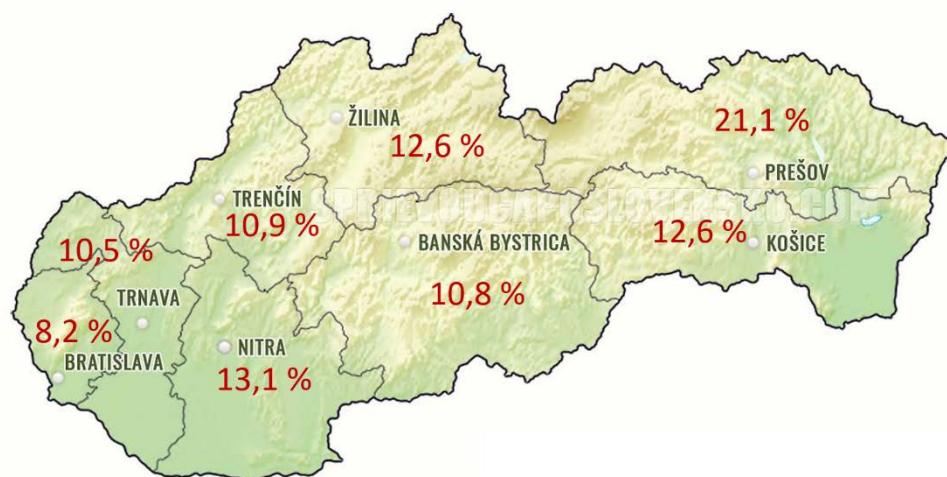
Adenovírusy zapríčiňujú zhruba každé desiate ochorenie respiračného charakteru u malých detí od 6 mesiacov do 7 rokov. Je to aj sezónne ochorenie typické najmä pre zimné mesiace alebo pre skoré leto či skorú chladnejšiu jar (Pezhouh a Yang, 2018).

Rizikovými skupinami sú seniori a malé deti, pretože pre nich môže byť ochorenie v prípade komplikácií aj život ohrozujúce. Rizikovými faktormi sú tiež chronické choroby a nedávna transplantácia (Goikhman et al., 2020).

Kompletná charakteristika najčastejšie sa vyskytujúcich vírusov spôsobujúcich gastroenteritídy je uvedená v tab. 4.

Tab. 4 Základné informácie o najčastejších pôvodcoch črevných infekcií (Marlow, 2016)

Vírus	Inkubačná doba	Trvanie choroby	Sezónnosť	Prenos
Rotavírus	1 – 3 dni	5 – 7 dní	Prevažne v zime a na jeseň	Fekálno-orálnou cestou, kvapôčková infekcia
Norovírus	12 – 48 hodín	1 – 4 dni	Celoročne, zvlášť v zime	Fekálno-orálnou cestou, kvapôčkovou infekciou, jedlo, predmety, voda
Sapovírus	1 – 2 dni	3 – 4 dni	Celoročne	Fekálno-orálnou cestou
Astrovírus	4 – 5 dni	5 – 6 dní	Prevažne v zime	Fekálno-orálnou cestou a vodou
Enterický adenovírus	3 – 10 dní	6 – 9 dní	Prevažne v lete	Fekálno-orálnou cestou



Obr. 1 Percentuálny podiel črevných vírusových a iných, bližšie určených infekcií v jednotlivých krajoch Slovenskej republiky (2011 – 2020)

Najvyšší výskyt vírusových črevných ochorení bol za ostatných 10 rokov zaznamenaný v Prešovskom kraji. Podľa epidemiologických záznamov každoročne najviac prípadov pribúda hlavne v okrese Poprad, Prešov a Kežmarok a vo väčšine sú to deti vo veku 0 až 4 roky. Keďže ochorenia sa prenášajú fekálno-orálnou cestou, pravdepodobne sa tento zvýšený výskyt

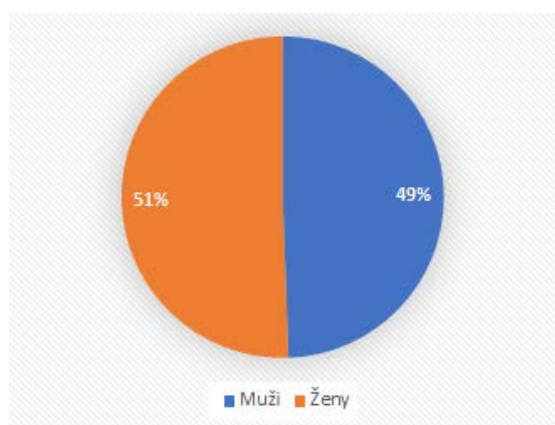
vzťahuje na oblasti a ľudí s nižším hygienickým štandardom. Tie sú v podmienkach Slovenskej republiky situované do vyššie uvedených okresov. Na porovnanie Bratislavský kraj sa na celkovom výskyte hlásených prípadov črevných vírusových infekcií podieľa 8 %. Okrem sociálno-ekonomických podmienok podstatnú úlohu zohráva miera zaočkovanosti detí, keďže vakcína proti rotavírusu je dobrovoľná a nie je hrazená zdravotnými poisťovňami.

Pokiaľ ide o sezónnosť, vírusové črevné infekcie boli najviac hlásené v zimných mesiacoch (> 7500) s maximálnym výskytom v januári (11,82 %) a marci (11,14 %). Naopak, nižší výskyt bol zaznamenaný v mesiacoch jún – september, čo predstavuje v priemere 6,8 % (4595 ochorení).

Niektoré enterické vírusové infekcie majú sezónny charakter. V regiónoch s miernym podnebím dosahujú infekcie spôsobené enterovírusmi zvyčajne vrchol v lete a začiatkom jesene. Naopak, rotavírusové, norovírusové a astrovírusové infekcie sa vyskytujú hlavne v chladnejších mesiacoch, aj keď už boli opísané sezónne a nesezónne distribúcie rotavírusu v odpadových vodách. Enterické adenovírusové infekcie vrcholia v polovici leta. Tieto údaje naznačujú, že teplota a pravdepodobne relatívna vlhkosť môžu mať zmysel v sezónnom rozložení ohnisk určitých ľudských enterických vírusov, z dôvodu vplyvu týchto faktorov na perzistenciu vírusu (Bosch et al., 2008; Sánchez, Bosch, 2016).

Akútna gastroenteropatia spôsobená norovírusmi je prítomná v populácii celoročne, aj keď väčší výskyt je zaznamenaný najmä v zimnom období (URL 3).

Analýza výskytu vírusových črevných infekcií za 10 rokov z hľadiska pohlavia a veku priniesla rovnako zaujímavé výsledky. V prvom rade treba konštatovať, že vírusové gastroenteritídy boli hlásené približne v rovnakom počte u mužov, ako i žien (graf 4).



Graf 4 Percentuálny podiel črevných vírusových a iných, bližšie určených infekcií u mužov a žien (2011 – 2020)

Z tabuľky 5 vyplýva, že tieto typy črevných infekcií boli hlásené v každej vekovej skupine, pričom ich najvyšší počet (38 902) bol zaznamenaný u 0 – 4 ročných detí, čo činí neuveriteľných 61 %. Deti v tomto veku sa pritom najčastejšie liečia na rotavírusové enteritídy. K rizikovým skupinám však patria aj deti vo veku 5 – 9 rokov (13 %) a seniori starší ako 65 rokov. Z údajov vyplýva, že najvyššia chorobnosť bola zaznamenaná v roku 2019, kedy dosahovala až 165,05/100 000 osôb. Výsledky potvrdili, že podobne ako u iných ochorení antroponózneho charakteru, sú aj na vznik vírusových enteritíd vnímavejší novorodenci, dojčatá a ľudia so zníženou imunitou, resp. zníženou aciditou žalúdka, u ktorých stačí k infekcii podstatne nižšie množstvo mikroorganizmov.

Tab. 5 Výskyt vírusových črevných infekcií a iných, bližšie určených črevných infekcií z hľadiska veku (2011 – 2020)

Vek/rok	0 až 4	5 až 9	10 až 19	20 až 34	35 až 54	55 až 64	65+	Spolu	*
2011	3976	885	325	271	268	124	361	6210	144,27
2012	3413	761	578	471	263	126	376	5988	109,97
2013	3415	535	286	154	167	101	327	4985	92,13
2014	3466	718	347	219	197	123	422	5492	101,40
2015	5058	1125	606	222	217	139	481	7848	144,76
2016	4185	1143	715	425	589	307	1276	8640	159,23
2017	4664	1092	469	270	255	136	619	7505	138,09
2018	5484	920	465	283	371	252	514	8289	152,45
2019	5241	1196	758	418	329	217	837	8996	165,05
2020	Údaje neboli v systéme EPIS uvedené								
Spolu	38902	8375	4549	2733	2656	1525	5213	63953	1207,4

* Chorobnosť/100 000

Ako najčastejší faktor prenosu vírusových gastroenteritíd sa uvádza kontakt s chorým, kontaminované prostredie alebo kontaminovaný predmet. V skupine „kontaminované“ boli najviac hlásené faktory vzduch a ruky. Z potravinárskeho hľadiska dominovala zmiešaná strava, surová zelenina, lahôdkárske výrobky a pokrmy typu Fast food.

Enterické vírusy sa prenášajú najmä tým spôsobom, že nakazený človek (pracovník v potravinárskom podniku) rozširuje infekciu, ale ešte nejaví žiadne príznaky (môže byť nosič), alebo je chorý a nedbá na pravidlá hygieny, alebo je pracovník v rekonvalescencii, čo znamená, že je infekčný dlhú dobu aj po zotavení. Ku kontaminácii potravín ako následku ľudskej manipulácie môže dôjsť vo všetkých stupňoch procesu ich spracovania: od zberu a balenia, až po prípravu pokrmov (Souza et al., 2006).

Pezhouh a Yang (2018) uvádzajú, že mnohé vírusy majú zvýšenú afinitu k niektorým potravinám:

- NoV – lastúrniky (ustrice, mušle, škeble, srdcovky a slávky)
- NoV – čerstvé ovocie, zelenina, bobuľovité plody („fresh produce“)
- NoV a HAV – manuálne pripravované potraviny: šaláty, sendviče, studené mäsové oblohy, hamburgery
- NoV a AdV – voda (pitná voda, voda používaná na prípravu pokrmov)

Podľa Pexara a Govarisa (2020) živočíšne a ľudské rotavírusy, ktoré vnikli do odpadových vôd a životného prostredia môžu kontaminovať povrchové vody, morské plody, ovocie a zeleninu. Potraviny môžu kontaminovať aj infikovaní pracovníci manipulujúci s potravinami. Infekčná dávka je pre človeka veľmi nízka, odhaduje sa na 10 – 100 vírusových častíc nachádzajúcich sa v potravinách alebo vo vode.

Epidémie enterických vírusov prenášané potravinami sa spájajú s konzumáciou surových mäkkýšov, hlavne ustríc kontaminovaných ľudskými splaškami (John, 2013).

Hnačky vyvolané adenovírusmi sa oveľa častejšie prenášajú vodou (aj v bazénoch), pričom osobná hygiena tu zohráva podstatnú úlohu (O'Shea, 2019).

Regionálne úrady verejného zdravotníctva zistili, že za výskytom viacerých epidémií boli katastrofálne sociálno-hygienické podmienky, ktoré súviseli s nízkou úrovňou bývania a stravovania, nezaočkovanosť rizikových skupín obyvateľstva či vyššia koncentrácia osôb na jednom mieste (detské kolektívy). Medzi najčastejšie druhy opatrení, ktoré boli uskutočňované v ohniskách nákazy patrili: dezinfekcia, vyhľadávanie podozrivých z nákazy a ochorenia,

zákaz výkonu epidemiologicky závažných činností, preškolenie osôb pracujúcich s potravinami, technické opatrenia, zdravotná výchova, informovanie zainteresovaných, sprísnenie hygienicko-epidemiologického režimu, likvidácia odpadu, laboratórne vyšetrenie faktoru prenosu, zákaz činnosti potravinárskej prevádzky a likvidácia faktoru prenosu.

ZÁVER

Slovensko sa začlenilo do sietí Európskej únie pre surveillance infekčných ochorení. Vývoj a zavedenie systému EPIS na Slovensku viedlo k posilneniu surveillance infekčných chorôb, zvýšeniu akcieschopnosti epidemiológov v oblasti kontroly prenosných ochorení, manažmentu epidémií a zvládania mimoriadnych situácií, k zrýchleniu a skvalitneniu zabezpečovania podkladov pre rozhodovaciu činnosť, čo je predpokladom rýchleho prijímania efektívnych protiepidemických opatrení na ochranu zdravia obyvateľov.

Prevenca a kontrola črevných vírusových infekcií je podobná ako pri ostatných nákazách prenášaných interhumánnym prenosom. Spoľahlivá ochrana spočíva jednak v prísnom dodržiavaní hygienických a sanitačných podmienok zameraných na zabránenie kontaminácii vody a potravín fekálno-orálnou cestou, ako aj v prísnom dodržiavaní hygieny stravovania (preváranie vody, pitie nápojov balených v originálnych obaloch, eliminácia konzumácie pokrmov rýchleho občerstvenia, neumytej zeleniny, tepelne neošetrených rýb, morských plodov a pod). Účinná vakcinácia je ďalšou z možností, ako znižovať výskyt týchto infekcií. U osôb vracajúcich sa z dovolenkových destinácií, u ktorých sa prejavila gastroenteritída je nevyhnutá karanténa a vyšetrenie v zdravotníckom zariadení. Dodržiavanie hygienických návykov, umývanie ovocia a zeleniny pre ich možnú kontamináciu prachom alebo pôdou, umývanie rúk po WC a pred jedlom, či dôsledná tepelná úprava, patria medzi najefektívnejšie možnosti prevencie vírusových črevných infekcií.

Najnutnejšie je v budúcnosti podporovať rozvoj programov na zlepšenie hygieny v sociálne zanedbaných oblastiach, to nielen vykonaním jednorazovým sanitačným programom v týchto oblastiach, ale i poskytovaním informácií o možnosti zlepšenia ich zdravotného stavu, ale aj aktívnejšej pomoci pri zabezpečovaní potrieb osobnej hygieny, obmedzenie úmrtí hlavne detí v rizikovom veku a hygienických podmienok všeobecne.

