

1

2009



Vedecký potravinársky časopis

číslo

[www.potravinarstvo.com](http://www.potravinarstvo.com)

ročník 3  
číslo 1  
marec 2009

potravinárstvo 1 (3)  
ISSN 1337-0960

## Potravinárstvo

### Vedecký časopis pre potravinárstvo

#### Šéfredaktor:

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

#### Zástupca šéf redaktora:

doc. Ing. Anna Michalcová, PhD.,  
SPU Nitra

#### Redaktori:

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

#### Redakčná rada

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

## Potravinárstvo

### Scientific journal of food science

#### Editor:

Jozef Golian,  
SPU Nitra

#### Deputy of Editor:

Anna Michalcová,  
SPU Nitra

#### Sub-Editor:

Peter Zajác,  
Radoslav Židek,  
Jozef Čapla,  
SPU Nitra

#### Editorial Board:

Bohuslava Tremlová,  
VFU Brno  
Stanislav Kračmár,  
UTB Zlín  
Jozef Nagy,  
UVL Košice  
Jolana Karovičová,  
STU Bratislava  
Róbert Toman,  
SPU Nitra  
Teresa Fortuna,  
UA Krakow, Poľsko  
Tadeusz Trziszka,  
Wroclav, Poľsko  
Roman Labuda,  
Tuln, Rakúsko  
Zuzana Bírošová,  
Ministerstvo pôdohospodárstva SR

• **Potravinárstvo**® • **Ročník**: 3, č. 1/2009 • Vedecký časopis pre potravinárstvo • Scientific journal of food science • **Vydavateľ**: Vydáva združenie HACCP Consulting v spolupráci s Katedrou hygieny a bezpečnosti potravín SPU v Nitre • **Internetová stránka časopisu**: [www.potravinarstvo.com](http://www.potravinarstvo.com) • **Adresa redakcie**: Slivková 12, 951 01 Nitrianske Hrnčiarovce • **E-mail**: [info@potravinarstvo.com](mailto:info@potravinarstvo.com) • **Jazyková úprava**: Publikované články neprešli jazykovou úpravou • **Právne informácie a autorské práva**: Za obsah jednotlivých článkov zodpovedajú autori. Za obsah inzerátov zodpovedajú inzerenti • **Grafická úprava**: Flame-studio Nitra • **Tlač**: SPU Nitra

Všetky práva vyhradené, © 2009 Potravinárstvo®  
ISSN 1337-0960



Katedra hygieny a bezpečnosti  
potravín

H A C C P  
CONSULTING

# VYUŽITIE PCR METÓDY NA DÔKAZ FALŠOVANIA Mlieka A Mliečnych výrobkov

## APPLICATION OF PCR METHOD FOR MILK ADULTERATION AND MILK PRODUCTS IDENTIFICATION.

*Alica Bobková, Radoslav Židek, Erika Flimelová, Marek Bobko, Michaela Fiková*

### ABSTRAKT

The aim of this work was detect addition cow milk in sheep milks with application of PCR method. In line with set the target are practised laboratory analysis of 8 wilfully falsified samples milks. The samples was prepared dilution of sheep milks with cow milks. Detection presence cow milks was performance using of PCR methods, which are determination detecting limit for chosen method. Addition cow milk was detected in lowest representation at sample number 4, where to have been additional 0,01% cow milk.

**Keywords:** PCR, false food, species specification, milk

### ÚVOD

Pod pojmom mlieko rozumieme vo všeobecnosti biologickú tekutinu, ktorú vylučujú mliečne žľazy rôznych druhov cicavcov, napr. kráv, oviec, kôz, byvolích kráv, tiav, lám, jakov či sobov (Mair-Waldburg et al., 2003). Mlieko a mliečne výrobky sú zdrojom cenných látok nevyhnutných pre výživu a vývoj ľudského organizmu, pre normálnu funkciu látkovej výmeny a ochranu zdravia človeka (Jamrichová, 2004). Mlieko obsahuje vodu, tuk, bielkoviny, mliečny cukor – laktózu, minerálne látky, vitamíny, enzýmy, plyny a ďalšie zlúčeniny biochemického pôvodu (Keresteš, Selecký, 2005). Taktiež obsahuje vitamíny a ďalšie zložky, pričom je veľmi dôležitý pomer v akom sú živiny zastúpené (Haenlein, 1995).

Podľa Popelku et al. (2002) sa falšovanie potravín spája so zhoršujúcou sa kvalitou potravín. Cieľom falšovania potravín je vlastne oklamať spotrebiteľa alebo štát a získať ekonomický prospech, pričom falšovanie môže predstavovať v niektorých prípadoch aj závažné zdravotné následky (Hamr, Cuhra, 2004). Zelenáková, Golian (2003) udávajú ako príčinu falšovania mlieka predovšetkým silné sezónne poklesy v produkcii ovčieho a kozieho mlieka a ich vysokú cenovú úroveň na rozdiel od kravského mlieka. V minulých rokoch sa stala druhová identifikácia živočíšnych produktov dôležitou otázkou týkajúcou sa potravinovej autentifikácie (Sawyer et al., 2003). Pre zaručenie potravinovej autenticity je potrebný vývoj analytických techník umožňujúcich úradom a producentom kontrolovať, či produkty sú správne popisované a označené (Santos, Fernandes, Bardsley, 2003). Metódy, ktoré je možné použiť na autentifikáciu mlieka rozdelili García et al. (1991) na dve skupiny, a to neimunologické metódy (plynová chromatografia, gélová elektroforéza, izoelektrická fokusácia) a imunologické metódy (imunodifúzia na agarózovom géle, radiálna imunodifúzia, raketová imuno elektroforéza, krížová

imuno elektroforéza, protismerná elektroforéza, hemaglutinačná inhibícia, imunoblotting, ELISA – imunoenzýmová analýza). Vo veľkej miere sa na detekciu falšovania kravským mliekom využíva technika elektroforézy na polyakrylamidovom a škrobovom géle (Hermanová 1993).

Naša práca bola zameraná na možnosti využitia molekulárnej biologickej metódy PCR na detekciu prídavku nedeklarovaného druhu mlieka. Podľa Maškovej (2005) metóda PCR využíva mnohonásobné pomnoženie vybraného úseku DNA izolovaného zo vzorky. Vlastné množenie je riadené naprogramovanými cyklickými zmenami teploty, ktoré sa pravidelne opakujú. Celý proces sa odohráva v prístroji zvanom termocycler. Podobne Branciarri et al. (2000) popisujú PCR ako jednoduchú metódu na zistenie pôvodu druhov mlieka používaného na produkciu syra. Viacnásobnú PCR schopnú identifikovať kravské, ovčie, kozie mlieko v mliečnych produktoch použili aj Bottero et al. (2003). Špecifické priméry boli popísané na amplifikáciu fragmenov mitochondriálneho 12S a 16S génu pre ribozonálnu RNA. Navrhnutá mnohonásobná PCR reprezentuje rýchlu, jednoduchú a citlivú metódu použiteľnú v bežnej praxi. S kvalitnou hraničnou citlivosťou (0,5 %) umožňuje detegovať prídavky mlieka iného druhu v rôznych mliečnych výrobkoch. Mafra et al. (2007) použili dvojitú PCR na identifikáciu prídavku už 0,1% kravského mlieka v kozom syre. Rýchlu, špecifickú a citlivú identifikáciu byvolieho, kravského a ovčieho mlieka použili Abdel-Rahman, Ahmeda (2006) druhovo rozdielnymi metódami PCR a PCR-RFLP. PCR technika identifikuje gén 603 bp v byvolom a kravskom mlieku, zatiaľ čo v ovčom mlieku identifikuje gén 374 bp. PCR-RFLP technika bola používaná na rozlišovanie fragmentov byvolieho, kravského a ovčieho mlieka, kde sa analyzuje mitochondriálny cytochróm b.

### MATERIÁL A METODIKA

Detekcia prítomnosti kravského mlieka v inom druhu mlieka (ovčie a kozie mlieko) bola vykonaná použitím metódy PCR. Metóda bola použitá na analýzu úmyselne sfaľovaných vzoriek (tabuľka 1), pripravených miešaním jednotlivých druhov mlieka. Vzorka č. 1 bola pripravená ako kombinácia 900µl ovčieho mlieka a 100µl kravského mlieka. Vzorka bola zhomogenizovaná vortexovaním. Vzorka č. 2 bola pripravená ako kombinácia 100µl predchádzajúcej vzorky a 900µl ovčieho mlieka. V súlade s touto metodikou bolo pripravených nasledujúcich 6 vzoriek, pričom celkový počet vzoriek bol 8. Genomová DNA bola extrahovaná z každej vzorky pomocou centrifugácie pri 11000 rpm počas 6 min. Sediment bol zmiešaný s lyzačným roztokom (lyzačný tlmivý roztok, TWEEN, proteináza K) o množstve 200µl. Pripravené vzorky sa vložili do termostatu na 80 min. pri teplote 66°C a následne sa upravila teplota na 96°C a vzorky sa v termostate ponechali ešte 20 min. Potom sa scentrifugovali pri 13000 rpm počas 1,5 min. Vzorky s vyextrahovanou DNA boli uskladnené v chladničke až do spracovania. Priméry boli navrhnuté v súlade s Ilhak a Arslan (2007). Priméry amplifikovali 271 bp dlhý úsek mitochondriálnej DNA u hovädzieho dobytku a 225 bp u oviec. Reakčná zmes pre PCR obsahovala : DNA; 1,80 mM MgCl<sub>2</sub>; 0,25

**Tabuľka 1.** Riedenie ovčieho mlieka kravským mliekom na identifikáciu detekčného limitu

Riedenie		PCR
vzorka	%	
1	10	+
2	1	+
3	0,1	+
4	0,01	+
5	0,001	-
6	0,0001	-
7	0,00001	-
8	0,000001	-

mM AB dNTP mix  
10mM; 1,00 μM  
AdulHD-F (5'-  
GCCATATACTCTCC  
TTGGTGACA-3');  
1,00 μM AdulHD-R  
(5'-  
GTAGGCTTGGGAA  
TAGTACGA-3'); 1  
jednotku GoTaq  
HotStart Polyme;  
doplnené destilovanou  
vodou do objemu 50μ l.  
Zmes obsahovala  
tlmivý roztok Go Taq  
green pufor 5x  
(Promega, Medison  
USA) a amplifikácia  
prebehla v termálnom  
cykléri (PTC-150  
MiniCycler™, MJ

prídavok až do 0,01% kravského mlieka t.j. po vzorku č. 4.

Dosiahnuté výsledky (obrázok č. 1) demonštrujú, že prídavok kravského mlieka do mlieka ovčieho môže byť detegovaný až do 0,01%. Výsledky v obrázku č. 1 poukazujú na intenzitu znižovania PCR produktu. Vzorka č. 4 (0,01% prídavok kravského mlieka) mala najnižšiu intenzitu, ale stále bola detegovateľná. Najväčšiu intenzitu mala vzorka č. 1 (prídavok kravského mlieka v množstve 10%). Bottero et al. (2003) použitím podobných primérov stanovili detekčný limit nižší ako 0,5%. Naše výsledky sú podobné s López-Calleja et al. (2005) a taktiež s Mafrom et al. (2007), ktorí deklarujú detekčný limit nižší ako 0,1% hovädzej zložky na celkové množstvo.

## ZÁVER

Pre zaručenie potravinovej autenticity je potrebný vývoj analytických techník umožňujúcich úradom a producentom kontrolovať, či produkty sú správne popisované a označené. Detekcia prítomnosti kravského mlieka v inom druhu mlieka (ovčie a kozie mlieko) bola vykonaná použitím metódy PCR. V súlade s prezentovanými výsledkami môžeme potvrdiť, že zvolená PCR metóda je schopná amplifikovať úsek špecifickej DNA typickej len pre hovädzí dobytok. Metóda bola použitá na 8 vzoriek ovčieho mlieka, ktoré boli úmyselne sfaľované prídavkom kravského mlieka v rôznom percentuálnom zastúpení. Detekčný limit zvolenej metódy sme určili na hodnote 0,01% prímеси hovädzieho mlieka.

## LITERATÚRA

ABDEL-RAHMAN, S. M., AHMED, M. M. M., 2007. Rapid and sensitive identification of buffalo's, cattle's and sheep's milk using species-specific PCR and PCR-RFLP techniques, In *Food Control*, roč. 18, 2007, č. 10, s. 1246-1249.

BOTTERO, M. T., CIVERA, T., NUCERA, D., ROSATI, S., SACCHI, P. - TURI, R. M., 2003. A multiplex polymerase chain reaction for the identification of cows, goats and sheeps milk in dairy products In *International Dairy Journal*, roč. 13, 2003, č. 4, s. 277-282.

BRANCIARI, R., NIJMAN, I. J., PLAS, D. E., [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=pubmed&Cmd=Search&Term=%22Plas%20ME%22%5BAuthor%5D&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Pubmed.Pubmed\\_ResultsPanel.Pubmed\\_DiscoveryPanel.Pubmed\\_RVAbstractPlusDI](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=pubmed&Cmd=Search&Term=%22Plas%20ME%22%5BAuthor%5D&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Pubmed.Pubmed_ResultsPanel.Pubmed_DiscoveryPanel.Pubmed_RVAbstractPlusDI)

ANTONIO, E., LENSTRA, J. A., 2000. Species origin of milk in Italian mozzarella and Greek feta cheese In *J. Food Prot.*, roč. 63, 2000, s. 408-411.

GARCÍA, T., MARTÍN, R., RODRÍGUEZ, E., AZCONA, J. I., SANZ, B., HERNANDEZ, P. E., 1991. Detection of bovine milk in ovine milk by a sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). In *J. Food Prot.* roč. 54, 1991, s. 366-369.

HAENLEIN, G. F. W., 1995. Nutritional value of dairy products of ewe and goat milk. In *Production and utilization of ewe and goat milk*. Brussel, IDF, 1995, s. 159-178

HAMR, K., CUHRA, P., 2004. Falšování potravin a jeho prokazování, zajímavé případy. In *Výživa a potraviny*, roč. 59, 2004, č. 4, s. 92-93. ISSN 1211-846X.

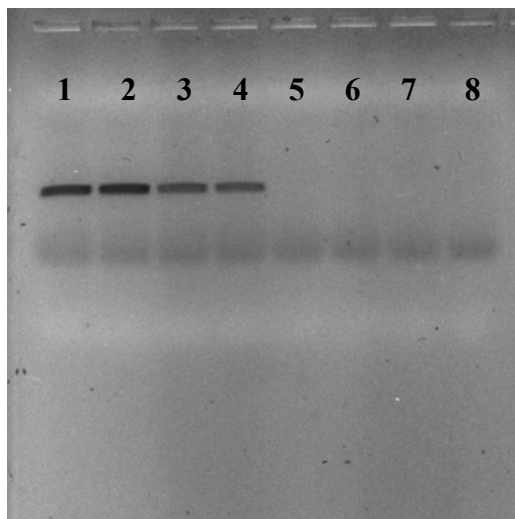
ILHAK, O. I., ARSLAN, A., 2007. Identification of Meat Species by Polymerase Chain Reaction (PCR) Technique. In *Turk. J. Vet. Anim. Sci.* roč. 31, 2007, č. 3, s. 159-163.

Research, Watertown USA).

Postup PCR reakcie bol nasledovný: preinkubácia 95°C na 4 min., 40 cyklov obsahujúcich denaturáciu pri 95°C na 45 sekúnd, nasadenie pri 61°C po dobu 45 sekúnd a predĺžovanie pri 72°C po dobu 1,5 min. záverečný predĺžovací krok bol pri teplote 72°C počas 7 min. a schladenie na teplotu 20°C na čas 0,01 sekúnd.

Získané PCR fragmenty boli vizualizované na 1 % agarózovom géle pomocou ethidium bromidu pri 125V po dobu 30 min.

## VÝSLEDKY A DISKUSIA



**Obrázok 1.** Detekčný limit prídavku kravského mlieka do ovčieho mlieka (dráha 1 – vzorka č. 1, dráha 2 – vzorka č. 2, dráha 3 – vzorka č. 3, dráha 4 – vzorka č. 4, dráha 5 – vzorka č. 5, dráha 6 – vzorka č. 6, dráha 7 – vzorka č. 7, dráha 8 – vzorka č. 8)

Metóda PCR bola schopná detegovať prítomnosť kravského mlieka vo vzorkách ovčieho mlieka. Jedným z cieľov práce bolo stanoviť citlivosť vybranej metódy, preto boli testované vzorky ovčieho mlieka obsahujúce rôzne percento prídavku kravského mlieka (tabuľka 1), kde je zrejmé, že PCR metóda bola schopná detegovať

JAMRICOVÁ, S., 2004. Princípy technológie výroby tepelne ošetrovaných mliečnych výrobkov. In *Mliekárstvo*, roč. 35, 2004, č. 4, s. 23. ISSN 1210-3144.

KERESTEŠ, J., SELECKÝ, J., 2005. *Syrárstvo na Slovensku, história a technológia*. ISBN 80-969387-9-7. Považská Bystrica: Copyright, 2005, 166 s.

LÓPEZ-CALLEJA, I. M., GONZÁLEZ, I., FAJARDOA, V., HERNÁNDEZA, P. E., GARCÍA, T., MARTÍNA, R., 2005. PCR detection of cows' milk in water buffalo milk and mozzarella cheese, In *International Dairy Journal*, roč. 15, 2005, č. 11, s. 1122-1129

MAFRA, I., ROXOA, Á., FERREIRA, I. M. P. L. V. O., OLIVEIRA, B. M. P. P., 2007. A duplex polymerase chain reaction for the quantitative detection of cows' milk in goats' milk cheese, In *International Dairy Journal*, roč. 17, 2007, č. 9, s. 1132-1138.

MAIR-WALDBURG, H., FRIEDRICH – WILHELM, E., MARKOVÁ, M., VACHULOVÁ, K., FLUBACHER, H. D., 2003. Čo je syr. *Syry: Veľká encyklopédia – všetko o syroch*,

*Lexikón syrov, Recepty*, Bratislava : Trio Publishing, 2003, s. 7, ISBN 80-968705-1-3.

MAŠKOVA, E., 2005. Jíme doopravdy čistý kozí a ovčí sýr? In *Výživa a potraviny*, roč. 60, 2005, č. 4, s. 101-102. ISSN 1211-846X.

POPELKA, P., HORSKÁ, D., GOLIAN, J., MARCINČAK, S., 2002. Detekcia falšovania ovčieho mlieka a syrov pomocou enzýmovej imunoanalýzy (ELISA). In *Slovenský veterinársky časopis*, roč. 3, 2002 s. 36-37. ISSN 1335-0099.

SANTOS, J., FERNANDES, P., BARDSLEY, R., 2003. Portuguese „PDO“ cheese and species origin of Milk. In *Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry*, 2003, s. 476-479. ISSN 1579-4377.

SAWYER, J., WOOD, C., SHANAHAN, D., GOUT, S., 2003. Real-time PCR for quantitative meat species testing. *Food Cont.* roč. 14, 2003, s. 549-583.

ZELEŇÁKOVÁ, L., GOLIAN, J., 2003. Aplikácia ELISA metódy na detekciu falšovania ovčieho mlieka a syrov. In *Mliekárstvo*, roč. 34, 2003, č. 4, s. 38-40. ISSN 1210-3144

### **KVANTIFIKÁCIA SÓJE V POTRAVINÁCH POUŽITÍM REAL- TIME PCR SOY QUANTIFICATION IN FOOD PRODUCTS BY REAL-TIME POLYMERASE CHAIN REACTION**

*Michal Bošiak , Radoslav Židek , Jozef Golian*

#### **ABSTRACT**

The aim of this assay was to quantify soy in soy containing products using real-time polymerase chain reaction (real-time PCR) as an indirect method for soy allergen presence detection. According to the aim of this assay we have analyzed wheat flour samples artificially contaminated by defatted soybean powder. Results show that selected primers based on lectin gene region are able to quantify soy presence only in range between 12.5 % and 1,56 %. Presence of soy contamination under 1,56 % is undetectable because of primer set nonspecific reaction.

**Keywords:** food allergens, soy, quantification, real-time PCR

#### **ÚVOD**

Alergické reakcie na potraviny vyplývajú z nárastu imunitných odpovedí na glykoproteínové zložky prítomné v potravinách a predstavujú častý zdravotný problém (Metcalfe, 1991; Shah, Walker, 2002).

Deti a dospelý, u ktorých sa prejavujú tieto reakcie trpia tzv. potravinovou hypersenzitivitou, alebo potravinovou alergiou. Ide o termíny definujúce reakciu vystavenia potravinu vyvolávajúcu objektívne reprodukovateľné symptómy, alebo znaky v dávke tolerovanej bežnými konzumentmi (Crespo et al., 2004).

Odhaduje sa že približne 6 % detí a asi 2 % všeobecnej populácie má potravinovú alergiu, s prevahou gastrointestinálnych symptómov (Sampson, 2003).

I keď niekoľko imunologických mechanizmov môže spolupôsobiť na alergickej reakcii na potravinu, IgE-sprostredkovaná okamžitá reakcia hypersenzitivity je, najviac potvrdeným mechanizmom (Bischoff et al., 2000).

Alergia na proteíny kravského mlieka, vajec, pšenici a sóji je bežnejšia u detí (do 7 rokov) a mladistvých, zatiaľ čo morské produkty, arašidy a orechy najčastejšie zapríčínajú potravinovú alergiu v dospelosti (Bischoff et al., 2000).

Sója je uznaná ako jeden z hlavných potravinových alergénov, ktoré môžu byť prítomné v potravině a z uvedeného dôvodu musí byť jej prítomnosť označená v súlade s Európskou Direktívou 2007/68/ES.

V súčasnosti jedinou účinnou starostlivosťou o pacientov trpiacich potravinovou alergiou, alebo intoleranciou je vyhnutie sa príčinnej potravině prostredníctvom diéty. Bohužiaľ skryté potravinové alergény v komplexných potravinách sú základným problémom pre týchto pacientov kvôli nedôslednému označovaniu, alebo neúmyselnej krížovej kontaminácii komerčných potravín v priebehu spracovania (Holzhauser, Vieths 1999).

Hourihane et al., 1997; MalmhedenYman et al., 1994, poukazujú na potrebu senzitivných detekčných metód špecificky detegujúcich skryté alergény za účelom pomoci pacientom trpiacim potravinovou alergiou, z dôvodu zistení nízkych dávok prírodných potravín schopných vyvolať alergické reakcie.

Polymerázová reťazová reakcia (PCR) založená na detekcii špecifických DNA sekvencií bola navrhnutá ako alternatíva k imunologickým metódam na detekciu skrytých alergénov v komplexných potravinách (Torp et al., 2006).

Hlavným nevyhnutným predpokladom pre PCR analýzu je DNA dobrej kvality a kvantity (Gryson et al., 2008).

Stabilita DNA ju robí preferovaným analytom pre PCR analýzu. Táto technika je tiež zahrnutá v analýze alergénov v potravinárskych produktoch. Aj keď PCR nie je schopná detegovať priamo alergickú zložku v produkte, môže byť použitá na detekciu druhov, z ktorých alergická zložka pochádza. Preto môže byť použitá ako dôležitý nástroj preverovania potravinárskych produktov na prítomnosť alergénov. Okrem uvedeného PCR je známa ako veľmi citlivá metóda, špeciálne v porovnaní so sandwich ELISA technikou, najviac používanou na detekciu alergénov (Holst-Jensen et al., 2003; Poms et al., 2004).

Niekoľko štúdií poukázalo na dobrú koreláciu medzi prítomnosťou amplifikovateľnej DNA a proteínom stanoveným ELISA metódou (Allmann et al., 1993);

Dahinden et al., 2001; Holzhauser et al., 2002; Holzhauser et al., 2000).

Mimo toho, krížové reakcie a falošne pozitívne výsledky môžu byť minimalizované dôkladnou selekciou PCR-primérov, ktoré sa vyznačujú rozlišovacou schopnosťou medzi sekvenciami biologicky blízkych druhov. Kity na sóju a arašidy sú založené na detekcii lektinového génu (Poms et al., 2004).

## MATERIÁL A METÓDY

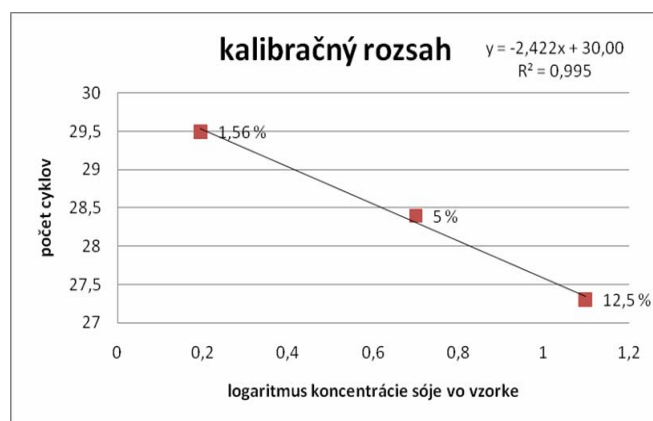
Detekcia prítomnosti sóje bola vykonaná použitím real-time PCR metódy. Zvolená metóda bola použitá na analýzu úmyselne kontaminovaných vzoriek, pripravených riedením pšeničnou múkou. Kontaminácia pšeničnej múky bola vykonaná odtučneným sójovým púdom.

Genomová DNA bola extrahovaná z každej vzorky použitím NucleoSpin® Food purification kit (Macherey-Nagel, Suisse). Vyextrahovaná DNA bola kvantifikovaná NanoPhotometer™ (Implen GmbH, Germany) a zriedená s primeraným objemom destilovanej vody na finálnu koncentráciu 25 ng.  $\mu\text{l}^{-1}$ . Vzorky boli skladované pri teplote  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  až do spracovania. Primérový pár bol navrhnutý tak aby detegoval prítomnosť lektinového génu (Karudapuram, Batey, 2008). Hlavnou zložkou v objeme 12,5  $\mu\text{l}$  bol 2x SYBR® Green I Hot Start Real-Time PCR Mix (Ecoli s.r.o), ktorý bol doplnený o 0,5 pmol. $\mu\text{l}^{-1}$  z každého priméru a 2  $\mu\text{l}$  templátov DNA s koncentráciou 50ng na reakciu. Reakčný roztok bol doplnený bidestilovanou vodou do celkového objemu 25  $\mu\text{l}$ . PCR cyklus začínal pre-denaturáciou na teplote  $95\text{ }^{\circ}\text{C}$  pod dobu 1 minúty. Následne bolo zopakovaných 40 cyklov s teplotným profilom: 15 sek. pri  $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 20 sek. pri  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 25 sek. pri  $72\text{ }^{\circ}\text{C}$  a 2 sek. pri  $82\text{ }^{\circ}\text{C}$  s následným meraním fluorescence. Finálne predĺžovanie fragmentov prebiehalo pri  $72\text{ }^{\circ}\text{C}$  po dobu 5 minút. Krivka topenia PCR produktov bola spustená zahriatím vzorky na  $95\text{ }^{\circ}\text{C}$  a okamžitým schladením na  $65\text{ }^{\circ}\text{C}$  po dobu 15 sekúnd. Vzorka bola následne zohrievaná rýchlosťou  $0,1\text{ }^{\circ}\text{C}$  za sekundu a pri každej zmene teploty o desatinu stupňa bola odmeraná fluorescence. PCR reakcia prebiehala v kapilárovom cykléri LightCycler® 1,5 (Roche) za pomoci softvéru LightCycler software version 4.05 (Roche). Získané dáta boli spracované do tabuliek v programe EXCEL 2007.

## VÝSLEDKY

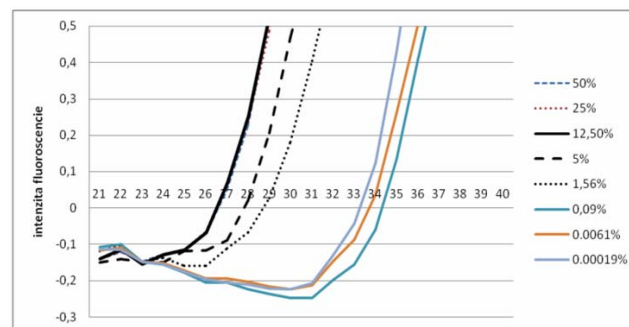
Pre získanie kalibračnej krivky boli použité vzorky s rôznym podielom sójového púdu vo vzorke. Analýza

**Obrázok 2.** Kalibračný rozsah detekcie sójového púdu



nárastu fluorescence (obrázok 1) poukazuje na rovnaké hodnoty fluorescence pre vzorky s podielom 50 %, 25 % a 12,5 % sóje. Pre spomenuté vzorky nebolo možné identifikovať rozdiely v lineárnej fáze nárastu PCR produktov. Veľmi podobné výsledky boli pozorované pri pomerne malých podieloch sóje vo vzorke, ktoré

**Obrázok 1.** Graf nárastu fluorescence pre PCR cyklus u vzoriek s rôznym obsahom sóje



predstavovali 0,09 %, 0,0061 % a 0,00019 %. U týchto vzoriek bola pozorovaná zmena fluorescence s následnou lineárnou fázou avšak po analýze získaných PCR produktov pomocou krivky topenia a vizualizácie na agarózovom géle bola potvrdená ich nešpecifickosť. Spomenuté vzorky nebolo možné preto použiť ako základ pre zostrojenie kalibračnej krivky nakoľko ich fluorescenčná krivka nemala preukazný vzťah k zmene podielu pridanej sóje vo vzorke. Analýzou fluorescenčnej krivky sa podarilo dokázať vzťah medzi intenzitou fluorescence a lineárnou fázou nárastu PCR produktov len u vzoriek s podielom 12,5 %, 5 % a 1,56 % podielu sójového púdu. Ako vyplýva z obrázku 2, len v rozmedzí koncentrácie od 1,56 % do 12,5 % je možné spoľahlivo kvantifikovať prítomnosť sóje vo vzorke za pomoci lineárnej regresie. U ostatných percentuálnych podielov nie je možné prítomnosť sóje kvantifikovať z dôvodu nelineárneho vzťahu medzi fluorescenciou a koncentráciou, alebo z dôvodu nešpecifickosti získaného PCR produktu.