V neposlednom rade sú zodpovední za produkciu bezpečných potravín majitelia potravinárskych a gastronomických prevádzok. Tí zabezpečujú, aby produkty boli kvalitné a v súlade s legislatívou. Kontrola začína pri prijíme vstupných surovín od farmárov a chovateľov. Ďalej pokračuje počas celého procesu výroby, spracovania, balenia, distribúcie, dovozu a predaja. Aby sme zabezpečili zdravotne bezpečné potraviny, je nutné dodržiavať všetky preventívne opatrenia.

Pod'akovanie: Práca bola podporená projektom KEGA č. 017SPU-4/2019 „Inovácia obsahovej štruktúry a e-learning v študijných programoch Bezpečnosť a kontrola potravín a Potraviný a technológie v gastronómii“.

LITERATÚRA

- Bellido B. J. et al. 2011. Epidemiology of Infectious Diarrhoea. In *Encyclopaedia of Environmental Health*. p. 569-581. Dostupné na: <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-52272-6.00689-9>
- Bosch, A. et al. 2008. Detecting virus contamination in seafood. In *Improving Seafood Products for the Consumer*, vol. 3, pp. 194-211. Dostupné na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7152261/>
- Ciarlet, M., Schödel, F. 2009. Development of a rotavirus vaccine: Clinical safety, immunogenicity, and efficacy of the pentavalent rotavirus vaccine, RotaTeq®. In *4th Semmering Vaccine Symposium*, vol. 27, no. 6, pp. 72-81. ISSN: 0264-410X. Dostupné na: <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2009.09.107>
- Contzen, M., Mayr C., Strohe, G. 2009. Detection of rotavirus in food associated with a gastroenteritis outbreak in a mother and child sanatorium. In *International Journal of Food Microbiology*, vol. 135, no. 2, pp. 179-182. Dostupné na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19717201/>
- Desselberger, U. 2017. Viral gastroenteritis. In *Medicine*, vol. 45, no. 11, pp. 690-694. Dostupné na: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/>

- Gary, P. 2016. Shellfish-Associated Enteric Virus Illness: Virus Localization, Disease Outbreaks and Prevention. In *Viruses on Foods*, pp. 185-207. Dostupné na: https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-319-30723-7_7
- Goikhman, Y. et al. 2020. Adenovirus load correlates with respiratory disease severity among hospitalized pediatric patients. In *International Journal of Infectious Diseases*, vol. 97, pp. 145-150. ISSN: 1201-9712. Dostupné na: <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2020.06.010>
- Harsányi, Š. 2009. *Liečba črevnej chrípky (Gastroenteritidy) doma*. Medinet s.r.o. 2009. Dostupné na: <http://www.medinet.sk/modules.php?name=News&file=article&sid>
- Inadomi, J. et al. 2019. Infections of the Gastrointestinal Tract. Yamada's Handbook of Gastroenterology. In *Wiley online library*, pp. 431-446. Dostupné na: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/9781119515777.ch41>
- Johne, R. et al. 2013. Detection and Typing of Norovirus from Frozen Strawberries Involved in a Large-Scale Gastroenteritis Outbreak in Germany. In *The National Centre for Biotechnology Information*, vol. 5, no. 3, pp. 162-168. Dostupné na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3753465/>
- Lin, Gu-Lung et al. 2019. Molecular epidemiology and clinical features of adenovirus infection in Taiwanese children, 2014. In *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, vol. 52, no. 2, pp. 215-224. ISSN: 1684-1182. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jmii.2018.07.005>
- Marlow, S. 2016. The best approaches to acute gastroenteritis. In *Contemporary clinic*. Dostupné na: <https://www.contemporaryclinic.com/view/best-approaches-to-acute-gastroenteritis>
- Mast, T. Christopher et al. 2009. The impact of rotavirus gastroenteritis on the family. In *BMC Pediatrics*, vol. 9, no. 11. ISSN: 1471-2431. DOI: <https://doi.org/10.1186/1471-2431-9-11>
- Nováková, E. et al. 2013. Lekárska mikrobiológia. In *Portál Jesseniovej lekárskej fakulty Univerzity Komenského*. Dostupné na: <https://portal.jfmed.uniba.sk/clanky>
- O'Shea, H. 2019. Viruses Associated With Foodborne Infections. In *Reference Module in Life Sciences*, pp. 1-15. Dostupné na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/>
- Parashar, D. et al. 2006. Rotavirus and Severe Childhood Diarrhea. In *Emerging Infectious Diseases*, vol. 12, no. 2, pp. 304-306. ISSN: 1080-6059. DOI: 10.3201/eid1202.050006
- Parbhoo, N., Dewar, J. B., Gildenhuis, S. 2016. Sequence analysis and structural implications of rotavirus capsid proteins. In *Acta virologica*, vol. 60, pp. 260-270. ISSN: 1336-2305. DOI: doi: 10.4149/av_2016_03_260
- Parker, N. et al. 2016. *Microbiology*. p. 1317. ISBN-10: 1-947172-23-9
- Pexara, A., Govaris, A. 2020. Foodborne Viruses and Innovative Non-Thermal Food-Processing Technologies. In *Foods*, vol. 9, no. 11. Dostupné na: <https://www.mdpi.com/2304-8158/9/11/1520>
- Pezhouh, M. K., Yang, Guang, Yu. 2018. Viral infections of the gastrointestinal tract. In *Diagnostic Histopathology*, vol. 24, no. 12, pp. 487-492. Dostupné na: <https://doi.org/10.1016/j.mpdhp.2018.09.003>
- Sánchez, G., Bosch, A. 2016. Viruses in Foods. In *Springer Link*, pp. 367-392. Dostupné na: https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-319-30723-7_13
- Souza, D. et al. 2006. Persistence of caliciviruses on environmental surfaces and their transfer to food. In *International Journal of Food Microbiology*, vol. 5, no. 3, pp. 162-168. Dostupné na: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S09505005854>
- URL 1 Najčastejšie infekčné črevné nákazy. In: RVZPO. [cit. 2020-30-10] Dostupné na: <http://www.ruvzpo.sk/novinky/n24.htm>
- URL 2 Štandardy v zdravotníctve. 2020. In: Národné centrum zdravotných informácií. Dostupné na: <http://www.nczisk.sk/Standardy-v-zdravotnictve/Pages/Medzinarodna-klasifikacia-chorob-MKCH-10.aspx>
- URL 3 <https://zdravoteka.sk/choroby/akutna-gastroenteropatia-zapricinena-virusom-norwalk/>

Kontaktná adresa: doc. Ing. Lucia Zeleňáková, PhD., Katedra hygieny a bezpečnosti potravín, FBP, SPU v Nitre, Trieda A. Hlinku 2, 949 76 Nitra. E – mail: lucia.zelenakova@uniag.sk

**REGENERÁCIA ZELENINOVO-RYŽOVÝCH JEDÁL POMOCOU
MIKROVLNNÉHO OHREVVU Z HĽADISKA MIKROBIOLOGICKÉHO
HODNOTENIA
REGENERATION OF VEGETABLE-RICE MEALS BY MICROWAVE HEATING
FROM THE MICROBIOLOGICAL EVALUATION POINT OF VIEW**

Lucia Zeleňáková, Anna Kolesárová, Simona Kunová

Abstract: In order to assess the effect of microwave heating of vegetable-rice meals on microorganisms, we selected total viable count (TVC), number of microscopic filamentous fungi (MFF) and yeast, the content of coliform bacteria and the occurrence of *Bacillus cereus* from microbial parameters. The total viable count (TVC) in fresh risotto was $1.75 \cdot 10^2$ CFU.g⁻¹. After microwave heating decreased on $1.27 \cdot 10^2$ CFU.g⁻¹ (the second day) at 750 W and 1 minute heating and $5.81 \cdot 10^2$ CFU.g⁻¹ on the third day at 500 W and 30 s. The number of MFF and yeast was low in fresh meal as well as regenerated ones ($<1 \cdot 10^1$ CFU.g⁻¹). There were no coliforms in the all samples. *Bacillus cereus* colonies were also not present in the samples, indicating that the food was well stored.

Key words: rice, vegetables, microwave heating, regeneration, microorganisms

ÚVOD

Regenerácia je proces zvyšovania teploty vopred pripravených potravín. Je to posledný krok v technologických postupoch prípravy pokrmov, napr. varenie, chladenie, zmrazenie a môže zahŕňať konečný krok bezprostredne pred servírovaním. Na regeneráciu sú vhodné pokrmy, ktoré boli sušené, čerstvé, zmrazené, predpripravené i konzervované (Monaghan, 2014).

Regenerácia znamená opätovnú tepelnú úpravu, nie iba ohrev pokrmu. Je veľmi dôležité prevádzať regeneráciu tak, aby pokrm bol dôkladne prehriaty v celom objeme, a tým boli zničené prípadné škodlivé mikroorganizmy, ktoré sa môžu v pokrme od doby jeho tepelnej úpravy objaviť. Ohrev musí prebiehať rýchlo, aby čo najrýchlejšie bolo prekonané nebezpečné teplotné rozmedzie medzi 10 – 60 °C, pri ktorom sa väčšina škodlivých mikroorganizmov v potravinách najlepšie množí (Zeleňáková et al., 2018).

Regenerácia ohrevom eliminuje väčšinu bakteriálnych buniek, skôr vytvorené toxíny môžu v pokrme zostať. Z hľadiska overenia bezpečnosti režimu tepelnej úpravy sa odporúča preveriť podmienky ohrevu a určiť pre daný, vždy rovnaký druh pokrmov jednotný režim tepelnej úpravy (počiatočná teplota, výkon zariadenia, čas na dosiahnutie požadovanej teploty v jadre pokrmu) (Yang et al., 2016; Zeleňáková et al., 2018).

V gastronómii sa dá použiť niekoľko spôsobov na regeneráciu (zohriatie) jedál zo schladeného, resp. zmrazeného stavu. Medzi najčastejšie využívané možnosti patrí mikrovlnná rúra (Trembová, 2013).

Mikrovlnné rúry pracujú pomocou elektromagnetických vĺn prostredníctvom magnetronu obsiahnutého vo vnútri rúry. Tieto vlny spôsobujú vibráciu molekúl vody v potravinách vplyvom mikrovlnného žiarenia s frekvenciou 2 450 MHz, čím dochádza k treniu molekúl a tvorbe tepla, ktoré sa potom prenáša do ostatných zložiek výrobku vedením alebo prúdením, preto hlavný vplyv na rýchlosť ohrevu má obsah vody a soli v potravine, jej merné teplo a tiež ostatné zložky a tvar potraviny (Sobral et al., 2018).

Mikrovlnný ohrev potravín sa niekedy spája s nerovnomerným zohrievaním v dôsledku „horúcich a studených miest“. Rozloženie teploty v mikrovlnne ohrievaných potravinách je určené termofyzikálnymi vlastnosťami potravín, ako aj distribúciou rozptýlenej mikrovlnnej energie. Distribúcia mikrovlnného ohrevu v potravine je zase určená elektrickým poľom vo

vnútri mikrovlnnej rúry alebo aplikátora, dielektrickými vlastnosťami potraviny a mikrovlnnou frekvenciou (Wäppling, 2015).

Neodporúča sa používať náhly nárast vysokých teplôt, regenerácia potravín neznamená prehriatie alebo nadmerné varenie. V kuchyni sa musí dodržiavať chladiaci reťazec, aby sa zachovali organoleptické vlastnosti potravín. Použitie vysokých teplôt (viac ako 70 °C) môže pokrm variť alebo dokonca spáliť, čím stráca svoju pôvodnú chuť a textúru. Pri regenerácii jedla je potrebné monitorovať teplotu pomocou vpichového teplomera. Aj keď z vonkajšej strany jedlo vyzerá ohriate a chrumkavé, vo vnútri môže byť studené. Aby bolo jedlo úplne zohriate, musí mať vnútornú teplotu pri podávaní 65 °C až 70 °C (Zavarská, 2018).

Opakované ohrievanie zvyškov alebo príprava jedla v mikrovlnnej rúre môže viesť k suchému, gumovitému jedlu. Ak sa už má použiť mikrovlnná rúra, je dôležité používať nádoby vhodné pre mikrovlnnú rúru. Väčšina papierových, sklenených a keramických nádob sa dá bezpečne používať v mikrovlnkách, pretože nimi prechádzajú mikrovlny. Niektoré plastové nádoby sú bezpečné v mikrovlnnej rúre, ale mnohé z nich by sa nemali používať. Pokrm by mal byť usporiadaný tak, aby sa rovnomerne zohrieval. Usporiadanie potravín v jednej vrstve pomáha rovnomernejšiemu ohriatiu (Price, 2018).

Na balenie potravín, ako aj na výrobu plastových nádob pre mikrovlnný ohrev sa používajú materiály (napríklad polyetylén, polypropylén, polykarbonát, polystyrén, polyetyléntereftalát), ktoré neobsahujú chlór a preto tieto nepredstavujú žiadne zdravotné riziko spôsobené vyššie uvedenými toxickými a kancerogénnymi látkami. Uvedené fakty potvrdili vo svojich stanoviskách aj Európsky úrad pre bezpečnosť potravín – EFSA alebo americký Úrad pre potraviny a lieky – FDA. Na základe uvedených skutočností informácia o škodlivosti plastov pri mikrovlnnom ohreve je jednoznačne zavádzajúca, a preto sa spotrebiteľia nemusia obávať použitia plastových nádob alebo obalov určených pre skladovanie a prepravu potravín a nápojov, ako aj pre ohrev v mikrovlnných zariadeniach (Bukovský, 2013).

Mikrovlnný ohrev vytvára svojou rýchlosťou, ale najmä nerovnomerným rozložením teplôt predpoklady pre nedodržanie bezpečného tepelného opracovania a tým aj možnosť prežívania nežiaducich mikroorganizmov. Táto skutočnosť má význam hlavne pri potravinách, ktoré sa v mikrovlnke len ohrievajú, teda hotové jedlá. Povrchová, sekundárne kontaminujúca mikrobiota hotových jedál je takmer vždy pri konvenčnom ohreve spoľahlivo devitalizovaná. Pri mikrovlnnom ohreve je však teplo vedené z jadra na povrch a pri krátkych expozičných dobách je teplota povrchu na devitalizáciu mikroorganizmov nedostatočná. Pred konzumáciou skladovaných, resp. zmrazených potravín sa odporúča ich zahriatie na 75 °C na 15 sekúnd (Zeleňáková et al., 2018).

Neexistuje dôkaz o tom, že by sa vyskytli akékoľvek patogénne baktérie s jedinečnou odolnosťou proti mikrovlnnému ohrevu. Existuje všeobecná zhoda v tom, že hlavným mechanizmom mikrobiálnej inaktívácie mikrovlnami je teplo. Absorbovaná energia z mikrovln môže zvýšiť teplotu potravín dostatočne vysoko na inaktíváciu mikroorganizmov. Aj keď veľké množstvo štúdií preukázalo, že tepelný účinok je podstatným prispievateľom k ničeniu mikroorganizmov, niektorí vedci sa pokúsili poskytnúť vysvetlenie netermálnych účinkov mikrovln na mikrobiálnu inaktíváciu (Davidson et al., 2017).

MATERIÁL A METODIKA

V kontexte s uvedeným bolo cieľom práce analyzovať a zhodnotiť vplyv mikrovlnne ohrievaných zeleninovo-ryžových pokrmov na prítomnosť vybraných druhov mikroorganizmov. Pre experimentálne účely boli použité vzorky zeleninového rizota, ktoré boli čerstvo pripravené na Katedre hygieny a bezpečnosti potravín za prísnych hygienických podmienok a následne v laboratóriách tejto katedry analyzované. Zloženie a postup výroby zeleninového rizota je uvedený v tab. 1.

Výroba rizota a analýza vzoriek bola uskutočnená 3-krát nezávisle od seba, pričom v každej vzorke boli uskutočnené 3 paralelné merania. Základný rozpis jednotlivých analýz je uvedený nižšie. Každá vzorka vážila 100 g, pričom vyhláška č. 533/2007 Ministerstva zdravotníctva Slovenskej republiky o podrobnostiach o požiadavkách na zariadenia spoločného stravovania uvádza, že vzorka pokrmu musí mať hmotnosť najmenej 50 g, ak nejde o kusový tovar. Každá vzorka bola pred mikrobiologickou analýzou dôkladne zhomogenizovaná a analýzy sme vykonávali paralelne, čo znamená, že vzorka sa odoberala z dvoch miest daného kusa.

Tab. 1 Zloženie a postup výroby zeleninového rizota

 Vzorka rizota (100 g)	Suroviny: • 500 g ryže • 250 g mrazeného hrášku • 250 g mrkvy • plechovka kukurice v slanom náleve • 250 ml smotany na varenie • olej • bazalka • soľ • čierne korenie
Postup: Na oleji si opražíme ryžu a zalejeme ju vodou. Kým sa uvarí ryža, pripravíme si zeleninu. Na troške oleja si opražíme na kocky nakrájanú mrkvu, hrášok a nakoniec pridáme kukuricu. Zeleninu dusíme do zmäknutia. Keď bude zelenina mäkká, zalejeme ju smotanou na varenie a chvíľku povaríme. Následne pridáme uvarenú ryžu a dochutíme soľou, korením a bazalkou.	

Na ohrev vzoriek sme používali Whirlpool JET Chef JT469, ktorý má viacero funkcií, napr. Microwave, Jet Start, Grill, Crisp, Forced Air, 6th Sense Reheat, 6th Sense Defrost, 6th Sense Steam, Combi Grill + Microwave, Combi Forced Air + Microwave, 6th Sense Bread Defrost.

Regenerácia pokrmov mikrovlnným ohrevom (výkon a čas): 750 W/ 1 min. 45 s, 30 s
650 W/ 1 min. 45 s, 30 s
550 W/ 1 min. 45 s, 30 s

Fázy odberu vzoriek: 1 deň – čerstvo pripravené
2 deň – schladené v chladničke (4 ± 1 °C) a regenerované
3 deň – schladené v chladničke (4 ± 1 °C) a regenerované

Počas obdobia experimentu sme sledovali celkový počet mikroorganizmov (CPM), koliformné baktérie, mikroskopické vláknité huby (VMH) a kvasinky, ale aj prítomnosť baktérie *Bacillus cereus*. Charakteristika metodických postupov je uvedená v tab. 2.

Na izolovanie koliformných baktérií sme použili VČŽL agar, ktorý sa používa na rozmnoženie a izoláciu rastovo náročných baktérií, najmä črevných patogénnych mikroorganizmov. Je to agar s kryštálovou violetou, neutrálnou červenou, žltými soľami a laktózou

Na hodnotenie celkového počtu mikroorganizmov sme použili PCA agar – Plate Count Agar (Standard Methods Agar), čo je neselektívne rastové médium, a je bežne používané na monitorovanie celkového bakteriálneho rastu vo vzorke. Skladá sa z kazeinového enzymatického hydrolyzáta, kvasnicového extraktu, dextrózy a agaru.

Na izolovanie *Bacillus cereus* sme použili živnú pôdu Modified MYP Agar Base, ktorá sa skladá z peptónu, mäsového extraktu, D-manitolu, chloridu sodného, fenolovej červene, agaru.

Pri mikroskopických vlákňitých hubách a kvasinkách sme použili živnú pôdu Dichloran Medium Base/w Rose ktorá je zložená z peptonu, dextrózy, hydrogenfosforečnanu draselného, síranu horečnatého, bengálskej červene, dichloranu, agaru.

Na prípravu živných pôd sme si navážili príslušné množstvo dehydrovanej živnej pôdy, ktoré sme rozmiešali v destilovanej vode. Po precíznom rozmiešaní sme živnú pôdu sterilizovali v autokláve pri teplote 121 °C, tlaku 120 kPa, 15 minút.

Tab. 2 Charakteristika metodických postupov

Mikroorganizmus	Riedenie	Objem	Živná pôda	Kultivácia	STN/ISO
Koliformné baktérie	10 ⁻¹ , 10 ⁻² , 10 ⁻³	1 ml	VČŽL agar	30±1 °C, 24 h	STN EN ISO 4832
CPM	10 ⁻¹ , 10 ⁻² , 10 ⁻³	1 ml	PCA agar	30±1 °C, 72 h±3 h	ISO STN 4833
Kvasinky a mikroskopické vlákňité huby	10 ⁻¹ , 10 ⁻²	1 ml	DRBC agar	25±1 °C, 5 dní	ISO 7954
<i>Bacillus cereus</i>	10 ⁻¹ , 10 ⁻²	0,1 ml	MYP agar	30±1 °C, 20 h	STN EN ISO 7932

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Vzorky boli laboratórne vyšetrené hneď po uvarení pokrmu a na druhý a tretí deň po uskladnení v chladničke a následnom tepelnom ohreve v mikrovlnnej rúre za stanovených podmienok.

Výsledky čerstvo pripravených pokrmov sme vyhodnotili podľa Výnosu MP SR a MZ SR č. 06267/2006 – SL, ktorým sa vydáva hlava Potravinového kódexu upravujúca mikrobiologické požiadavky na potraviny a obaly na ich balenie. Výsledky sme vyhodnotili podľa mikrobiologických limitov pre **m**, pretože sme jednotlivé mikroorganizmy nestanovili 5 vzorkovým systémom (tab. 3).

Tab. 3 Kritériá hygieny procesu výroby (Výnos MP SR a MZ SR č.06267/2006- SL) pre hotové pokrmy v zariadeniach spoločného stravovania vrátane bufetovej časti potravinárskych predajní

Pokrmy čerstvo pripravené tepelne opracované	n	c	m	M
Koliformné baktérie	5	1	10 ²	5.10 ²
Sulfidredukujúce klostrídie	5	1	0b	50
Koagulázopozitívne stafylokoky	5	0	10 ²	-
<i>Bacillus cereus</i>	5	2	10 ²	10 ³

Pod pojmom CPM – celkový počet mikroorganizmov stanovený v 1 ml alebo v 1 g vzorky zriedovacou kultivačnou metódou rozumieme počet kolónií označovaných KTJ, ktoré narástli z očkovaného množstva za predpísaný kultivačný čas vynásobený recipročnou hodnotou zriedenia vzorky, za predpísanej kultivačnej teploty. Takto stanovená KTJ predstavuje len percento zo skutočného počtu. Je to následok toho, že konkrétne kultivačné parametre nevyhovujú fyziologickým požiadavkám všetkých druhov a rodov baktérií (STN ISO 4833). CPM sa zisťuje z dôvodu preverenia čistoty výroby. Taktiež poukazuje na nezávládnutie chladiaceho procesu a neprípustný čas skladovania.

Ako uvádza Valík et al. (2011), stanovenie CPM je dôležité z dôvodu zistenia úrovne mikrobiálnej čistoty daného výrobku.

V čerstvo pripravenom rizote (tab. 4) bol celkový počet mikroorganizmov na úrovni 1,75.10²±0,19 KTJ.g⁻¹. Uchovávaním vzoriek rizota cez noc v chladničke hodnoty CPM stúpili,

a to na druhý deň na úroveň $1,82 \cdot 10^2 \pm 1,04 \text{ KTJ} \cdot \text{g}^{-1}$ a na tretí dokonca na $2,93 \cdot 10^2 \pm 0,50 \text{ KTJ} \cdot \text{g}^{-1}$.

Tab. 4 Matematicko-štatistické ukazovatele pre hodnotenie CPM v čerstvo pripravenom a chladenom rizote (n = 9)

Celkový počet mikroorganizmov [$\text{KTJ} \cdot \text{g}^{-1}$]			
Ukazovateľ	Čerstvo pripravené	Chladené v chladničke (4 °C)	Chladené v chladničke (4 °C)
	1. deň	2. deň	3. deň
$\bar{x}$	$1,75 \cdot 10^2$	$1,82 \cdot 10^2$	$2,93 \cdot 10^2$
s_x	$0,19 \cdot 10^2$	$1,04 \cdot 10^2$	$0,50 \cdot 10^2$
$x_{\min}$	$1,54 \cdot 10^2$	$1,27 \cdot 10^2$	$2,45 \cdot 10^2$
$x_{\max}$	$1,90 \cdot 10^2$	$2,63 \cdot 10^2$	$3,45 \cdot 10^2$
$v [\%]$	10,71	57,30	17,07

Celkový počet mikroorganizmov sa vo vzorkách rizota pohyboval v intervale od $1,27 \cdot 10^2 \pm 0,16 \text{ KTJ} \cdot \text{g}^{-1}$ vo vzorke regenerovanej 1 minútu v intenzite žiarenia 750 W do $5,81 \cdot 10^2 \pm 0,63 \text{ KTJ} \cdot \text{g}^{-1}$ vo vzorke regenerovanej 30 s pri 500 W. Z výsledkov vyplýva, že najviac mikroorganizmov sa vyskytovalo pri ohreve s intenzitou 500 W a dĺžkou žiarenia 30 s. Na základe výsledkov odporúčame intenzitu ohrevu 750 W a čas ohrevu 1 minúta (tab. 5).

Tab. 5 Matematicko-štatistické ukazovatele pre hodnotenie CPM v rizote po regenerácii (n = 27)

Regenerované v mikrovlnnej rúre	2 deň				3 deň		
		1 min	45 s	30 s	1 min	45 s	30 s
750 W	$\bar{x}$	$1,27 \cdot 10^2$	$1,39 \cdot 10^2$	$1,69 \cdot 10^2$	$1,30 \cdot 10^2$	$1,72 \cdot 10^2$	$2,36 \cdot 10^2$
	s_x	$0,16 \cdot 10^2$	$0,41 \cdot 10^2$	$0,89 \cdot 10^2$	$0,36 \cdot 10^2$	$0,79 \cdot 10^2$	$0,71 \cdot 10^2$
	$x_{\min}$	$1,27 \cdot 10^2$	$1,09 \cdot 10^2$	$1,09 \cdot 10^2$	$1,09 \cdot 10^2$	$1,27 \cdot 10^2$	$1,54 \cdot 10^2$
	$x_{\max}$	$1,36 \cdot 10^2$	$1,39 \cdot 10^2$	$2,72 \cdot 10^2$	$1,72 \cdot 10^2$	$2,63 \cdot 10^2$	$2,81 \cdot 10^2$
	$v [\%]$	12,27	29,20	52,78	27,98	45,56	30,07
650 W	$\bar{x}$	$1,69 \cdot 10^2$	$1,81 \cdot 10^2$	$2,72 \cdot 10^2$	$2,51 \cdot 10^2$	$2,54 \cdot 10^2$	$3,21 \cdot 10^2$
	s_x	$0,37 \cdot 10^2$	$0,81 \cdot 10^2$	$0,65 \cdot 10^2$	$0,89 \cdot 10^2$	$1,74 \cdot 10^2$	$1,00 \cdot 10^2$
	$x_{\min}$	$1,36 \cdot 10^2$	$1,18 \cdot 10^2$	$2,18 \cdot 10^2$	$2,00 \cdot 10^2$	$1,36 \cdot 10^2$	$2,63 \cdot 10^2$
	$x_{\max}$	$2,09 \cdot 10^2$	$2,72 \cdot 10^2$	$3,45 \cdot 10^2$	$3,54 \cdot 10^2$	$4,54 \cdot 10^2$	$4,36 \cdot 10^2$
	$v [\%]$	21,80	44,42	24,03	35,38	68,56	31,15
500 W	$\bar{x}$	$3,36 \cdot 10^2$	$4,11 \cdot 10^2$	$4,84 \cdot 10^2$	$3,57 \cdot 10^2$	$4,66 \cdot 10^2$	$5,81 \cdot 10^2$
	s_x	$0,47 \cdot 10^2$	$0,51 \cdot 10^2$	$1,14 \cdot 10^2$	$1,09 \cdot 10^2$	$0,26 \cdot 10^2$	$0,63 \cdot 10^2$
	$x_{\min}$	$3,09 \cdot 10^2$	$3,54 \cdot 10^2$	$3,54 \cdot 10^2$	$2,54 \cdot 10^2$	$4,36 \cdot 10^2$	$5,45 \cdot 10^2$
	$x_{\max}$	$3,90 \cdot 10^2$	$4,54 \cdot 10^2$	$5,63 \cdot 10^2$	$4,72 \cdot 10^2$	$4,81 \cdot 10^2$	$6,54 \cdot 10^2$
	$v [\%]$	13,98	12,50	23,47	30,67	5,58	10,83

Analýzy vlákňitých mikroskopických húb a kvasiniek sme v rámci pokusu robili aj napriek tomu, že v legislatíve (výnos č. 06267/100-SL) nie sú určené maximálne prípustné limity pre mikroskopické huby v čerstvo pripravených tepelne opracovaných pokrmoch.