## ZÁVER

Alergické reakcie na potraviny vyplývajú z nárastu imunitných odpovedí na glykoproteínové zložky prítomné v potravinách a predstavujú častý zdravotný problém. Sója je uznaná ako jeden z hlavných potravinových alergénov, ktoré môžu byť prítomné v potravine a z uvedeného dôvodu musí byť jej prítomnosť označená. Na to aby mohla byť zložka potravín kvantifikovaná je potrebné zostrojiť kalibračnú krivku. Pre získanie kalibračnej krivky boli použité vzorky s rôznym podielom sójového púdu vo vzorke. Môžeme konštatovať, že primérový pár špecifický pre prítomnosť sóje navrhnutý autormi Karudapuram a Batey (2008), je schopný korektno detegovať prítomnosť prímеси sóje len do koncentrácie 1,56 %. Pri nižšom zastúpení sóje vo vzorke primérový pár nešpecificky reaguje a vytvára iné ako autormi popísané produkty. Pri vyššom zastúpení sóje ako 12,5 % nebola pozorovaná zmena v náraste fluorescence PCR produktov.

## LITERATÚRA

ALLMANN, M., CANDRIAN, U., HÖFELEIN, C., LÜTHY, J., 1993. Polymerase chain reaction (PCR): a

possibly alternative to immunochemical methods assuring safety and quality of food. In Detection of wheat contamination in non-wheat food products. *Zeitschrift für Lebensmittel Untersuchung und Forschung*, vol. 196, 1993, p. 248–251.

BISCHOFF, S. C., MAYER, J. H., MANNS, M. P. 2000. Allergy and the gut. In *Int. Arch. Allergy Immunol.*, vol. 121, 2000, p. 270–283.

CRESPO, J. F., JAMES, J. M., RODRIGUES, J. 2004. Diagnosis and therapy of food allergy. In *Mol. Nutr. Food Res.*, vol. 48, 2004, p. 347–355.

DAHINDEN, I., VONBÜREN, M., LÜTHY, J. 2001. A quantitative competitive PCR system to detect contamination of wheat, barley or rye in gluten-free food for coeliac patients. In *European Food Research and Technology*, vol. 212, 2001, p. 228–233.

GRYSON, N., MESSENS, K., DEWETTINCK, K. 2008. PCR detection of soy ingredients in bread. In *Eur. Food Res. Technol.*, vol. 227, 2008, p. 345–351.

HOLST-JENSEN, A., RONNING, S. B., LOVSETH, A., BERDAL, K. G. 2003. PCR technology for screening and quantification of genetically modified organisms (GMOs). In *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 375, 2003, p. 985–993.

HOLZHAUSER, T., VIETHS, S. 1999. Indirect competitive ELISA for determination of traces of peanut (*Arachis hypogaea* L.) protein in complex food matrices. In *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 47, 1999, p. 603–611.

HOLZHAUSER, T., WANGORSCH, A., VIETHS, S. 2000. Polymerase chain reaction (PCR) for detection of potentially allergenic hazelnut residues in complex food matrices. In *European Food Research and Technology*, vol. 211, 2000, p. 360–365.

HOLZHAUSER, T., STEPHAN, O., VIETHS, S. 2002. Detection of potentially allergenic hazelnut (*Corylus avellana*) residues in food: a comparative study with DNA PCR- ELISA and protein sandwich- ELISA. In *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 50, 2002, p. 5808–5815.

HOURIHANE, J. O. B., KILBURN, S. A., NORDLEE, J. A., HEFLE, S. L., TAYLOR, S. L., WARNER, J. O. 1997. An evaluation of the sensitivity of subjects with peanut allergy to very low doses of peanut protein: a randomized, double-blind,

placebo-controlled food challenge study. In *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, vol. 100, 1997, p. 596–600.

KARUDAPURAM, S., BATEY, D. 2008. Detection of Genetically Modified Soybean in Processed Foods Using Real-Time Quantitative PCR with SYBR Green I Dye on the DNA Engine Opticon® 2 System. [online]. [s.a.]. [cit. 10.11.2008]. Bio-Rad Laboratories, Inc. Dostupné na internete:

<<http://www.biocompare.com/Articles/TechnicalArticle/1131/Detection-Of-Genetically-Modified-Soybean-In-Processed-Foods-Using-Real-Time-Quantitative-PCR-With-SYBR-Green-I-Dye-On-The-DNA-Engine-Opticon-2-System.html>>

MALMHEDENYMAN, I., ERIKSON, A., EVERITT, G., YMAN, L., KARLSSON, T. 1994. Analysis of food proteins for verification of contamination or mislabelling. In *Food and Agricultural Immunology*, vol. 6, 1994, p. 167–172.

METCALFE, D. D. 1991. Food allergy. In *Curr. Opin. Immunol.*, vol. 3, 1991, p. 881–886.

POMS, R. E., KLEIN, C. L., ANKLAM, E. 2004. Methods for allergen analysis in food: a review. In *Food Addit Contam.*, vol. 21, 2004, p. 1–31.

SAMPSON, H. A. 2003. Foody allergy. In *J. Allergy Clin. Immunol.*, vol. 112, 2003, p. 540–547.

SHAH, U., WALKER, W. A. 2002. Pathophysiology of intestinal food allergy. In *Adv. Pediatr.*, vol. 49, 2002, p. 299–316.

SMERNICA KOMISIE 2007/68/ES z 27. novembra 2007, ktorou sa mení a dopĺňa príloha IIIa k smernici Európskeho parlamentu a Rady 2000/13/ES, pokiaľ ide o určité zložky potravín.

TORP, A. M., OLESEN, A., STEN, E., STAHL SKOV, P., BINDSLEV-JENSEN, U., POULSEN, L. K., BINDSLEV-JENSEN, C., ANDERSEN, S. B. 2006. Specific, semi-quantitative detection of the soybean allergen Gly m Bd 30K DNA by PCR. In *Food Control.*, vol. 17, 2006, p. 30–36.

**Pod'akovanie:** Práca vznikla s podporou projektu VEGA 1/3475/06.

**Kontaktná adresa:** Ing. Michal Bošiak, Fakulta biotechnológie a potravinárstva, Katedra hygieny a bezpečnosti potravín, SPU Nitra, m.bosiak@gmail.com

## TVORBA BIOFILMOV NA POVRCHOCH Z NEREZOVEJ OCELI V PROSTREDÍ POTRAVINÁRSKEHO PRIEMYSLU

### BIOFILM FORMATION ON STAINLESS STEEL SURFACES IN FOOD INDUSTRY ENVIRONMENT

Jozef Čapla, Peter Zajác, Jozef Golian,  
Vladimír Vietoris

#### ABSTRACT

Both microbial adhesion and biofilms are of great importance for the food industry and occur on a high variety of food contact surfaces (Burnett et al., 2000). Microbial adhesion occurs due to microorganism deposition and attachment onto surfaces, initiating a

growth process. Cell multiplication gives rise to colonies and biofilm is established when the cellular mass is thick enough to aggregate nutrients, residues and other microorganisms (Zottola et al., 1994). The aim of this article is to investigate the cells attachment of *Bacillus* to stainless steel. The objective of this study was to investigate if biofilm formation occurs and examines the most important aspects involved in bacterial attachment to a surface.

**Keywords:** biofilm, *Bacillus subtilis*, stainless steel surfaces.

#### ÚVOD

Biofilm je dynamický komplex životného prostredia (Zacheus et al., 2000). Všeobecne možno povedať, že tvorba biofilmu zahŕňa prichytenie, osídlenie a rast mikroorganizmov (Kumar et Anand, 1998). Rôzne živiny vo vlhkom prostredí absorbované na povrchy vytvárajú aklimatizačný povlak s odlišnými fyzikálno-chemickými vlastnosťami (Wirtanen et al., 1996). Fyzikálno-chemické vlastnosti povrchu určujú ako sa baktéria pripevní (Frank,

2001). Biofilm môže byť vytvorený jedným bakteriálnym druhom (Wang et al., 2007). V posledných rokoch *Bacillus subtilis*, sporetvorná gram pozitívna baktéria sa stala modelovým organizmom pre štúdium tvorby biofilmu (Branda et al., 2001). Nerezová oceľ aj keď citlivá k bakteriálnemu pripovneniu je najčastejšie používaný materiál pre stavbu lodí, potrubí, ventilov a rôznych typov zariadení používaných v potravinárskom priemysle. Hygienický stav povrchov, nástrojov a zariadení v potravinárskom priemysle zásadne ovplyvňuje kvalitu spracovaných produktov. Ak čistiace a sanitačné procesy sú nedostatočné, vyššie uvedené zdroje spôsobia kontamináciu a biofilm vytvorený okolo mikroorganizmov poskytuje ochrannú vrstvu proti sanitačným a dezinfekčným prostriedkom (Hood et al., 1997).

### MATERIÁL A METÓDY

**Testovaný mikroorganizmus.** Testovaný mikroorganizmus bol *Bacillus subtilis*. *B. subtilis* bol pestovaný aerobne pri 30°C na živnom agare 1 deň.

**Testovaný materiál.** Kovový povrch používaný pri týchto testoch bolo z nerezovej ocele (W4301 - Cr.Ni 18,10). Kovové platničky (8 cm x 8 cm) boli ponorené do acetónu po dobu 30 minút a po tomto ponorení do roztoku NaOH (1%) po dobu 1 h. Kovové platničky boli dôkladne opláchnuté destilovanou vodou a sterilizované pri 121°C na 35 minút.

Tento materiál bol použitý pretože má charakteristické vlastnosti blízke tým, ktoré sa používajú v potravinárskom priemysle bez toho, aby negatívne ovplyvnil životaschopnosť buniek a umožnili mikroorganizmom obnovenie kultivácie.

**Očkovanie vzoriek a tvorba biofilmu.** Sterilné mlieko s obsahom buniek *Bacillus subtilis* bolo použité pre naočkovanie vzoriek, rovnomerne prevedené na celé platničky testovacieho povrchu. Bol použitý 1 cm<sup>3</sup> pre každú platničku. Očkovanie bolo robené asepticky. Platničky nerezovej ocele boli uchovávané pri konštantnej teplote po dobu 3, 6, 12, 24, 48 a 120 kontaktných hodín pre tvorbu biofilmu.

**Mikrobiálne kultúry.** Baktérie boli zotreté z každého testovaného povrchu (8 cm x 8 cm) s hrotom z vatového tampónu, ktorý bol prenesený do skúmavky obsahujúcej 50 ml sterilného fyziologického séra. Skúmavky obsahujúce tampón boli po dobu 2 minút miešané k uvoľneniu buniek v sére. Vzorky boli zriedené. Baktérie boli kultivované na Agarových platniach počas 48-72 h pri 30 °C.

**Analýza dát.** Kolónie tvoriace jednotky boli známe pre každý typ vzoriek, testy boli vykonané celkom trikrát, získané stredné hodnoty pre kolónie v Petriho miskách.

**Bakteriálna adhézia.** Súčasne boli spravené 3 samostatné vzorky na identifikáciu bakteriálnej adhézie. Po naočkovaní bakteriálnej suspenzie platničky boli ponorené do 10 ml média v sterilných Petriho miskách. Výpočet životaschopnosti bol vykonaný pre pôvodné kultúry. Po inkubačnej dobe 9 hodín a 24 h pri 30 °C bol proces ukončený tým, že odstránil voľné baktérie a nerezová oceľ bola trikrát čistená sterilným fyziologickým roztokom. Pripovnenie bolo posudzované pre každú platničku počtom baktérii schopných rastu vytlačených z povrchu po 15 minútovom kontakte s 5 ml sterilného fyziologického roztoku, ďalej zotretím za 30 sekúnd, aby sa odstránili

priľnuté baktérie. Bol vykonaný aj výpočet vitality pri finálnej 24 h kultúre.

### VÝSLEDKY A DISKUSIA

Tvorenie biofilmu môže nastať v následnosti krokov ako je: aklimatizácia, prítlačivosť, pripovnenie, dozrievanie a uvoľnenie. S každým krokom sa stáva biofilm viac a viac pevne pripojený s povrchmi. Získané údaje sú uvedené v tab. 1 a opisujú vznik biofilmu pri 20 ± 1 °C na nerezovej oceli po 3, 6, 12, 24, 48 a 120 kontaktných hodinách. Prvý krok vzniku biofilmu predstavuje vytvorenie aklimatizačnej vrstvy, zabezpečenej prídelením 1 cm<sup>3</sup> mlieka naočkovaného s *Bacillus subtilis* na testovaných povrchoch platničiek. Stabilizačný krok môže začať v priebehu niekoľkých sekúnd expozície na povrch. Charakteristickým pre tento krok je skutočnosť, že baktéria vo svojej planktónovej forme sa pohybuje a narazí na povrch, látky a ďalšie organizmy. Počiatočná adhézia mikroorganizmu na testovaných povrchoch ako je uvedené na obrázku 1 je získaná v intervale 3-6 hodín, kedy takmer 80% platničiek testovanej plochy bolo osídlené. Populácia priľnúca na povrchu nerezovej ocele získala maximum v rozvoji biofilmu po 9 hodinách, po ktorom nasleduje krátke obdobie konštantného rastu. V rozsahu 9 - 24 hodín, baktérie rastúce v biofilme zostali pevne pripojené na povrch a k sebe navzájom. To je možné kvôli polysacharidovému materiálu, ktorý zadržiava bunky. Biofilm životného prostredia je v súčasnosti bohatá vrstva živín, ktorá je schopná rýchleho rastu. Biofilm sa časom stáva viac etablovaný a hrubší, schopný zablokovať prenikajúce dezinfekčné prostriedky. Odlúčené bunky bolo vidieť po 12 hodinách ale krátkodobo a povrch bol kolonizovaný úplne bezprostredne po tom, že boli charakterizované na základe reverzibilného kroku. Po 24 hodinách počet buniek zosilnel. Vývoj biofilmu môže byť vysvetlený povrchovým znova osídlením, čo je nezvratný krok pripovnenia. Biofilm sa potom stáva etablovaný na povrchu, bunky v biofilme i naďalej rastú, produkujú extracelulárne polymérne látky a rozvíjajú maticu biofilmu. Tento pokračujúci rast vedie k hrubšiemu a viac detekovateľnému biofilmu. V tomto bode sa usadenina stáva dosť masívna, je dosť viditeľná a ľahko zistiteľná. V tabuľke 1 je uvedená schopnosť baktérie držať sa a produkovať biofilmy na platničke nerezovej oceli počas inkubácie pri teplote 30 °C po dobu 9 hodín a 24 h. Počiatočná úroveň kultúry použitej k vytvoreniu biofilmov bola vyššia ako u vystavených kultúr buniek pri 9 h s

**Tabuľka 1.** Prichytenie *Bacillus subtilis* na nerezovej oceli v priebehu inkubácie pri teplote 30°C po dobu 9 hodín a 24 h.

Ošetrovanie	KTJ / cm
Východiskové kultúry používané na tvorbu biofilmu	5 x 10 <sup>7</sup> (± 0,27)
Pripojené k nerezovej oceli 9 h expozície	6,7 x 10 <sup>4</sup> (± 0,45)
Pripojené k nerezovej oceli 24 h expozície	4 x 10 <sup>5</sup> (± 0,37)

účinnosťou 0,3% pripovnených buniek. Po 24 h expozícii

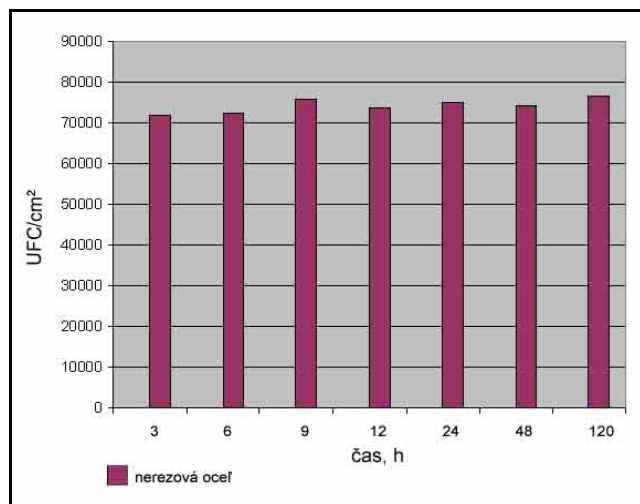


buniek sa objavilo jednoduchšie držanie na nerezovej oceli s účinnosťou 0,8% pripevnených buniek.

### ZÁVER

Tieto experimenty ukázali že *Bacillus subtilis* môže tvoriť biofilmy na povrchoch nerezovej oceli. Cieľom tejto štúdie bolo zistiť schopnosť baktérie priľnúť a vytvoriť biofilm a identifikovať kroky vývoja biofilmu. Pochopenie bakteriálneho pripevnenia na pevných povrchoch ako je nerezová oceľ môže pomôcť v budúcom vývoji povrchov so zníženým alebo žiadnym prichytením, alebo vo vývoji

**Obrázok 1.** Tvorba biofilmu a rast pri teplote  $20 \pm 1$  °C na povrchu nerezovej oceli po 3, 6, 12, 24, 48 a 120 hodinách.



účinného sanitáčného programu a tým k redukcii potenciálnej kontaminácie spracovaných produktov znehodnotením alebo patogénnymi baktériami.

### LITERATÚRA

ZOTTOLA, E. A., SASAHARA, K. C., 1994. Microbial biofilms in the food processing industry Should they be a concern? *Int. J. Food Microbiol.*, 23(2), 1994, 125-148.

## MOŽNOSTI DETEKČIE REZÍDUÍ ROPNÝCH LÁTKOK V SLNEČNICOVOM OLEJI

### POSSIBILITIES OF DETECTION RESIDUE OF MINERAL OIL IN SUNFLOWER OIL

Róbert Germuška, Miriam Vlčáková, Silvia Tóthová

#### ABSTRACT

It is not first time we eat mineral oil material. Mineral oil is the largest contamination of our body. Products of mineral oil are everywhere around us. Food can be contaminated during production from machine (vaseline, hydraulic oil.) or from packing (wax paper) or during transport (motor oil, tarmac). The analytical target is the determination of mineral oil material in sunflower oil. Present analytical methods only enable the detection of the paraffins (saturated alkanes), but not of the (usually highly alkylated) aromatics (which make up roughly 30 % of the mineral oil). Mineral paraffins (alkanes of mineral oil origin) must be

HOOD, S., ZOTTOLA, E. A., 1997. Adherence to stainless steel by foodborne microorganisms during growth in model food systems. *Int. J. Microbiol.*, 37, 1997, 145-153.

WANG H. H., HANS, M. A., BLASCHEK., P., 2007. Biofilms in the Food Environment, Publisher: Iowa State University Press, 2007, 208 p., ISBN 9780813820583.

FRANK, J. F., 2001. Microbial attachment to food and food contact surfaces. *Adv. Food. Nutr. Res.*, 43 : 2001, 319-369.

WIRTANEN, G., ALANKO, T., MATTILA-SANDHOLM, T., 1996. Evaluation of epifluorescence image analysis of biofilm growth on stainless surfaces. *Colloids Surf., B*, 5: 1996, 319-326.

BURNETT, S. L., CHEN, J., BEUCHAT, L. R., 2000. Attachment of *Escherichia coli* O157:H7 to the surfaces and internal structures of apples as detected by confocal scanning laser microscopy. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66: 2000, 4679-4687.

BRANDA, S. S., GONZALEZ-PASTOR, J. E., BEN-YEHUDA, S., LOSICK, R., KOLTER, R., 2001. Fruiting body formation by *Bacillus subtilis*. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 98, 2001, 11621-11626.

KUMAR, C. G., ANAND, S. K., 1998. Significance of microbial biofilms in food industry: a review. *Int. J. Food. Microbiol.*, 42, 1998, 9-27.

ZACHEUS, O. M., IVANAINEN, E. K., NISSINEN, T.K., LEHTOLA, M.J., MARTIKAINEN, P. J., 2000. Bacterial biofilm formation on polyvinyl chloride, polyethylene and stainless steel exposed to ozonated water. *Water Res.*, 34(1), 2000, 63-70.

BURNETT, S. L., CHEN, J., BEUCHAT, L. R., 2000. Attachment of *Escherichia coli* O157:H7 to the surfaces and internal structures of apples as detected by confocal scanning laser microscopy. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66: 2000, 4679-4687.

**Kontaktná adresa:** Ing. Jozef Čapla, Slovenská poľnohospodárska univerzita Nitra, Katedra hygieny a bezpečnosti potravín, jozef.capla@uniag.sk

distinguished from paraffins of plant origin. Plant paraffins primarily consist of n-alkanes and are characterized by the predominance of the odd-numbered species (usually C<sub>27</sub>, C<sub>29</sub>, C<sub>31</sub> and C<sub>33</sub>). Mineral paraffins primarily consist of branched or cyclic species (in GC forming a hump of unresolved material), possibly with n-alkanes on top with even and odd numbered species being balanced. Sample preparation included a pre-separation step whereby only saturated hydrocarbons remain in the sample matrix to analyse used of a silica gel column for sample clean-up. Detection method is preferably GC-FID (flame ionisation detector). Calibration by an alkane or paraffin oil assuming equal response of all paraffins. Analytical results reflected only the presence of saturated hydrocarbons in the range of C<sub>10</sub>-C<sub>56</sub> from external sources (the endogenous presence of hydrocarbons has not to be reported, in the case of sunflower oil, the alkanes C<sub>27</sub>, C<sub>29</sub> and C<sub>31</sub> are considered to be of endogenous origin). Acceptable level of saturated hydrocarbons ("mineral oil") from external sources in crude sunflower oil is 50 ppm. Acceptable level of saturated hydrocarbons ("mineral oil") from external sources in refined sunflower oil is 50 ppm.

State Veterinary and Food Institute (SVFI) in Dolný Kubín uses for determination of mineral oil in sunflower oil Kattel method from 2008. Sample is clean up using activated

silica gel packed in glass tube. Clean extract is injected using on-column injection on non polar fused silica capillary column and pollutants are detected by FID. Quantification of mineral oil is done using of relative ratio of peaks area of hump to internal standard C16. During year 2008 were investigated 42 official samples of sunflower oils from market or border control. Country of origin (48% Ukraine, 23% Hungary, 48% Slovakia, 5% Czech republic, 5% Germany). One sample has contained mineral oil in relative high concentration (650 mg/kg) what was over of acceptable level (50 mg/kg). Three samples contained mineral oils close to acceptable level. All positive samples were from Ukraine. Due to know relative high contamination of mineral oil around us systematic random control of food is needed.

**Keywords:** mineral oil; edible oil; GC/FID; HPLC-HPLC-GC-FID

### ÚVOD

Nie je to prvý krát, čo človek skonzumoval ropné látky. Naše telo je najviac kontaminované práve týmito látkami. Ropné látky sú všade okolo nás. Nachádzajú sa v exhalátoch z výfukových plynov áut, v rôznych mazadlách a taktiež v asfalte, po ktorom chodíme. Je logické, že každodennej expozícii sa nevyhneme. Ropa je komplikovaná zmes najmä alkánov a arómatov. Ropné látky sú vlastne produkty frakčnej destilácie ropy ako benzín, petrolej, nafta, vykurovací olej, vazelína, parafín, mazut a rôzne druhy olejov a mazacích tukov. Jedná sa vždy o zmes látok a nie o individuálne látky. Každá táto zmes látok má iné destilačné rozmedzie. S vyšším počtom uhlíkov v alkánoch stúpa aj teplota ich varu. Do potravín sa môžu ropné látky dostať z priesaku mazadiel z potravinových strojov, obalového materiálu alebo pri preprave v nedokonale vyčistených cisternách. Už v roku 1989 bola zistená vysoká koncentrácia ropných látok v lieskových orieškoch. Zdrojom kontaminácie boli jutové vrecia. Jutové vlákna boli máčané v oleji na zlepšenie ich vlastností. Nasledovalo ďalšie objavenie ropných látok aj v iných potravinách ako čokoláda, jedlé oleje alebo mlieko. V roku 2008 bolo meraniami zistené, že slnečnicový olej dovážaný do Európskej únie je značne kontaminovaný ropnými látkami. Úroveň tejto kontaminácie sa pohybovali až do 7000 mg/kg. Preto vyvstal problém urýchlene zaviesť oficiálne kontroly slnečnicového oleja na prítomnosť ropných látok. Rozhodnutie Komisie

2008/433/ES z 10. júna 2008 zaviedlo osobitné podmienky pre dovoz slnečnicového oleja pochádzajúceho z Ukrajiny v dôsledku kontaminácie ropnými látkami.

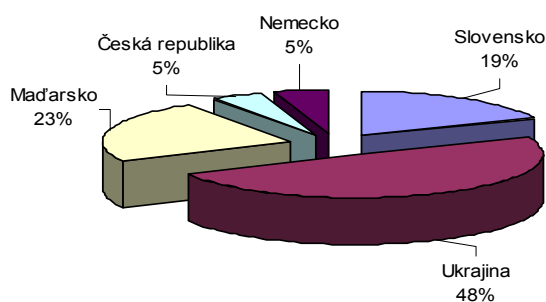
Detekcia ropných látok v potravinách je založená na simulovanej destilácii na chromatografickej kolóne. Ropné n-alkány majú konštantnú diferenciu retenčného času každého ďalšieho atómu uhlíka. Píky môžu byť preto spočítavané. Vlastne je pozorovaná homogénna distribúcia veľkostí píkov párných a nepárných reťazcov. Na detekciu sa používa najmä plameňovoionizačný detektor (FID). Tento detektor je nešpecifický a málo citlivý, ale všetky uhl'ovodíky majú takmer rovnakú odozvu. Tento fakt nám umožňuje kvantifikovať aj uhl'ovodíky, ktoré v kalibračnom roztoku nemáme. Vlastne dopredu nepoznáme zdroj kontaminácie a všetky kvantifikácie sú založené iba na tomto fakte rovnakej odozvy na FID detektore. Naopak hmotnostný detektor nemá rovnakú odozvu u uhl'ovodíkov, čo významne sťažuje presnejšiu kvantifikáciu. Ropné látky sa na chromatografickom zázname dajú rozpoznať tvorením hrbu. Veľkosť tohoto hrbu je úmerná koncentrácii. Problém nastáva so zistením presného druhu kontaminácie. Totiž každý druh ropného produktu vytvára na chromatograme hrb iného tvaru a v iných pozíciách. Tak napríklad vazelína má hrb elujúci neskôr ako napríklad lubrikačný olej. Ak je zdrojom kontaminácie viacero ropných derivátov, potom môže vzniknúť aj napríklad dvojhreb. Na odhad ropného druhu kontaminácie treba mať veľké skúsenosti. Súčasná analytické metódy dovoľujú detekovať len saturované alkány, ale nie zvyčajne vysoko alkylované arómaty, ktorých je až 30% všetkých látok obsiahnutých v ropných produktoch. Alkány z ropy musia byť rozlíšené od prírodných alkánov z rastlín (napríklad vosky). Rastlinné alkány sú charakterizované predominciou nepárných reťazcov (zvyčajne C<sub>27</sub>, C<sub>29</sub>, C<sub>31</sub> and C<sub>33</sub>). Ropné alkány primárne obsahujú bočné alebo cyklické reťazce (v plynovej chromatografii formujú hrb).

### MATERIÁL A METÓDY

Na detekciu a kvantifikáciu množstva ropných látok v slnečnicovom oleji a potravinách sa používajú rôzne metódy. Jedná sa o chromatografické metódy stanovenia pomocou plynovej chromatografie s plameňovoionizačným detektorom (FID). Metóda Christoph 2001 používa na prečistenie vzorky oxid hlinitý, elučným činidlom je hexán. Pri použití metódy Katell 2008 sa vzorka čistí cez silikagél.

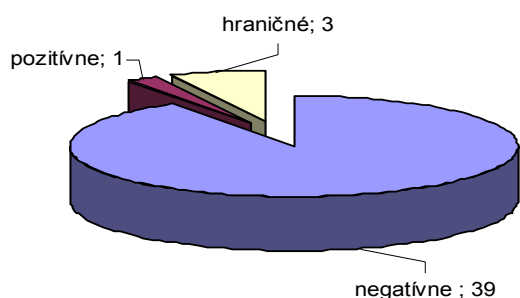
Graf 1

Podľa krajiny pôvodu



Graf 2

Podľa výsledku analýzy

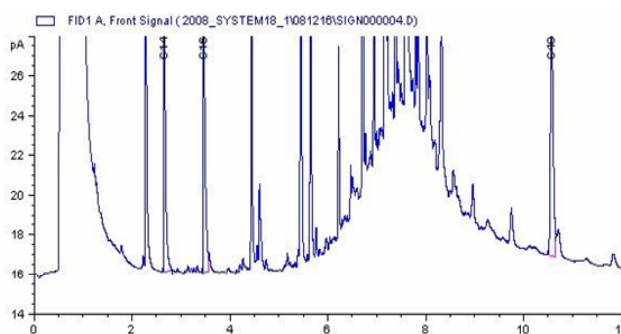


Ako eluent je použitý taktiež hexán. Tieto dve metódy sú tzv. „manuálne“. Po prečistení vzoriek oleja a prípadnom čiastočnom zahutnení (nikdy nie do sucha) sa vzorky injektujú na chromatografickú kolónu. Injektáž sa môže vykonať tromi spôsobmi: on-column, PTV (programmed temperature vaporizing), splitless.

Kvantifikácia sa vykoná pomocou triangulácie nameranej plochy „hrbu“ a následným prepočtom s použitím odozvočných faktorov získaných z nameraných plôch hrbu štandardu (parafín), vnútorného štandardu a vzorky. Iným spôsobom je použitie kalibračnej krivky. Pri tomto postupe je potrebné zintegrovat' všetky píky (cez baseline), následne zintegrovat' píky na vrchole "hrbu" a z rozdielu plôch vypočítat' obsah ropných látok vo vzorke.