Mikroskopické huby predstavujú dôležitú časť všetkých mikroorganizmov. Venuje sa im veľká pozornosť vo vzťahu k ľuďom a zvieratám. V priaznivých podmienkach mikroskopické huby svojou nežiaducou činnosťou môžu zničiť veľké množstvá rôznych surovín a produktov. Niektoré druhy mikroskopických húb využívame v potravinárskom priemysle pri výrobe potravín (Kačániová et al., 2019).

Kontaminácia potravín vláknitými mikroskopickými hubami je veľmi užitočným indikátorom na hodnotenie kvality potravín. Vláknité mikroskopické huby bežne kontaminujú rôzne potraviny a spôsobujú znehodnotenie produkciou mykotoxínov, ktoré môžu spôsobiť poškodenie pečene a otravu jedlom u ľudí (Zakki et al., 2017).

Počet VMH sa v jednotlivých vzorkách – čerstvých i podrobených rôznym podmienkam mikrovlnného ohrevu – pohyboval v nízkych množstvách $<1.10^1$ KTJ.g⁻¹, mierne sa zvýšil pri intenzite ohrevu 500 W, kedy bol počet $<4.10^1$ KTJ.g⁻¹.

Kvasinky sú mikroskopické huby, ktoré sa najčastejšie rozmnožujú vegetatívne pučaním buniek, alebo menej často pričným delením. Sú to eukaryotické organizmy, ktoré sa rozmnožujú pomalšie ako väčšina baktérií, a preto sa zvyčajne nerozmnožujú v prostredí, ktoré vyhovuje baktériám. Podobne ako vláknité mikromycéty naopak tolerujú kyslé pH. Kvasinky sú aktívnejšie v kyslom a kvapalnom prostredí. Avšak mnohí zástupcovia kvasiniek sú odolní voči slnečnému žiareniu a vysušeniu (Tančinová et al., 2017).

Počet kvasiniek v rizote bol podobne ako pri vláknitých mikroskopických húb nízky. V čerstvo pripravených vzorkách sa kvasinky takmer vôbec nevyskytovali, resp. sa vyskytovali v množstve $<1.10^1$ KTJ.g⁻¹. Počas ďalších dní uchovávaní a regenerovania vzoriek sa ich počty mierne zvýšili. Druhý a tretí deň analýzy sa počet kvasiniek v chladenej vzorke pohyboval v rozmedzí od $<1.10^1$ KTJ.g⁻¹ do $5,4.10^1$ KTJ.g⁻¹. Vo vzorkách analyzovaných po regenerácii v mikrovlnnej rúre sa ich počet výrazne nemenil, avšak malé zmeny nastali pri intenzite ohrevu 650 W a čase 1 minúta, resp. 650 W a čase 30 sekúnd ($<1.10^1$ KTJ.g⁻¹).

Baktéria *Bacillus cereus* je z hľadiska ochorenia z potravín významným zástupcom veľkého rodu *Bacillus*, ktorý je známy ako potenciálny kontaminant potravín rastlinného aj živočíšneho pôvodu. Do potravín sa dostáva kontaminovanými surovinami – hlavne zeleninou, múkou, korením, cukrom. V týchto surovinách je prítomný vo forme odolných spór, ktoré mu umožňujú znášať suché prostredie a prežívať i bežné teplotné intervaly pri výrobe potravín. Najčastejšie bol jeho výskyt preukázaný v ryži, surovom mäse, rybách, mlieku, zelenine a korení (Long et al., 2018).

V Anglicku je ochorenie nazývané „syndróm čínskej reštaurácie“. Veľké množstvo ryže uvarenej do zásoby niekoľko dní dopredu poskytuje ideálne prostredie k rozmnožovaniu *B. cereus*. Počas skladovania predvarenej ryže dochádza ku klíčeniu a rastu spór a následnej produkcii toxínov (Gherardi, 2016).

Bacillus cereus sa vo vzorkách rizota vyskytoval v počte $<1.10^1$ KTJ.g⁻¹. Regenerácia mikrovlnným ohrevom naňho nemala žiaden vplyv. Zároveň možno konštatovať, že aj proces uchovávaní pokrmov v chladničke a ďalšia manipulácia s nimi nespôsobila ich kontamináciu. Ryžové jedlá sú pritom náchylné na rozmnožovanie *B. cereus* práve pri zlom skladovaní.

Tab. 6 Bakteriálni pôvodcovia ochorenia z potravín (Výnos č. 062067/2006-SL)

Patogénne baktérie	Potraviny	NMH*
<i>Bacillus cereus</i>	Potraviny určené na priamu ľudskú spotrebu	10 ⁵ .g
	Potraviny na priamu ľudskú spotrebu	10 ⁴ .g
	Potraviny pre dojčatá a malé deti	10 ² .g

*NMH = Najvyššia medzná hodnota

Pre zamedzenie rastu baktérií *B. cereus* je nutné skladovať ryžu v teplote najviac 15 °C. Aby sa zamedzila aj tvorba emetického toxínu v uvarenej ryži, je potrebná teplota pod 12 °C, ešte lepšie pod 10 °C. Čím skôr teda uložíme ryžu do chladu pod 10 °C, tým menej nebezpečného toxínu sa v nej stihne vyprodukovať. Raz uvarená ryža sa odporúča ohrievať najviac jedenkrát (Palovčíková, 2018).

Prítomnosť koliformných baktérií v potravinách a vode vo všeobecnosti znamená fekálnu kontamináciu, ktorá vedie k riziku pôsobenia patogénov spôsobujúcich gastrointestinálne ochorenia. Nedostatočná sanitácia výrobného prostredia a zlá osobná hygiena sú vo veľkej miere zodpovedné za kontamináciu koliformnými baktériami. Nesprávne skladovanie potravín vedie k rozmnožovaniu týchto baktérií v potravinách (Nkere et al., 2011).

Počet koliformných baktérií v rizote bol na úrovni $<1.10^1$ KTJ.g⁻¹, čo svedčí o dobrej sanitácii zariadení a náradia pri príprave samotných jedál, ale aj vzoriek.

Pozitívom je tiež kvalita surovín, ktoré boli použité na prípravu. Zároveň môžeme konštatovať, že výsledky našich analýz splnili legislatívne kritériá pre výskyt koliformných baktérií. Výnos č. 06267/2006-SL totiž stanovuje najvyššie prípustné množstvo koliformných baktérií v čerstvo pripravených tepelne opracovaných pokrmoch na 10^2 .

ZÁVER

Vo všeobecnosti platí, že nepoškodené mikrovlnné rúry sú na ohrievanie a prípravu potravín bezpečné. Ale len vtedy, ak rúru udržiavame v dobrom stave, dvierka tesnia, tesnenia sú čisté a funkčné. Napriek tomu by sme nemali jedlo prehrievať alebo nedostatočne ohrievať, stáť príliš blízko mikrovlnnej rúry alebo ohrievať čokoľvek v plastovej nádobe, pokiaľ to nie je označené ako bezpečné na použitie.

Z výsledkov našich analýz vyplývajú závery:

- V čerstvo pripravenom rizote bol celkový počet mikroorganizmov na úrovni $1,75.10^2$ KTJ.g⁻¹. Uchovávaním rizota v chladničke hodnoty CPM stúpili na druhý deň na úroveň $1,82.10^2$ KTJ.g⁻¹ a na tretí dokonca na $2,93.10^2$ KTJ.g⁻¹. Ohrevom rizota boli hodnoty CPM od $1,27.10^2$ KTJ.g⁻¹ na druhý deň pri ohreve 750 W a 1 minúte až po $5,81.10^2$ KTJ.g⁻¹ na tretí deň pri intenzite 500 W a 30 s.
- Počas troch dní analýzy boli v čerstvej vzorke, chladených vzorkách aj vo vzorkách po mikrovlnnom ohreve nízke počty VMH. Ich počet sa ešte znížil ohrievaním po dobu 1 min pri 750 W, resp. 650 W ($<4.10^1$ KTJ.g⁻¹, $<1.10^1$ KTJ.g⁻¹).
- Počet kvasiniek bol rovnako nízky. Mierne sa zvýšil na druhý a tretí deň analýzy a to v chladenej vzorke, kedy pohyboval v rozmedzí od $<4.10^1$ KTJ.g⁻¹ do $5,4.10^1$. Vo vzorkách analyzovaných po regenerácii v mikrovlnnej rúre sa ich počet výrazne nemenil, avšak malé zmeny nastali pri intenzite ohrevu 650 W a čase 1 minúta, resp. 650 W a čase 30 sekúnd ($<1.10^1$ KTJ.g⁻¹).
- *Bacillus cereus* sa vo vzorkách rizota vyskytoval v počte $<1.10^1$ KTJ.g⁻¹.
- Počet koliformných baktérií bol na úrovni $<1.10^1$ KTJ.g⁻¹, čo svedčí o dobrej sanitácii zariadení a náradia pri príprave samotných jedál, ale aj vzoriek.

Pod'akovanie: 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.

LITERATÚRA

Bukovský, I. 2013. Plasty v mikrovlnkách ako časovaná bomba? Zistite, či vám môžu ublížiť [online]. Dostupné na: <https://vysetrenie.zoznam.sk/cl/1000679/1366205/Plasty-v-mikrovlnkach>
Davidson, P. M., Cekmer, B. H. 2017. Microwaves for microbial inactivation—efficiency and inactivation kinetics. In REGIER, M. In Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition. The Microwave Processing of Foods (Second Edition). pp. 220-251. ISBN 9780081005286. Dostupné na: DOI: doi.org/10.1016/B978-0-08-100528-6.00011-5

- Gherardi, G. 2016. *Bacillus cereus* Disease Other Than Food-Borne Poisoning. In Savini, V. The Diverse Faces of *Bacillus cereus*. Academic Press. pp. 61-72. ISBN 9780128014745. Dostupné na: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801474-5.00005->
- Kačániová, M., Tančinová, D., Felšöciová, S., Mašková, Z. 2019. Prediktívna mikrobiológia v potravinárstve. Nitra: SPU. 145s. ISBN 978-50-552-2040-6
- Long, S. S., Prober, G. CH., Fischer, M. 2018. Principles and Practice of Paediatric Infectious Diseases. Elsevier, 2018. ISBN 978-0-323-40181-4
- Monaghan, P. 2014. Regeneration of pre-prepared food [online]. Dostupné na: <https://prezi.com/47ctea9ztga3/regeneration-of-pre-prepared-food/>
- Nkere, C. K., Ibe, N., Iroegbu, C. U. 2011. Bacteriological Quality of Foods and Water Sold by Vendors and in Restaurants in Nsukka, Enugu State, Nigeria: A Comparative Study of Three Microbiological Methods. In *Journal of Health, Population and Nutrition*, vol. 29, no. 6, pp. 560-566. ISSN 2072-1315. Dostupné na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3259718/>
- Palovčíková, M. 2018. Ryža môže spôsobiť vážne problémy! Ak ju varíte takto, buďte pokojní. [online] no.12.07.2018. Dostupné na: <http://www.pluska.sk/izdravie/zdrave-jedlo/ryza-moze-sposobit-vazne-zdravotne-problemy-vedeli-ste-nej-toto.html/>
- Sobral, M., Cunha, S., Faria, M., Ferreira, I. 2018. Domestic Cooking of Muscle Food: Impact on Composition of Nutrients and Contaminants. Comprehensive Reviews. In *Food Science and Food Safety*. Dostupné na: DOI: doi.org/10.1111/1541-4337.12327
- Price, M. 2018. Tieto triky zabránia vysušaniu vášho jedla v mikrovlnnej rúre [online]. Dostupné na: <https://www.cnet.com/news/how-to-microwave-your-food-without-drying-it-out/>
- Tančinová, D., Kačániová, M., Felšöciová, S., Mašková, Z. 2017. Mikrobiológia potravín. Nitra: SPU. 239 s. ISBN 978-80-552-1642-3
- Trembová, M. 2013. *Technológia prípravy pokrmov 2*. Spišská Nová Ves: Hotelová akadémia, Kód ITMS projektu: 26110130583
- Valík, L., Medvedová, A., Bírošová, L., Liptáková, D., Šnelcer, L. 2011. Contribution to the debate on the microbiological quality of raw milk from vending machines. *Potravinárstvo*. 2011, vol. 5(3), pp. 38-43. Dostupné na: <http://www.potravinarstvo.com/journal1/index.php/potravinarstvo/article/view/98/pdf>
- Výnos MP SR a MZ SR č. 062067/2006-SL, ktorým sa vydáva hlava Potravinového kódexu SR upravujúca mikrobiologické požiadavky na potraviny a na obaly na ich balenie
- Vyhláška MZ SR č. 533/2007 Z. z. o požiadavkách o podrobnostiach na zariadenia spoločného stravovania
- Yang, Y., Achaerandio, I., Pujol, M. 2016. Effect of the intensity of cooking methods on the nutritional and physical properties of potato tubers. In *Food Chemistry*, vol. 197, Part B, pp. 1301-1310. ISSN 0308-8146. DOI: 10.1016/j.foodchem.2015.11.028
- Wäppling, R. B. 2015. Improving the heating uniformity in microwave processing. In Regier, M. In Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition. The Microwave Processing of Foods (Second Edition). pp. 381-406. ISBN 9780081005286. Dostupné na: DOI: 10.1016/B978-0-08-100528-6.00017-6
- Zakki, S. A., Qureshi, A. H., Ghias, W., Sharif, M., Ansar, F. 2017. Microbial Quality Evaluation and Prevalence of Bacteria and Fungus in Different Varieties of Chicken Meat in Lahore. In *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences*, vol. 5, no. 1, pp. 30 – 37. ISSN 1482-1826. Dostupné na: https://www.researchgate.net/publication/316512251_qualities_of_Chicken_Meat_in_Lahoe
- Zavarská, S. 2018. Mikrovlnná rúra: Používať ju, či nie? Ohrozuje mikrovlnka zdravie? [online]. Dostupné na: <https://www.slovenskypacient.sk/je-mikrovlnna-rura-skodлива-ziarenie-zdravie/>
- Zeleňáková, L., Čapla, J., Zajác, P. 2018. *Hygiena výživy a stravovania: uplatňovanie hygienických zásad v zariadeniach spoločného stravovania*. Nitra: Slovenská poľnohospodárska univerzita, 2018. ISBN 978-80-552-1806-9

Kontaktná adresa: doc. Ing. Lucia Zeleňáková, PhD., Katedra hygieny a bezpečnosti potravín, FBP, SPU v Nitre, Trieda A. Hlinku 2, 949 76 Nitra. E – mail: lucia.zelenakova@uniag.sk

Ing. Anna Kolesárová, PhD., Katedra technológie a kvality rastlinných produktov, FBP, SPU v Nitre, Trieda A. Hlinku 2, 949 76 Nitra. E – mail: anna.kolesarova@uniag.sk

doc. Ing. Simona Kunová, PhD., Katedra hygieny a bezpečnosti potravín, FBP, SPU v Nitre, FBP, SPU v Nitre, Trieda A. Hlinku 2, 949 76 Nitra. E – mail: simona.kunova@uniag.sk

VPLYV APLIKÁCIE INOKULANTU NA OBSAH VYBRANÝCH POLYFENOLOVÝCH ZLÚČENÍN V SEMENÁCH LUPINY BIELEJ INFLUENCE OF INOCULANT APPLICATION ON THE CONTENT OF SELECTED POLYPHENOL COMPOUNDS IN WHITE LUPINE SEEDS

Zetochová Erika, Tirdiľová Ivana, Vollmannová Alena

Abstract: The study is focused on the effect of Rizobine inoculant application on the content of selected phenolics in the seeds of 11 foreign genotypes of white lupine (*Lupinus albus* L.). HPLC method was used for phenolic content determination. The caffeic acid content in A variant (without inoculant) was in interval 242.25 mg.kg⁻¹ Alban (FRA) - 501.53 mg.kg⁻¹ Los Palacios (ESP), while in B variant (with inoculant) it was 361.11 mg.kg⁻¹ WTD (POL) - 510.92 mg.kg⁻¹ Los Palacios (ESP). The content of trans-ferulic acid (A variant) was 1.39 mg.kg⁻¹ Solnecnyj (UKR) - 7.42 mg.kg⁻¹ Astra (CHL), in B variant it was 1.04 mg.kg⁻¹ Satmarean (ROM) - 3.17 mg.kg⁻¹ Solnecnyj (UKR). Of the determined flavonoids, the myricetin content (A variant) ranged from 7.35 mg.kg⁻¹ POP I. (POL), WTD (POL) to 12.48 mg.kg⁻¹ Satmarean (ROM), while in B variant it was 3.53 mg.kg⁻¹ Nelly (HUN) - 9.65 mg.kg⁻¹ Satmarean (ROM). The determined genistein content (A variant) was in interval 0.65 mg.kg⁻¹ R-933 (POL) - 0.90 mg.kg⁻¹ Astra (CHL) and 0.69 mg.kg⁻¹ Satmarean (ROM), POP I. (POL) - 0.88 mg.kg⁻¹ Los Palacios (ESP) in B variant.

Keywords: white lupine, inoculation, genotyp, phenolic acids, flavonoids

ÚVOD

Vzhľadom na vzrastajúci záujem odbornej, ale i laickej verejnosti o vzťahy medzi stravou a zdravím človeka, sa v poslednom období venuje zvýšená pozornosť potravinám s preukázateľným a účinným antioxidačným pôsobením. Medzi neesenciálnymi potravinovými antioxidantmi je najpočetnejšie zastúpená skupina fenolových a polyfenolových látok (Timoracká et al., 2004). Strukoviny sú dobrým zdrojom bielkovín, škrobu, vlákniny, vitamínov a minerálií a tiež obsahujú značné množstvo fenolových zlúčenín, ako sú fenolové kyseliny a flavonoidy, ktoré majú významné antioxidačné vlastnosti prospešné pre ľudské zdravie (Mudryj et al., 2014; Cornara et al., 2016; Silva et al., 2016). Zo všetkých bioaktívnych zlúčenín prítomných v semenách lupiny sú fenolové zlúčeniny primárne zodpovedné za antioxidačnú kapacitu semien (Khan et al., 2015). Fenolové kyseliny prispievajú k charakteristickej kyslej a adstringentnej chuti strukovín. Sú lokalizované v osemení a ich obsah závisí od typu a druhu strukoviny (Hagerman et al., 1998). Troszynska a Ciska (2002) sledovali zastúpenie a obsah fenolových kyselín v semenách bielych a farebných typov hrachu. Celkový obsah fenolových kyselín (voľných aj viazaných) bol vyšší vo farebných odrodách hrachu (78,53 mg.kg⁻¹ sušiny), v porovnaní s odrodami hrachu s bielym osemením (17,17 mg.kg⁻¹ sušiny).

Lupinové zrná sú bohatým zdrojom komplexných sacharidov, bielkovín, vitamínov a minerálnych prvkov. Strukovínové zrná obsahujú tiež látky na zlepšenie zdravia, ako sú fenolové zlúčeniny (Afshin et al., 2014). Fenolové zlúčeniny sú odolné voči oxidácii a chránia bunky pred poškodením a zabraňujú riziku degeneratívnych chorôb vďaka svojim antioxidačným, protizápalovým, antialergickým a antikarcinogénnym účinkom. (Nderitu et al.,

2013; Xu et al., 2009). Najbežnejšie fenolové zlúčeniny zistené v semenách lupiny bielej patria do podtried fenolových kyselín, flavónov a izoflavónov (Dueñas et al., 2009; Ranilla, Genovese a Lajolo, 2009; Siger et al., 2012).

Ďalšou významnou vlastnosťou strukovín je ich schopnosť fixovať atmosférický dusík v symbióze s pôdnymi baktériami rhizobia v súčasnosti rozšírenými v niekoľkých druhoch a rodoch (Peix et al., 2015). Tieto baktérie indukujú uzliny v koreňoch alebo stonkách strukovín, kde dochádza k fixácii dusíka (Peix et al., 2010).

Rod *Bradyrhizobium* je hlavným endosymbiontom vigny (*Vigna unguiculata*) a lupiny bielej (*Lupinus albus*) (Peix et al., 2015).



Obrázok1

Porast lupiny bielej *Lupinus albus* L. na pokusných parcelkách Výskumného ústavu rastlinnej výroby v Piešťanoch (Foto: autor)

MATERIÁL A METODIKA

Práca bola zameraná na zistenie zmien obsahu vybraných polyfenolových zlúčenín ovplyvnených pridaním inokulantu vo vybraných genotypoch lupiny bielej (*Lupinus albus* L.). Rastlinný materiál pre tento účel tvorilo 11 genotypov lupiny bielej Alban (FRA), Astra (CHL), R-933 (POL), Satmarean (ROM), Nelly (HUN), POP I. (POL), Los Palacios (ESP), Primorskij (RUS), Solnecnyj (UKR), Weibit (DEU), WTD (POL). Vybrané genotypy boli poskytnuté génovou bankou SR a boli vysiate na pokusných parcelkách Výskumného ústavu rastlinnej výroby v Piešťanoch. Inokulácia osiva bola zabezpečená inokulantom Rizobín, ktorý sa používa na inokuláciu bôbových rastlín. Vyrába sa v Anglicku (Legume technology Ltd). Je charakteristický vysokým obsahom živých baktérií - až 5×10^9 . Ako spojivo je v preparáte použitý organický polymér. Inokulant bol aplikovaný ručným premiešaním osiva.

Na stanovenie obsahu vybraných fenolových kyselín a flavonoidov sme použili HPLC metódu podľa Kreft et al. (2006) a Germ et al. (2019). Vzorky semien strukovín boli zhomogenizované

a následne bol pripravený 50 ml extrakt s použitím 80 % metanolu a Twisselmannovho extraktora. Sledované látky boli stanovené s použitím vysokoúčinného kvapalinového chromatografu Agilent 1260. Získané dáta boli spracované pomocou softvéru Agilent OpenLab ChemStation pre LC3D systémy. Výsledky analýz boli spracované štatistickým programom Statgraphics Centurion XVI.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Polyfenoly a fenolové zlúčeniny predstavujú jednu z najpočetnejších a najviac zastúpených skupín rastlinných metabolitov a tvoria tak neoddeliteľnú súčasť potravy ľudí a zvierat (Croteau et al., 2000). Fenolové kyseliny sa v rastlinách nachádzajú buď vo voľnej forme, rozpustnej konjugovanej (estero vo viazané na sacharidové zložky), alebo viazanej (spojené kovalentnými väzbami) so zložkami bunkovej steny (Liu, 2004). Ako uvádza odborná literatúra, biologická aktivita a určovanie kvality lupiny sú spojené aj s jej obsahom fenolových látok. Antibakteriálna aktivita, ktorá bola zistená v strukoch lupiny, je závislá od celkového obsahu fenolových zlúčenín, avšak antioxidačná aktivita kultivarov lupiny nemusí byť závislá od farby strukov a obsahu polyfenolov (Lampart-Szczapa et al., 2003). V našej práci sme sa zamerali na hodnotenie obsahu vybraných fenolových kyselín – kyseliny kávovej a trans ferulovej. Z flavonoidov sme analyzovali myricetin a genisteín. Celkový priemerný obsah jednotlivých polyfenolových zlúčenín v kontrolnom variante A a variante s pridaním inokulantu B vo vybraných genotypoch lupiny bielej uvádza tabuľka 1.

Tabuľka 1 Priemerný obsah vybraných polyfenolových zlúčenín vo vybraných odrodách lupiny bielej v kontrolnom variante A a variante s pridaním inokulantu B.

Polyfenolové zlúčeniny (mg.kg ⁻¹)	Lupina biela variant A	Lupina biela variant B
Kyselina kávová	415,529 ± 85,508	426,887 ± 49,341
Kyselina trans-ferulová	4,042 ± 1,889	2,113 ± 0,715
Myricetín	8,707 ± 1,647	7,663 ± 1,854
Genisteín	0,777 ± 0,308	0,765 ± 0,311

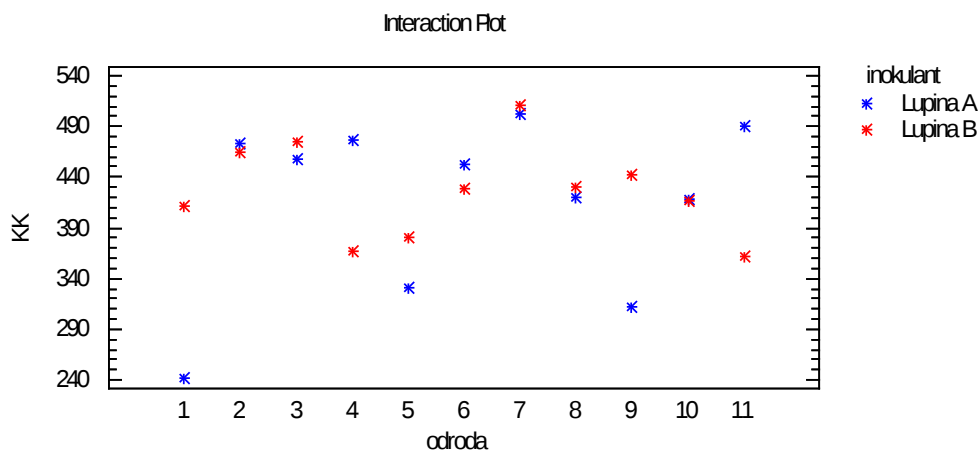
Obsah kyseliny kávovej sa pohyboval v rozmedzí od 242,25 mg.kg⁻¹ Alban (FRA) do 501,53 mg.kg⁻¹ Los Palacios (ESP) v kontrolnom variante A. Najnižší obsah kyseliny kávovej vo variante s pridaním inokulantu B sme zaznamenali v odrode WTD (POL) 361,11 mg.kg⁻¹, najvyšší rovnako ako pri variante A v odrode Los Palacios (ESP) 510,92 mg.kg⁻¹. Porovnaním variantov A a B sme zistili v odrode Alban (FRA) zvýšenie obsahu kyseliny kávovej o 69,90 % pridaním inokulantu vo variante B. Najnižší % rozdiel v rámci variantov A a B bol zaznamenaný v odrode Weibit (DEU) 0,60 %. Na základe analýzy rozptylu môžeme konštatovať, že inokulácia a vybrané testované odrody lupiny bielej a tiež ich vzájomná interakcia sú významným zdrojom variability obsahu kyseliny kávovej (Tab. 2, Obr. 2.).

Tabuľka 2 Analýzy rozptylu obsahu kyseliny kávovej v sledovaných odrodách lupiny bielej v závislosti od inokulantu a odrody

zdroj premenlivosti	Df	Priemerné štvorce	F-Koeficient	P-Hodnota	HD _{0,05}
A:inokulant	1	2384,35	10845,69	0,0000	0,199586
B:odroda	10	21713,7	98769,33	0,0000	0,46807
Interakcia					
AB	10	15373,0	69927,41	0,0000	
Reziduálny rozptyl	66	1,08904			
Súčet	87				

Df-stupeň voľnosti, HD_{0,05}-hraničná diferencia pri $\alpha=0,05$

Obrázok2 Graf vplyvu vzájomnej interakcie odrody a inokulantu na obsah kyseliny kávovej vo vybraných odrodách lupiny bielej vo variantoch A a B.