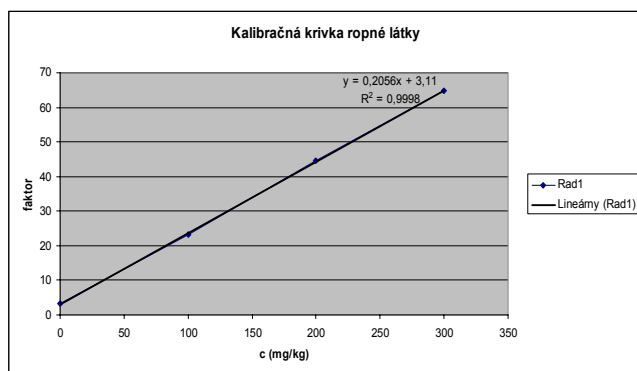
Ďalšou použiteľnou metódou je metóda on-line HPLC-HPLC-GC-FID. Prečistenie vzorky a jej analýza prebieha v uzatvorenom HPLC systéme (dve po sebe nasledujúce preparatívne HPLC kolóny) a analýza elučného alkánového

**Obrázok 1.** Chromatogram 100 mg/kg parafínu v negatívnom slnečnicovom oleji



okna z HPLC časti zariadenia priamo automatickou injektážou do plynového chromatografu s plameňoionizačným detektorom (FID), čím je riziko kontaminácie vzorky znížené na minimum. Vyhodnotenie sa vykoná jedným z horeuvedených spôsobov. U všetkým metód je dôležité vyhnúť sa zahusťovaniu vzoriek z dôvodu

**Obrázok 2.** Kalibračná krivka

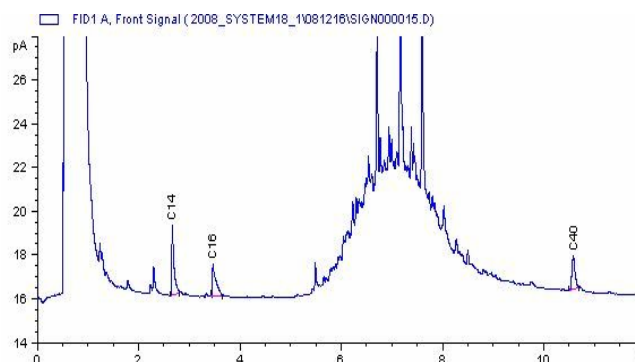


diskriminácie (strát) nižšie vriacich alkánov C10 – C 18. Pokiaľ je použitý konvenčný FID detektor, tak ten nemá dostatočnú citlivosť, aby limit detekcie (LOD) ropných látok ležal niekde v hladine 10 - 20 mg/kg. Preto je potrebná injektáž väčšieho objemu prečisteného extraktu, čo vedie k problémom so zahutnením a kontamináciou chromatografickej kolóny. Mala by sa použiť tzv. technika retenčnej medzere alebo konkurenčnej rekondenzácie rozpúšťadla. Všetky parametre týchto techník treba optimalizovať.

V laboratóriu ŠVPÚ Dolný Kubín sa stanovujú ropné látky metódou Katell 2008. Vzorka sa po prečistení na silikagéli čiastočne zahutní na TurboVape a následne injektuje technikou on-column na chromatografickú kolónu. Kvantifikácia sa vykoná trianguláciou nameranej plochy hrbu u vzorky a jej porovnanie voči hrbu vytvoreného parafinom. Ako vnútorný štandard je použitý hexadekán (C16) a tetrakontán (C40). Ako verifikačný štandard je použitý alkán tetradekán (C14), ktorý sa pridáva až do prečisteného extraktu. Pomer plôch píkov alkánov C40/C16 slúži na kontrolu diskriminácie jednotlivých alkánov pri separácii alkánov. Tento pomer by mal byť okolo 1. Pomer plôch píkov alkánov C16/C14 slúži na kalkuláciu strát počas prípravy vzorky. Takto sa určuje výťažnosť u každej meranej vzorky. Pomer plôch hrbu/C16 slúži na kvantifikáciu a je to vlastne relatívny odozvočný faktor. Na identifikáciu jednotlivých alkánov bol použitý roztok n-alkánov C12–C40. Správnosť a presnosť analytickej metódy bola overená účasťou na medzinárodnom porovnávacom teste organizovanom IRMM Geel Belgicko, kde sa stanovoval obsah ropných látok v štyroch vzorkách: kalibračný roztok, slnečnicový olej s prídavkom ropných látok, kontaminovaný rafinovaný slnečnicový olej, kontaminovaný surový slnečnicový olej.

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

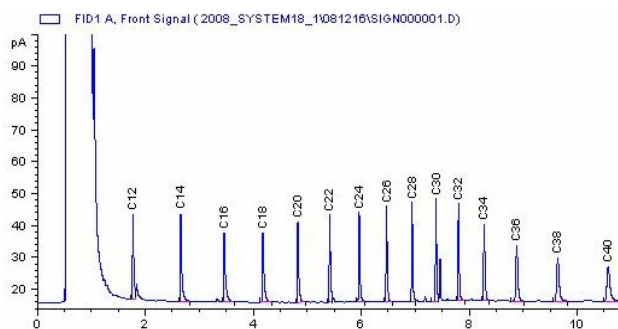
**Obrázok 3.** pozitívny slnečnicový olej



V roku 2008 bolo vyšetrených 42 vzoriek slnečnicového oleja a 1 vzorka repkového oleja. Rozdelenie podľa krajiny pôvodu je v grafe 1.

Z analyzovaných vzoriek bola 1 vzorka pozitívna (slnečnicový olej, krajina pôvodu Ukrajina) a u 3 vzoriek boli zistené hraničné hodnoty okolo 50 mg/kg (graf 2). Na obrázku 1 je zobrazený chromatogram kalibračného

**Obrázok 4.** Štandard alkánov C12-C40 (každý 1mg/l)



roztoku, ktorý bol pripravený pridaním parafínu do negatívneho slnečnicového oleja na hladine 100mg/kg.

Pre výpočet LOD a LOQ bola zostrojená kalibračná krivka, ktorú tvorili body s koncentráciou ropných látok (0, 100, 200 a 300) mg/kg. Jej priebeh a parametre uvádza obrázok 2.

Obrázok 3 ukazuje chromatografický záznam vzorky slnečnicového oleja, v ktorom bola zistená prítomnosť vysokého obsahu ropných látok. Z toho dôvodu musela byť upravená navážka vzorky a taktiež objem pridaného vnútorného štandardu (viď výšku pík C14, C16 a C40 v porovnaním s obrázkom 1). Uvedená vzorka oleja pochádzala z Ukrajiny. Pri analýze iných šarží slnečnicového oleja tejto značky nebola dokázaná prítomnosť ropných látok.

Pre zistenie retenčných časov jednotlivých alkánov sa pred každú sériu meraní zaraďuje štandard alkánov C12-C40 (obrázok 4).

Z výsledkom analýz vyplýva, že kontaminácia ropnými látkami je preukázateľná a do budúcnosti treba venovať týmto rozborom väčšiu pozornosť. V niektorých vzorkách slnečnicových olejov boli zistené obsahy ropných látok okolo limitných hodnôt (50 mg/kg). Jedna vzorka bola vysoko nadlimitná.

### LITERATÚRA

WAGNER, CH., NEUKOM, H. P., GALETTI, V., GROB, K., 2001. Determination of mineral paraffines in feeds and foodstuffs by bromination and preseparation on aluminium oxide, method and results of a ring test. *Mitt. Lebensm. Hyg.*

92, 2001, 231-249

GROB, K., BIEDERMANN, M., FISELIER, K., 2008. Mineral oil material in foods: analytical methods, occurrence evaluation. Workshop of the European Commission and the Official Food Control Authority of the Canton of Zurich, 17.-18. September 2008, Zurich, Switzerland

ROZHODNUTIE KOMISIE 2008/433/ES z 10. júna 2008, ktorým sa zavádzajú osobitné podmienky pre dovoz slnečnicového oleja pochádzajúceho z Ukrajiny v dôsledku kontaminácie minerálnym olejom

MCGILL, A. S., MOFFAT, C. F., MACHIE, P. R., CRUIESHANK, P., 1993. The Composition and Concentration of n-Alkanes in Retail Samples of Edible Oils. *J. Sci. Food Agric.* 1993, 61, 357-362

SANCO - RASSF, Alert notification., 2008. 0461-add75, Subject: Mineral oil in sunflower oil destined for refining from Ukraine, 10. July 2008, Brussels, Belgium

### Kontaktná adresa:

Ing. Róbert Germuška, Štátny veterinárny a potravinový ústav, Janoškova 1611/58, 026 01 Dolný Kubín, germuska@svpudk.sk

Ing. Miriam Vlčáková, Štátny veterinárny a potravinový ústav, Janoškova 1611/58, 026 01 Dolný Kubín, vlcakova@svpudk.sk

Ing. Silvia Tóthová, Štátny veterinárny a potravinový ústav, Janoškova 1611/58, 026 01 Dolný Kubín, tothova@svpudk.sk

## ANTIMIKROBIÁLNA AKTIVITA LAKTOBACILOV IZOLOVANÝCH ZO SUROVÉHO OVČIEHO A KRAVSKÉHO MLIEKA

### ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF LACTOBACILLI ISOLATED FROM RAW EWES AND COWS MILK

*Mária Greifová, Eva Krajčová, Gabriel Greif,  
Jolana Karovičová, Marcela Kontová, Martin  
Tomaška*

#### ABSTRACT

Ten lactobacilli strains were isolated from cow and ewe milk to study their antimicrobial activity against selected bacteria and molds by diffusion method. From among antimicrobial substances, production of lactic and phenyllactic acids in MRS broth was monitored by HPLC UV/RID.

**Keywords:** lactic acid bacteria, lactic acid, phenyllactic acid, antimicrobial activity

#### ÚVOD

Kyslomliečne baktérie (KMB) sú dôležitou zložkou spoločenstiev technologicky významných mikroorganizmov, ktoré sa používajú ako výrobné prostriedky pri fermentačných procesoch v technológii kysnutých a kvasených potravín živočíšneho a rastlinného pôvodu. Produkujú široké spektrum antimikrobiálne pôsobiacich primárnych a sekundárnych látok. Špecifický antimikrobiálny mechanizmus zahŕňa produkciu organických kyselín, CO<sub>2</sub>, diacetyl, etanol, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Kyslomliečne baktérie pozostávajú z bakteriálnych rodov v rámci kmeňa Firmicutes, ktorý zahŕňa okolo 20 rodov. Rody *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Oenococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* a *Weissella* sú hlavnými príslušníkmi KMB (Axelsson, 1998).

Typické KMB sú grampozitívne, nespórulujúce, katalázonegatívne, bez cytochrómov, anaeróbne alebo aeróbne koky alebo paličky. Sú acidotolerantné a produkujú kyselinu mliečnu ako hlavný koncový produkt počas fermentácie sacharidov (Reddy et al., 2008). Môžu rásť pri teplote od 5 do 45 °C. Prekvapivo sú tolerantné ku kyslopým vonkajším podmienkam. Väčšina rodov je schopných rásť pri pH 4,4. Optimum rastu je pri pH 5,5 –



**Obrázok 1.** Inhibičné zóny pri testovaní laktobacilov č. 65 voči *Cladosporium herbarum* a *E.coli* a č. 85 voči *Fusarium nivale* a *E.coli* (z ľava do prava) dvojvrstvou metódou

6,5 a organizmy sú náročné na aminokyseliny, peptidy, nukleotidové bázy, vitamíny, minerály, masné kyseliny a uhľohydráty.

Hlavným metabolitom KMB je kyselina mliečna, ktorá je zodpovedná za významnú zmenu pH v ich rastovom prostredí, dostatočnú pre antagonizmus viacerých baktérií. Nedisociovaná forma slabých organických kyselín difunduje cez bunkovú membránu a je v závislosti na intracelulárnom pH viac alebo menej disociovaná vo vnútri bunky, uvoľňuje H<sup>+</sup> ióny, ktoré okysľujú cytoplazmu. Navyše nedisociovaná forma molekuly sprostredkováva antimikrobiálny efekt kolapsom elektrochemického protónového gradientu, čím vzniká bakteriostatický vplyv alebo smrť citlivej baktérie. Efekt je výraznejší pri pH hodnote pod pK<sub>a</sub> hodnotu kyseliny, t.j. keď kyselina je v nedisociovanom stave (Kazateľová, 2003).

Kyselina fenylmliečna je ďalším produktom, ktorý vzniká počas fermentácie KMB. Je uznávaná ako hlavný faktor zodpovedný za antifungálnu aktivitu a predĺženie skladovateľnosti potravín. Jej inhibičné vlastnosti boli preukázané na niekoľkých plesniach izolovaných z pekárskych produktov, múky a obilia, vrátane niektorých toxigénnych druhov ako *Aspergillus ochraceus*, *Penicillium verrucosum* a *Penicillium citrinum*. Tiež proti niektorým bakteriálnym kontaminantom, ako *Listeria* spp., *Staphylococcus aureus* a *Enterococcus faecalis*. Kyselina fenylmliečna prispieva k organoleptickým vlastnostiam, zapája sa do vytvárania syrovej chuti. Je produkovaná KMB cez degradáciu fenylalanínu. Laktobacily transformujú fenylalanín na fenylpyruvát a fenyllaktát,

ktorý je následne premenený na karboxylovú kyselinu so silnou arómou (Valerio et al., 2004).

### CIEĽ PRÁCE

Izolácia a charakteristika izolovaných laktobacilov zo surového kravského a ovčieho mlieka, sledovanie ich antimikrobiálneho účinku voči vybraným baktériám a plesniam. Sledovanie produkcie organických kyselín týmito laktobacilmi v MRS bujóne pri teplote 37 °C s využitím HPLC RID metódy.

### MATERIÁL A METÓDY

Izolácia nových kmeňov laktobacilov: Laktobacily boli izolované zo vzoriek surového kravského a ovčieho mlieka náhodne vybraného od súkromných chovateľov z oblasti Malej Fatry. Charakteristické kolónie laktobacilov na MRS agare sú šošovčikovité, rozmeru 1 – 3 mm podľa hustoty populácie. Takto sa vyzolovalo cca 50 kmeňov laktobacilov, u ktorých sa testovala antimikrobiálna aktivita. Na základe najvyššej antimikrobiálnej aktivity sa ďalej pracovalo s 10 kmeňmi laktobacilov označených ako: 65, 81, 85, 91 (izoláty kravského mlieka) a 123, 161, 163, 173, 183, 202 (izoláty ovčieho mlieka). Fenotypová charakteristika a identifikácia laktobacilov, ktoré mali najlepšie antimikrobiálne účinky sa uskutočnila na základe nasledovných testov: ((Gramovo farbenie, katalázový test, sledovanie rastu v MRS bujóne pri rôznej teplote (15 °C, 37 °C, 45 °C), pri rôznom pH (6, 9) a rôznom obsahu NaCl (2 %, 4 %, 6,5%), sledovanie tvorby CO<sub>2</sub>, rozlíšenie homo- a heterofermentatívnych druhov, utilizácia sacharidov využitím API 50CH testov, rezistencia laktobacilov voči vybraným antibiotikám, PCR

**Tabuľka 1.** Antibakteriálny účinok laktobacilov izolovaných zo vzoriek surového kravského mlieka (65, 81, 85, 91) a zo vzoriek surového ovčieho mlieka (123, 161, 163, 173, 183, 202) vyjadrený ako % inhibície

Číslo vzoriek	% inhibície voči					
	<i>B. cereus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>E. coli</i>	<i>L. mono-cytogenes</i>	<i>Ps. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>
65	15,2	13,0	15,2	12,3	13,4	14,3
81	18,2	18,3	11,8	20,8	15,4	13,4
85	23,1	13,9	13,9	20,2	12,6	15,7
91	15,4	16,3	11,3	24,5	13,9	12,8
123	17,4	19,9	11,9	10,4	15,5	13,4
161	17,4	3,3	4,8	10,5	2,5	8,8
163	14,9	9,9	12,9	20,5	16,3	16,4
173	16,3	16,4	13,9	16,0	18,3	14,6
183	17,9	14,8	10,1	18,7	12,3	15,4
202	22,5	23,1	10,2	9,7	20,8	21,4

Číslo vzoriek	% inhibície voči					
	<i>A. flavus</i>	<i>Cl. herbarum</i>	<i>Fus. nivale</i>	<i>Muc. racemosus</i>	<i>P. funiculosum</i>	<i>Rh. oryzae</i>
65	9,3	23,9	21,7	2,3	6,2	12,9
81	9,6	21,8	31,9	2,3	3,1	16,5
85	6,6	13,3	43,2	5,8	6,2	12,9
91	10,1	21,3	31,4	3,5	4,1	12,9
123	9,9	25,5	30,7	6,2	4,1	12,9
161	10,5	11,8	25,8	7,3	6,2	14,5
163	11,6	22,5	33,7	6,8	4,9	17,4
173	11,3	18,2	36,9	4,1	6,4	14,5
183	9,1	12,9	35,3	3,9	6,4	18,9
202	9,3	16,3	24,3	4,1	5,8	14,5

**Tabuľka 2.** Antifungálny účinok laktobacilov izolovaných zo vzoriek surového kravského mlieka (65, 81, 85, 91) a zo vzoriek surového ovčieho mlieka (123, 161, 163, 173, 183, 202) vyjadrený ako % inhibície

identifikácia)).

Sledovanie antimikrobiálneho účinku laktobacilov na vybrané indikátokové mikroorganizmy dvojvrstvou metódou: Pri dvojvrstvovej difúznej metóde bol testovaný kmeň laktobacilov nanesený pomocou mikrobiologického očka v 2,5 cm línii na tuhý MRS agar a kultivovaný pri 37 °C 48 hod. Po vyrastení laktobacilov boli Petriho misky (PM) preliate mäkkým BHI resp. Sabouroudovým agarom s vhodnou koncentráciou indikátorového kmeňa. Po 24 h aeróbnej kultivácii pri 37 °C resp. 25 °C bola vypočítaná plocha inhibície (vyjasnená zóna) podľa vzorca:  $S = \pi \cdot a \cdot b$ , (plocha elipsy), kde a,b sú poloosi. (Magnusson et al., 2003).

Sledovanie tvorby kyseliny fenylmliečnej metódou HPLC: Tvorba kyseliny fenylmliečnej bola sledovaná v MRS bujóne s prídavkom 0,1 % fenylalanínu ako prekurzora po 72 h anaeróbnej kultivácii laktobacilov pri 37 °C. Vstupná koncentrácia laktobacilov bola 10<sup>6</sup> KTJ/ml.

Predanalytická úprava vzorky: MRS bujón s testovanými mikroorganizmami sa odstredil pri otáčkach 9000 ot.min<sup>-1</sup>. Supernatant sa zmiešal v alikvotnom pomere s mobilnou fázou, prefiltraval cez mikrofilter (0,2 µm) a následne aplikoval na kolónu.

Podmienky analýzy: Vysokotlaková pumpa DeltaChrom™ SDS 030, dávkovač Rheodyne 7725i, dávkovacia slučka 20 µl, kolóna: Polymér IEX H<sup>+</sup> (250 x 8 mm),

**Tabuľka 3.** Obsah kyseliny 3-fenylmliečnej a mliečnej produkovaný laktobacilmi pri anaeróbnej kultivácii v MRS bujóne s prídavkom 0,1% fenylalanínu (37 °C, 72 h)

Mikroorganizmus	n	k. 3-fenylmliečna [mM]		k. mliečna [M]	
		Priemer	sr	Priemer	sr
Lactobacillus sp. 65	2	0,3725	0,0176	0,1801	0,0027
Lactobacillus sp. 81	2	0,3752	0,0177	0,1786	0,0019
Lactobacillus sp. 85	2	0,4507	0,0177	0,1789	0,0024
Lactobacillus sp. 91	2	0,3813	0,0150	0,1791	0,0027
Lactobacillus sp. 123	2	0,4002	0,0177	0,1802	0,0017
Lactobacillus sp. 161	2	0,2446	0,0053	0,1796	0,0035
Lactobacillus sp. 168	2	0,4986	0,0171	0,1789	0,0018
Lactobacillus sp. 173	2	0,4226	0,0168	0,1817	0,0043
Lactobacillus sp. 183	2	0,4447	0,0061	0,1806	0,0021
Lactobacillus sp. 202	2	0,4136	0,0151	0,1808	0,0029

DeltaChrom™ Temperature Control Unit (50±0,1 °C), mobilná fáza: 1 mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, prietok mobilnej fázy: 1 cm<sup>3</sup>.min<sup>-1</sup>, detektor: UV Applied Biosystems 759A (210 nm), zberač dát a vyhodnotenie v programe Apex Clarity.

Sledovanie tvorby kyseliny mliečnej metódou HPLC RID: Množstvo vzniknutej kyseliny mliečnej bolo stanovené s využitím HPLC-RID metódy s predanalytickou úpravou vzorky a podmienkami analýzy ako pri stanovení kyseliny fenylmliečnej.

### VÝSLEDKY A DISKUSIA

Identifikácia laktobacilov: Pomocou softvéru na identifikáciu jednotlivých laktobacilov vyhodnotením testov API 50CH sme identifikovali všetkých desať vybraných kmeňov ako *Lactobacillus rhamnosus*, čo sa následne potvrdilo PCR metódou.

Stanovenie antimikrobiálnej aktivity

Zvýšený záujem o ochranné pôsobenie KMB je spojený s tendenciou nahradzovať chemické konzervačné látky látkami prírodnej povahy. Komplexný antimikrobiálny efekt vybraných laktobacilov bol študovaný dvojvrstvou difúznou metódou voči vybraným baktériám a plesniam. V tab. 1 a 2 je uvedené percento inhibície laktobacilov voči jednotlivým testovaným mikroorganizmom. V odbornej literatúre sa hodnotí vyjasnená plocha do 3 % plochy PM ako +, vyjasnená plocha od 3-9 % plochy PM ako ++ a vyjasnená plocha nad 9 % plochy PM ako +++. Môžeme konštatovať, že nami vybrané laktobacily mali veľmi vysokú antimikrobiálnu aktivitu. Na obr. 1 sú uvedené niektoré príklady inhibície.

Sledovanie tvorby kyseliny mliečnej, kyseliny fenylmliečnej testovanými laktobacilmi HPLC metódou Tvorba kyseliny mliečnej a utilizácia glukózy sa sledovala po 72 h stacionárnej kultivácii laktobacilov pri 37 °C v MRS médiu. Tvorba kyseliny fenylmliečnej sa sledovala po 72 h stacionárnej kultivácii v MRS bujóne s prídavkom 0,1 % fenylalanínu. Obsah sledovaných kyselín je uvedený v tab. 3.

Počas fermentácie sa tvorí D- a L-forma kyseliny fenylmliečnej, pričom oba stereoizoméry pôsobia porovnateľne na nežiaduce mikroorganizmy. Kyselina pôsobí spolu s ostatnými fermentačnými produktmi, ktoré

zvyšujú jej účinnosť. Podľa autorov (Dieuleveux, Lemariner, Guéguen 1998; Lavermicocca, Valerio, Visconti 2003; Ström et al., 2002) je jej účinok na mikrobiálnu bunku je podobný ako u kyselín (mliečna, octová). Zatiaľ nie je celkom známy mechanizmus jej účinku. Ström (2005) predpokladá, že cieľ jej účinku je enzým fenylalanindehydrogenáza. Tento enzým prítomný v baktériách katalyzuje deamináciu fenylalanínu, čím vzniká pyridín potrebný pre syntézu nukleotidov.

Výskumy naznačujú, že kyselina má potenciál pre praktické využitie ako antimikrobiálne činidlo v potravinárskom priemysle vzhľadom na jej rozsiahlu inhibičnú aktivitu voči mnohým plesniam kontaminujúcim potraviny (Lavermicocca, Valerio, Visconti 2003).

Netoxickosť kyseliny fenylmliečnej pre ľudské a zvieracie bunkové línie dovoľuje jej bezpečné použitie

v potravinách, aj keď informácie o jej vplyve na reológiu a chuťnosť by mali byť získané pre každý potravinový systém. Preto kyselina fenylmliečna, ako ďalšia antibakteriálna látka produkovaná laktobacilmi, predstavuje sľubnú prírodnú možnosť pre kontrolu kontaminantov v potravinovom systéme. Navyše výhodou v porovnaní s inými zložkami, ako napríklad kyselina octová, je zjavný nedostatok vône roztoku kyseliny fenylmliečnej.

### LITERATÚRA

AXELSSON, L., 1998. Lactic acid bacteria: Classification and physiology. In *Lactic Acid Bacteria: Microbiology and functional aspects, 2nd Edition, Revised and Expanded*. Edited by S. Salminen & A. von Wright. pp. 1-72. Marcel Dekker, 1998. Inc. New York.

DIEULEVEUX, V., LEMARINIER, S., GUÉGUEN, M., 2003. Antimicrobial spectrum and target site of D-3-phenyllactic acid. *International Journal of Food Microbiology*, 40, 1998, s. 177-183.

KAZATELOVÁ M., 2003. Produkty metabolismu bakterií mléčného kvašení s antimikrobiální aktivitou. *Bulletin of Food Research*, 42(1-2), 2003, s. 67-73.

MAGNUSSON, J., STRÖM, K., ROOS, S., SJÖGREN, J., SCHNÜRER, J., 2003. Broad and complex antifungal activity among environmental isolates of lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Letters*, 219 (1), 2003, s. 129-135.

LAVERMICOCCA, P., VALERIO, F., VISCONTI, F., 2003. Antifungal Activity of Phenyllactic acid against Molds

Isolated from Bakery Products. *Applied And Environmental Microbiology*, 69, 2003, s. 634-640

REDDY, G., ALTAF, MD., NAVEENA, B. J., VENKATESHWAR, M., KUMAR, E.V., 2005. Amylolytic bacterial lactic acid fermentation – A review. *Biotechnology Advances*, 26, 2008, s.22-34.

STRÖM K., 2005. Fungal Inhibitory Lactic Acid Bacteria-Characterization and Application of *Lactobacillus plantarum* MiLAB 393. Doctor's dissertation. Faculty of Natural Resources and Agricultural Sciences, Department of Microbiology, Uppsala 2005

STRÖM, K., SJÖGREN, J., BROBERG, A., SCHNÜRER, J., 2002, *Lactobacillus plantarum* MiLAB 393 produces the antifungal cyclic dipeptides cyclo(L-Phe-L-Pro) and cyclo(L-Phe-trans-4-OH-L-Pro) and phenyl lactic acid. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 2002, s. 4322-4327.

VALERIO, F., LAVERMICOCCA, P., PASCALE, M., VISCONTI, A., 2004. Production of phenyllactic acid by lactic acid bacteria: an approach to the selection of strains contributing to food quality and preservation. *FEMS Microbiology Letters*, 233, 2004, s.289-295.

Práca bola podporená grantami APVV 0310-06, APVV-0158-07 a VEGA 1/0570/08

**Kontaktná adresa:** doc. Ing. Mária Greifová, PhD., Fakulta chemickej a potravinárskej technológie STU Bratislava, Radlinského 9, 812 37 Bratislava, SR; maria.greifova@stuba.sk

## MOŽNOSTI VYUŽITÍ DIKARBOXYLOVÝCH KYSELIN JAKO NÁHRADY TAVICÍCH SOLÍ PŘI VÝROBĚ TAVENÝCH SÝRŮ USE OF DICARBOXYLIC ACID IN EMULSIFYING AGENTS REPLACING DURING PROCESSED CHEESE PRODUCTION

*Kristýna Hladká, František Buňka, Vendula Pachlová, Petra Vojtíšková, Natália Kosibová, Stanislav Kráčmar*

### ABSTRACT

The work deals with replacing phosphate emulsifying agents by dicarboxylic acids and their salts. Model processed cheese samples were assessed by sensory analysis. Number of carbons did not have significant influence on the fusibility. Samples with 1 and 2 % (w/w) sodium oxalate were homogeneous. Other samples were not homogeneous.

**Keywords:** processed cheese, emulsifying agent, dicarboxylic acid.

### ÚVOD

Tavené sýry jsou vyráběny zahříváním směsi různých druhů přírodních sýrů, které mohou být v různém stupni prozrálosti, s tavicími solemi za částečného podtlaku a stálého míchání, než je dosažena homogenní hmota

požadovaných vlastností. Konkrétní složení tavicí směsi pro tavený sýr je závislé na požadovaných vlastnostech výsledného produktu (Carić & Kaláb, 1997; Guinee *et al.*, 2004). Frakce  $\alpha_{s1}$ -,  $\alpha_{s2}$ - a  $\beta$  kaseinů mají hydrofilní i lipofilní segmenty, což propůjčuje frakcím emulgační schopnosti. Vápníkové můstky zesilující matrici sýra tyto schopnosti potlačují. Tavicí soli mají schopnost odštěpit vápník, který je vázán na fosfoserinové zbytky kaseinu (Carić & Kaláb, 1997; Guinee, 2003). Nejčastěji jsou používány ortofosfáty, pyrofosfáty, polyfosfáty, citráty a obvykle tvoří 2-3 % hmotnosti surovinové skladby (Molins, 1991; Anonym, 2002). Pokud by byla tavicí směs zahřívána bez přítomnosti tavicích solí, lze očekávat uvolnění vody a došlo by k oddělení hydrofilní a hydrofobní fáze (Guinee, 2003). Hlavní úlohou tavicích solí je upravit prostředí v tavené směsi tak, aby přítomné proteiny mohly uplatnit své přirozené vlastnosti emulgátorů (Carić & Kaláb, 1997).