Ďalšou zo sledovaných fenolových kyselín bola kyselina trans-ferulová, ktorej obsah sa zvýšil o 128,36 % pridaním inokulantu v odrode Solnecnyj (UKR). Obsah kyseliny trans - ferulovej v kontrolnom variante A bol od 1,39 mg.kg⁻¹ Solnecnyj (UKR) do 7,42 mg.kg⁻¹ Astra (CHL). Všetky ostatné odrody mali nižší obsah kyseliny trans-ferulovej vo variante s pridaním inokulatu B a pohyboval sa v rozmedzí od 1,04 mg.kg⁻¹ Satmarean (ROM) – 7,42 mg.kg⁻¹ Solnecnyj (UKR). Odroda Primorskij (RUS) sa vyznačovala rovnakým obsahom kyseliny trans-ferulovej 1,79 mg.kg⁻¹ v oboch variantoch A a B. Obsah kyseliny trans-ferulovej je tak štatisticky významne ovplyvnený nielen inokulantom ale aj odrodou a ich vzájomnou interakciou (Tab. 3, Obr. 3).

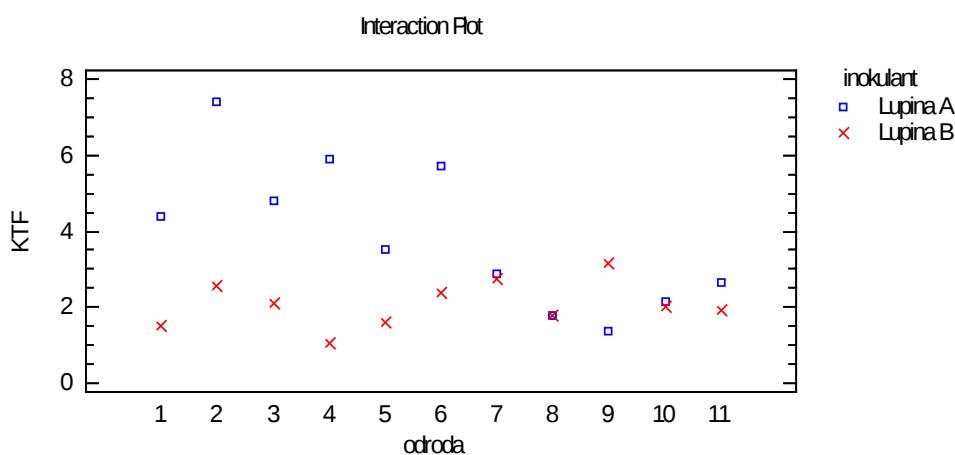
Król a kol. (2018) zistili, že najvyššia koncentrácia kyseliny ferulovej sa nachádza v extraktoch z nízkoalkaloidových kultivarov Dalbor (2,123 mg.g⁻¹ extraktu) a Zeus (1,529 mg.g⁻¹ extraktu). Mierne nižšie koncentrácie kyseliny ferulovej boli zaznamenané v extraktoch zo semien odrody Kadryl (1,231 mg.g⁻¹ extraktu). Najnižšia koncentrácia kyseliny ferulovej bola zistená v extraktoch semien odrody Karo (1,437 mg.g⁻¹ extraktu).

Tabuľka 3 Analýzy rozptylu obsahu kyseliny trans-ferulovej v sledovaných odrodách lupiny bielej v závislosti od inokulantu a odrody

Zdroj premenlivosti	Df	Priemerné štvorce	F-Koeficient	P-Hodnota	HD _{0,05}
A:inokulant	1	71,2142	637,78	0,0000	0,142239
B:odroda	10	7,19649	64,45	0,0000	
Interakcia					
AB		9,15645	82,00	0,0000	0,333581
Reziduálny rozptyl	66	0,111659			
Súčet	87				

Df-stupeň voľnosti, HD_{0,05}-hraničná diferencia pri $\alpha=0,05$

Obrázok 3 Graf vplyvu vzájomnej interakcie odrody a inokulantu na obsah kyseliny trans-ferulovej vo vybraných odrodách lupiny bielej vo variantoch A a B.



Flavonoidy sa najčastejšie vyskytujú vo forme glykozidov, lebo táto forma im umožňuje vyššiu rozpustnosť v bežných fyziologických podmienkach rastlinnej bunky (Erlund, 2002) a súčasne znižuje ich reaktivitu a zabezpečuje lepšiu stabilitu (Shi et al., 2005). Podľa Ortembergovej (2000) flavonoidy majú vynikajúce detoxikačné a antioxidačné vlastnosti, dokonca štvornásobne silnejšie ako vitamín E. Slúžia ako zachytávače voľných radikálov, ktoré poškodzujú bunky. Niektoré zabráňujú rastu nádorových buniek a zabíjajú ich. Flavonoidy sú najviac zastúpené v ovocí, zelenine a strukovinách. Najväčšie množstvo flavonoidov možno nájsť v sóji a v ďalších strukovinách, v orechoch a v rastlinných semenách.

Z flavonoidov sme vo vybraných odrodách lupiny bielej sledovali obsah myricetínu, ktorý sa pohyboval v kontrolnom variante A v rozmedzí od 7,35 mg.kg⁻¹ POP I. (POL), WTD (POL) do 12,48 Satmarean (ROM). Pridaním inokulantu sa jeho obsah zvýšil u odrody Alban (FRA) o 4,72 % a odrody R-933 o 8,38 %. U ostatných odrôd sme zaznamenali zníženie obsahu myricetínu pridaním inokulantu vo variante B. Namerané hodnoty sa tak vo variante B s pridaním inokulantu pohybovali v rozmedzí od 3,53 mg.kg⁻¹ Nelly (HUN) do 9,65 mg.kg⁻¹ Satmarean (ROM). Odroda Satmarean (ROM) sa vyznačovala zároveň rovnakým obsahom genistéínu v oboch variantoch 0,69 mg.kg⁻¹. V kontrolnom variante A sa obsah genistéínu pohyboval od 0,65 mg.kg⁻¹ R-933 (POL) do 0,90 mg.kg⁻¹ Astra (CHL). Pridaním inokulantu variant B boli namerané hodnoty v rozmedzí od 0,69 mg.kg⁻¹ Satmarean (ROM), POP I. (POL)

do 0,88 mg.kg⁻¹ Los Palacios (ESP). Zo sledovaných flavonoidov bol obsah myricetínu ovplyvnený štatisticky významne inokulantom a tiež odrodou a ich vzájomnou interakciou (Tab.4). Inokulant a výber odrody v prípade sledovaného obsahu genistéínu v lupine bielej nie je štatisticky významným zdrojom premenlivosti (Tab.5).

Tabuľka 4 Analýzy rozptylu obsahu myricetínu v sledovaných odrodách lupiny bielej v závislosti od inokulantu a odrody

Zdroj premenlivosti	Df	Priemerné štvorce	F-Koeficient	P-Hodnota	HD _{0,05}
A:inokulant	1	28,1363	93,86	0,0000	0,24489
B:odroda	9	15,9252	53,13	0,0000	0,54759
Interakcia					
AB	9	8,00458	26,70	0,0000	
Reziduálny rozptyl	60	0,299764			
Súčet	79				

Df-stupeň voľnosti, HD_{0,05}-hraničná diferencia pri $\alpha=0,05$

Tabuľka 5 Analýzy rozptylu genistéínu v sledovaných odrodách lupiny bielej v závislosti od inokulantu a odrody

Zdroj premenlivosti	Df	Priemerné štvorce	F-Koeficient	P-Hodnota	HD _{0,05}
A:inokulant	1	0,00124116	0,01	0,9112	0,14029
B:odroda	10	0,0350113	0,35	0,9622	0,313698
Reziduálny rozptyl	72	0,0990522			
Súčet	83				

Df-stupeň voľnosti, HD_{0,05}-hraničná diferencia pri $\alpha=0,05$

ZÁVER

Najznámejšie bioaktívne zlúčeniny strukovín sú izoflavóny, ktoré spolu s fenolovými kyselinami a prokyanidínmi tvoria hlavné fenolové zlúčeniny prítomné v ich semenách (Silva et al., 2016) a niektoré z týchto bioaktívnych zlúčenín sú ovplyvnené rhizobiálnou inokuláciou. Naočkovanie týmito baktériami indukuje metabolické zmeny v rastline, z ktorých sa doteraz študuje zvýšenie obsahu dusíka a bielkovín a v poľnohospodárstve sa využíva na zlepšenie výnosu niekoľkých strukovín (Silva et al., 2017).

V našej práci sme sa zamerali na sledovanie vplyvu inokulácie na obsah vybraných polyfenolových zlúčenín. Záverom možno zhodnotiť, že inokulant, odroda a tiež ich vzájomná interakcia štatisticky významne vplývajú na obsah vybraných fenolových kyselín a myricetínu pri hladine spoľahlivosti 95,0 % nakoľko hodnoty P sú menšie ako 0,05. V prípade genistéínu sme zistili, že hodnoty P sú väčšie ako 0,05, nemá tak odroda a tiež inokulant štatisticky významný vplyv na obsah genistéínu pri hladine spoľahlivosti 95,0 %.

LITERATÚRA

Afshin, A., Micha, R., Khatibzadeh, S., Mozaffarian, D. 2014. Consumption of nuts and legumes and risk of incident ischemic heart disease, stroke, and diabetes: A systematic review and meta-analysis. In *The American Journal of Clinical Nutrition*, vol. 100, no. 1, pp. 278-288. <https://doi.org/10.3945/ajcn.113.076901>

- Cornara L, Xiao J, Burlando B. 2016 Therapeutic potential of temperate forage legumes: a review. In *Crit Rev Food Sci Nutr*. vol. 56, pp. 149–S161. <https://doi.org/10.1080/10408398.2015.1038378>
- Croteau, R., Kutchan, T. M., Lewis, N. G. 2000. *Natural products secondary metabolites*. In *Biochemistry and molecular biology of plants*, pp. 1250-1318.
- Dueñas, M., Hernández, T., Estrella, I., Fernández, D. 2009. Germination as a process to increase the polyphenol content and antioxidant activity of lupin seeds (*Lupinus angustifolius* L.). *Food chemistry*, vol. 117, pp. 599-607. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.04.051>
- Erlund, I., 2002. Chemical analysis and pharmacokinetics of the flavonoids quercetin, hesperetin and naringenin in humans. *Dissertation*. University of Helsinki, Helsinki.
- Hagerman, A. E., Riedl, K. M., Jones, A., Sovik, K. N., Ritchard, N. T., Hartzfeld, P. W., Riechel, T. L. 1998. In Król, A., Amarowicz, R., & Weidner, S. 2018. Content of phenolic compounds and antioxidant properties in seeds of sweet and bitter cultivars of lupine (*Lupinus angustifolius*). In *Natural Product Communications*, vol. 13, no. 10, 1934578X1801301027. <https://doi.org/10.1177%2F1934578X1801301027>
- Lampart-Szczapa E, Korczak J, Nogala-Kalucka M, Zawirska-Wojtasiak R. 2003. Antioxidant properties of lupin seed products. In *Food Chem*, vol. 83, pp. 279–285. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(03\)00091-8](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(03)00091-8)
- Liu, R. H. 2004. *Potencial synergy of phytochemicals in cancer prevention: mechanism of action*. In *Journal of Nutrition*, vol. 134, pp. 3479-3485. <https://doi.org/10.1093/jn/134.12.3479S>
- Khan, M.K., Kampanit, W., Nasar-Abbas, S.M., Zill-e-Huma, Jayasena, V. 2015. Phytochemical composition and bioactivities of lupin: A review; In *International Journal of Food Science and Technology*, vol. 50, pp. 2004-2012. <https://doi.org/10.1111/ijfs.12796>
- Mudryj, A.N., Yu, N., Aukema, H.M. 2014. Nutritional and health benefits of pulses. In *Appl Physiol, Nutr Metabolism*, vol. 9, pp. 1197–1204. <https://doi.org/10.1139/apnm-2013-0557>
- Nderitu, A. M., Dykes, L., Awika, J. M., Minnaar, A., Duodu, K. G. 2013. Phenolic composition and inhibitory effect against oxidative DNA damage of cooked cowpeas as affected by simulated in vitro gastrointestinal digestion. In *Food Chemistry*, vol. 141, no. 3, p. 1763-177. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.05.001>
- Ortembergová, A. 2002. *Mládne s antioxidanty*. 1. vyd. Praha: Ivo Železný, 126s., ISBN 80-237-3742-2.
- Peix, A, Ramírez-Bahena, M.H, Velázquez, E, et al. 2015. Bacterial associations with legumes. In *Crit Rev Plant Sci*, vol. 34, pp. 17–42. <https://doi.org/10.1080/07352689.2014.897899>
- Peix, A., Velázquez E, Silva Luis, R, et al. 2010 *Key molecules involved in beneficial infection process in rhizobia-legume symbiosis*. In Khan MS, Zaidi A, Mussarrat J, et al., editors. *Microbes for legume improvement*. Berlin: Springer; pp. 55–79.
- Ranilla, L. G., Genovese, M. I., & Lajolo, F. M. 2009. Isoflavones and antioxidant capacity of Peruvian and Brazilian lupin cultivars. In *Journal of Food Composition and Analysis*, vol. 22, no. 5, pp. 397-404. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2008.06.011>
- Shi, J., Nawaz, H., Pohorly, J., Mittal, G., Kakuda, Y., & Jiang, Y. (2005). Extraction of polyphenolics from plant material for functional foods—Engineering and technology. *Food reviews international*, 21(1), 139-166. <https://doi.org/10.1081/FRI-200040606>
- Siger, A., Czubinski, J., Kachlicki, P., Dwiecki, K., Lampart-Szczapa, E., Nogala-Kalucka, M. 2012. Antioxidant activity and phenolic content in three lupin species. In *Journal of food composition and analysis*, vol. 25, no. 2, pp. 190-197. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2011.10.002>
- Silva, L.R, Peix, Á, Albuquerque, C, et al. 2016. *Bioactive compounds of legumes as health promoters*. In: Silva, L.R., Silva, B.M., editors. *Natural bioactive compounds from fruits and vegetables as health promoters*. part 2. Sharjah, UAE: Bentham Science Publishers; 2016. pp. 3–27. <https://doi.org/10.2174/9781681082431116010004>
- Silva, L. R., Bento, C., Gonçalves, A. C., Flores-Félix, J. D., Ramírez-Bahena, M. H., Peix, A., Velázquez, E. 2017. Legume bioactive compounds: influence of rhizobial inoculation. In *AIMS microbiology*, vol. 3, no. 2, p.267. <https://doi.org/10.3934/microbiol.2017.2.267>
- Timoracká, M., Vollmannová, A., Bystrická, J., 2004. Polyphenols in chosen species of legumens – a review. In *Potravinárstvo Slovak Journal of Food Sciences*, 2010, 4.4: 65-72. <https://doi.org/10.5219/81>
- Troszynska, A., Ciska, E. 2002. Phenolic compounds of seed coats of white and coloured varieties of pea (*Pisum sativum* L.) and their total antioxidant activity. In *Czech J. Food Sci*, vol. 20, 2002, no. 1, pp. 15-22. <https://doi.org/10.17221/3504-CJFS>
- Xu, J. G., Tian, C. R., Hu, Q. P., Luo, J. Y., Wang, X. D., Tian, X. D. 2009. Dynamic changes in phenolic compounds and antioxidant activity in oats (*Avena nuda* L.) during steeping and germination. In *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 57, no. 21, pp. 10392-10398. <https://doi.org/10.1021/jf902778j>

PodĎakovanie: Táto práca bola podporovaná projektom VEGA 1/0139/17.

Kontaktná adresa: Erika Zetochová, National Agriculture and Food Centre – Research Institute of Plant Production, Bratislavská 122, 921 01 Piešťany, Slovakia, Tel.: +42133797303, E-mail: erika.zetochova@nppc.sk
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3170-1603>

Alena Vollmannová, Slovak University of Agriculture in Nitra, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Department of Chemistry, Tr. A. Hlinku 2, 94976 Nitra, Slovakia, Tel.: +421376414374, E-mail: alena.vollmannova@uniag.sk

Ivana Tirdiliová, Slovak University of Agriculture in Nitra, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Department of Chemistry, Tr. A. Hlinku 2, 94976 Nitra, Slovakia, Tel.: +421376414378, E-mail: xtirdilova@uniag.sk

OCCURRENCE OF SOME PATHOGENITY FACTORS IN STAPHYLOCOCCI ISOLATED FROM MASTITIC DAIRY COWS

František Zigo, Zuzana Farkašová, Zuzana Lacková, Jana Výrostková, Ivana Regecová, Mária Vargová, Nad'a Sasáková

Abstract: The aim of study was to monitor the occurrence of mastitis in five different dairy herds of Slovak spotted cattle breed at the first phase of lactation. The comprehensive examination of 960 dairy cows included clinical examination, sensory analysis of milk from fore stripping of each udder quarter, followed by assessment of the California mastitis test and laboratory analyses of bacteria pathogens. Screening the health status of the mammary gland revealed that 314 cows (32.7%) had positive CMT score (1-3) for one or more quarters. Out of 230 infected milk samples, representing 24.0% of all examined dairy cows, were the most commonly isolated staphylococci (59.1% of positive findings), followed by *E. coli* (11.3%), streptococci *Str. uberis* (9.1%), *Str. agalactiae* (3.4%), and enterococci (6.1%). From 136 isolates of staphylococci, *S. aureus*, *S. chromogenes* and *S. warneri* had the most numerous representation of detected virulence factors, as demonstrated by the increased incidence of clinical forms of mastitis compared to less virulent strains. Generally, isolated staphylococci showed production of hemolysins β and δ with formation of biofilm and common resistance to streptomycin, neomycin cloxacillin and amoxicillin.

Keywords: milking, cows, mastitis, virulence factors, biofilm, resistance

INTRODUCTION

Mastitis is an inflammation of the udder that affects a high proportion of dairy cows throughout the world. Mastitis differs from most other animal diseases in that several diverse kinds of bacteria are capable of infecting the udder. These pathogens invade the udder, multiply, and produce harmful substances that result in inflammation, reduced milk production, and altered milk quality (Dufour et al., 2019; Tančin et al., 2020).

Microorganisms that most frequently cause mastitis can be divided into two broad categories, as follows: contagious pathogens, which are spread from cow to cow, primarily during the milking process, and environmental pathogens, which are found throughout the habitat of dairy cows. The predominant contagious pathogens are *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, and *Corynebacterium bovis* (Vasil' et al., 2012), while the predominant environmental pathogens are *Escherichia coli*, *Streptococcus uberis*, *Streptococcus dysgalactiae*, and other Gram-positive and catalase-negative cocci (Cobirka, Tančin and Slama, 2020).

In recent years, *S. aureus* and coagulase-negative staphylococci (CoNS) belong of the most common microorganisms causing mastitis in dairy cows (El-Diasty et al., 2019). The manifestations of the inflammatory process caused by staphylococci are different, as they depend on the degree of reaction of the udder tissue to injury or infection. The clinical manifestations of mammary gland (MG) inflammation as well as its further course depend on the interplay between the innate resistance and adaptive immunity of the dairy cow and the concentration, and virulence of staphylococcal strains (Morini, Dastehgoli and Akramian, 2007).

The CoNS usually have a lower proportion of virulence factors compared to *S. aureus*, but their essential factor of pathogenicity is the production of a biofilm and thus resist the applied disinfection and sanitation procedures. In addition, in the study, Nascimento et al. (2005) confirmed that the CoNS (*S. epidemidis*, *S. saprophyticus*, *S. hominis* and *S. aerletae* isolated from mastitic cows, were resistant to the antibiotics used and were able to produce some of the staphylococcal enterotoxins. Haveri, Roslöf and Pyörälä, (2007) and Vasil et al. (2012; 2017)

consider the ability to produce biofilm and lysine to be an important virulence factors that are responsible for the development of clinical forms of mastitis.

Previous studies indicate that staphylococci with some virulence factors are very important in pathogenesis of mastitis and its clinical manifestation. Therefore, the aim of study was to monitor the occurrence of udder pathogens. Particularly in isolated staphylococci were determined the presence of selected virulence factors (formation of hemolysins, gelatinase, biofilm, hydrolyze DNA, and resistance to antibiotics) and their effect on the severity of mastitis in dairy cows.

MATERIAL AND METODOLOGY

Monitored herds and udder health examination

The practical part of study was realized in five different dairy herds located in Eastern (4 herds) and Western (1 herd) Slovakia with conventional (non-organic) farming. Herd size ranged from 150 to 300 dairy cows of Slovak spotted cattle breed between 1st - 4th lactation. Dairy cows from all four farms were kept in a free housing system with straw bedding and were allowed *ad libitum* access to water. All herds were fed total mixed ration based on silage, hay and concentrate according to international standards (NRC, 2001) to meet the nutritional requirements of a 600 kg cow yielding 15 – 25 kg of milk/day. All cows were milked twice daily in parallel (Boumatic, USA) or fishing parlor (DeLaval, Sweden). From all monitored dairy farms, were investigated 960 cows with the evaluation of mammary gland included clinical examination, sensory analysis of milk from fore stripping of each udder quarter and collection of a mixed milk sample from each cow with positive California mastitis test (CMT).

Laboratory analyzes

Milk inoculum (10 µl) of each sample was aerobically cultivated on the plates with 5% blood agar at 37 °C for 24h. The primocultivation and identification of *Staphylococcus* spp. was carried out according to the assessment growth of suspected bacteria on nutrient agars (5% of blood Agar, N° 110, Baird-Parker agar, Brilliance UTI Clarity Agar (OXOID Ltd., Basingstoke, Hants, UK). The pigment formation, catalase positivity, Gram positivity, creation of free or coupled coagulase, the ability of staphylococci to hydrolyze DNA, production of hemolysins, gelatinase and biofilm (Fig. 1) were determined according to studies Vasil' et al. (2017) and Hiko (2019). Streptococci were determined by colony morphology and CAMP-reaction according to Holko et al. (2019). Enterococci were confirmed by Gram-staining and growth of typical colonies on SlaBa-plates (Slanetz & Bartley, Medium, Oxoid Ltd., Basingstoke, England). A milk sample was classified as positive if more than three colonies from one type of colony-forming unit (CFU) of *S. aureus* or *Str. agalactiae* was isolated. For other bacteria, the presence of more than five CFUs was needed for positive classification. Samples were classified as contaminated if three or more bacterial types were isolated from one milk sample and growth of a major udder pathogen was not identified. The identification of each species was made by Staphy test, Strepto test, and resp. Entero test using the software TNW Pro 7.0 (Erba-Lachema, Brno, Czech Republic) with a probability of correct designations of the kind above 90%.



Figure 1 DNase test and biofilm production on Congo Red Agar for staphylococcal detection

Susceptibility testing

Isolated staphylococci were tested for susceptibility to 14 antimicrobial agents from the following groups: penicillin, ampicillin, amoxicillin, amoxicillin+clavulanat acid, ceftiofur, cloxacillin, cephalixin enrofloxacin, lincomycin, neomycin, novobiocin, rifaximin, streptomycin and tetracycline. *In vitro* susceptibility of the isolates against antimicrobial agents was determined on Mueller Hinton agar as described by the standard disk diffusion procedure (CLSI, 2013). The diameters of the inhibition zones were evaluated (susceptible, intermediate, resistant) according to CLSI breakpoints (CLSI, 2018).

Statistical analysis

Data were entered in to Microsoft Excel 2007® (Microsoft Corp., Redmond, USA) and analyzed using Excel, State 11, and SPSS version 20 (IBM Corp., Armonk, USA). The dependence of production of virulence factors in the four most frequently isolated bacterial pathogens among the type of mastitis in cows were statistically analysed using the Chi-square test. The dependence of the individual signs was tested at a significance level $\alpha = 0.05$, with critical value = 7.815.

RESULTS AND DISCUSSION

An examination of five dairy cow herds showed, that from the 960 dairy cows examined during the first two months of lactation, 314 cows (32.7%) had CMT score (1-3) for one or more quarters. Of the mixed milk samples taken from selected dairy cows based on positive CMT score, 230 (73.2%) were identified bacterial agents of mastitis causing a clinical or subclinical form of mastitis, and 84 (26.8%) samples were identified as negative or contaminated. Out of 230 infected milk samples (23.9%) of all examined dairy cows were in 136 cases (73.2%) the most commonly isolated staphylococci. Mixed infection of two pathogens was identified in 16 cases with the combination of a major udder pathogen. The CoNS represented the most commonly detected bacteria (42.6% of positive findings); *S. aureus* (16.5%) were the second most abundant pathogens followed by *E. coli* (11.3%), streptococci (*Str. uberis*: 9.1%, *Str. agalactiae* (3.4%) and enterococci (6.1%).

Our results are consistent with the study Holko et al. (2019), which recorded a high incidence of CoNS and *S. aureus* isolated from milk samples during the examination of 42 dairy farms in the west of Slovakia. The CoNS represented 35.9% of positive findings and were the most commonly detected bacteria.

Table 1 described the number of isolated strains of *Staphylococcus* spp. and their role in severity of mastitis and the presence of selected virulence factors. Among the most serious causative agents of mastitis was *S. aureus*, which was isolated in 23 clinical and 15 subclinical cases of mastitis. Eight species were isolated from CoNS, with the following recorded as the most numerable species: *S. chromogenes* (22.4%), *S. warneri* (20.4%), *S. xylosus* (18.4%), *S.*

epidermidis (9.1%) and *S. haemolyticus* (7.1%). The representation of CoNS on the individual forms of IMI was different. Most frequently were detected cases of subclinical mastitis (58), caused predominantly by *S. warneri*, *S. xylosus* and *S. epidermidis*. Clinical mastitis was detected in 40 cases, caused by *S. chromogenes*, *S. haemolyticus*, *S. warneri*, and *S. xylosus*.

In compare to our results the researchers Supre et al. (2011) reported, that the *S. haemolyticus*, *S. chromogenes*, *S. warneri* and *S. xylosus* were isolated as dominant strains of CoNS isolated from mastitis in cows. CoNS was mainly due to clinical mastitis associated with significantly reduced milk production, an increase in SCC, and resistance to beta-lactam antibiotics (penicillin, ampicillin, amoxicillin).

For the individual virulence factors, co-production of lysines β and δ observed in 7 species, single lysine δ in 9 species of staphylococci. Production of DNase was detected in *S. aureus*, *S. chromogenes*, *S. warneri*, *S. xylosus*, and *S. haemolyticus* as well as production of gelatinase, except for *S. xylosus* and *S. haemolyticus*. The staphylococci *S. aureus*, *S. chromogenes* and *S. warneri* had most numerous representation of virulence factors (production of lysines, gelatinase and biofilm, the ability to hydrolyze DNA) what are resulted as increasing incidence of clinical cases of mastitis in compare to less virulent strains. From all 40 clinical IMI, in 35 cases the production of lysines, in 23 hydrolysis of DNA, 17 cases with production of gelatinase, and 33 cases with biofilm production were detected. Totally, the production of biofilm we found in 50 isolates, whereas in *S. capitis* the production of biofilm has not been detected. On the significance level of $\alpha = 0.05$ was confirmed the independence the production of virulence factors on type of mastitis in cows, in four strains of staphylococci (*S. aureus*, *S. chromogenes*, *S. warneri*, *S. xylosus*).