Ideální poměr vápníku a fosforu se ve výživě udává 1:1. Ovšem tento poměr je v tavených sýrech v nepříznivé oblasti pro vstřebávání vápníku, a to 1: 1,8 (Schäffer *et al.*, 1999, 2001). Pokud by byly tavicí soli nahrazeny, pravděpodobně by se zvýšila biovyužitelnost vápníku z tavených sýrů. Náhradami tavicích solí se již některé práce zabývaly. Jako náhradu tavicích solí použili Černíková *et al.* (2007) nízkometylovaný pektin spolu s emulgátorem lecitinem. Schäffer *et al.* (1999, 2001) aplikovali blíže nespecifikovaný hydrokoloid rostlinného původu. Jako částečnou náhradu použili Carić & Kaláb (1997) monoacylglyceroly, kterými nahradili až 50 % tavicích solí. Kwak *et al.* (2002) dosáhli uspokojivých výsledků při použití částečně hydrolyzovaného kaseinu, kterým nahradily do 50 % tavicích solí. Pluta *et al.* (2000)

**Tabulka.1** Přehled použitých dikarboxylových kyselin a jejich solí v různých koncentracích  
Vysvětlení označení: \* + vzorek se utavil, - vzorek se neutavil/\*\* průměr ± S.D.

přidatná látka	proveditelnost tavyby* / pH**							
	0,5 % (w/w)		1 % (w/w)		2 % (w/w)		3 % (w/w)	
kyselina šťavelová	+	4,71 ± 0,01	+	4,02 ± 0,02	+	2,85 ± 0,01	+	1,57 ± 0,01
šťavelan sodný	-	-	+	6,21 ± 0,02	+	6,68 ± 0,01	+	6,65 ± 0,01
kyselina malonová	-	-	+	4,54 ± 0,01	+	4,00 ± 0,02	+	3,50 ± 0,02
malonát sodný	-	-	-	-	-	-	-	-
kyselina jantarová	-	-	+	4,70 ± 0,02	+	4,35 ± 0,01	+	4,1 ± 0,01
sukcinát sodný	-	-	-	-	-	-	-	-
kyselina glutarová	-	-	-	-	-	-	-	-
kyselina adipová	-	-	-	-	-	-	-	-
kyselina pimelová	-	-	-	-	+	4,72 ± 0,02	-	-
kyselina suberová	-	-	-	-	+	4,97 ± 0,02	-	-
kyselina maleinová	-	-	+	4,75 ± 0,02	+	4,12 ± 0,02	+	3,52 ± 0,02
maleinát sodný	-	-	-	-	-	-	-	-
kyselina fumarová	-	-	-	-	+	3,88 ± 0,01	+	3,5 ± 0,01
fumarát sodný	-	-	-	-	-	-	-	-

použili jako částečnou náhradu některé hydrokoloidy (např. nízkometylovaný pektin, modifikovaný škrob) Dikarboxylové kyseliny mají i v malých koncentracích vliv na organoleptické a technologické vlastnosti výrobku. Určují hodnotu pH potravin, čímž do značné míry ovlivňují i průběh chemických reakcí a mikrobiologickou stabilitu během tepelného zpracování a skladování výrobků (Davídek *et al.*, 1983). Karboxylová skupina je silně polární a vytváří jak mezi sebou, tak i mezi dalšími polárními molekulami silné vodíkové vazby. V porovnání s minerálními kyselinami patří mezi slabé kyseliny. (Svoboda *et al.*, 2005; McMurphy, 2007). Dikarboxylová kyselina má afinitu k vápenatým iontům (Bazin *et al.*, 1995; Fleming *et al.*, 2001), je tedy schopna odštěpit vápník z proteinu a lze ji použít jako možnost náhrady tavicích solí.

Cílem práce bylo prozkoumat možnosti náhrady tavicích solí dikarboxylovými kyselinami a jejich sodnými solemi. Výsledný produkt by měl být v této fázi homogenní na makroskopické úrovni.

## MATERIÁL A METÓDA

K výrobě tavených sýrů s obsahem sušiny 40 % (w/w) a 50 % (w/w) tuku v sušině byly použity následující suroviny: eidamská cihla, sojový tuk (s obsahem 70 % mononenasycených mastných kyselin), pitná voda, přidatné látky (tavicí soli nebo dikarboxylové kyseliny a jejich sodné soli). U každé série byly vyrobeny tzv. kontrolní vzorky bez dikarboxylových kyselin, s přidavkem 2,5 % (w/w) komerčních fosfátových solí (BK Landenburg, Germany). Všechny výrobky byly taveny na přístroji Vorwerk Thermomix TM 31-1 (Vorwerk & Co. Thermomix; GmbH, Wuppertal, Germany). Při tavení byla použita tavicí teplota 90 °C po dobu 1 min. Sýry byly po výrobě nality do polystyrénových vaniček, zataveny, zchlazeny a poté skladovány při teplotě 6 ± 2 °C. Senzorické hodnocení vzorků probíhalo vždy 14 dní po výrobě pomocí 5-ti bodové stupnice v panelu tří posuzovatelů na úrovni expert, školených dle normy ISO 8586-2. Byly hodnoceny senzorické znaky: vzhled, konzistence a homogennost

výrobků. Po 14-ti dnech bylo měřeno pH výrobků při 24 ± 1 °C. K měření pH byl používán přístroj pH Sper (Eutech Instruments, Oakton, Malaysia).

Jako náhrady tavicích solí při výrobě tavených sýrů byly použity: kyselina šťavelová a šťavelan sodný, kyselina malonová a malonát sodný, kyselina jantarová a sukcinát sodný, kyselina glutarová, kyselina adipová, kyselina pimelová, kyselina suberová, kyselina maleinová a maleinát sodný a kyselina fumarová a fumarát sodný (Sigma Aldrich, Inc., St. Louis, USA) v koncentracích 0,5; 1; 2 a 3 % (w/w). Všechny přidatné látky byly použity v práškové formě.

## VÝSLEDKY A DISKUZE

Byla zhodnocena proveditelnost taveb použitých dikarboxylových kyselin a jejich solí v tabulce č.1. Kontrolní vzorky byly u všech utavených sérií homogenní, lesklé a hladké.

Níže uvedené koncentrace použitých přidatných látek jsou vždy uváděny v hmotnostních % (w/w).

Přes 60 % variant vzorků se nepodařilo utavit: vzorky s přidavkem 0,5 % šťavelanu sodného, 0,5 % kyseliny malonové, 0,5; 1; 2 a 3 % malonátu sodného, 0,5 % kyseliny jantarové, 0,5; 1; 2 a 3 % sukcinátu sodného, 0,5; 1; 2 a 3 % kyseliny glutarové, 0,5; 1; 2 a 3 % kyseliny adipové, 0,5; 1 a 3 % kyseliny pimelové, 0,5; 1 a 3 % kyseliny suberové, 0,5 % kyseliny maleinové, 0,5; 1; 2 a 3 % maleinátu sodného, 0,5 a 1 % kyseliny fumarové a 0,5; 1; 2 a 3 % fumarátu sodného.

Vzorky s přidavky 0,5; 1; 2 a 3 % kyseliny šťavelové byly nehomogenní, řídkší konzistence, struktura byla nespojená, krátká, trhala se, uvolňovala se voda. Vzorky s přidavky 1 a 2 % šťavelanu sodného se jevíly makroskopicky homogenní, řídké konzistence, lesklé, hladké. Vzorek s 3 % šťavelanem sodným byl nehomogenní, roztékavé, blátivé konzistence. Vzorky s přidavky 1; 2 a 3 % kyseliny malonové byly nehomogenní, blátivé konzistence, uvolňovala se voda. U přidavků 2 a 3 % byly viditelně odděleny vrstvy, nahoře tuhá a dole tekutá vrstva. Vzorky s přidavky 1; 2 a 3 %



kyseliny jantarové byly nehomogenní, uvolňovaly vodu. U přísad 1 a 2 % byly odděleny vrstvy, horní byla tekutá, spodní tužší zrnitá. Vzorky se jeví lepší se stoupající koncentrací. Vzorky s přísadou 2 % kyselin pimelové a suberové byly nehomogenní, tužší konzistence, krátké struktury, mírně se uvolňovala voda. Vzorky s přísadami 1; 2 a 3 % kyseliny maleinové byly nehomogenní, tužší konzistence, krátké struktury, drobné. U přísad 2 a 3 % se uvolňovala voda. Vzorky s přísadami 2 a 3 % kyseliny fumarové byly nehomogenní, tužší, drobné konzistence, uvolňovaly vodu.

U většiny vzorků se hodnoty pH pohybovaly v příliš nízké oblasti, vlivem uvolněných vodíkových iontů. Vzorky jejichž hodnoty pH se pohybovaly kolem izoelektrického bodu kaseinů byly tužší, až drobné. Vzorky, jejichž hodnota pH se pohybovala pod hodnotou izoelektrického bodu, byly měkčí konzistence a uvolňovaly vodu. Marchesseau *et al.*, (1997) uvádějí, že optimální hodnoty pH tavených sýrů se pohybují v rozmezí 5,7 až 6,0. Pokud má tavený sýr výrazně vyšší pH, vykazoval by příliš měkkou konzistenci. Naopak při nižších hodnotách pH, které se blíží izoelektrickému bodu kaseinů, by byl tavený sýr příliš tuhý, až drobný. Kontrolní vzorky měly průměrnou hodnotu pH  $5,67 \pm 0,04$ , byly tedy v optimálním rozmezí a nevykazovaly žádné z výše uvedených konzistenčních extrémů. Jako nejlepší se jeví vzorky s přísadou 2 % šťavelanu sodného s průměrnou hodnotou pH  $6,68 \pm 0,01$ , jejichž konzistence byla měkká a řídká.

Vyhláška č. 4/2008 Sb., v platném znění, povoluje přidávat do potravin kyseliny jantarovou, adipovou a fumarovou. Ostatní látky vyhláška neuvádí. V práci byly použity pro úplnost i látky, které dnes nejsou povoleny pro výrobu potravin (byly testovány látky s různým počtem uhlíků v molekule). Bylo zjištěno, že počet uhlíků neměl vliv na tavitelnost. Jako homogenní byl ohodnocen pouze výrobek s přísadou šťavelanu sodného. Tato látka však nemůže být použita, jelikož se jedná o substanci s toxickými účinky. Pro jiné než potravinářské a krmivářské účely by však tato látka použita být mohla.

### ZÁVĚR

Byly utaveny tavené výrobky s obsahem 40 % (w/w) sušiny a 50 % (w/w) tuku v sušině. U kontrolních vzorků byly při výrobě použity fosfátové tavicí soli v koncentraci 2,5 % (w/w). U ostatních vzorků byly tavicí soli nahrazeny dikarboxylovými kyselinami a jejich solemi v koncentracích 0,5; 1; 2 a 3 % (w/w). Byly sledovány senzorické znaky v porovnání s kontrolním vzorkem. Nejlépe se jevil vzorek s přísadou 2 % (w/w) šťavelanu sodného. Vzorek se zdál makroskopicky homogenní, byl hladký a lesklý.

Záměrem dalších experimentů bude zkoušení dalších přídatných látek či jejich kombinací. Z důvodu příliš nízkých hodnot pH by bylo vhodné přidávat zásadité látky, které by byly schopné přijmout uvolněné vodíkové ionty a tím zvýšit pH.

### LITERATURA

- ANONYM, 2002. *Processed cheese manufacture*. BK Giulini Chemie GmbH & Co. OHG, JOHA, 2002, 238 s.
- BAZIN, H., BOUCHU, A., DESCOTES, G., PETIT-RAMEL, M., 1995. Comparison of calcium complexation of some carboxylic acids derived from D-glucose and D-

fructose. *Canadian Journal of Chemistry*, 74, 1995, 1338-1347.

CARIĆ, M., KALÁB, M., 1997. Processed cheese products. *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, 2, 1997, 467-505.

ČERNÍKOVÁ, M., BUŇKA, F., HLADKÁ, K., BŘEZINA, P., HRABĚ, J., 2007. *Využití pektinu při náhradě tavicích solí ve výrobě tavených sýrů*. Bezpečnost a kontrola potravin, SPU Nitra, 2007, 267-270, ISBN 978-80-8069-861-4.

DAVÍDEK, J., JANÍČEK, G., POKORNÝ, J., 1983. *Chemie potravin*. SNTL, 1983, 629 s.

FLEMING, D. E., VAN BRONSWIJK, W., RYALL, R. L., 2001. A comparative study of the adsorption of amino acids on to calcium minerals found in renal calculi. *Clinical science*, Medical Research Society, 101, 2001, 159-168.

GUINEE, T. P., 2003. Pasteurized processed cheese product. *Encyclopedia of Dairy Science*, 1, 2003, 411-418.

GUINEE, T. P., CARIĆ, M., KALÁB, M., 2004. Pasteurized Processed Cheese and Substitute/Imitation Cheese Products. *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, 2, 2004, 349-394.

KWAK, H. S., CHOI, S. S., AHN, J., LEE, S. W., 2002. Casein hydrolysate fraction act as emulsifiers in process cheese. *Journal of Food Science*, 67, 2002, 821-825.

MARCHESSEAU, S., GASTALDI, E., LAGAÚDE, A., CUQ, J. L., 1997. Influence of pH on Protein Interaction and Microstructure of Process Cheese. *Journal of Dairy Science*, 80, 1997, 1483-1489.

MC MURRY, J., 2007. *Organická chemie*. VUT v Brně, 2007, 1176 s. ISBN 978-80-214-3291-8.

MOLINS, R. A., 1991. *Phosphates in food*. Boca Raton: CRC Press, 1991, 261 s. ISBN 0-8493-4588-X.

PLUTA, A., ZIARNO, M., SMOLIŃSKA, A., 2000. Możliwości zastosowania hydrokoloidów w produkcji serów topionych. *Przemysł Spożywczy*, 5, 2000, 42-44.

SCHÄFFER, B., LÖRINCZY, D., BELÁGYI, J., 1999. DSC and electronmicroscopic investigation of dispersion-type processed cheeses made without peptization. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 56, 1999, 1211-1216.

SCHÄFFER, B., SZAKÁLY, S., LÖRINCZY, D., SCHÄFFER, B., 2001. Processed cheeses made with and without peptization. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 64, 2001, 671-679.

SVOBODA, J., DVOŘÁK, D., LHOTÁK, P., LIŠKA, F., KVÍČALA, J., STIBOR, I., 2005. *Organická chemie I*. Praha: VŠCHT, 2005, 310 s., ISBN 80-7080-561-7.

VELÍŠEK, J., DAVÍDEK, J., HRNČÍŘÍK, K., KOPLÍK, R., KUBEC, R., ŠAVEL, J., VALENTOVÁ, H., 1999. *Chemie potravin 2*. Tábor: OSSIS, 1999, 328 s., ISBN 80-902391-4-5.

VYHLÁŠKA č. 4/2008 Sb., kterou se stanoví druhy a podmínky použití přídatných látek a extrakčních rozpouštědel při výrobě potravin, v platném znění.

**Poděkování:** práce vznikla za podpory projektu MŠMT: MSM 7088352101.

**Kontaktná adresa:** Ing. Kristýna Hladká, Ústav biochemie a analýzy potravin, Fakulta technologická, Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, nám. T.G.Masaryka 275, 762 72 Zlín, tel. 00420 576 033 007, e-mail: hladka@ft.utb.cz

## VYUŽITIE ENZÝMOVÝCH PREPARÁTOV NA STANOVENIE INULÍNU

## USING OF ENZYMATIC PREPARATION TO THE DETERMINATION OF INULIN

*Ivana Šimonová, Jolana Karovičová, Vladimír Mastihuba*

### ABSTRACT

The selection of suitable enzymatic preparation, were carried out by high-performance liquid chromatography with RI-detection. The amount of released fructose were determined after enzymatic hydrolyze in the three model solution and in the lactic acid fermented cabbage juices with addition of inulin preparations. The best results were obtained during enzymatic hydrolyze with preparation FRUCTOZYME L.

**Keywords:** inulin, enzymatic hydrolysis, HPLC

### ÚVOD

V krajinách EU sú inulín a oligofruktóza zaradené medzi potravinové zložky. Sú funkčnými zložkami potravín, ktoré poskytujú kombináciu dôležitých technologických výhod a vlastností, pozitívne ovplyvňujúce zdravie konzumenta (Roberfroid, 2002b). Môžu byť používané bez obmedzenia ako prídavné látky v potravinách a nápojoch (Franck, 2002). Inulín a oligofruktóza patria medzi fruktány a vyskytujú sa v niektorých druhoch ovocia a zeleniny. Ich najbežnejšími zdrojmi sú cibuľa, cesnak, pór, čakanka, topinambur, artičoky (Roberfroid a Slavin, 2000).

Z chemického hľadiska sú fruktánové molekuly popisované vzorcom:  $GF_n$ , v ktorom G=Glukóza, F=Fruktóza. Fruktány tiež obsahujú malé množstvo fruktánov  $F_n$ , v ktorých koncové glukózové jednotky nie sú prítomné. Hlavné komerčne dostupné typy fruktánov sú inulín (DP – stupeň polymerizácie 3-60) a fruktooligosacharidy (FOS) (DP 3-10). FOS sú komerčne získavané z inulínu enzymatickou hydrolyzou, enzymatickou syntézou zo sacharózy a fruktózy alebo bakteriálnou enzymatickou syntézou (Andersen a Sorensen, 1999).

Enzymová hydrolyza inulínu prirodzenými endoglykozidázami rastlín, tzv. inulinázou ( $\beta$  – 1,2 – fruktán fruktonohydroláza), poskytuje lineárne polyméry typu  $GF_n$  (ak je molekula fruktánov zakončená  $\alpha$  – D – glukopyranózou označuje sa  $GF_n$ , G=Glukóza, F=Fruktóza, n=stupeň polymerizácie – počet viazaných molekúl fruktózy) alebo tiež polyméry typu  $F_n$  (tento typ je lineárnym homopolymérom fruktózy, ktorý inulín vždy správa) (Flickinger et al., 2003).

Správidla na dôkaz a rozlíšenie polysacharidov sa používa hydrolyza silnými kyselinami alebo špecifickými enzýmami a následná chromatografia mono- až polysacharidov pôvodného polysacharidu (Corradini et al., 1999). Inulín a oligofruktóza môžu byť kvantitatívne

stanovené vo frakcii rozpustnej vlákniny potravín získanej pomocou gravimetrickej AOAC metódy. Analytické metódy stanovenia fruktánov sú rozdelené do dvoch skupín: priame metódy stanovenia reťazcov fruktánov a nepriame metódy stanovenia množstva glukózy a fruktózy po hydrolyze fruktánov (Andersen a Sorensen, 1999). Metódy HPLC a GC môžu byť použité na separáciu fruktánov s krátkym reťazcom, ale tieto metódy sú limitované nedostatkom komerčne dostupných analytických štandardov. Na stanovenie z fruktánov uvoľnenej fruktózy a glukózy je často využívaná metóda HPAEC-PAD (High performance anion exchange chromatography with pulsed amperometric detection) (Garbelotti et al., 2003). Vendrell-Pascuas et al., (2000) kvantitatívne stanovili inulín v mäsových výrobkoch (šunka, morčacie prsia), metódou HPLC s použitím RI-detektora.

Po extrakcii inulínu s horúcou vodou, nasledovala enzymatická hydrolyza (Fructozyme, zmes exo- a endoinulinázy) a vlastné stanovenie fruktózy. Ako špecifickú metódu Sugita a Tomiyama (1995) opisali enzymatické stanovenie inulínu a Inutestu (injektovaná forma inulínu) za použitia enzýmov inulináza, fruktokináza, fosfoglucoizomeráza.

Cieľom práce bolo zistiť optimálne podmienky pre enzymatickú hydrolyzu inulínu pomocou preparátov Fructozyme L a Lactozym v modifikovaných prostrediach ako aj v reálnych vzorkách (mliečne fermentované kapustové šťavy).

### MATERIÁL A METÓDY

Pre určenie optimálnych podmienok enzymovej hydrolyzy, ktorá prebiehala pri laboratórnej teplote  $25 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$  bol použitý citrátovo – fosfátový pufo s hodnotami pH 4.0, 4.5, 5.0. Z inulinového preparátu „Fructafit (95 % inulínu, firma BRENNTAG Slovakia)“ bol pripravený roztok o koncentrácií použitej pri príprave mliečne fermentovaných štiav (2 % prídavok) v deionizovanej vode. Pripravený inulinový roztok bol riedený v pomere 1:1 s citrátovo – fosfátovým pufram s danými pH hodnotami. Po pridaní 1,5 x zriedeného enzýmu Fructozyme L (Inulinase *Aspergillus niger*, BIOTECH, Trnava) do reakčnej zmesi sa v nami určených časových intervaloch (0 až 90 min) odoberali vzorky reakčnej zmesi. Hydrolyza bola zastavovaná prídavkom rovnakého objemu 0,5 M  $\text{Na}_2\text{PO}_4$ . Po zmiešaní a prefiltrovaní bola vzorka injektovaná na analýzu metódou HPLC (Marsilio et al., 2000). Rovnaký postup bol zvolený aj pri použití enzýmu „Lactozym L“ ( $\beta$ -Galactosidase *Kluyveromyces lactis*, BIOTECH, Trnava).

Vzorky štiav na báze zeleniny (biela hlávková kapusta) boli fortifikované D-glukózou, NaCl a 2 % prídavkom prebiotického preparátu „Fructafit“ a následne 168 h fermentované s *Lactobacillus plantarum* CCM 7039, *Lactobacillus amylophilus* CCM 7001, *Lactobacillus amylovorus* CCM 4380 a *Bifidobacterium longum* CCM 4990.

HPLC stanovenie použitého prebiotického preparátu bolo uskutočnené nepriamou metódou, ako stanovenie obsahu fruktózy (Marsilio et al., 2000). Analýza vzoriek fermentovaných štiav bola vykonaná pred a po

enzymatickej hydrolýze inulínu enzýmom Fructozyme L.. Podmienky stanovenia s HPLC: RI - detekcia, kolóna – polymer IEX H forma (Watrex), mobilná fáza – kyselina sírová 9mM, laboratórna teplota.

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

Na stanovenie optimálnych podmienok (pH prostredia, enzýmový preparát a čas potrebný na úplnú hydrolýzu inulínu) bola použitá reakčná zmes s obsahom citrátovo-fosfátového pufru s pH 4,0, 4,5 a 5,0, 2 % prídavku prebiotického preparátu Fructafit a enzymatické preparáty Fructozyme L a Lactozym L.

V nami zvolených časových intervaloch sa odoberali vzorky reakčnej zmesi na stanovenie množstva uvoľnenej fruktózy počas enzymatickej hydrolýzy inulínu metódou HPLC s RI detekciou.

Na základe výsledkov, bolo zistené, že inulínový preparát najlepšie hydrolyzoval v prostredí s pH 4,5, pričom v danom prostredí sa uvoľnilo najväčšie množstvo fruktózy ( $0,0548 \text{ mol.dm}^{-3}$ ) a to v 30 min enzymatickej reakcie (obrázok 1). Tento čas, dané pH prostredie a použitá koncentrácia enzýmu sú dostatočné na úplnú hydrolýzu polysacharidových preparátov inulínového typu v koncentrácií 2 %.

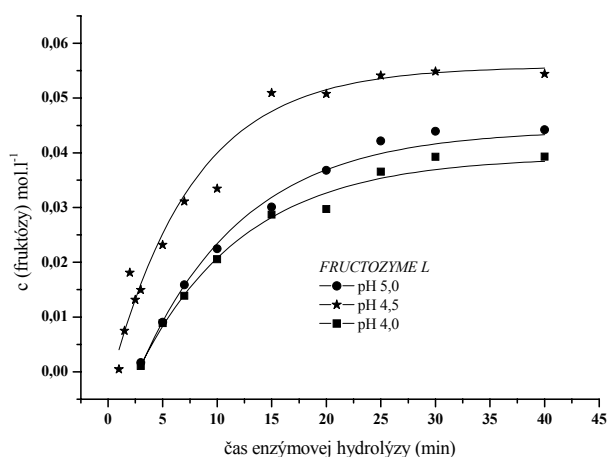
Zistené podmienky boli aplikované na stanovenie inulínu vo vzorkách fermentovaných kapustových štiav s 2 % prídavkom prebiotického preparátu Fructafit. Metódou HPLC bol stanovený obsah fruktózy pred a po enzýmovej hydrolýze a to na začiatku (0h) a na konci (168 h) fermentačného procesu. Bolo zistené, že počas fermentačného procesu nedochádzalo k poklesu obsahu inulínového preparátu.

Pri sledovaní vplyvu enzýmového preparátu Lactozym bolo zistené, že daný preparát počas nami stanoveného časového intervalu (0 až 90 min.) a vo zvolených pH prostrediach nie je schopný hydrolyzovať inulínový preparát, čo sa potvrdilo pri zisťovaní obsahu fruktózy metódou HPLC. Jej obsah sa v priebehu reakcie nemenil. Z toho vyplýva, že daný enzým v nami sledovaných podmienkach nie je vhodný na stanovenie inulínu.

## ZÁVER

Vzhľadom na zloženie inulínových preparátov, predovšetkým z hľadiska zastúpenia oligosacharidov

**Obrázok 1.** Hydrolýza inulínového prípravku enzýmovým preparátom FRUCTOZYME L



rôznej dĺžky, je problematické nájsť univerzálnu metódu jeho stanovenia. Preto bol inulín stanovený nepriamo ako množstvo uvoľnenej fruktózy po enzýmovej hydrolýze preparátom inulinázy Fructozyme L.. Enzým pôsobil rovnako v roztokoch s rôznym pH, ako aj vo vzorkách fermentovaných štiav, z čoho vyplýva, že HPLC stanovenie je možné vykonať priamo v reálnych vzorkách pripravených štiav, bez predchádzajúcej izolácie inulínovej zložky zo vzoriek.

## LITERATÚRA

ROBERFROID, B. M., 2002. Functional Foods: concept and applications to inulin and oligofructose. *British Journal of Nutrition*, 2, 2002, 87, s. 139 – 143.

FRANCK, A., 2002. Technological functionality of inulin and oligofructose. *British Journal of Nutrition*, 87, 2002, 2, s. 287 – 291.

ROBERFROID, M. B., SLAVIN, J., 2000. Nondigestible oligosaccharides. *Critical review in Food Science and Nutrition*, 40, 2000, s. 461 – 480.

ANDERSEN, A., SORENSEN, A., 1999. An enzymatic method for the determination of fructans in foods and food products. *European Food Research and Technology*, 210, 1999, s. 148 – 152.

GARBELOTTI, M. R., PINATTI MARSIGLIA, D. A., TORRES, A. F. S., 2003. Determination and validation of dietary fibre in food by the enzymic gravimetric method. *Food Chemistry*, 83, 2003, s. 469 – 473.

VENDRELL-PASCUAS, S., CASTELLOTE-BARGALLÓ, A. I., LÓPEZ-SABATER, M. C. 2000. Determination of inulin in meat products by high-performance liquid chromatography with refractive index detection. *Journal of Chromatography A*, 881, 2000, s. 591 – 597.

SUGITA, O., TOMIYAMA, Y., 1995. A new enzymatic method for the determination of inulin. *Annals of Clinical Biochemistry*, 32, 1995, 6, s. 561 – 565.

MARSILIO, R., NATURALE, M., MANGHI, P., MONTINI, G., MURER, L., ROS, M., BISOGNO, G., ABDRETTA, B., DUSSINI, N., GIORDANO, G., ZACCHELLO, G., DALL'AMICO, R., 2000. Rapid and simple determination of inulin in biological fluid sny high-performance liquid chromatography with light-scattering detection. *Journal of Chromatography B*, 744, 2000, s. 241 – 247.

**Pod'akovanie:** Táto práca bola podporovaná Agentúrou na podporu výskumu a vývoja na základe Zmluvy č. APVV-0310-06 a APVV-0158-07 a grantom VEGA 1/0570/08.

## Kontaktná adresa:

Ing. Ivana Šimonová, doc., Ing. Jolana Karovičová, PhD, Ing. Zlatica Kohajdová, PhD., Ing. Vladimír Mastihuba, PhD\*. STU, FCHPT, Ústav biotechnológie a potravinárstva, Oddelenie potravinárskej technológie, Radlinského 9, 812 37 Bratislava, \*Chemický ústav SAV, Dúbravská cesta 9, 845 38 Bratislava, e - mail: ivana.simonova@stuba.sk

**KYSLOMLIEČNE KULTÚRY  
S PROTEKTÍVNIMI VLASTNOSŤAMI  
AKO PROSTRIEDOK NA ZVÝŠENIE  
ZDRAVOTNEJ BEZPEČNOSTI  
SYROV**

**LACTIC ACID CULTURES WITH  
PROTECTIVE PROPERTIES AS A  
TOOL FOR HEALTH SAFETY  
ENHANCE IN CHEESES**

Marcela Kontová, Miroslav Kološta, Mária Greifová, Gabriel Greif, Martin Tomáška

**ABSTRACT**

V laboratórnych, poloprevádzkových i pokusných prevádzkových výrobách sme sledovali účinok kultúr laktobacilov (*Lactobacillus rhamnosus* LC 705 a *Lactobacillus plantarum* ALC01), ako prídavných kultúr ku zmesi viacerých druhov laktokokových kultúr bežne používaných v praxi, na celkový prebeh prekysávania a zrenia syrov Eidamská tehla. Zistili sme vplyv prídavných kultúr na zlepšenie prekysávania syrov po výrobe, ale hlavne na priebeh proteolýzy syrov a na celkovú kvalitu syrov počas šiestich mesiacov zrenia. Medzi najobávanejšie vady syrov patrí vada tzv. neskoré nadúvanie syrov zapríčinené výskytom sporulujúcich anaeróbov v mlieku, ktoré majú na syry nepriaznivý vplyv na chuť a vôňu syrov. V práci sme sledovaním in vitro zistili i priaznivý inhibičný účinok laktobacilových kultúr voči vyizolovanej zmesi sporulujúcich anaeróbov z nadutých syrov.

**Keywords:** *Lactobacillus*, syr, bezpečnosť antimikrobiálny účinok, antifungálny účinok

**ÚVOD**

Zistenie a potvrdenie tvorby antimikrobiálnych metabolitov produkovaných kyslomliečnymi baktériami viacerými laboratórnymi prácami (Plocková et al., 2001; Holo et al., 2001) sú dobrým predpokladom pre zaistenie zvýšenej zdravotnej bezpečnosti potravín. Pri našich sledovaniach (Kontová et al., 2004) sa taktiež potvrdil antimikrobiálny a antifungálny účinok u troch testovaných kmeňoch laktobacilov (*L. plantarum* ALC 01, *L. rhamnosus* LC 705 a *L. rhamnosus* VT1) voči viacerým indikátorovým zbierkovým alebo izolovaným druhom a kmeňom mikroorganizmov a to: *Listeria* sp. (bolo sledovaných 22 kmeňov, z toho 12 kmeňov *Listeria monocytogenes*) *Bacillus cereus* – vyizolovaný z mlieka, *Pseudomonas fluorescens* CCM 2826, *Staphylococcus aureus* CCM 3953, *Enterobacter aerogenes* CCM 2531, *Enterococcus faecium* Milcom 106/02, kvasinka *Aureobasidium pullulans*-vyizolovaná zo syrov. Okrem zistenia antimikrobiálneho a antifungálneho účinku laktobacilov je pre výrobu syrov dôležité overenie ich technologickej vhodnosti a vplyvu na zmenu senzorických vlastností syrov.

Cieľom práce bolo:

Navrhnuť spôsob purifikácie bezbunečného supernatantu, získaného zo živých kultúr kmeňov *Lactobacillus rhamnosus* LC 705, *Lactobacillus rhamnosus* VT1 a *Lactobacillus plantarum* ALC01 a sledovať jeho inhibičný účinok na zmes sporulujúcich anaeróbov.

Overiť kysiaciu aktivitu jednotlivých i kombinovaných druhov kultúr.

Porovnať proteolytické zmeny pri vzájomnej kombinácii kultúr v modelových poloprevádzkových a prevádzkových podmienkach.

Sledovať zmeny senzorického profilu syrov vyrobených s doplnkovými laktobacilovými kultúrami.

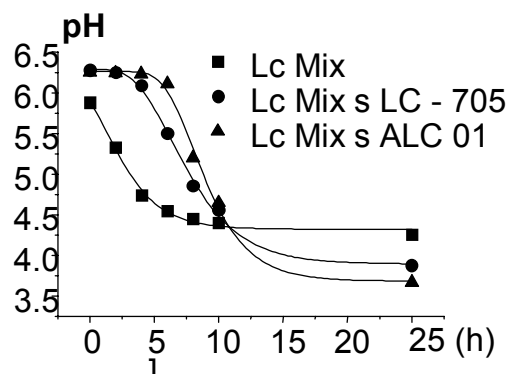
**MATERIÁL A METÓDY**

Kyslomliečne kultúry

Štartovacie druhy kultúr, ktoré sa používajú pri výrobe eidamských druhov syrov:

LC Mix a DL Mix – výrobca Danisco cultor, Dánsko, MT 53 – dodávateľ Skar, SR (kultúra z Austrálie). Doplnkové druhy kultúr: *L. plantarum* ALC 01, *L. rhamnosus* LC 705

**Obrázok 2.** Krivky aktívnej kyslosti (pH) v kombinácii s kultúrou Lc Mix



– výrobca Danisco cultor, Dánsko.

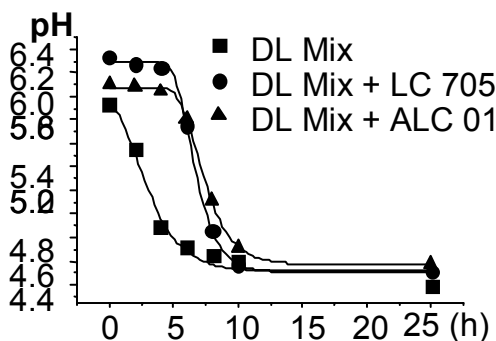
Sporulujúce anaeróby a príprava ich inokula

Zmes sporulujúcich anaeróbov bola izolovaná z kontaminovaného syra Primátor (výrazne nadutý syr) po dvoch mesiacoch zrenia; zmes nebola identifikovaná, iba mikroskopicky sledovaná po každom pomnožení v agare s glukózou za anaeróbných podmienok. Na prípravu suspenzie vyšetřovaných sporulujúcich anaeróbov pre inokuláciu s aplikáciou antimikrobiálneho supernatantu sa použila KTJ po 5 dňovom raste s 10 ml sterilného fyziologického roztoku.

Príprava supernatantov z KMB

Postup prípravy supernatantu: 1 000 ml MRS bujónu na

**Obrázok 3.** Krivka aktívnej kyslosti (pH) v kombinácii s kultúrou DL Mix



konci exponenciálnej fázy rastu pri inokulácii 2 % v/v, ktorý bol upravený (centrifugáciou 4800 g, na pH-hodnotu 6,5, odstránením buniek filtráciou cez membránový filter-0,22 µm). Z bezbunkového filtrátu sa pomocou síranu amonného (40 % saturácia) vyzrážala jemná zrazenina, ktorá po odstredení bola rozpustená vo fosfátovom tlmivom roztoku. Aktivita získaného bezbunečného supernatantu bola sledovaná pred a po aplikácii na viacerých kolónach (karboxymetyl celulóza, Sephadex G-50 a Amberlite XAD-16) z jednotlivých frakcií eluovaním s 1 M NaCl.

Determinácia inhibičného efektu

Aktivita jednotlivých frakcií supernatantu získaného z

difúznou metódou, naproti tomu kmene LC 705 a ALC01 preukázali pomerne značný inhibičný efekt supernatantu ešte pred purifikáciou na kolónach.

Súčasne s mikrobiologickým vyšetrovaním rastu sa sledovala kysacia schopnosť jednotlivých druhov kultúr. Dosiahli sa zaujímavé rozdielne výsledky, ktoré sú znázornené na obrázkoch 1-3.

Ako zo znázornenia vyplýva, priebeh prekysávania je značne odlišný pri jednotlivých kombináciách štartovacích a doplnkových kultúr. Pri kombinácii štartovacích kultúr Lc Mix i DL Mix prekysávanie s doplnkovými kultúrami bolo zo začiatku pomalšie ako pri samotnej štartovacej kultúre, po 24-hodinovej kultivácii sa zistili rozdiely; kým

**Tabuľka 1.** Stanovenie kyseliny glutamínovej v syroch z pokusných modelových a prevádzkových výroby po rôznej dobe zrenia syrov

Aplikovaná kultúra	Obsah kyseliny glutamínovej (KGA) v g.kg <sup>-1</sup>					
	Modelové pokusné výroby			Prevádzkové pokusné výroby		
	po 7 dňoch	po 14 dňoch	po 21 dňoch	po 7 dňoch	po 1 mesiaci	po 4 mesiac.
MT 53	3,160	3,401	3,696	2,968	8,875	9,508
MT 53+LC	3,213	3,621	4,283	-	-	-
DL Mix	3,748	4,294	4,647	4,700	10,889	12,078
DL Mix+LC	3,773	4,761	4,911	4,037	19,204	21,046
Lc Mix	3,266	4,183	4,100	3,872	9,888	10,508
Lc Mix+LC	3,480	4,258	4,217	3,871	10,983	22,083

kultúr KMB na inhibíciu zmesi sporulujúcich anaeróbov sa sledovala difúznym testom (Kontová et al., 2004). Počas kultivácie sa sledoval ich rast, podiel vyjasnených zón a farebné zmeny.

Aplikácia kyslomliečnych kultúr

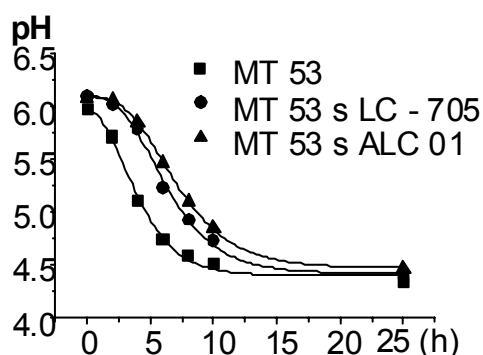
laboratórne sledovanie potenciálu rastu a aktívnej kyslosti za optimálnych podmienok – kultiváciou v sterilnom plnotučnom mlieku po 2, 4, 6, 10 a 24 hodinovej kultivácie pri teplote 37°C pri samotnej štartovacej kultúre bola vstupná koncentrácia 10<sup>8</sup> KTJ.ml<sup>-1</sup> a pri kombinácii štartovacej a doplnkovej kultúre boli počty 10<sup>6</sup> KTJ.ml<sup>-1</sup> a 10<sup>4</sup> KTJ.ml<sup>-1</sup> po druhom preočkovaní z lyofilizovanej formy.

poloprevádzkové a prevádzkové pokusné výroby – použitie lyofilizovaných kultúr po hodinovej rehydratácii v doporučených dávkach výrobcom kultúr, pričom pri kombinácii kultúr bola štartovacia kultúra nahradená 1/3 doplnkovou kultúrou.

### VÝSLEDKY A DISKUSIA

Pozoruhodné výsledky v sledovaní inhibičného efektu sa zistili u supernatantov na vyzisovanú zmes sporulujúcich anaeróbov; kmeň VTI nepreukázal inhibičný efekt

**Obrázok 1.** Krivky aktívnej kyslosti (pH) v kombinácii s kultúrou MT 53



konečné kyslosti v kombinácii s DL Mix sa vyrovnali, samotná kultúra Lc Mix dosiahla nižšiu kyslosť. Pri sledovaní kyslosti u samotnej štartovacej kultúry MT 53 sa dosiahli na začiatku hodnoty o niečo vyššie ako pri kombinácii s doplnkovými kultúrami, ale po 25 hodinách sa opäť vyrovnali.

Na základe týchto výsledkov môžeme predpokladať, že prídavok doplnkových kultúr môže byť i nižší (eidamské typy syrov patria medzi mierne nakyslé syry); počiatočné dobré prekysávanie však môže výrazne ovplyvniť a usmerniť celkový priebeh ďalšieho zrenia dobrým štartovacím začiatkom.

Proteolýza je jednou z majoritných výsledkov biochemických reakcií, ktoré prebiehajú počas zrenia syrov, kedy dochádza k štiepeniu p-kazeínu. Produktom proteolýzy sú peptidy o rôznej molekulovej dĺžke a tvorba aminokyselín. Primárnou proteolýzou vznikajú dlhé vo vode nerozpustné peptidy a krátke vo vode rozpustné peptidy. V našej práci sme pre porovnanie proteolytických zmien u syrov z modelových poloprevádzkových i prevádzkových výroby zvolili OPA-metódu; zistené hodnoty syrov po rôznej dobe zrenia v prepočte na kyselinu glutamínovú (KGA) sú uvedené v tabuľke č.1.

Zistenými výsledkami sa potvrdilo, že proteolytické zmeny narastajú v priebehu zrenia a to najviac v prvých týždňoch. Výraznejšie hodnoty sa zistili u syrov vyrobených s doplnkovými kultúrami laktobacilov, čo pravdepodobne môže súvisieť s vyššou tvorbou proteolytických enzýmov laktobacilmi. Čím hodnota KGA bola vyššia, tým i hĺbka proteolýzy bola vyššia. Ako Ginziger et al., (2000) uvádza, pri sledovaní ementálskych typov syrov, existuje vzťah medzi hodnotou OPA a trvanlivosťou, pričom najviac trvanlivé syry boli tie, u ktorých sa zistili hodnoty do 20,0 kg<sup>-1</sup>KGA, pri vyššej hodnote KGA sa u syrov prejavovali chyby v konzistencii a tvorbou trhlín. Pri našom sledovaní sme vznik trhlín

u sledovaných syrov do 4-och mesiacoch zrenia nepozorovali.

Komisionálnym bodovým senzoričným hodnotením syrov v stanovených charakteristikách (vôňa, chuť, konzistencia) boli zistené podstatnejšie rozdiely až po dlhšej dobe zrenia. U syrov z modelových poloprevádzkových výrobov po 21 dňoch zrenia boli minimálne rozdiely v chuti a konzistencii. O niečo výraznejšie rozdiely boli pozorované u syrov z prevádzkových výrobov po 1 mesiaci zrenia, ale značná rozdielnosť sa prejavila u syrov po 4-och mesiacoch zrenia a to predovšetkým v konzistencii a chuti; syry vyrobené s doplnkovými kultúrami mali mäkšiu a elastickejšiu konzistenciu a plnšiu syrovú chuť. Uvedené rozdiely v organoleptických vlastnostiach neboli neprijateľné, ale naopak prispeli k celkovej lepšej kvalite eidamských druhov syrov.

### ZÁVER

V práci sa overovalo použitie doterajších (MT 53) i nových mezofilných kultúr (Lc-MIX a DL-MIX) v kombinácii s doplnkovými kultúrami (*L. rhamnosus* LC 705 a *L. plantarum* ALC 01) s protektívnymi vlastnosťami, ktoré sa zatiaľ pri výrobe syrov neaplikujú. Pri overovaní vybratých kultúr sa v laboratórnych, poloprevádzkových i prevádzkových výroboch potvrdil ich priaznivý vplyv na prekysávanie syrov, dosiahlo sa zlepšenie organoleptických vlastností syrov po ich zrení hlavne mäkšia a elastickejšia konzistencia a plnšia chuť oproti kontrolných syrom (bez aplikácie doplnkových kultúr),

čím sa dosiahlo zlepšenie celkovej kvality polotvrdých syrov eidamského typu.

### LITERATÚRA

- GINZINGER, W., Syrotech 2000, Zborník prednášok, Žilina, 43-46 s., 2000.
- HOLO HELGA, JEKNIC, Z. DAESCHEL, M., STEVANOVIC, S., NES, I. F., 2001. *Microbiology*, 147, 643-646, 2001.
- KONTOVÁ, M., GREIFOVÁ, M., GREIF, G., VOLLEK, V., 2004. Hygiena Alimentorum XXV, Zborník prednášok a posterov, Štrbské Pleso – Vysoké Tatry, 134-135, 2004.
- KONTOVÁ, M., GREIFOVÁ, M., GREIF, G., KOHAJDOVÁ, Z., 2004. *Chem. Listy*, 98 (8), 689, 2004.
- KONTOVÁ, M., GREIFOVÁ, M., KOHAJDOVÁ, Z., SLOTTOVÁ, A., 2004. Výživa a potraviny pre tretie tisícročie, Zborník prednášok a posterov, Nitra, 74-78 s., 2004.
- PLOCKOVÁ, M., STILES, J., CHUMCHALOVÁ, J., HALFAROVÁ, R., 2001. *Czech J. Food Sci.*, 19, 46-49, 2001.
- TSCHAGER, E., 1990. *Milchwirtschaftliche Berichte*, 105, 204-207, 1990.

Práca bola podporená grantom APVV 0158-07.

**Kontaktná adresa:** Ing. Marcela Kontová, CSc., Výskumný ústav mliekarenský, a.s.; Dlhá ul.95, 010 01 Žilina, e-mail: mar.kont@post.sk.

## STANOVENIE ODOLNOSTI BAKTERIÁLNYCH BUNIEK VIAZANÝCH V BIOFILME VOČI DEZINFECTANTOM S VYUŽITÍM OVERENÝCH INŠTRUMENTÁLNYCH METÓD

## DETERMINATION OF DISINFECTANT RESISTANCE OF BIOFILM FORMED BACTERIA BY AUTHENTIC INSTRUMENTAL METHODS

Janka Koreňová

### ABSTRACT

Disinfectants on the basis of chlor, quarternary ammonium compounds, active oxygen, aldehyds were tested against bacteria in biofilm. Crystal violet assay and fluorescein diacetate assay were used for quantification of biofilm. Disinfectants on the basis of quarternary ammonium compounds, resp. active oxygen, were found more effective against G<sup>+</sup>, resp. G<sup>-</sup> bacteria in biofilm.

**Keywords:** biofilm, *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, disinfectant

### ÚVOD

Malé a stredné potravinárske podniky spracovávajúce živočíšne produkty tvoria významnú časť hospodárstva vo

všetkých krajinách s rozvinutou trhovou ekonomikou. Aj preto je opodstatnená snaha sledovať dodržiavanie a účinnosť opatrení na zabezpečenie hygienického prostredia výroby v týchto prevádzkach (Agel, 2007, Godič-Torkar, 2004).

Samotné výrobné zariadenia sú rizikové, ako potenciálny zdroj mikrobiologickej kontaminácie, najmä z hľadiska schopnosti niektorých baktérií tvoriť biofilm na ich povrchu. Biofilm sa formuje na tuhých povrchoch ako komplex mikroorganizmov produkujúcich exkrementy polysacharidickej a glykoproteínovej povahy, ktoré majú pre mikroorganizmy ochrannú a adhéznú funkciu. Ochranná funkcia biofilmu spočíva v bariére proti dezinfektantom (Carpentier, 1993, Ammor, 2004, Wirtanen, 2005, Bagge, 2004). V príspevku sa uvádzajú výsledky aplikácie inštrumentálnych metód na skúšanie účinnosti dezinfekčných prostriedkov voči baktériám v biofilme ako rýchlejšej alternatívy kultivačných metód.

### MATERIÁL A METÓDY

Bakteriálne kmene boli vybrané zo skupín G<sup>+</sup> a G<sup>-</sup> baktérií izolovaných z výrobných zariadení mäsiarskych a ovčiarskych MSP, prípadne zakúpených v Českej zbierke mikroorganizmov (CCM), podľa kritéria slabej a silnej tvorby biofilmu *Staphylococcus aureus* 4/3, *Staphylococcus aureus* CCM 2022, *Staphylococcus saprophyticus* 10/1, *Staphylococcus saprophyticus* 12/17, *Staphylococcus saprophyticus* 17/5, *Staphylococcus saprophyticus* 18/2, *Pseudomonas aeruginosa* 2/13, *Pseudomonas aeruginosa* CCM 1961.

Ako vzorky tuhého materiálu boli použité 96-jamkové mikrotitračné platničky z priehľadného polystyrénu (Sarstedt), alebo z bieleho polystyrénu (Nunc). Po

## Potravinárstvo

nanesení bakteriálnej suspenzie prebiehala tvorba biofilmu pri teplote 37 °C alebo 20 °C po dobu 18 - 24 hodín.

Výber skúšaných dezinfekčných prostriedkov (DP) bol urobený podľa frekvencie použitia v dotazovaných výrobných spracujúcich živočíšne produkty a na základe odlišnosti účinných zložiek. Boli vybrané po dva DP so štyrmi rôznymi účinnými zložkami označené ako Chlór I., II., kvartérna amóniová zlúčenina (KAZ) I., II, Aktívny kyslík I., II, Aldehyd I, II.

K biofilmu na tuhom nosiči bolo pridané 100 µl skúšaného dezinfekčného prostriedku (DP). Ako pozitívna kontrola boli merané jamky, na ktoré bolo aplikované 100µl sterilnej vody. Laboratórna teplota aplikácie, základná doba pôsobenia a koncentrácia použitých DP bola určená podľa odporúčaní výrobcu, resp. aplikovaná v 3-násobku.

Pre kvantifikáciu biomasy biofilmu po aplikácii DP sa použila metóda farbenia s kryštálovou violeťou a pre kvantifikáciu množstva živých buniek v biofilme po aplikácii DP bola použitá fluorescenčná metóda.

### VÝSLEDKY A DISKUSIA

Po tvorbe biofilmu prebiehajúcej pri 37°C boli zo skúšaných kmeňov v biofilme devitalizované po 10 min.

pôsobenia DP KAZ I., všetky kmene skúšaných stafylokokov, rovnako ich devitalizoval DP KAZ II., ale až po 30 min. pôsobenia (tab. 4). Podobná účinnosť týchto dvoch DP na báze KAZ na stafylokoky bola zaznamenaná aj po tvorbe biofilmu pri 20°C, keď prípravok KAZ II. bol účinný až po 3-násobnom zvýšení odporúčanej koncentrácie (tab. 6). Selektívny účinok KAZ prípravkov na G<sup>+</sup> kmene baktérií je známy, potvrdený aj vo vedeckých prácach (Lebert, 2007).

Prípravok Aktívny kyslík I. devitalizuje bunky G<sup>+</sup> baktérií až po 30 min pôsobenia okrem jedného kmeňa *Staph. aureus* (tab. 5).

Na G<sup>-</sup> bakteriálne kmene zastúpené baktériami *Ps. aeruginosa*, po tvorbe biofilmu pri teplote 37°C, ktorá menej podporuje tvorbu biofilmu u týchto kmeňov, bol zaznamenaný devitalizačný účinok DP. Aktívny kyslík I. a Aldehyd II. už po 10 min pôsobenia a tiež približne 70% redukcia živých buniek po aplikácii DP Aktívny kyslík II. Tento prípravok ako jediný bol schopný odstraňovať aj celkovú biomasu biofilmu u pseudomonád na 22 - 9% (tabuľka 5).

Po tvorbe biofilmu skúšaných G<sup>+</sup> a G<sup>-</sup> kmeňov baktérií pri 20°C, bola zaznamenaná najlepšia devitalizácia buniek stafylokokov po aplikácii prípravku KAZ I., a KAZ II.

**Tabuľka 4 a 5:** Účinnosť dezinfekčných prostriedkov na báze kvartérnych amóniových zlúčenín (KAZ), chlóru aktívneho kyslíka a aldehydu na potravinárske G<sup>+</sup> a G<sup>-</sup> bakteriálne kontaminanty tvoriace biofilm na polystyrénovom nosiči počas 18 - 24 h pri teplote 37°C.

Biofilm	KAZ I. 0,5%				KAZ II. 2%				Chlór I. 1%				Chlór II. 1%			
	10 min.		30 min.		10 min.		30 min.		10 min.		30 min.		10 min.		30 min.	
	CV	fda	CV	fda	CV	fda	CV	fda	CV	fda	CV	fda	CV	fda	CV	fda
S.aureus 4/3	97	0	3	4	100	3	>100	0	>100	0	>100	13	>100	6	>100	0
S.aureus 2022	>100	14	61	16	>100	28	>100	2	>100	33	>100	3	>100	40	>100	27
S.saproph. 10/1	82	5	65	10	98	9	87	1	63	47	68	7	84	54	88	49
S.saproph. 12/17	58	2	69	14	63	0	>100	0	>100	0	>100	11	>100	6	>100	0
S.saproph. 17/5	-	0	-	44	100	25	>100	0	62	1	53	4	>100	0	68	0
S.saproph. 18/2	73	2	66	4	>100	20	>100	3	55	36	67	7	75	10	65	12
Ps.aerug. 1961	75	44	40	64	80	46	>100	21	>100	32	>100	25	>100	38	>100	>100
Ps.aerug. 2/13	72	75	90	80	100	55	96	0	>100	0	82	0	51	34	36	83

Biofilm	Aktívny kyslík I. 1%				Aktívny kyslík II. 1%				Aldehyd I. 1%				Aldehyd II. 0,5%			
	10 min.		30 min.		10 min.		30 min.		10 min.		30 min.		10 min.		30 min.	
	CV	fda	CV	fda	CV	fda	CV	fda	CV	fda	CV	fda	CV	fda	CV	fda
S.aureus 4/3	>100	15	-	0	0	10	32	-	>100	2	>100	51	>100	1	>100	0
S.aureus 2022	>100	47	>100	41	97	80	>100	-	>100	63	>100	83	>100	49	>100	48
S.saproph. 10/1	>100	22	>100	12	63	56	>100	33	>100	2	>100	11	71	25	>100	21
S.saproph. 12/17	>100	5	-	0	>100	44	>100	-	>100	30	>100	8	>100	3	>100	0
S.saproph. 17/5	>100	8	>100	0	45	31	>100	-	>100	9	>100	10	>100	34	89	77
S.saproph. 18/2	>100	8	>100	4	44	54	>100	>100	>100	3	>100	9	>100	2	79	0
Ps.aerug. 1961	>100	0	>100	0	22	37	13	28	89	21	97	17	34	2	53	3
Ps.aerug. 2/13	97	0	>100	0	9	25	16	29	>100	100	>100	>100	>100	0	>100	0

Dezinfekčné prostriedky boli aplikované vo výrobcom odporúčanej koncentrácii počas 10 a 30 min. pôsobenia pri laboratórnej teplote.

## Potravinárstvo

(tabuľka 6), Aktívny kyslík I. (tabuľka 7) v oboch skúšaných koncentráciách a prípravkov Chlór I. a Aldehyd II. po 3-násobnom zvýšení odporúčanej koncentrácie (tab. 6, 7). Prípravok KAZ I. vo zvýšenej koncentrácii 1,5% odstraňoval aj biomasu biofilmu stafylokokov na 48 - 20% pôvodnej biomasy. (tab. 6). Kmene pseudomonád, ktoré pri 20°C tvoria mohutnejší biofilm, boli znova devitalizované prípravkom Aktívny kyslík I. v oboch koncentráciách, avšak odstránenie biomasy biofilmu bolo zaznamenané pôsobením DP Aktívny kyslík II. len na 60 - 39% (tab. 7).

Testovanie DP na odstraňovanie biomasy biofilmov kvantifikované metódou s kryštálovou violeťou preukázalo ich nedostatočný účinok. Dokonca hodnoty absorbancie po farbení s kryštálovou violeťou dosahovali hodnoty > 100% oproti pôvodnému biofilmu, čo môže byť spôsobené reakciou DP so zbytkami organickej hmoty a ich koaguláciu, čo sa prejavuje ako nárast organickej biomasy (Kvasničková, 1991).

Fluorescenčná metóda nepriameho dôkazu živých buniek v biofilme a metóda farbenia organických živých aj neživých štruktúr biofilmu s kryštálovou violeťou boli potvrdené, ako vhodné rýchle, lacné a menej pracné alternatívy kultivačných metód kvantifikácie biofilmu (Koreňová, 2008).

### ZÁVER

Baktericídny účinok skúšaných dezinfekčných prostriedkov sa zvyšuje skôr so zvýšením aplikovanej koncentrácie DP, ako s predlžovaním času pôsobenia.

**Tabuľka 6 a 7:** Účinnosť dezinfekčných prostriedkov (DP) na báze kvartérnych amóniových zlúčenín (KAZ), chlóru, aktívneho kyslíka a aldehydu na potravinárske G<sup>+</sup> a G<sup>-</sup> bakteriálne kontaminanty tvoriace biofilm na polystyrénovom nosiči počas 18 - 24 h pri teplote 20°C.

DP		KAZ I.				KAZ II.				Chlór I.			
		0,5%		1,5%		2%		6%		1%		3%	
Koncentrácia DP		CV	fda	CV	fda	CV	fda	CV	fda	CV	fda	CV	fda
G <sup>+</sup>	S.aureus 4/3	79	2	20	0	98	4	>100	26	>100	0	>100	0
	S.saproph. 10/1	87	8	30	0	87	9	>100	2	74	39	88	0
	S.saproph. 12/17	62	10	48	0	54	2	>100	0	>100	12	>100	0
	S.saproph. 18/2	75	6	45	0	>100	13	>100	0	60	40	84	0
G <sup>-</sup>	Ps.aerug. 1961	68	54	26	41	80	42	72	43	>100	29	76	69
	Ps.aerug. 2/13	72	78	51	43	>100	48	51	41	>100	2	62	51

DP		Aktívny kyslík I.				Aktívny kyslík II.				Aldehyd II.			
		0,5%		1,5%		2%		6%		1%		3%	
Koncentrácia DP		CV	fda	CV	fda	CV	fda	CV	fda	CV	fda	CV	fda
G <sup>+</sup>	S.aureus 4/3	>100	20	-	0	2	12	-	4	>100	12	-	0
	S.saproph. 10/1	>100	15	>100	0	58	65	>100	37	71	20	>100	9
	S.saproph. 12/17	>100	10	>100	0	>100	47	>100	55	>100	10	93	0
	S.saproph. 18/2	>100	6	91	0	56	42	72	61	>100	3	92	2
G <sup>-</sup>	Ps.aerug. 1961	84	12	100	3	31	80	39	61	46	60	65	59
	Ps.aerug. 2/13	83	0	78	0	60	81	57	62	100	35	72	33

Účinnosť je vyjadrená v % zostatku pôvodnej biomasy biofilmu meranom ako absorbancia po farbení s kryštálovou violeťou (CV), resp. v % zostatku živých buniek v biofilme meranom metódou s fluoresceíndiacetátom (fda).

Dezinfekčné prostriedky boli aplikované vo výrobcom odporúčanej koncentrácii a v jej 3-násobnom zvýšení počas 10 min. pôsobenia pri laboratórnej teplote.



GRAM, L., 2001. *Shewanella putrefaciens* adhesion and biofilm formation on food processing surfaces. *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 2001, s. 2319-2325.

CARPENTIER, B., CERF, O. 1993. Biofilms and their consequences, with particular reference to hygiene in the food industry. A Review. *Journal of Applied Bacteriology* 1993, 75, 499 – 511.

GODIČ TORKAR, K., GOLC TEGER, S., 2004. The microbial quality of some critical control points in the cheese production of individual Slovenian cheese-makers. *Acta Agriculturae Slovenica*, 84 (december 2004)1, 43-61

KOREŇOVÁ, J., LOPAŠOVSKÁ, J., KUČHTA, T., 2008. Comparison of three microtitre plate-based methods for quantification of biofilm formation ability of bacteria contaminating food technologies. *Journal of Food and Nutrition Research*, 47, 2008, pp. 100-104.

KVASNIČKOVÁ, A., 1991. Hygiena a sanitace v potravinářském průmyslu. VÚPP Praha, 1991.

LEBERT, I., LEROY, S., TALON, R., 2007. Effect of industrial and natural biocides on spoilage, pathogenic and technological strains grown in biofilm. *Food Microbiology*, 24, 2007, 281-287.

WIRTANEN, G., SALO, S., 2005. Biofilm risks. In: Handbook of hygiene control in the food industry. Lelieveld, H.L.M., Mostert, M.A. & Holah, J. (eds.). Cambridge: Woodhead Publishing Ltd. Pp. 46.68. ISBN 1-85573-957-7.

**Kontaktná adresa:** Ing. Janka Koreňová, Výskumný ústav potravinársky Bratislava, Biocentrum, Kostolná 7, 900 01 Modra, tel.: 00421 33 690 57 21, korenova@vup.sk

## MOLD CHEESES OF ROQUEFORT TYPE; ARE THESE Dainties SAFE ENOUGH?

Roman Labuda, Michael Sulyok, Kristina Stefanikova, Martina Spodniakova

### ABSTRACT

A total of 15 fermented cheeses of Roquefort type (all representing different cheese brands) randomly purchased from different local markets in Slovakia in 2008 were analyzed for presence of mycotoxins by means of liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS/MS). This preliminary study confirmed presence of roquefortin C (100 % samples) and other toxic indole alkaloids, i.e. chanoclavine (93 %) and isofumigaclavine (80 %) produced by *Penicillium roqueforti* in the samples investigated. In one case, also presence of immunosuppressive mycophenolic acid was confirmed. Even though the results obtained in this study represent semi-quantitative estimations of the toxins levels in the cheeses, it seems obvious that the moldy cheeses of Roquefort type may represent a potential source of toxic fungal metabolites naturally contaminating them due to the metabolic activity of the internal mold used in the fermentation process, i.e. *Penicillium roqueforti*.