Table 1 The role of CoNS in severity of mastitis and the occurrence of selected virulence factors

<i>Staphylococcus</i> spp./number	IMI ¹ /number	hemolysins ²	DNase ³	gelatinase	biofilm	Test* G
<i>S. aureus</i> (38)	clinical (23)	9 α + β /7 α /4 δ	14	11	12	1.089*
	subclinical (15)	3 α + β /4 α	8	7	5	
<i>S. chromogenes</i> (22)	clinical (13)	4 β + δ /4 δ	3	4	7	0.332*
	subclinical (9)	2 δ	1	1	3	
<i>S. warneri</i> (20)	clinical (9)	2 β + δ /4 δ	2	2	5	1.578*
	subclinical (11)	3 β +1 δ	2	0	2	
<i>S. xylosus</i> (18)	clinical (8)	2 β + δ /3 δ	2	0	5	1.601*
	subclinical (10)	2 β +1 δ	0	0	4	
<i>S. epidermidis</i> (9)	clinical (2)	1 δ	0	0	1	-
	subclinical (7)	3 δ	0	0	2	
<i>S. haemolyticus</i> (7)	clinical (4)	2 β +1 δ	1	0	2	-
	subclinical (3)	0	0	0	0	
<i>S. capitis</i> (6)	clinical (2)	1 δ	0	0	0	-
	subclinical (4)	0	0	0	0	
<i>S. piscifermentans</i> (6)	clinical (2)	β +1 δ	0	0	1	-
	subclinical (4)	2 δ	0	0	0	
<i>S. hyicus</i> (10)	clinical (0)	0	0	0	0	-
	subclinical (10)	1 δ	0	0	1	

Note: IMI¹ – intramammary infection/number of isolates and their incidence on severity mastitis; *S. spp.* - *Staphylococcus* spp.; lysines² - production of hemolysins type α , β or δ ; DNase³ - ability of staphylococci to hydrolyze DNA; *Chi-quadrat test (on significant level $\alpha = 0.05$ (5%) critical value $\chi^2 = 7.815$), * - independence of individual sign on significant level $\alpha = 0.05$ was not rejected.

Biofilm production by the staphylococcal strains is considered an important virulence factor responsible for adhesion of these microorganisms with living or non-living surfaces

(Otto, 2018). The bacteria carrying this typical peculiarity are highly resilient to antibiotics. The intramammary infection due to biofilm producers *S. aureus* (Marques et al., 2017) or CoNS (Fredheim et al., 2009; Isaac et al., 2017) is difficult to treat even with intramammary antibiotics so proper considerations should be given to the infections produced by biofilm producing bacteria. Generally, staphylococcal strains which produce biofilm lead to chronic mastitis after unsuccessful treatment, especially with beta-lactam antibiotics in dairy animals (Vinodkumar et al., 2017).

In all isolated strains of staphylococci, *in vitro* resistance to antibiotics was tested. Out of the 136 tested isolates, 38 (27.9%) proved to be resistant to at least one antimicrobial agent. The widest spectrum of resistance was found in *S. aureus*, which showed resistance to 12 types of antimicrobial agents out the 6 (15.7%) tested species (Tab. 2).

Table 2 Antibiotic resistance of isolated udder pathogens (% of resistant pathogens) from positive milk samples

Bacterial strains	<i>S. aureus</i>	<i>S. chromogenes</i>	<i>S. warneri</i>	<i>S. xylosus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. haemolyticus</i>	<i>S. capitis</i>	<i>S. piscifermentans</i>	<i>S. hyicus</i>
n	38	22	20	18	9	7	6	6	10
Antibiotic / % of resistance	%	%	%	%	%	%	%	%	%
Penicillin	13.2	18.1	25.0	16.7	-	42.9	33.3	33.3	-
Ampicillin	13.2	9.0	15.0	16.7	11.1	28.6	16.7	16.7	-
Amoxicillin	18.4	9.0	10.0	5.6	11.1	14.3	-	-	-
Amox. + clav.	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ceftiofur	5.3	-	-	-	-	-	-	-	-
Cloxacillin	18.4	18.1	15.0	11.1	-	14.3	16.7	-	10.0
Cephalexin	10.5	9.0	-	-	-	-	-	-	-
Enrofloxacin	18.4	9.0	10.0	16.7	-	-	-	-	-
Lincomycin	13.2	9.0	5.0	11.1	-	14.3	-	33.3	-
Neomycin	31.6	18.1	20.0	16.7	11.1	42.9	33.3	-	10.0
Novobiocin	10.5	18.1	10.0	11.1	11.1	42.9	-	-	-
Rifaximin	5.3	-	-	-	-	-	-	-	-
Streptomycin	29.0	27.3	25.0	11.1	33.3	42.9	16.7	-	10.0
Tetracycline	5.3	-	-	-	-	-	-	-	-

Note: n – number of tested isolates; S. spp. - *Staphylococcus* spp.

Similar results were recorded by Bogdanovičová et al. (2014) who monitored of *Staphylococcus aureus* prevalence in raw milk and milk filters and its antibiotic resistance. Of total 58 samples were positive for *S. aureus*, of which were 37 (14.2%) isolated from raw milk samples and 21 (8.1%) from milk filters. The largest amount of *S. aureus* isolates (17.8%) from raw milk were resistant to amoxicillin, followed by oxacilin, tetracycline, erythromycin and cefotaxime, clindamycin and rifampicin.

In tested *S. aureus* (Tab. 2) is seen similar results as in the previous study. Other CoNS such as *S. chromogenes*, *S. warneri*, *S. xylosus*, and *S. haemolyticus* were resistant to 8–10 types of antimicrobials. They demonstrated high resistance to neomycin, streptomycin, novobiocin,

amoxicillin cloxacillin, lincomycin and penicillin. Generally, the lowest level of resistance was shown to the amoxicillin reinforced with clavulanic acid, tetracycline and rifaximin (Tab. 2).

CONCLUSION

The study showed that the most frequently isolated udder pathogens were CoNS, followed *S. aureus*, *E. coli* and streptococci. Coagulase negative staphylococci such as *S. chromogenes*, *S. warneri* and *S. xylosus* isolated from clinical mastitis indicated highest degree of pathogenity in production of more virulence factors (lysines, DNase, gelatinase, biofilm). From the results manifests that the impact of CoNS is increasing on IMI, probably because prevalence of others major pathogens (*Str. agalactiae* or *Str. dysgalactiae*) is decreasing. On the other hand, tested staphylococci showed frequent resistance to aminoglycosides, which are the most commonly used antimicrobials in drying and mastitis treatment of dairy cows in Slovakia. In order to reduce resistance of bacterial agents causing the IMI, it is necessary to base the obtained antibiogram results on monitored farms as well as selective therapy of dairy cows during dry period.

REFERENCES

- Bogdanovičová, K., Skočková, A., Šťásková, Z., Karpišková, R. 2014. Occurrence and antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* in bulk tank milk and milk filters. In *Potravinárstvo Slovak Journal of Food Sciences*, [online], vol. 8, no. 1, p. 97-101. [cit. 2021-02-05]. Dostupné na: <https://doi.org/10.5219/363>
- Cobirka, M., Tančin, V., Slama, P. 2020. Epidemiology and Classification of Mastitis. In *Animals*. [online], vol. 10, p. 2212. [cit. 2021-02-20]. Dostupné na: <https://doi.org/10.3390/ani10122212>
- CLSI. 2013. Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals. In 4th Edn. CLSI Supplement VET01-A4, 72. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.
- CLSI. 2018. Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals. In 4th Ed. CLSI Supplement VET08, 170. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute. doi.org/10.1017/S0022029919000694
- Dufour, S., Labrie, J., Jacques, M. 2019. The Mastitis Pathogens Culture Collection. In *Microbiol Resour Announc.* [online], vol. 8, no. 15: e00133-19. [cit. 2021-02-03]. Dostupné na: doi: 10.1128/MRA.00133-19
- El-Diasty, M., Talaat, H., Atwa, S., Elbaz, E., Eissa, M. 2019. Occurrence of Coagulase-negative Staphylococcal mastitis in dairy cows. In *Mansoura Veterinary Medical Journal*. [online], vol. 23, p. 35-39. [cit. 2021-02-010]. Dostupné na: doi: 10.35943/mvmj.2019.23.207
- Fredheim, E. G. A., Klingenberg, C., Rodhe, H., Frankenberger, S., Gaustad, P., Flaegstad, T., Sollid J. E. 2009. Biofilm formation by *Staphylococcus haemolyticus*. In *J. Clin. Microbiol.* [online], vol. 47, p. 1172-80. [cit. 2021-02-03]. Dostupné na: <https://doi.org/10.1128/jcm.01891-08>
- Haveri, M., Roslöf, A., Pyörälä, S. 2007. Virulence genes of bovine *Staphylococcus aureus* from persistent and no persistent intramammary infections with different clinical characteristics. In *J Appl Microbiol.* [online], 103, p. 993-1000. [cit. 2021-02-04]. Dostupné na: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03356.x>
- Hiko, A. 2019. Isolation, DNase-cross-Coagulase test and antimicrobial resistance test on *Staphylococcus* along beef abattoir line in Addis Ababa Ethiopia. In *Ethiop. Vet. J.*, [online], vol. 23, no.1, p. 90 - 110. [cit. 2021-02-05]. Dostupné na: <https://dx.doi.org/10.4314/evj.v23i1.7>
- Holko, I., Tančin, V., Vršková, M., Tvarožková, K. 2019. Prevalence and antimicrobial susceptibility of udder pathogens isolated from dairy cows in Slovakia. In *Journal of Dairy Research*. [online], p. 1 – 4. [cit. 2021-02-10]. Dostupné na: doi.org/10.1017/S0022029919000694
- Isaac, P., Bohl, L. P., Breser, M. L., Orellano, M. S., Conesa, A., Ferrero, M. A., Porporatto, C. 2017. Commensal coagulase-negative *Staphylococcus* from the udder of healthy cows inhibits biofilm formation of mastitis-related pathogens. In *Vet Microbiol.* [online], vol. 207, p. 259-266. [cit. 2021-02-05]. Dostupné na: <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2017.05.025>
- Marques, V. F., da Motta, C. C., Soares, B. S., de Melo, D. A., de Oliveira C.S.H., Coelho, I.S., Santos, H.B., de Souza, M.M.S. 2017. Biofilm production and beta-lactamic resistance in Brazilian *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis. In *Brazilian Journal of Microbiology*. [online], vol. 48, no 1, p. 118-124. [cit. 2021-01-10]. Dostupné na: <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.10.001>
- Moniri, R., Dastehgoli, K., Akramian, A. 2007. Increasing resistant CNS in bovine clinical mastitis. In *Pakistan J Biolog Sci.* [online], vol. 10, no. 15, p. 2465-2469. [cit. 2021-02-03]. Dostupné na: doi: 10.3923/pjbs.2007.2465.2469

- Nascimento, J. S., Fugundes, P. C., Brito, A. V., Dos Santos, K. R., Bastos, M. C. 2005. Production of bacteriocins by coagulase-negative staphylococci involved in bovine mastitis. In *Veterinary Microbiology*. [online], 106, p. 61-71. [cit. 2021-02-05]. Dostupné na: <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2004.10.014>
- NRC. 2001. *Nutrient Requirements of Dairy Cattle*. 7th ed. WASHINGTON, USA: The National Academies Press, National Research Council. 381 p.
- Otto, M. 2018. Staphylococcal Biofilms. In *Microbiol Spectr*. [online], vol. 6, no. 4, p. 1-26. [cit. 2021-02-03]. Dostupné na: <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.gpp3-0023-2018>
- Supre, K., Haesebrouck, F., Zadoks, R. N., Vaneechoutte, M., Piepers, S., De Vlieghe, S. 2011. Some coagulase-negative *Staphylococcus* species affect udder health more than others. In *J. Dairy Sci.*, [online], vol. 94, p. 2329-2340. [cit. 2021-02-05]. Dostupné na: <https://doi.org/10.3168/jds.2010-3741>
- Tančin, V., Mikláš, Šimon, Čobirka, M., Uhrinčat, M., Mačuhová, L. 2020. Factors affecting raw milk quality of dairy cows under practical conditions. In *Potravinárstvo Slovak Journal of Food Sciences*, [online], vol. 14, p. 744–749. [cit. 2021-02-03]. Dostupné na: <https://doi.org/10.5219/1336>
- Vasil, M., Elečko, J., Zigo, F., Farkašová, Z. 2012. Occurrence of some pathogenity factors in coagulase negative staphylococci isolated from mastitis milk in dairy cows. In *Potravinárstvo Slovak Journal of Food Sciences*. [online], vol. 6, no. 2, pp. 60-63. [cit. 2021-02-03]. Dostupné na: <https://doi.org/10.5219/186>
- Vasil, M., Farkašová, Z., Elecko, J., Illek, J., Zigo, F. 2017. Comparison of biofilm formation by *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* strains isolated from sheep milk using three diagnostic methods. In *Polish J. of Vet. Sci.* [online], vol. 20, 795-801. [cit. 2021-02-08]. Dostupné na: <https://doi.org/10.1515/pjvs-2017-0100>
- Vinodkumar K., Neetha, N., Ashok, S., Suchithra, S., Justin, D., Radhik., S. 2017. Genotypic and phenotypic β -lactam resistance and presence of PVL gene in Staphylococci from dry bovine udder. PLOS ONE. [online], vol. 12. e0187277. [cit. 2021-02-03]. Dostupné na: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187277>

Acknowledgments: This research was funded by the Slovak grants APVV no. SK-PL-18-0088, KEGA no. 006UVLF-4-2020, VEGA no. 1-0529-19 and Visegrad fund no. 22010056: Factors determining the occurrence of bovine mastitis in dairy herds situated in marginal regions

Contact address: DVM. František Zigo, PhD., University of Veterinary Medicine and Pharmacy, Department of Nutrition and Animal Husbandry, Komenského 73, 041 81 Košice, Slovakia, Tel.: +421908689722, E-mail: frantisek.zigo@uvlf.sk

Názov: Bezpečnosť a kvalita potravín - zborník vedeckých prác

Zostavili: prof. Ing. Jozef Golian, Dr., Ing. Jozef Čapla, PhD.

Vydavateľ: Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre

Vydanie: prvé

Rok vydania: 2021

Forma vydania: online

Neprešlo redakčnou úpravou vo Vydavateľstve SPU v Nitre.

ISBN 978-80-552-2353-7