**Keywords:** *Penicillium roqueforti*, moldy cheeses, roquefortin C, mycotoxins

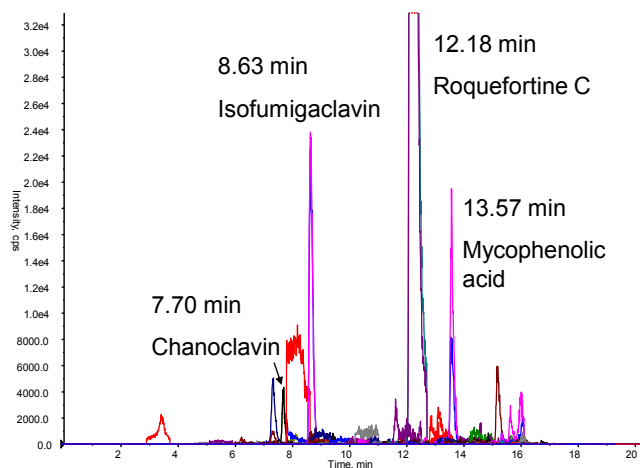
### INTRODUCTION

In most cases, eradication of the fungal infection responsible for mycotoxin production is the most reasonable method for elimination of these compounds from commercial foodstuff. However, an interesting exception to this generalization is found for example in the roquefortine family of natural products. Roquefortine C was isolated independently by researchers in Japan and France from the *Penicillium roqueforti* Thom strain. This finding was significant due to the fact that this fungus is essential for the production of Roquefort and a number of other blue-veined cheeses containing internal mold (Richard et al., 2004). Together

with isofumigaclavins (another alkaloids from *Penicillium roqueforti*), the neurotoxin roquefortine C has repeatedly been reported as a frequent natural contaminant in past (e.g. Ohmomo et al., 1977; Scott et Kennedy, 1976; Ware et al., 1980). The interest in roquefortin C is due to its frequent presence in all blue cheeses and the health implications of its existence in human products in terms of its neurotoxic properties that include paralytic symptoms (convulsive seizures) in experimental animals (Wagener et al., 1980) and in cows (Hägglom, 1990), or more recently, roquefortin C was found in the stomach contents of six dogs suffering from strychninelike poisoning (Lowe et al., 1992). However, variability of responses to different toxicity tests clearly indicates that the effects exerted were not due to the presence of a single toxin but to several substances present in variable quantities in the extracts of different strains (Shangguan et al., 2008). A nonalkaloid natural product also produced by *Penicillium roqueforti*, PR toxin, was found to possess greater toxicity (Richard et al., 2004). Above mentioned facts concerning a toxinogenic potential of the essential fungus used in the

**Figure 1** Chromatogram of cheese No. 6, revealing presence of four toxins

HPLC-ESI(+)-MS/MS chromatogram of cheese Nr. 6



production of Roquefort cheeses, and more significantly, even reported “natural contamination” of the blue chesses, logically give everyone rise a speculation about the overall safety of this product.

The main goal of this study was to bring new information about incidence of roquefortines and allied alkaloids in a randomly selected group of blue Roquefort cheeses produced and marketed in EU.

**MATERIAL AND METHODS**

**Samples**

A total of 15 blue vein cheese (Roquefort type) samples were randomly purchased from several local stores in Slovakia during a two months period, from January to February 2008. The samples represented 15 different cheese brands of a variety of origin within the EU countries. At the time of purchase to the time of analysis (extraction) they were stored at 5°C, if not processed immediately.

Extraction A portion of ca. 0.5 g was cut off from each cheese sample, in particular, from the zones vigorously covered by the blue fungus (*Penicillium roqueforti*) and placed into sterile plastic Petri dish lid and let dry overnight. After drying the sample was grinded in mortar and the resulting mass was placed into 2 ml vial and mixed with chloroform/methanol (2:1) extraction solvent.

Extraction was carried out by vigorous vortexing of the samples for approximately 3 min. After the filtration (Acrodisc® CR 4 mm Syringe Filters) the extract was dried down freely in a vacuum hood. Before the LC-MS/MS analysis the dried extracts were re-dissolved, each with 500 µl of acetonitrile/water (1/1), filtered again and transferred into HPLC vials.

**LC-MS/MS analysis**

Detection and quantification was performed with a QTrap 4000 LC/MS/MS system (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) equipped with a TurboIonSpray ESI source and a 1100 Series HPLC system (Agilent, Waldbronn, Germany). Chromatographic separation was performed at 258C on a Gemini1 C18 column, 150 x 4.6mm i.d., 5 mm particle size, equipped with a C18 4 x 3mm i.d. security guard cartridge (all from Phenomenex, Torrance, CA, USA). Mycotoxin standards were obtained from Iris Biotech (Germany), Alexis (distributed in Vienna, Austria), and Sigma-Aldrich (Germany).

**RESULTS AND DISCUSSION**

This preliminary study conducted on 15 samples revealed that blue cheeses representing different brands and origin within EU have been naturally contaminated by *Penicillium roqueforti* secondary metabolites, and the occurrence of the following four compounds was

**Table 1** “Natural contamination” of Roquefort type cheeses marketed in Slovakia in 2008

Blue cheese samples	Roquefortine C µg.kg <sup>-1</sup> (ppb)	Chanoclavine µg.kg <sup>-1</sup> (ppb)	Isofumigaclavine µg.kg <sup>-1</sup> (ppb)	Mycophenolic acid µg.kg <sup>-1</sup> (ppb)
1	1280	0,568	5,13	nd
2	346	4,25	97,5	nd
3	293	0,405	8,28	nd
4	380	0,469	3,55	nd
5	715	0,566	3,58	nd
6	974	1,89	54,8	198
7	172	0,875	16,5	nd
8	1090	0,662	nd	nd
9	307	1,73	32	nd
10	979	nd	nd	nd
11	594	nd	nd	nd
12	101	1,32	13,4	nd
13	268	3,28	90,8	nd
14	196	0,131	1,332197	nd
15	802	1,26	31,5	nd
an average	566,47	1,34	29,86	-
a range	101-1280	0,13 - 4,25	1,33 - 97,5	-
StDEV	380,02	1,21	33,9	-

nd-not detected

\* these concentrations are, however, semi-quantitative estimations as extraction efficiencies and matrix effects have not been investigated yet

confirmed. Concentrations of the natural contaminants found to range from ppb (chanoclavine, isofumigaclavine and mycophenolic acid) to ppm (roquefortin C) amounts (Table 1)\*.

First report concerning the contamination of blue cheeses by metabolites of the fermentation fungus was published more than 30 years ago. Ohmomo et al. (1975) reported the presence of low concentrations of roquefortine C in roquefort-type blue cheese. However, no information was presented concerning the exact concentrations of alkaloids in the cheese. One year later, Scott and Kennedy (1976) found roquefortine in all samples of blue cheese examined in concentrations of up to 6800  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  (ppb). Further studies confirmed the presence of roquefortine in blue cheese, and for instance Ware et al. (1980) found average roquefortine levels of 424  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  (ppb). Accordingly, an average of the roquefortin C levels (566,5 ppb) in the cheeses investigated in our study seems to be in approximately the same range as those already reported and mentioned above, providing a proof that the problem with the application of toxinogenic strains of *Penicillium roqueforti* as an internal mold for fermentation of cheeses still remains an unsolved problem. Its presence in the food regardless of relatively low concentrations (several mg per kg of cheese), a total amount of consumed blue cheeses, and the fact that there is still the lack of consistent toxicological data there (Richard et al., 2004; Shangguan et al., 2008), should not be neglected in any case.

In addition, according to Frisvad et Samson (2004), apart from the roquefortines and isofumigaclavines, the fungus *Penicillium roqueforti* is able to produce also PR toxin and mycophenolic acid. Mycophenolic acid is immunosuppressive and may thus cause secondary (indirect) mycotoxicosis and/or mycoses. In fact, in one case (cheese sample No. 6), apart from roquefortin, chanoclavine and isofumigaclavine, this immunosuppressive acid was confirmed at ppb levels (see figure 1). Another important toxin, PR toxin (not surveyed in this study, though) is claimed to be very toxic (Chang et al., 1991). Fortunately, it had been demonstrated by Scott et Kanhere (1979) that PR toxin is not stable in blue cheese.

### REFERENCES

FRISVAD, J. C., SAMSON, R. A. 2004. Polyphasic taxonomy of *Penicillium subgenus Penicillium* A guide to identification of food and air-borne terverticillate *Penicillia* and their mycotoxins. *Studies in Mycology*, 49, 2004, 1-174

HAGGBLOM, P. 1990. Isolation of roquefortine C from feed grain. *Applied and Environmental Microbiology* 56, 1990, 2924-2926.

LOWES, N.R., SMITH, R.A., BECK, B.E. 1992. Roquefortine in the stomach contents of dogs suspected of strychnine poisoning in Alberta. *The Canadian Veterinary Journal* 33, 1992 535-538.

OHMOMO, S., SATO, T., UTAGAWA, T., ABE, M. 1975. Isolation of festuclavine and three new indole alkaloids, roquefortine A, B and C from the cultures of *Penicillium roqueforti*. *Agricultural and Biological Chemistry* 39, 1975, 1333-1334.

RICHARD, D. J., SCHIAVI, B., JOULLIE, M. M. 2004. Synthetic studies of roquefortine C: Synthesis of isoroquefortine C and a heterocycle. *PNAS Chemistry* 33, 2004, 11971-11976.

SCOTT, P. M., KENNEDY, B. P. C. 1976. Analysis of blue cheese for roquefortine and other alkaloids from *Penicillium roqueforti*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 24, 1976, 865-868.

SCOTT, P. M., KANHERE, S. R. 1979. Instability of PR toxin in blue cheese. *Journal- Association of Official Analytical Chemists* 62, 1979, 141-147.

SHANGGUAN, N., HEHRE, W. J., OHLINGER, W. S. BEAVERS, M. P., JOULLIE, M. M. 2008. The total synthesis of roquefortine C and a rationale for the thermodynamic stability of isoroquefortine C over roquefortine C. *Journal of the American Chemical Society* 130, 2008, 6281-6287.

WAGENER, R. E., DAVIS, N. D., DIENER, U. L. 1980. Penitrem A and Roquefortine Production by *Penicillium commune*. *Applied and Environmental Microbiology* 39, 1980, 882-887.

WARE, G. M., THORPE, C. W., POHLAND, A. E. 1980. Determination of roquefortine in blue cheese and blue cheese dressing by high pressure liquid chromatography with ultraviolet and electrochemical detectors. *Journal-Association of Official Analytical Chemists* 63, 1980, 637-641.

CHANG, S. C., WEI, Y. H., WIE, D.L., CHBN, Y.Y., JONG, S.C. 1991. Factors affecting the production of eremofortin C and PR Toxin in *Penicillium roqueforti*. *Applied and Environmental Microbiology* 57, 1991, 2581-2585

**Contact adress:** Roman Labuda Dr. R&D-Manager, Microbiology group, BIOPURE Referenzsubstanzen GmbH, Technopark 1, 3430 Tulln, Austria,

## FULLY LABELED STABLE ISOTOPE STANDARDS OF U-[<sup>13</sup>C<sub>17</sub>]- AFLATOXINS; A NEW SOLUTION FOR MORE PRECISE LC-MS ANALYSES

Roman Labuda, Guenther Jaunecker, Martin Freudenschuss, Georg Häubl, Michael Sulyok, Georg Mitterer,

### ABSTRACT

The production and purification of fully <sup>13</sup>C isotope labeled U-[<sup>13</sup>C<sub>17</sub>]-aflatoxins B<sub>1</sub> and G<sub>1</sub> is described, and their significance as internal standards (IS) for the accurate determination of these carcinogenic substances in food and/or feeds by liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS/MS) is discussed here.

**Keywords:** aflatoxins, carcinogens, food contaminants, LC-MS/MS, mycotoxin analyses

### INTRODUCTION

The aflatoxins (produced mostly by *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*) are a family of structurally related, highly toxic, and the most potent natural carcinogens

known (Class 1; JECFA, 1997), affecting all vertebrate animal species, including humans (Dutton et al., 1985; Pildain et al., 2008; Frisvad et al., 2006). Early epidemiological studies conducted in areas with high hepatocellular carcinoma (HCC) incidence (e.g. in southern China and sub-Saharan Afrika), basically investigated the possible correlation between dietary exposure to aflatoxins and the occurrence of HCC (Galvano et al., 2005). Four compounds are commonly produced in foods, aflatoxins B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> and G<sub>2</sub> (Bennett et Klich, 2003; Frisvad et al., 2006). Their small quantities believed “not to be dangerous” are legally tolerated, and many public authorities worldwide have fixed legal limits for these carcinogenic mycotoxins in foods (Galvano et al., 2005). Within the European Union, maximum tolerable levels of aflatoxins in foodstuffs based on current valid legislation range from 0.1 to 15.0 ppb (µg.kg<sup>-1</sup>), depending on the type of food (Commission Regulation, 2006).

Since aflatoxins are undoubtedly the most frequently analyzed mycotoxins worldwide (including Europe) the importance of fast analytical methods with high accuracy and low detection limits is growing. No other technique in the area of chemical analysis developed so rapidly during the past ten years as liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS/MS) (Häubl et al., 2006). However, the accuracy of quantitative analytical methods for the determination of mycotoxins by liquid chromatography (LC)-mass spectrometry (MS) and LC-MS/MS is limited by matrix effects during the ionization process in the MS source. The differences in ionization efficiencies and hence in signal intensities between standard substances

This work describes in brief the production, purification and significance of fully <sup>13</sup>C isotope labeled U-[<sup>13</sup>C<sub>17</sub>]-aflatoxins B<sub>1</sub> and G<sub>1</sub> as internal standards (IS) for the accurate determination of aflatoxins in food and/or feeds by HPLC electrospray (ESI) MS/MS.

## MATERIAL AND METHODS

### Organism and growth conditions

The aflatoxin B<sub>1</sub> and G<sub>1</sub> - producing strain of *Aspergillus parasiticus* s. str. was grown on Czapek yeast extract agar (Frisvad et Samson, 2004) at 28°C, for 5 days, in dark. A loopfull of the spores from the 5 days-old-colony was transferred into 500 ml Erlenmeyer flasks containing 100 ml of a medium adopted from Adye et Mateles (1964) supplemented with a stable isotope labeled <sup>13</sup>C glucose (D-[U-<sup>13</sup>C<sub>6</sub>] Glucose, Cambridge Isotope Lab., CLM-1396). Cultivation was carried out at 25 °C on a gyratory shaker at 130 rpm for 6 days, in dark.

Extraction, purification and purity determination of the labeled aflatoxins B<sub>1</sub> and G<sub>1</sub>

Merged cultures (fungal mass with medium) were extracted with ethyl acetate, filtered through Celite® 545 (VWR, Austria) and evaporated under reduced pressure at 40 °C on a rotary evaporator (Büchi®, Switzerland) to dryness. Resulting residues were then re-dissolved in 20 ml methanol/acetonitrile/water (57/17/26) and centrifuged (Bachman Coulter, Allegra X-22) at 13.000 rpm for 20 min. The obtained supernatant was filtered through a glass-filter (1.2 µm size). The remaining interfering matrix compounds (impurities) were removed by preparative

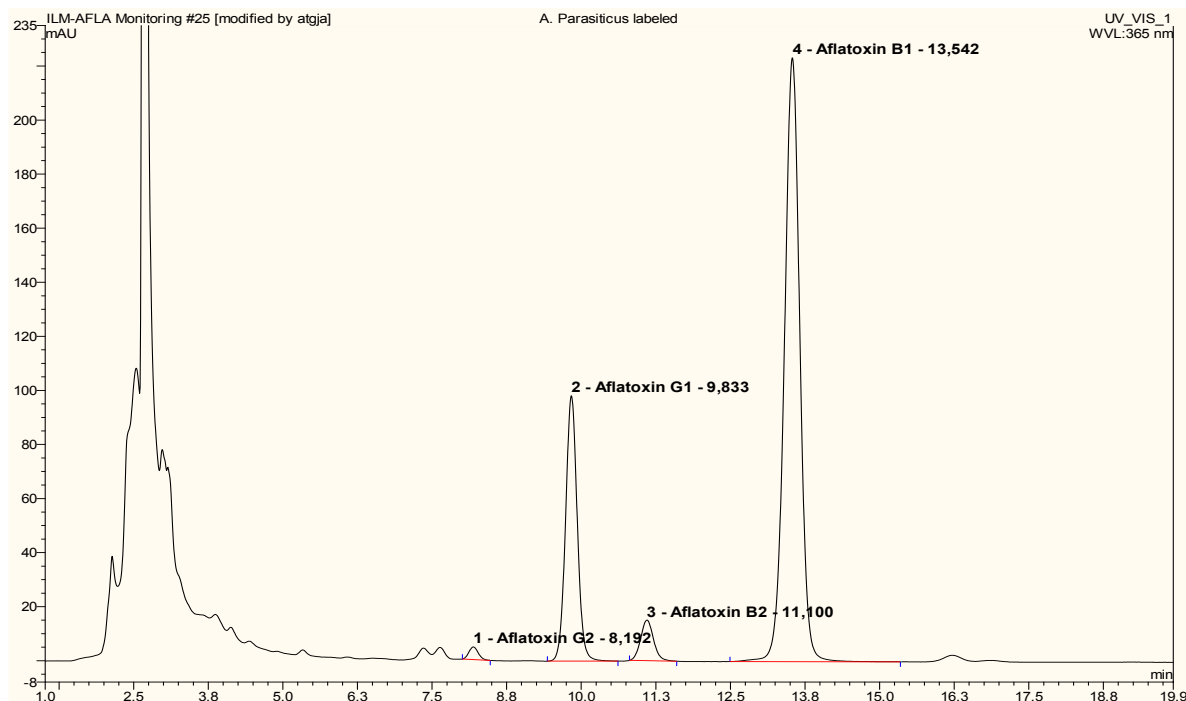
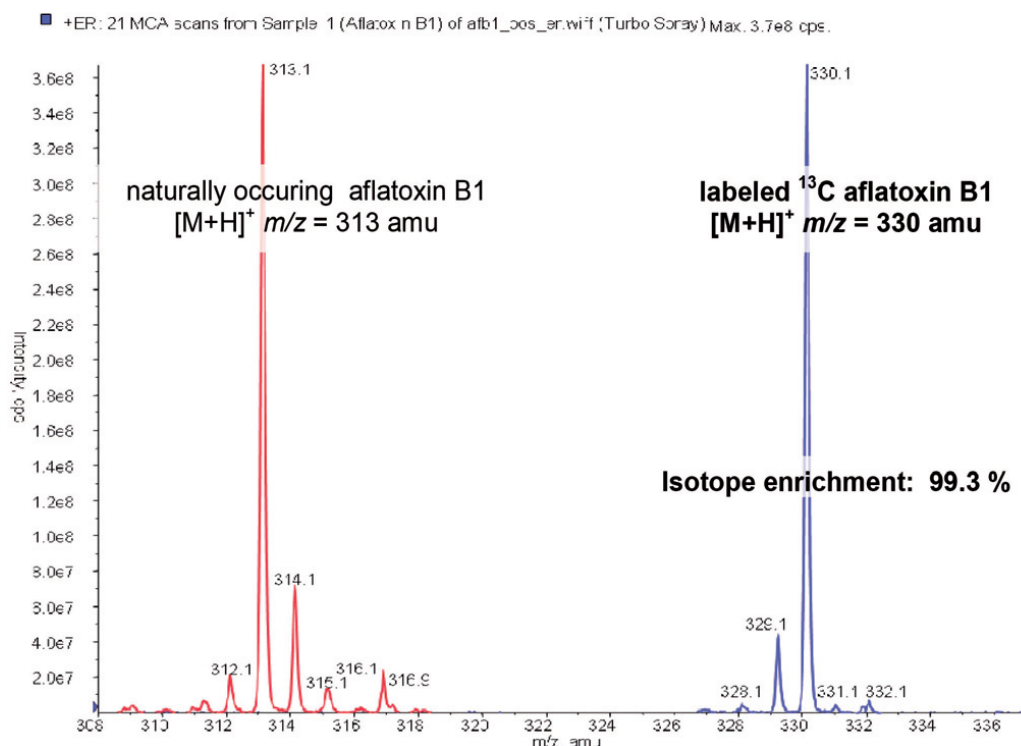


Figure 1. HPLC-UV chromatogram of U-[<sup>13</sup>C<sub>17</sub>]-aflatoxin B<sub>1</sub> and G<sub>1</sub>

and the substances influenced by interferences, e.g. from the matrix, are limiting the accuracy of LC-MS methods. Fully labeled isotope standards are best suited to correct matrix effects and to improve both the accuracy and the precision of analytical methods employing LC-MS and LC-MS/MS (Häubl et al., 2007).

liquid chromatography (Agilent HP 1100 Series Preparative Chromatography equipped with a DAD detector (Büchi®)). All fractions containing aflatoxins were mixed together and distilled to remove organic solvent and lyophilized to remove water. Determination of the isotope enrichment

**Figure 2** Comparison of the full scan spectra of the naturally occurring and fully labeled aflatoxins



The isotope enrichment of  $^{13}\text{C}$  labeled aflatoxins was calculated from the isotope pattern of the full scan mass spectra according to Häubl et al. (2006). For performing a full scan, the compound was directly injected into the Turbo Ion spray ESI ion source of the MS and recorded at positive polarity (QTrap 4000 LC-MS/MS system; Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

**RESULTS AND DISCUSSION**

A total concentration of the aflatoxins in fermentation broth after 6 day cultivation reached a production maximum of the *A. parasiticus* strain used and was determined by using HPLC as follows: U- $^{13}\text{C}_{17}$ -aflatoxin B<sub>1</sub> 5572  $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ , and U- $^{13}\text{C}_{17}$ -aflatoxin G<sub>1</sub> 2574  $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ . Their retention times ( $R_f$ ) were 13.542 and 9.833 min, respectively (Figure 1).

Note: In addition to aflatoxin G<sub>1</sub> (peak 2.) and aflatoxin B<sub>1</sub> (peak 4.), the peaks (1. and 3.) also indicate presence of the labeled aflatoxin G<sub>2</sub> and B<sub>2</sub>, respectively, yet their very low concentrations would render their further purification steps impossible

After extraction and purification steps (as mentioned in the material and methods section), purity of the aflatoxins was estimated to be higher than 98 %. The isotope enrichment of  $^{13}\text{C}$  labeled aflatoxins was found to be 99.3 atom %  $^{13}\text{C}$  for both U- $^{13}\text{C}_{17}$ - aflatoxin B<sub>1</sub> (Figure 2) and U- $^{13}\text{C}_{17}$ -aflatoxin G<sub>1</sub>.

Note: The chromatogram gives an evidence that 99.3 % of carbon atoms incorporated in U- $^{13}\text{C}_{17}$ -aflatoxin B<sub>1</sub> were replaced by the stable carbon isotope  $^{13}\text{C}$ .

The isotopic enrichments and isotope patterns of U- $^{13}\text{C}_{17}$ -aflatoxin B<sub>1</sub> and U- $^{13}\text{C}_{17}$ -aflatoxin G<sub>1</sub> are given in detail in tables 1 and 2. These calibrants were, moreover, certified on the basis of gravimetric preparation according to Josephs et al. (2003).

The mass of the isotope labeled aflatoxins is expected to have + 17 AMU (atom mass units) in order to provide an isotope pattern which would not interfere with the pattern of the naturally occurring aflatoxins, and thus, rendering LC-MS analyses more accurate. This property makes fully labeled aflatoxins suitable for their usage as internal standards (IS). Consequently, the fully labeled aflatoxins can be directly used for detection and accurate quantification of the aflatoxin contamination in any kind of matrix (food/feed) without time consuming procedures, such as standard addition (spiking) and/or matrix calibration (Häubl et al., 2006; 2007).

**Table 1.** Isotopic enrichment and isotope pattern of U- $^{13}\text{C}_{17}$ -aflatoxin B<sub>1</sub>

Isotope pattern <sup>a</sup>	
Compound	Isotopic distribution
$^{13}\text{C}_{17}$ -Aflatoxin B1	88.4 %
$^{13}\text{C}_{16}$ -Aflatoxin B1	10.6 %
$^{13}\text{C}_{15}$ -Aflatoxin B1	1.0 %
Calculated isotopic enrichment level <sup>a</sup> : 99.3 atom % $^{13}\text{C}$	
<sup>a</sup> Approximation based on LC-MS/MS data	

**Table 2.** Isotopic enrichment and isotope pattern of U- $^{13}\text{C}_{17}$ -aflatoxin G<sub>1</sub>

Isotope pattern <sup>a</sup>	
Compound	Isotopic distribution
$^{13}\text{C}_{17}$ -Aflatoxin G1	89.0 %
$^{13}\text{C}_{16}$ -Aflatoxin G1	9.9 %
$^{13}\text{C}_{15}$ -Aflatoxin G1	1.0 %
Calculated isotopic enrichment level <sup>a</sup> : 99.3 atom % $^{13}\text{C}$	
<sup>a</sup> Approximation based on LC-MS/MS data	

## REFERENCES

- ADYE, J., MATELES, R. I., 1964. Incorporation of labeled compounds into aflatoxins. *Biochimica et Biophysica Acta* 86, 1964, 418-420.
- BENNETT, J. W., KLICH, K. 2003. Mycotoxins. *Clinical Microbiology Reviews* 16, 2003, 497-516.
- DUTTON, M. F., EHRLICH, K., BENNETT, J. W., 1985. Biosynthetic Relationship among Aflatoxins B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, M<sub>1</sub>, and M<sub>2</sub>. *Applied and Environmental Microbiology*, 49, 1985, 1392-1395.
- FRISVAD, J. C., SAMSON, R. A., 2004. Polyphasic taxonomy of *Penicillium* subgenus *Penicillium*. A guide to identification of food and air-borne terverticillate *Penicillia* and their mycotoxins. *Studies in Mycology*, 49, 2004, 1-174.
- FRISVAD, J. C., THRANE, U., SAMSON, R. A., PITT J. I., 2006. Important mycotoxins and the fungi which produce them. In: *Advances in Food Mycology*, A. D. Hocking, R. A. SAMSON, J. I. PITT AND U. THRANE (Eds.), Springer US, 571, p. 3-31.
- GALVANO, F., RITIENI, A., PIVA, G., PIETRI, A., 2005. Mycotoxins in the human food chain. p. 187-224. In: *The Mycotoxin Blue Book*, Diaz, D.E. (Ed.), Nottingham University Press.
- HÄUBL, G., BERTHILLER, F., HAMETNER, C., RECHTHALER, J., JAUNECKER, G., FREUDENSCHUSS, M., KRŠKA, R., SCHUHMACHER, R., 2007. Characterization of (13C<sub>24</sub>) T-2 toxin and its use as an internal standard for the quantification of T-2 toxin in cereals with HPLC-MS/MS. *Analytical and bioanalytical chemistry* 389, 2007, 931-940.
- HÄUBL, G., BERTHILLER, F., RECHTHALER, J., JAUNECKER, G., BINDER, E. M., KRŠKA, R., SCHUHMACHER, R., 2006. Characterization and application of isotope-substituted (13C<sub>15</sub>)-deoxynivalenol (DON) as an internal standard for the determination of DON. *Food Additives and Contaminants*, 23, 2006, 1187-93.
- JECFA., 1997. Evaluation of certain food additives and contaminants. Forty-sixth report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives 1996. WHO Technical Report Series 868. Geneva: World Health Organization.
- JOSEPHS, R. D., KRŠKA, R., MACDONALD, S., WILSON, P., PETERSSON, H., 2003. Preparation of a calibrant as certified reference material for determination of the Fusarium mycotoxin zearalenone. *Journal of AOAC International* 86, 2003, 50-56.
- PILDAIN, M. B., FRISVAD, J. C., VAAMONDE, G., CABRAL, D., VARGA, J., SAMSON, R. A., 2008. Two novel aflatoxin-producing *Aspergillus* species from Argentinean peanuts. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58, 2008, 725-735.

**Contact adress:** Roman Labuda Dr. R&D-Manager, Microbiology group, BIOPURE Referenzsubstanzen GmbH, Technopark 1, 3430 Tulln, Austria,

## CITLIVOSŤ *YERSINIA*-LIKE BAKTÉRIÍ IZOLOVANÝCH Z RÝB KU ANTIMIKROBIÁLNYM SUBSTANCIÁM

### SENSITIVITY OF *YERSINIA*-LIKE BACTERIA ISOLATED FROM FISHES TO ANTIMICROBIALS

Andrea Lauková, Renáta Szabóová, Viola Strompfová, Monika Simonová, Rudolf Žitňan

#### ABSTRACT

To take into account population health as well as health fish habitat, the occurrence of aeromonads, salmonellae, listeriae, yersiniae or vibriae in the fish ecosystem are not acceptable. Keeping these points in our mind, the aim of our work was to select microflora from the intestinal tract of trouts with the impact to *Yersinia*-like bacteria and to test their sensitivity to antimicrobials such as antibiotics and bacteriocins-enterocins which were studied and characterized at our laboratory. The total counts of *Yersinia*-like bacteria reached less than 10<sup>1</sup> CFU/g (resp. log 10 <1,0 CFU/g) up to 5.47 CFU/g. Isolates 52T, 53T, 54T, 71T, 72T were resistant to all 6 enterocins tested, but sensitive to antibiotics used. The strain 51T was sensitive to ent 4231 (activity 400 AU/ml). Among 18 isolates, 17 were inhibited by the use of ent EK13 resp. ent A(P), ent 9296, ent 2019 and EF55 with activity 1600, 400-800, 200-800, 400 and 800 AU/ml, 14 isolates were sensitive to ent M (100 - 800 AU/ml) and 13 isolates were sensitive to ent 4231 (activity 100-400 AU/ml). The strain 72T was monoresistant (amoxicillin) and also resistant to tested enterocins. The isolates 104T and 91T were resistant to

amoxicillin. Fifteen isolates were biresistant, however, sensitive to enterocins. Most of isolates were sensitive to antibiotics as well as to enterocins, especially sensitivity to enterocins is promising result taking into account the fact that enterocins did not leave residues oppositely to antibiotics.

**Keywords:** trouts, *Yersinia*-like germs, inhibition activity, antibiotics, enterocines

#### ÚVOD

Z hospodárskeho hľadiska sú v rámci rybného hospodárstva významné najmä dve čeľade rýb, Lososovité a Kaprovité. Z čeľade Lososovité sú to najmä pstruh dúhový (*Salmo gairdnerii*), ktorý je i naskladňovaný na chovné účely a v bystrinných vodách sa vyskytujúci pstruh potočný (*Salmo trutta morpha fario*). Mikroflóra rýb je permanentne ovplyvňovaná širokou paletou mikroorganizmov, ktoré sú prítomné v ich životnom prostredí. Niektorí autori (Trust a Sparrow, 1974; Kamei et al., 1985) uvádzajú, že v črevnom trakte rýb je prítomných 10<sup>8</sup> aerobných heterotrofných baktérií na g a približne 10<sup>5</sup> anaerobných baktérií. Z hľadiska infikovania ľudskej populácie ako aj v kontexte výskytu ochorení ohrozujúcich zdravie a kvalitu rýb sú nepriaznivými nálezy aeromonád, salmonell, listérií či yersinii alebo vibrií (Lipp a Rose, 1997, Zlotkin et al., 1998, Novotný et al., 2004).

Aj keď ryby ako aj produkty z nich nie sú ideálnym zdrojom pre kyselinu mliečnu produkujúce baktérie (KMPB) vzhľadom na nízky obsah karbohydrátov v ekosystéme rýb, predsa len sú z rýb izolované a to hlavne zástupcovia rodov *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* a *Carnobacterium* (Ringo a Gatesoupe, 1998; Leroy et al., 2000) a niektoré KMPB izolované z rýb boli detegované aj ako producenti antimikrobiálnych substancií bakteriocínov nevynímajúc

(Campos et al., 2006). Bakteriocíny predstavujú ribozomálne syntetizované antimikrobiálne peptidy, ktoré inhibujú rast viac či menej príbuzných baktérií i patogénov vrátane niektorých Gram-negatívnych baktérií (Klaenhammer, 1993; Nes et al., 2000). Osobitú skupinu bakteriocínov tvoria enterocíny produkované zväčša enterokokmi (Franz et al., 2007), z ktorých sú najviac preštudované enterocíny produkované druhom *Enterococcus faecium* (Lauková et al., 1993; Cintas et al., 1998; Mareková et al., 2007). Štúdium enterocínov na našom pracovisku ÚFHZ SAV v Košiciach bolo priekopníckym najmä z hľadiska ruminálnych izolátov *E. faecium* (Lauková et al., 1993), a postupom času bolo na rôznych pracoviskách izolovaných, charakterizovaných a do homogenity purifikovaných viacero enterocínov (Franz et al., 2007). Preto sme sa rozhodli v súvislosti s Gram-negatívnymi izolátmi využiť práve na našom pracovisku charakterizované enterocíny a teda cieľom našej práce bolo zachytiť mikroflóru z črevného obsahu pstruhov s dôrazom na výskyt *Yersinia*-like baktérií a z hľadiska základného poznania zistiť ich citlivosť ku antimikrobiálnym látkam ako sú antibiotiká a bakteriocíny-enterocíny.

### MATERIÁL A METODIKA

V experimente bolo testovaných 14 vzoriek črevného obsahu zo 14 pstruhov, čeľaď Lososovité - *Salmonidae* (3 pstruhy potočné-*Salmo trutta morpha fario*, 11 pstruhov dúhových – *Salmo gairdnerii*) v období apríla roku 2007 z lokalít Hornád-Malá Lodina a z vodnej nádrže v lokalite Bukovec. Vzorky boli spracované štandardnou mikrobiologickou metódou podľa ISO, pričom navážený črevný obsah bol zriedovaný v Ringerovom roztoku

v pomere 1:9. Pre záchyt *Yersinia*-like izolátov sme použili *Yersinia* selektívny CIN agar so suplementom 12311 (CIN inhibítor, Becton a Dickinson, Cockeysville, USA), pričom počty zachytených kolónií sme vyjadrili v kolónie tvorných jednotkách na g (log<sub>10</sub> KTJ/g). Zo 14 pstruhov bolo potom z CIN agaru odpichnutých 23 *Yersinia*-like kolónií, ktoré boli následne testované na ich citlivosť/rezistenciu ku antibiotikám a bakteriocínom/enterocínom, ktorých producenti ako aj samotné tzv. čiastočne purifikované substancie (CPS) sú izolátmi nášho pracoviska, Laboratória živočíšnej mikrobiológie na Ústave fyziológie hospodárskych zvierat SAV v Košiciach, kde aj CPS boli pripravené. Na testovanie citlivosti či rezistencie na antibiotiká bola použitá štandardná diskovo-difúzna metóda s použitím nasledovných antibiotických diskov: ampicilín, amdinocilín, tobramycin, gentamicin (10 µg), kanamycín, chloramfenikol, tetracyklín (30 µg), tikarcilín/kyselina klavulónová (85 µg), karbenicilín, piperacilín (100 µg, Becton a Dickinson, Cockeysville, USA; Lachema s r.o., Česká republika). Inhibícia resp. citlivosť na antibiotiká bola vyhodnotená podľa inštrukcií a manuálu výrobcu.

Jednotlivé kmene, producenti enterocínov ako aj CPS boli pripravené podľa protokolov uvádzaných v našich predchádzajúcich prácach (Lauková et al., 1993; Mareková et al., 2003, 2007, Marciňáková et al., 2005; Simonová a Lauková, 2007; Stropfová a Lauková, 2007). Koncentrácia jednotlivých CPS dosahovala od 100 po 12 800 AU/ml (arbitrárných jednotiek na ml), pričom na testovanie inhibičnej aktivity enterocínov bola použitá tzv. agarová difúzna metóda (De Vuyst et al., 1996) a aktivita bola vyjadrená ako najvyššie riedenie enterocínu (CPS),

Tabuľka 1 *Yersinia*-like izoláty a ich citlivosť ku bakteriocínom-enterocínom

Kmeň	Enterocíny					
	<sup>1</sup> EK13	<sup>2</sup> AL41	<sup>3</sup> 9296	<sup>4</sup> 2019	<sup>5</sup> 4231	<sup>6</sup> EF55
73T	1600	200	800	400	-	800
74T	1600	400	800	400	100	800
101T	1600	400	800	400	400	800
102T	1600	400	800	800	200	800
103T	1600	400	800	800	200	800
104T	1600	400	800	400	100	800
91T	1600	400	400	400	100	800
11T	1600	800	800	400	100	800
12T	1600	800	400	400	400	800
13T	1600	100	400	400	-	800
21T	1600	400	400	200	-	400
22T	1600	400	400	200	-	400
31T	1600	100	400	400	100	800
32T	1600	200	800	200	100	400
33T	1600	-	800	200	100	400
34T	1600	-	400	400	100	400
35T	1600	-	400	400	-	400
51T	-	-	-	-	400	-

<sup>1</sup>EK13, enterocín A (P) produkovaný kmeňom *Enterococcus faecium* EK13 (CCM7419), <sup>2</sup>enterocín M produkovaný kmeňom *E. faecium* AL41, <sup>3</sup>enterocín 9296 produkovaný kmeňom *E. faecium* 9296, <sup>4</sup>enterocín 2019 produkovaný kmeňom *E. faecium* 2019 (CCM742), <sup>5</sup>enterocín 4231 produkovaný kmeňom *E. faecium* CCM4231, <sup>6</sup>enterocín EF55 produkovaný kmeňom *E. faecium* EF55, antimikrobiálna (inhibičná) aktivita enterocínov je vyjadrená v arbitrárných jednotkách na ml (AU/ml), - testovaný kmeň nebol inhibovaný; Kmene 52T, 53T, 54T, 71T, 72T boli rezistentné ku testovaným enterocínom.

ktoré ešte inhibuje rast indikátorového kmeňa (v AU/ml). Na kultiváciu sme použili Tryptikáza-sójový agar (1,5% aj 0,7%) ako aj Tryptikáza- sójový bujón (Becton a Dickinson).

### VÝSLEDKY A DISKUSIA

Počty izolovaných *Yersinia*-like baktérií dosahovali menej ako  $10^1$  KTJ/g (resp.  $\log_{10} < 1,0$  KTJ/g) až 5,47 KTJ/g; pričom jednotlivé hodnoty detegované vo vzorkách od 4 pstruhov boli 5,47; 5,07; 4,11; 3,04 KTJ/g; ostatné hodnoty boli nižšie než 1,0 KTJ/g alebo nad 1,0 t.j. 1, 47; 1,60; 1,1; 1,77 KTJ/g. Priemerné počty *Yersinia*-like izolátov boli  $2,0 \pm 0,41$  KTJ/g. Zo 14 rýb bolo odpihnutých 23 *Yersinia*-like kolónií.

Izoláty 52T, 53T, 54T, 71T, 72T boli rezistentné ku všetkým 6 enterocínom resp. ani jeden použitý enterocín neinhiboval rast 5 uvádzaných izolátov *Yersinia*-like. Kmeň 51T (Tab. 1) bol citlivý len ku enterocínu (ent) 4231 s aktivitou 400 AU/ml. Z 18 izolátov (Tab. 1), 17 bolo inhibovaných ent EK13 resp. ent A(P), ent 9296, ent 2019 a EF55 pri aktivite 1600, 400-800, 200-800, 400 a 800 AU/ml, 14 izolátov bolo citlivých ku ent M (Tab. 1) resp. boli inhibované ent M pri aktivite 100 až 800 AU/ml a ku ent 4231 bolo citlivých 13 izolátov (aktivita 100-400 AU/ml). Najaktívnejší bol ent A (P) produkovaný kmeňom *E. faecium* EK13 (CCM7419), potom ent 9296 a EF55 nasledovaný ent 2019, ent M a ent 4231. Bakteriocíny produkované enterokokmi tvoria zväčša enterocíny, ktoré inhibujú viac alebo menej príbuzné i patogénne (nežiadúce) baktérie. Za nežiadúce baktérie považujeme i Gram-negatívne yersinie. Inhibíciu nežiadúcich i Gram-negatívnych baktérií enterocínmi sme detegovali v našich predchádzajúcich prácach nielen za *in vitro*, ale i za *in vivo* podmienok (Lauková a Czikková, 1998; Lauková, 2001; Lauková et al., 2002; Lauková et al., 2003). Podobnú *in vitro* inhibíciu, avšak s podnecujúcim účinkom látok ako napr. chelaton popísal i Boziaris et al., (1998). Pri štúdiu enterocínov (či bakteriocínov všeobecne) produkovaných enterokokmi sa získavajú stále novšie vedomosti o ich inhibičnom spektre, čo ich predurčuje na aplikačné protektívne využitie. Oblasť štúdia ekosystému rýb je z tohto hľadiska pomerne neprebádaným „listom“, takže tieto naše výsledky sú istým základom a odrazovým mostíkom pre detailnejšie štúdium využitia enterocínov v rybnom hospodárstve alebo sú i predpokladom pre ďalší rozvoj štúdia nových bakteriocín-produkujúcich kmeňov, izolátov z rýb. Je zaujímavé, že *Yersinia*-like izoláty 51T, 52T, 53T, 54T, 71T boli rezistentné ku enterocínom (okrem kmeňa 51T, ktorý bol citlivý ku ent 4231), ale citlivé ku testovaným antibiotikám (atb). Kmeň 72T bol monorezistentný z hľadiska antibiotík, vykázal rezistenciu ku ampicilínu, a bol rezistentný i ku enterocínom. Rovnako aj izoláty 104T a 91T boli rezistentné ku ampicilínu. Ostatné izoláty (15) boli birezistentné (ampicilín a tobramycín). Avšak tieto kmene boli citlivé ku enterocínom. Väčšina izolátov bola citlivá ako ku atb, tak i ku ent, čo je veľmi perspektívny výsledok obzvlášť v súvislosti s ent resp. bakteriocínmi, ktoré nezanechávajú nijaké reziduá na rozdiel od antibiotík. Ku ampicilínu bolo citlivých všetkých 23 kmeňov, rovnako i ku karbenicilínu, tetracyklínu, chloramfenikolu, tikarcilínu a piperacilínu. Medzi testovanými kmeňmi sa však vyskytla rezistencia ku gentamicínu, kanamycínu, už spomínanému ampicilínu

a tobramycínu. Získané poznatky rozširujú doterajšie informácie z hľadiska citlivosti yersínií ku antimikrobiálnym látkam a poskytujú ďalšie možnosti pre následné štúdie.

### LITERATÚRA

- BOZIARIS, I.S., HUMPHESON, L., ADAMS, M.R. 1998. Effect of nisin on heat injury and inactivation of *Salmonella enteritidis* PT4. *Int. J. Food Microbiol.* 43, 1998, 542-546.
- CAMPOS, C.A., RODRÍGUEZ, O., CALO-MATA, P., PRADO, M., BARROS-VELÁSQUEZ, J. 2006. Preliminary characterization of bacteriocins from *Lactococcus lactis*, *Enterococcus faecium* and *Enterococcus mundtii* strains isolated from turbot (*Psetta maxima*). *Food Res. Int.* 39, 2006, 356-364.
- CINTAS, L.M., CASAUS, P., HOLO, H., HERNANDEZ, P.E., NES, I.F., HAVARSTEIN, L.S. 1996. Enterocins L50A and L50B, are related to staphylococcal hemolysins. *J. Bacteriol.*, 180, 1998, 1998-1994. De Vuyst, L., Callewaert R., Pot, B. *System Appl. Microbiol.* 19, 1996, 9-20.
- FRANZ, CH. M. A. P., VAN BELKUM, M. J., HOLZAPFEL, W. H., ABRIQUEL, H. 2007. Diversity of enterococcal bacteriocins and their grouping in a new classification scheme. *FEMS Microbiol. Rev.*, 31, 2007, 293-310.
- KAMEI, Y., SAKATA, T., KAKIMOTO, D. 1985. Microflora in the alimentary tract of Tilapia: characterization and distribution of anaerobic bacteria. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 31, 1985, 115-124.
- KLAENHAMMER, T.R. 1993. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 12, 1993, 39-86.
- LAUKOVÁ, A., MAREKOVÁ, M., JAVORSKÝ, P. 1993. Detection and antimicrobial spectrum of a bacteriocin-like substance produced by *Enterococcus faecium* CCM 4231. *Lett. Appl. Microbiol.*, 16, 1993, 257-260.
- LAUKOVÁ, A., CZIKKOVÁ, S. 1998. Inhibition effect of enterocin CCM 4231 in the rumen fluid environment. *Lett. Appl. Microbiol.*, 26, 1998, 215-218.
- LAUKOVÁ, A. 2001. Effect of enterocins CCM 4231 and V24 on the cells of environmental isolates *Acinetobacter* spp. *Acta Vet. Brno*, 70, 2001, 473-477.
- LAUKOVÁ, A., MAREKOVÁ, M., VASILKOVÁ, Z., PAPAJOVÁ, I., JURIS, P. 2002. Selected microbial consortium of raw and digested pig slurry and its susceptibility to enterocins. *World J. Microbiol.*, Biotechnol. 18, 2002, 11-15.
- LAUKOVÁ, A., GUBA, P., NEMCOVÁ, R., VASILKOVÁ, Z. 2003. Reduction of *Salmonella* in gnotobiotic Japanese quails caused by the enterocin A-producing EK13 strain of *Enterococcus faecium*. *Vet. Res. Com.*, 27, 2003, 275-280.
- LEROY, F., JOFFRAUD, J., CHEVALIER, F. 2000. Effect of salt and smoke of the microbiological quality of cold-smoked salmon during storage at 5° C as estimated by the factorial design method. *J. Food Prot.* 63, 2000, 502-508.
- LIPP, E.K., ROSE, J. 1997. The role of seafood in food-borne diseases in the United States of America. *Rev. Sci. Tech. OIE*, 16, 1997, 620-640.
- MAREKOVÁ, M., LAUKOVÁ, A., DE VUYST, L., SKAUGEN, M., NES, I. F. 2003. Partial characterization of bacteriocins produced by environmental strain *Enterococcus faecium* EK13. *J. Appl. Microbiol.*, 94, 2003, 523-530.
- MAREKOVÁ, M., LAUKOVÁ, A., DE VUYST, L., SKAUGEN, M., NES, I. F. 2007. Isolation and characterization of a new bacteriocin, termed enterocin M,



produced by environmental isolate *Enterococcus faecium* AL41. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 34, 2007, 533-537

MARCIŇÁKOVÁ, M., SIMONOVÁ, M., STROMPFOVÁ, V., LAUKOVÁ, A. 2005. Occurrence of structural enterococci genes among silage enterococci. *Bull. Vet. Inst. Pulawy* 49, 2005, 387-391.

NES, I.F., TAGG, G. 2000. Class II antimicrobial peptides from lactic acid bacteria. *Biopolymers*, 55, 2000, 50-61.

NOVOTNÝ, L., DVORSKÁ, L., LORENCOVÁ, A., BERAN, V., PAVLÍK, I. Fish: a potential source of bacterial pathogens for human beings. *Vet. Med.-Czech*, 49, 2004, 343-358.

RINGO, E., GATESOUBE, F. 1998. Lactic acid bacteria in fish: a review. *Aquaculture* 160, 1998, 177-203.

SIMONOVÁ, M., LAUKOVÁ, A. 2007. Bacteriocin activity of enterococci from rabbits. *Vet. Res. Com.* 31, 2007, 143-152.

STROMPFOVÁ, V., LAUKOVÁ, A. 2007. In vitro study on bacteriocin production of Enterococci associated with chickens. *Anaerobe* 13, 2007, 228-237.

TRUST, T. J., SPARROW, R. A. H. 1974. The bacterial flora in the alimentary tract of freshwater salmonid fishes. *Can. J. Microbiol.* 20, 1974, 1219-1228.

ZLOTKIN, A., ELDAR A., GHITTO, C., BERCOVIER, H. 1998. Identification of *Lactococcus garviae* by PCR. *J. Clin. Microbiol.* 36, 1998, 983-985.

### Pod'akovanie

Časť tejto práce vznikla za podpory projektu Vega 2/0008/09. Srdečne ďakujem za vynikajúcu technickú pomoc pani Margite Bodnárovej.

**Kontaktná adresa:** MVDr. Andrea Lauková CSc., Ústav fyziológie hospodárskych zvierat SAV, Šoltésovej 4-6, 04001 Košice, Email:laukova@saske.sk, Tel.+421-55-7922964

## **BAKTERIOCÍN-PRODUKUJÚCI KMEŇ *STAPHYLOCOCCUS XYLOSUS* S03/1M/1/2, PERSPEKTÍVNE ADITÍVUM BAKTERIOCIN-PRODUCING STRAIN *STAPHYLOCOCCUS XYLOSUS* S03/1M/1/2, PERSPECTIVE ADDITIVE**

*Andrea Lauková, Monika Simonová, Viola Strompfová*

### ABSTRACT

*Staphylococcus xylosus* S03/1M/1/2 is bacteriocin-producing strain isolated and characterized at our laboratory (Laboratory of Animal Microbiology, Institute of Animal Physiology in Košice, Slovakia) also possessing probiotic properties. Nowadays, one of frequent tasks which are discussed among scientific society are functional food. Therefore, the aim of our study was to test antimicrobial activity of the strain S03/1M/1/2 as well as to test its surviving in salami. Start during its technological manufacturing and also to check water activity and pH. Among 12 Gram-positive isolates 9 (75%) were inhibited, Gram-negative *E. coli* and *Pseudomonas* sp. were not inhibited. Partially purified substance showed antimicrobial activity, although it is not clear its direct character. The strain SX S03/1M/1/2 colonizes salami. Start sufficiently; at week 4 of ripening reached 4.5 (log 10) CFU/g in the experimental salami from the initial amount 6.6 CFU/g (after batches inoculation). Comparing the samples from first week of ripening and at the end of ripening 1.95 log cycle increase was detected. The values of pH and water activity were not negatively influenced; they were in the range from 6.06-5.45 - pH and 0.94-0.91 water activity. Sensoric properties were not specifically tested, however, the quality and taste of the final products were not influenced negatively. Therefore, we have continued in these studies more detailly by providing the other experiments.

**Keywords:** *Staphylococcus xylosus*, additives, bacteriocine, inhibition activity, salami

### ÚVOD

Koaguláza-negatívne stafylokoky (KNS) zohrávajú významnú úlohu pri zrení salámových a klobásových fermentovaných výrobkov z pohľadu zabezpečenia dobrých sensorických a nutričných vlastností produktov a čiastočne i z hľadiska zabezpečenia ich nezávadnosti (Luecke, 1998). Stafylokoky majú význam pre rozvoj typickej arómy fermentovaného mäsového produktu ako aj pre rozvoj typickej chute a farby výrobku (Jessen, 1995). Majú schopnosť redukovat' nitráty na nitrity, čo vedie ku produkcii nitrosylmyoglobínu, ktorý je dôležitý práve pre charakteristické červenkasté sfarbenie týchto produktov (Skibsted, 1992). Stafylokoky produkujú lipázy, čo prispieva ku rozvoju typickej chute fermentovaných produktov (Talon a Montel, 2007). Navyiac, niektoré KNS sú schopné produkovať antimikrobiálne látky proteínového charakteru – bakteriocíny s inhibičným účinkom na nežiadúce mikroorganizmy (Klaenhammer, 1993; Lauková a Mareková, 1993). Kmeň *Staphylococcus xylosus* S03 1M/1/2 bol izolovaný z tradičnej domácej kolobázy pripravovanej bez štartérovej kultúry (Simonová et al, 2006). Avšak niektoré kmene druhov *S. xylosus* či *S. carnosus* môžu byť obsiahnuté v komerčne dostupných štartérových kultúrach (Jessen, 1995). Keďže v súčasnom období sa veľa polemizuje o funkčných potravinách, cieľom našej práce bolo testovať bakteriocínovú aktivitu kmeňa SX S03/1M/1/2, ktorý má i viaceré probiotické vlastnosti (Simonová et al., 2006) a sledovať jeho účinky na modelovom pokuse pri výrobe salámy Štart.

### MATERIÁL A METODIKA

Izolácia a identifikácia kmeňa *Staphylococcus xylosus* S03 1M/1/2 i jeho probiotické vlastnosti boli testované v našej predchádzajúcej práci (Simonová et al., 2006). Na testovanie bakteriocínovej aktivity sme použili tzv. čiastočne purifikovanú substanciu (CPS), ktorú sme si pripravili precipitáciou supernatantu (pH 5,5) síranom amónnym pri 70% saturácii. Ako hlavný indikátor teda najcitlivejší kmeň sme použili *Enterococcus avium* EA5, izolát nášho laboratória a metodiku podľa De Vuysta et al., (1996), pričom inhibičná aktivita CPS bola vyjadrená ako najvyššie riedenie CPS, ktoré ešte inhibuje rast indikátorovej baktérie v arbitrárných jednotkách na ml

(AU/ml). Indikátorové baktérie sú uvedené v Tabuľke 1. Na modelový experiment sme použili rifampicínom značený variant kmeňa SX S03/1M/1/2 kvôli rozlíšeniu od iných KNS. Na inokuláciu salámy Štart v rámci modelového experimentu sme použili  $10^8$  KTJ/ml koncentráciu buniek kmeňa S03/1M/1/2 z bujónovej kultúry po centrifugácii (BHI bujón, Becton a Dickinson, Cockeysville, USA) vo fyziologickom roztoku.

Komponenty pre prípravu salámy Štart ako aj celý technologický postup prípravy samotnej boli zadané a uskutočnené presne podľa normy, v spolupráci s podnikom Mäso Spiš, s.r.o, prevádzka Košice. Mäsová zmes bola rozdelená na pokusnú (PM) a kontrolnú masu (KM), pričom PM bola inokulovaná kmeňom SX S03/1M/1/2. Potom nasledoval technologický postup spracovania, pričom finálny produkt mal dĺžku okolo 50 cm a hmotnosť 0,5 kg na každú salámu. Počas jednotlivých etáp technologického spracovania boli odobraté vždy po dve vzorky z obidvoch mäs, (PM i KM) v časovom rozpätí na začiatku experimentu-v nultý resp. prvý deň, po týždni, po 2, 3 a 4 týždňoch zrenia salámy. Sledovali sme prežívanie kmeňa S03/1M/1/2 v saláme, vodnú aktivitu ( $a_w$ ) a pH. Na vysievanie sme použili BHI agar s rifampicínom a počty baktérií sme vyjadrili v  $\log_{10}$  KTJ/g  $\pm$  SD. Kultivácia trvala 48 h pri 37 °C. Hodnoty pH sme merali pomocou pH metra a vodnú aktivitu sme testovali podľa STN 56 0030.

*faecium*. Z 12 G+ izolátov bolo inhibovaných 9 t. j. 75 %, G- kmene neboli inhibované. CPS prejavila výraznú inhibičnú aktivitu, aj keď nie je zatiaľ presne stanovené o aký bakteriocín sa jedná. V tomto štúdiu ako aj v testovaní počtu indikátorových baktérií pokračujeme. Avšak, v našich predchádzajúcich prácach (Lauková a Mareková, 1993; Lauková et al., 2003b) sme detegovali i bakteriocín-like substancie s aktivitou proti G- druhom.

Pri vyhodnocovaní modelového pokusu môžeme skonštatovať, že kmeň SX S03/1M/1/2 dostatočne kolonizoval prostredie salámy Štart, keď na 4. týždeň zrenia dosahoval v pokusnej saláme hodnoty 4,5  $\log_{10}$  KTJ/g z počiatočného množstva 6, 6 KTJ/g (po inokulovaní). Porovnaním vzoriek v prvý týždeň zrenia a na konci experimentu bol zistený nárast o 1,95  $\log$  cyklu. Hodnoty pH a vodnej aktivity neboli negatívne ovplyvnené; tieto hodnoty boli v rozsahu 6,06-5,45 - pH a 0,94-0,91  $a_w$ . Doposiaľ sa v mäsovom priemysle na účel aditív využívali hlavne laktobacily (Léroy et al., 2006), ale v ostatnom čase sa experimentálne aplikovali i bakteriocíny produkované enterokokmi (Lauková et al., 1999, 2003a; Aymerich a kol., 2008). Aj keď senzorké vlastnosti nami testovaného produktu neboli špecificky sledované, kvalita produktu nebola znížená. Preto v tejto štúdií pokračujeme ďalšími experimentami.

### LITERATÚRA

**Tabuľka 1** Inhibičná aktivita bakteriocínu-čiastočne purifikovanej substancie produkovanej kmeňom *Staphylococcus xylosus* S03/1M/1/2

Indikátorové baktérie	CPS S03/1M/1/2
<sup>1</sup> <i>E. avium</i> EA5	100
<sup>2</sup> <i>S. aureus</i> SA5	-
<sup>3</sup> <i>L. monocytogenes</i> CCM 4699	-
<sup>4</sup> LM1	400
<sup>5</sup> LM3	100
<sup>6</sup> LM4	200
<sup>7</sup> LM6	6400
<sup>8</sup> LM8	400
<sup>9</sup> LM7	6400
<sup>10</sup> LM11	6400
<sup>11</sup> LM12	6400
<sup>12</sup> <i>L. innocua</i> LMG13568	-
<sup>13</sup> <i>E. coli</i>	-
<sup>14</sup> <i>Ps. sp.</i>	(100)

CPS-čiastočne purifikovaná substancia; -rast kmeňa nebol inhibovaný; aktivita je vyjadrená v arbitrárnych jednotkách na ml (AU/ml); <sup>1</sup>*Enterococcus avium*, izolát nášho laboratória LŽM ÚFHZ SAV, Košice (z ciciaka); <sup>2</sup>*Staphylococcus aureus* - LŽM ÚFHZ SAV, Košice (mastitídne mlieko); <sup>3</sup>Česká zbierka mikroorganizmov, Brno, Česká republika; <sup>4-11</sup>*Listeria monocytogenes* z rôznych produktov-kuracie plátky, tlačienka, saláma cikáro pik, viedenské párky, pečené koleno, klobása, kabanos, debrecínska pečeň-Štátny veterinárny ústav Olomouc, ČR, Dr. Sýčevová; <sup>12</sup>*Listeria innocua*-Univerzita Brusel, Belgicko; <sup>13</sup>*Escherichia coli*, izolát z fermentovaného produktu (LŽM ÚFHZ SAV, Košice); <sup>14</sup>*Pseudomonas species*, izolát z fermentovaného produktu (LŽM ÚFHZ SAV, Košice);

### VÝSLEDKY A DISKUSIA

*In vitro* inhibičnú aktivitu CPS S03/1M/1/2 sme testovali proti 14 indikátorovým baktériám, pričom 12 izolátov bolo Gram-pozitívnych (G+) a 2 izoláty boli Gram-negatívne (G-). Blok G+ izolátov tvorilo 9 kmeňov *L. monocytogenes*, 1 kmeň *L. innocua*, *S. aureus* a *E.*

AYMERICH, T., HOLO, H., HAVARSTEIN L. S., HUGAS, M., GARRIGA, M., NES, I. F. 1996. Biochemical and genetic characterization of enterocin A from *Enterococcus faecium*, a new antilisterial bacteriocin in the pediocin family of bacteriocins. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62, 1996, 1676-1682.

DE VUYST, L., CALLEWAERT R., POT, B. 1996. Characterization of the antagonistic activity of *Lactobacillus amylovorus* DCE 471 and large scale isolation of its bacteriocin amylovorin L471. *System.Appl.Microbiol.* 19, 1996, 9-20.

JESSEN B. 1995. Starter cultures for meat fermentation. In G. Campbell-Platt & P.E. Cook (Eds.), *fermented Meats* (pp. 130-154), Glasgow Blakie Academic & Professional.

KLAENHAMMER, T.R. 1993. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol.Rev.* 12, 1993, 39-86.

LAUKOVÁ, A., MAREKOVÁ, M., JAVORSKÝ, P. 1993. Detection and antimicrobial spectrum of a bacteriocin-like substance produced by *Enterococcus faecium* CCM 4231. *Lett. Appl. Microbiol.*, 16, 1993, 257-260.

LAUKOVÁ, A., CZIKKOVÁ, S., LACZKOVÁ, S., TUREK, P. 1999. Use of enterocin CCM 4231 to control *Listeria monocytogenes* in experimentally contaminated dry fermented Hornád salami. *Int. J. Food Microbiol.* 52, 1999, 115-119.

LAUKOVÁ, A., TUREK, P., MAREKOVÁ, M., NAGY, J. Use of ent M, new variant of ent P to control *Listeria innocua* in experimentally contaminated Gombasek sausage. *Archiv fuer Lebensmittelhyg.*, 54, 2003a, 46-48.

LAUKOVÁ, A., GUBA, P., NEMCOVÁ, R., VASILKOVÁ, Z. 2003. Reduction of Salmonella in gnotobiotic Japanese quails caused by the enterocin A-producing EK13 strain of *Enterococcus faecium*. *Vet. Res. Com.*, 27, 2003b, 275-280.

LUECKE, F. K. 1998. Fermented sausages In B.J.B. Wood (Ed.), *Microbiology of fermented foods* (pp. 441-483), London, UK: Blakie Academic & Professional.

LÉROY, F., VERLUYTEN, J., DE VUYST, L. 2006. Functional meat starter cultures for improved sausage fermentation. *Int. J. Food Microbiol.* 106, 2006, 270-285.

SIMONOVÁ, M., STROMPFOVÁ, V., MARCIŇÁKOVÁ, M., LAUKOVÁ, A., VESTERLUND, S., LATORRE-MORATALLA, M., BOVER-CID, S., VIDAL-CAROU, C. 2006. Characterization of *Staphylococcus xylosus* and *Staphylococcus carnosus* isolated from Slovak meat products. *Meat Sci.* 73, 2006, 559-564.

SKIBSTED, L.H. 1992. Cured meat products and their oxidative stability. In D.E. Johnston, M.K. Knight, & D.A. Ledward (Eds.), *The chemistry of muscle-based foods* (pp.266-286), Cambridge, UK: The Royal Society of Chemistry.

TALON, R., MONTEL, M.C. 2007. Hydrolysis of esters by staphylococci. *Int J. Food Microbiol.* 36, 2007, 207-214.

**Pod'akovanie:** Výsledky prezentované v tejto štúdií vznikli za podpory EU projektu s akronymom TRADISAUSAGE-QLK1-CT-2002-02240 a čiastočne i v rámci projektu VEGA 2/0008/29. Srdečne ďakujem za vynikajúcu technickú pomoc pani Margite Bodnárovej a Ing. Jozefovi Teliškovi ako aj Ing. Mariánovi Užákovovi (Mäso, Spiš, s r.o.) ako aj ďalším technickým spolupracovníkom.

**Kontaktná adresa:** MVDr. Andrea Lauková CSc., Ústav fyziológie hospodárskych zvierat SAV, Šoltésovej 4-6, 04001 Košice, Email:laukova@saske.sk, Tel.+421-55-7922964

## VLIV PRŮBĚHU ZRÁNÍ NA OBSAH VYBRANÝCH SLOŽEK V PŘÍRODNÍM SÝRU EIDAMSKÉHO TYPU

### THE EFFECT OF RIPENING CONDITIONS ON THE COMPOSITION OF DUTCH-TYPE CHEESE

*Vendula Pachlová, František Buňka, Leona Buňková, Eva Weiserová, Kristýna Hladká, Petra Vojtíšková, Stanislav Kráčmar*

#### ABSTRAKT

We investigated the effect of ripening conditions on the composition of Dutch-type cheese depending on storage temperature. Samples of cheese were stored at different temperatures. Protein profile, pH, content of dry matter, fat, total protein, NaCl and free amino acid was observed. The effect of storage temperature on proteolysis was evident.

**Keywords:** nature cheese, SDS-PAGE, free amino acid (FAA), proteolysis

#### ÚVOD

Přírodní sýry patří v Evropě k nejvíce konzumovaným mléčným výrobkům. Klíčovou částí produkce těchto

výrobků je jejich zrání probíhající zpravidla v tzv. zrácích sklepích. Zrání sýrů zahrnuje mikrobiologické, resp. biochemické změny podmiňující vývoj aroma a textury charakteristické pro určitý typ přírodního sýra. Biochemické reakce probíhající během zrání přírodních sýrů je možné rozdělit na primární a sekundární procesy. K primárním procesům řadíme přeměnu laktózy, proteolýzu a lipolýzu. Sekundární procesy zahrnují reakce, při kterých jsou zejména volné aminokyseliny a volné mastné kyseliny přeměňovány na těkavé složky aroma. Jedná se například o procesy deaminace, dekarboxylace, transaminace, eliminace, desulfurace aj. (McSweeney & Sousa, 1998; McSweeney, 2004).

U většiny přírodních sýrů patří proteolytické reakce k nejrozsáhlejším. Činností proteáz a endopeptidáz vznikají zejména velké polypeptidy a středně dlouhé peptidy, popř. také kratší peptidy. V proteolýze přírodních sýrů jsou dále aktivní exopeptidázy, tripeptidázy a dipeptidázy, jejichž hlavním produktem jsou volné aminokyseliny, které jsou zdrojem výživy bakterií mléčného kvašení (Fox et al. 2000). Koncentrace volných aminokyselin obecně s délkou zrání stoupá (McSweeney & Sousa, 1998).

Malé peptidy a aminokyseliny přímo přispívají k chuti a vůni jejich přeměnou na další látky jako jsou alkoholy, aminy, karboxylové kyseliny, estery, karboxylové sloučeniny a sloučeniny obsahující síru. Procesy přeměny volných aminokyselin a volných mastných kyselin se dějí prostřednictvím několika metabolických drah, kde spolupůsobí celá řada enzymatických systémů (Broome & Limsowtin 1998; Smit et al. 2005; McSweeney et al.,

2006). Během tzv. sekundárních procesů mohou kromě sensoricky aktivních látek vznikat i „netradiční aminokyseliny“, které se nenacházejí v kaseinovém komplexu, příkladem může být  $\gamma$ -aminomáselná kyselina (Nhuch et al., 2008).

Během zrání přírodních sýrů se však mohou vyskytnout i sensorické vady, typickým příkladem je hořkost sýrů. Jedná se zpravidla o peptidy s 2 – 25 aminokyselinami s převážně hydrofobním charakterem. Tyto sekvence existují v kaseinovém komplexu a při jejich odstěpení z příslušné kaseinové frakce se projeví jejich hořkost. Tyto proteolytické reakce mohou být katalyzovány zbytkovou činností syřidla nebo specifickými enzymy starterových, popř. nestarterových mikroorganismů. V některých případech se počáteční hořkost přírodních sýrů při dalším zrání „ztratí“. Důvodem je následná proteolýza, kdy hořké peptidy jsou dále degradovány na menší peptidy, popř. aminokyseliny, které již hořkou chuť nemusí vykazovat (McSweeney & Sousa 1998; McSweeney, 2004).

Intenzita proteolytických změn závisí na celé řadě faktorů, kde důležité místo zaujímá i délka zrání, která se u jednotlivých přírodních sýrů liší, například mozzarella (2-3 týdny), sýry s plisní v těstě (několik týdnů), sýry eidamského typu (6 – 12 týdnů), sýry ementálského typu (několik měsíců), Parmigiano-Reggiano, čedar (až několik let). Jelikož dlouhá doba zrání zvyšuje náklady na výrobu jednotlivých přírodních sýrů, je snahou výrobců tuto dobu minimalizovat. Může tak dojít k situaci, kdy je spotřebiteli prodán výrobek, který nedosáhl optimálního prozrání a byl do spotřební sítě dodán předčasně. Distribuční síť a konzumenti již však zpravidla nedisponují vhodným skladovacími prostory, kde by příslušné přírodní sýry mohly „dozrát“.

Cílem práce bylo porovnat vliv rozdílného průběhu zrání a skladování na markery zracího procesu přírodního sýra eidamského typu.

### MATERIÁL A METODY

Vzorky eidamské cihly (30 % w/w tuku v sušině) byly získány jako část standardní výroby z mlékárny Kromilk, s.r.o. Kroměříž. Eidamské cihly (1,23-1,46 kg) byly po uzavření do cryovacového obalu uloženy do zracího sklepa s teplotou  $10 \pm 2$  °C. Po 23 dnech (od počátku výroby) byla část cihel přemístěna ze sklepa do lednice ( $4 \pm 2$  °C), kde probíhalo další skladování. Po 38 dnech zrání (od počátku výroby) byla do lednice přemístěna další část cihel. Poslední část cihel zůstala po celou dobu pokusu ve zracím sklepe (celkem 98 dnů). Odběry vzorků ze sklepa (a později i z lednice) byly realizovány v 1., 2., 3., 4., 7., 10., 13., 16., 20., 23., 27., 34., 38., 43., 49., 56., 63., 70., 84. a 98. dnu od počátku výroby (v den 1 byly sýry vyrobeny, vylišovány a uloženy do solné lázně, v den 2 byly sýry vyjmuty ze solné lázně, zabaleny a uloženy do zracího sklepa). Z každé odebrané cihly (ze zracího sklepa i lednice) byl vykrojen středový útvar vymezený 3,5 cm od vnějších okrajů příčného řezu, o výšce 2 cm (střed podélného řezu).

Odebrané vzorky byly podrobeny analýze obsahu sušiny, tuku, hrubé bílkoviny, NaCl, pH a dále obsahu volných aminokyselin a proteinovému profilu. Obsah sušiny byl určen gravimetricky podle ČSN EN ISO 5534, obsah tuku byl stanoven acidobutyrometricky podle van Gulika, pH bylo zjištěno pomocí pH-metru (Gryf 208 L, Havlíčkův

Brod, ČR) se skleněnou elektrodou (THETA 90 HC 113, Havlíčkův Brod, ČR), hrubá bílkovina ( $N \times 6,38$ ) metodou dle Kjeldahla a obsah NaCl podle Indra, Mizera (1992). Obsah volných aminokyselin byl stanoven iontovýměnnou kapalinovou chromatografií (AAA 400, Ingos, ČR) pomocí systému litnocitrátových elučnic pufrů, ninhydrinové postkolonové derivatizace a spektrofotometrické detekce. Proteinový profil byl získán pomocí denaturační polyakrylamidové elektroforézy (SDS-PAGE). Vzorky byly připraveny podle Bütikofer et al. (1993). Vlastní elektroforetická separace byla provedena pomocí polyakrylamidového gelu (15 % w/v). Gel a systém pufrů byly připraveny podle metodiky Laemmli (1970).

Výsledky byly vyhodnoceny Kruskal-Wallisovým testem a Wilcoxonovým testem, v případě proteinového profilu shlukovou analýzou. K výpočtům byl využit program Unistat verze 5.5.

### VÝSLEDKY A DISKUZE

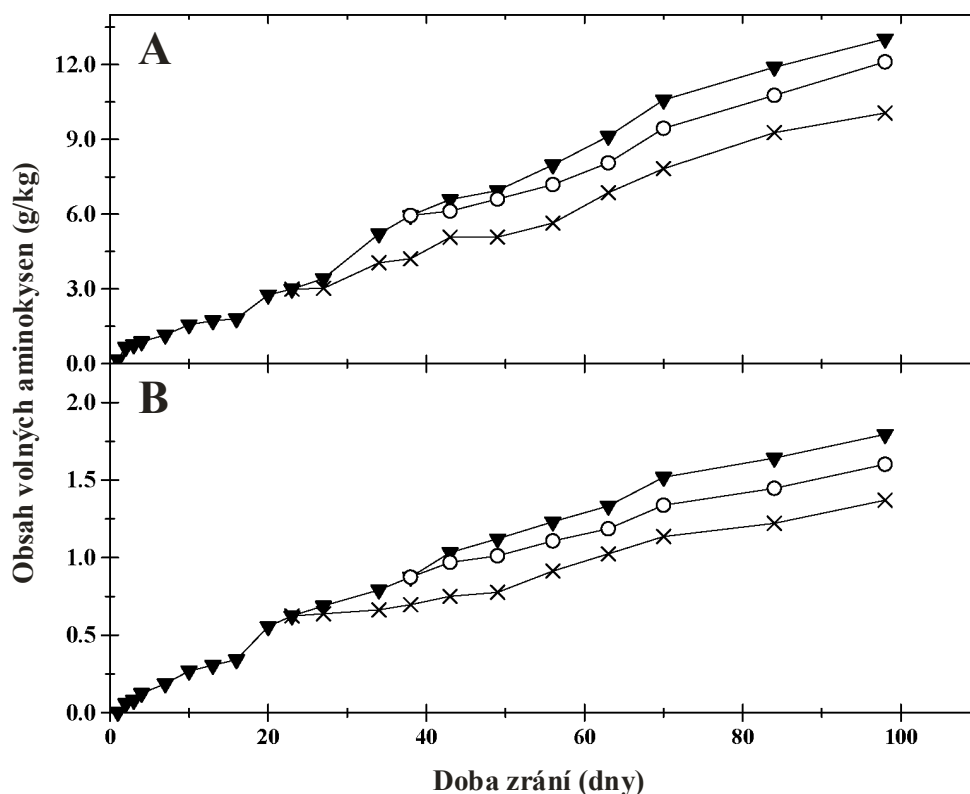
Během zracího, resp. skladovacího procesu byly sledovány jednotlivé markery zrání. Účelem práce bylo poukázat na možnou odlišnost obsahových složek přírodního sýra v případě, že optimální zrací proces je předčasně ukončen a sýr je dále skladován za chladírenských teplot.

Obsah sušiny byl bezprostředně po vyjmutí ze solné lázně a zabalení  $48,72 \pm 0,21$  % (w/w) a v průběhu téměř 100denního sledování se zvýšil na  $51,64 \pm 0,08$  % (w/w), přičemž rozdílný průběh zrání a skladování neměl na tuto charakteristiku významný vliv. Obsah NaCl v analyzované části eidamských cihel v průběhu sledování všech tří variant narůstal z původních  $0,11 \pm 0,01$  % (w/w) bezprostředně po vysolení na  $1,90 \pm 0,02$  % (w/w) po 98 dnech sledování. Zvyšování obsahu NaCl odpovídá postupné difúzi soli z okrajových částí do středu sýra (Fox et al., 2000). Podstatná změna byla zaznamenána v případě stanovení pH. Po vysolení přírodních sýrů bylo pH  $5,26 \pm 0,03$ . Po počátečním mírném poklesu odpovídajícím rozkladu zbytků laktózy na kyselinu mléčnou, byl zaznamenán postupný nárůst pH (po 98 dnech se zvýšilo na  $5,71 \pm 0,04$ ), což koresponduje s odbouráváním kyseliny mléčné bakteriemi mléčného kvašení (McSweeney, 2004). Nepřímým důkazem těchto reakcí je tvorba malých pravidelných ok zaznamenaných ve sledovaných vzorcích eidamské cihly. Obsah tuku ( $15,00 \pm 0,41$  % w/w) a obsah hrubých bílkovin ( $29,03 \pm 1,15$  % w/w) se v průběhu zrání prakticky neměnil.

Vývoj celkového obsahu volných aminokyselin ve vzorcích eidamských cihel v závislosti na průběhu zrání je uveden na obrázku 1 (část A). Je patrné, že po uložení sýrů do chladírenských podmínek sice obsah volných aminokyselin dále roste avšak pomaleji ve srovnání s výrobky uchovávanými ve zracím sklepe za optimálních podmínek. Z obrázku 1 dále vyplývá, že čím později je přírodní sýr přesunut do chladírenských podmínek, tím hlubší proteolýza proběhne. Zjištěné skutečnosti potvrzují, že pro správný průběh proteolýzy je zapotřebí optimálních teplotních podmínek (Fox et al., 2000; McSweeney, 2004). Rozdíl v proteolytických procesech u vzorků s různým průběhem zrání byl jednoznačně detekován i při analýze proteinového profilu metodou SDS-PAGE.

Obrázek 1

Vývoj sumárního obsahu volných aminokyselin (část A) a obsahu leucinu (část B) během 98denního sledování eidamských cihel: vzorky uložené po celou dobu ve zracím sklepě při  $10 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$  ( $\blacktriangledown$ ), vzorky skladované od 23. dne v lednici při  $4 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$  ( $\times$ ) a vzorky skladované od 38. dne v lednici při  $4 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$  ( $\circ$ )



Při porovnání vývoje obsahu jednotlivých volných aminokyselin v průběhu zrání, jsme dospěli k závěru, že k nejvíce obsaženým volným aminokyselinám patří leucin, glutamin, asparagin a lyzin. Nárůst obsahu těchto volných aminokyselin korespondoval s vývojovým trendem celkového obsahu volných aminokyselin. Tuto skutečnost je možné vidět na obrázku 1, kde v části B je zobrazen vývoj obsahu volného leucinu v závislosti na průběhu zrání. Leucin byl vybrán jako reprezentativní aminokyselina, neboť je pro popis zracích procesů velmi často používán (Fenelon et al., 2000; Al-Otaibi, 2004). Kromě 4 výše uvedené aminokyselin byla významnou volnou aminokyselinou i kyselina glutamová, která může vznikat jak při proteolýze kaseinového komplexu, tak i činností aminotrasferáz (z  $\alpha$ -ketoglutarátu) během metabolismu samotných volných aminokyselin (McSweeney, 2004). Jediná sledovaná volná aminokyselina, kde bez ohledu na zrací podmínky nebyl zaznamenán signifikantní nárůst v průběhu celého sledování byl arginin. Toto zjištění potvrzují i některé další práce, např. McSweeney & Sousa (2000). Zdůvodnění je možné hledat v detekovaném nárůstu obsahu ornitinu a citrulinu, pro které je arginin prekurzorem.

### ZÁVĚR

Průběh a teplotní režim při zracích procesech podstatně ovlivní proteolytické procesy a tím i jakost finálních produktů. Jsou-li výrobci z ekonomických důvodů nuceni vyskládkovat produkty dříve než optimálně vyzrálé, pak by tak měli činit nejdříve za 4 týdny.

### LITERATURA

- AL-OTAIBI, M. M., WILBEY, A., 2004. Effect of temperature and salt on the maturation of white-salted cheese. *International Journal of Dairy Technology*, 2004, 57, p. 57-63.
- BROOME, M. C., LIMSOVTIN, G. K. Y., 1998. Starter peptidase activity in maturing cheese. *Australian Journal of Dairy Technology*, 1998, 53.
- BÜTIKOFER, U., RÜEGG, M., ARDÖ Y., 1993. Determination of nitrogen fractions in cheese: evaluation of a collaborative study. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*, 1993, 26, 271-275.
- ČSN EN ISO 5534. Sýry a tavené sýry – stanovení obsahu celkové sušiny (referenční metoda). Český normalizační institut, 2005.
- FENELON, M. A., O'CONNOR, P., GUINEE, T. T., 2000. The effect of fat content on the microbiology and proteolysis in cheddar cheese during ripening. *Journal of Dairy Science*, 2000, 83, p. 2173-2183.
- FOX, P. F., GUINEE, T. P., COGAN, T. M., MCSWEENEY, P. L. H., 2000. *Fundamentals of Cheese Science*. 1st. ed. Gauthersburg (Maryland, USA): Aspen Publication, 2000, 638 p.
- INDRA, Z., MIZERA, J.: *Chemické kontrolní metody pro obor zpracování mléka*. Učebnice pro střední průmyslové školy potravinářské, Vydání první, 1992.
- LAEMMLI, U. K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 1970, 227, 680-685.

McSWEENEY, P. L. H., 2004. Biochemistry of cheese ripening. *International Journal of Dairy Technology*, 2004, 57, 127 – 144

McSWEENEY, P. L. H., HAYALOGLU, A. A., O'MAHONY, J. A., BANSAL, N., 2006. Perspectives on cheese ripening. *Australian Journal of Dairy Technology*, 2006, 61.

McSWEENEY, P. L. H., SOUSA, M. J., 2000. Biochemical pathways for the production of flavour compounds in cheese during ripening: A review. *Lait*, 2000, 80, 293 – 324.

NHUCH, E. L., PRIETO, B., FRANCO, I., BERNANDO, A., CARBALLO, J., 2008. Biochemical changes during the ripening of San Simón da Costa cheese (PDO)

manufactured from pasteurised milk. *The Australian Journal of Dairy Technology*, 2008, 63, p. 68-76.

SMIT, G., SMIT, A. G., ENGELS, W. J. M., 2005. Flavour formation by lactic acid bacteria and biochemical flavour profile of cheese products. *FEMS Microbiology Reviews* 29, 2005, p. 591-610.

**Poděkování:** Práce vznikla za podpory Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy České republiky (MSM 7088352101).

**Kontaktná adresa:** Vendula Pachlová, Ing., Ústav biochemie a analýzy potravin, Fakulta technologická, Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, nám. T.G.M. 275, 762 72 Zlín tel.+00420 576 033 007, e-mail: pachlova@ft.utb.cz

### THE INFLUENCE OF OXIDATION METHODS ON CONTENT OF MINERAL ELEMENTS IN STARCHES

*Sławomir Pietrzyk, Lesław Juszczak, Teresa Fortuna, Michał Drużkowski*

#### ABSTRACT

Potato, maize and waxy maize starches were oxidised with hydrogen peroxide under acidic or basic conditions in the presence or without Fe(II) and Cu(II) ions as catalysts. Native starch and the modified products obtained were examined for the carboxyl groups, aldehyde groups, and mineral elements (K, Na, Mg, Fe, Cu) contents. Oxidation process with Fe(II) and Cu(II) caused increase of their content in modified starches. Moreover oxidised potato starch under basic conditions had much more sodium than native potato starch. Generally the amounts of potassium and magnesium in oxidised starches decreased.

**Keywords:** oxidation starch, mineral elements, catalysts

#### INTRODUCTION

The starches can be modified physically, chemically and enzymatically. The oxidation process except for the hydrolysis is one of the most frequent used chemical method of the starch modification. This process relies on the generation the carbonyl or/and carboxyl groups in the starch depending on the conditions of the oxidising process and botanical origin of the starch. The reaction of oxidation is accompanied by the: polymerisation and weakness the intramolecular chemical bounds [Wurzburg 1987; Zhu et al. 1998; Fortuna and Pietrzyk 2005].

For many years the oxidised starches are the main component of the puddings, cream puddings, whipped cream and mixtures of the dough powder. The prepartes of the oxidised starch can be successfully used in the coating compositions. This starches are characterised by a good adhesion of coating to the coated food products, and crusted structure caused by roasting and/or cooling of food products [Wurzburg 1987; Walkowski and Lewandowicz 2004].

Starches serve not only as texturizing food component, but they can be also carriers of substances essential for life

(e.g. mineral elements). There is a possibility to increase or decrease content of mineral elements in starch during oxidation with catalysts.

The aim of the study was to check the influence of catalysts and pH of reaction environment on the content of mineral elements in starches obtained after modification with hydrogen peroxide.

#### MATERIAL AND METHODS

Commercial potato starch „Superior”, was produced by ZPZ Niechlów (Poland). Maize and waxy maize starches were produced by National Starch & Chemical. Starches were oxidised in an acidic or basic environment, with or without Fe(II) (from  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) and Cu(II) (from  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) ions as catalysts, as described by Parovuori et al. [1995]. 100 g of starch were weighed and dispersed in distilled water in the amount needed to give a 42% starch suspension. The metal salt was dissolved in water before preparing the suspension of starch. The concentration of the metal ions was 0.1% w/w (on dry starch basis). After heating the reaction mixture in a 40 °C water bath for 15 minutes while stirring it mechanically, a 30% solution of  $\text{H}_2\text{O}_2$  was added dropwise so as to reach its final concentration of 2 g/100 g d.m. starch. Then, the mixture was thermostated for 60 minutes to let the modification take place. After that, the modified starches were washed (0.5 dm<sup>3</sup> water), dried, pulverised and sieved. The basic conditions of the reaction were created by adding dropwise 2M NaOH (before using hydrogen peroxide and during the whole oxidation process) to reach pH = 10.

The original starch and the modified starches were subjected to the following determinations:

Carboxyl groups content, according to ISO 11214 standard [1996],

Aldehyde groups content, according to Potze and Hiemstra [1963],

Mineral elements content, potassium (K), sodium (Na), magnesium (Mg), iron (Fe) and copper (Cu) by Atomic Absorption Spectrometry method in spectrometer Avanta Sigma GBC (Australia) with air-acetylene flame atomisation. Starch early was mineralization 2.5 h. (250°C) in mixture concentrated nitric acid and concentrated sulfuric acid (Wet Digester B-440, Büchi).

**Table 1.** Content of carboxyl and aldehyde groups in oxidised starches

Starch Oxidized with	Content of carboxyl groups in starches [%]			Content of aldehyde groups in starches [CHOg/100g d.w.]		
	Potato	Maize	Waxy maize	Potato	Maize	Waxy maize
hydrogen peroxide	0.03	0.01	0.01	0.21	0.10	0.13
hydrogen peroxide, pH=10	0.33	0.03	0.01	0.03	0.02	0.03
hydrogen peroxide, Cu(II)	0.22	0.08	0.05	0.14	0.31	0.04
hydrogen peroxide, Fe(II)	0.59	0.32	0.41	0.87	0.76	0.75
hydrogen peroxide, Fe(II), pH=10	0.07	0.02	0.02	0.12	0.12	0.13
LSD <sub>α=0.05</sub>	0.01			0.01		

The significance of differences in the parameter values between the samples was determined using a one-way analysis of variance and the Tukey test ( $\alpha=0.05$ ).

**RESULTS AND DISCUSSION**

Table 1 shows the content of hydroxyl and aldehyde groups in the obtained modified starches. The number of those groups determines of effectiveness of starch

oxidation under applied conditions. Oxidation of starch by hydrogen peroxide under acidic conditions in the presence Fe(II) ions was the most effective (among used methods) because it caused the highest increase in the number of carboxyl and aldehyde groups.

Table 2 shows the content of mineral elements in native starches and in obtained modified starches. The results of mineral elements in native starches was in accordance with the results obtained by other authors [Nowotny 1969]. All applied oxidation processes caused decrease of the level of potassium (K) and magnesium (Mg) in modified starches. Only the contents of magnesium (Mg) did not change in potato starch oxidised in acid environment without catalysts and in waxy maize oxidised in alkaline condition with presence Fe(II) ions and was at the same level as in native starches.

Decrease in potassium (K) and magnesium (Mg) in obtained oxidised starches was caused by their release and washout during the washing of starch after oxidation process. Content of sodium (Na) was reduced after modification only in cereal starches (maize and waxy maize). In potato starches oxidised by hydrogen peroxide under acidic environment the number of sodium (Na) was the identical as compared to native starch. Increase in sodium (Na) was observed in potato starches oxidised under alkaline conditions. It was caused by the replacement of sodium ions (addition to mixture reactions in order to keep up alkaline conditions) to orthophosphoric acid(V) present in potato starch. Content of copper (Cu) in the obtained oxidised starches

**Table 2.** Content of mineral elements in starch before and after oxidation

Starch		Mineral elements[mg/100g d.w.]				
		K	Na	Mg	Fe	Cu
Potato native		11.54	3.82	6.88	0.00	0.27
Potato oxidised with:	hydrogen peroxide	3.40	2.87	7.05	0.00	0.06
	hydrogen peroxide, pH=10	3.00	26.75	4.91	0.00	0.00
	hydrogen peroxide, Cu(II)	1.40	3.22	1.32	0.00	27.50
	hydrogen peroxide, Fe(II)	0.95	4.06	1.78	22.51	0.27
	hydrogen peroxide, Fe(II), pH=10	2.48	27.90	4.43	37.52	0.16
Maize native		3.51	9.72	1.85	0.00	0.53
Maize oxidised with:	hydrogen peroxide	0.47	2.58	0.76	0.00	0.53
	hydrogen peroxide, pH=10	0.83	4.36	0.95	0.00	0.35
	hydrogen peroxide, Cu(II)	0.21	2.41	0.63	0.00	13.98
	hydrogen peroxide, Fe(II)	0.73	3.76	0.40	38.69	0.67
	hydrogen peroxide, Fe(II), pH=10	1.51	5.04	1.48	102.59	0.59
Waxy maize native		5.85	13.05	1.43	0.00	0.71
Waxy maize oxidised with:	hydrogen peroxide	0.61	3.08	0.95	0.00	0.58
	hydrogen peroxide, pH=10	0.62	6.07	0.65	0.00	0.63
	hydrogen peroxide, Cu(II)	0.21	1.15	0.15	0.00	14.68
	hydrogen peroxide, Fe(II)	1.56	2.83	0.57	43.44	0.37
	hydrogen peroxide, Fe(II), pH=10	0.93	2.71	1.57	88.01	0.57
LSD <sub>α=0.05</sub>		0.13	1.14	0.18	3.37	0.23

without Cu(II) ions was the same as in initial starches. Only in waxy maize starch modified under acidic conditions with Fe(II) ions was observed a decrease in content of copper (Cu) and in potato starch modified in alkaline environment without catalyst total washing out occurred. Increase in content of copper (Cu) was found in starches oxidised in acidic conditions with presence Cu(II) ions. Number of replaced copper was dependent on the type starches. Amount of bounded copper was highest (over 27%) in potato starch, whereas in cereal starches (14%) comparable to the number Cu(II) ions added during oxidation. Content of iron (Fe) in modified starches in the presence Fe(II) ions was about twice as high after modification in alkaline conditions as in acidic conditions. Number of iron (Fe) in modified starches was from over 20% (potato starch oxidised under acidic environment) to 100% (maize starch oxidised under alkaline environment) compared to the number added during oxidation. Substitution of starch and/or adsorption (on surface areas starch granules) of metal ions which are added during modification is in accordance with the results obtained by the others authors [Floor et al. 1989; Achremowicz et al. 2000; Kweon et al. 2001].

### CONCLUSIONS

All applied oxidation processes caused decrease of the level of potassium (K) and magnesium (Mg) in modified starches. Only the contents of magnesium (Mg) did not change in potato starch oxidised in acid environment without catalysts and in waxy maize oxidised in alkaline condition with presence Fe(II) ions and was at the same level as in native starches.

Oxidation of cereals starches (maize, waxy maize) caused the decrease of sodium (Na) level, whereas in potato starch oxidation process under basic conditions caused over 7 times increase of sodium (Na) volume.

Modified starches under basic condition with Fe(II) had twice more iron (Fe) than modified starches under acidic condition with Fe(II) ions.

Amount of copper in modified starches with Cu(II) was on the level from 14% in waxy maize starch to 27% in

potato starch in comparison with initial value of Cu(II) ions added during oxidation.

### REFERENCES

- ACHREMOWICZ, B., GUMUL, D., BALA-PIASEK, A., TOMASIK, P., HABERKO, K., 2000. Air oxidation of potato starch over Cu(II) catalyst. *Carbohydrate Polymers*, 2000, 42, 45-50.
- FLOOR, M., KIEBOOM, A. P. G. VAN BEKKUM, H., 1989. Preparation and calcium complexation of oxidized polysaccharides. *Starch/Stärke*, 1989, 9, 348-354.
- KWEON, D. K., CHOI, J. K., KIM, E. K., LIM, S. T., 2001. Adsorption of divalent metal ions by succinylated and oxidized corn starches. *Carbohydrate Polymers*, 2001, 46, 171-177.
- NOWOTNY, F. 1969. Skrobia. Wydawnictwo Naukowe Techniczne, Warszawa.
- PIETRZYK, S., FORTUNA, T., 2005. Oxidation induced changes in the surface structure of starch granules. *Polish Journal of Food and Nutrition Science*, 2005, 14/55, 159-164.
- STANDARD ISO 11214 1996. Modified Starch – Determination of Carboxyl Group Content of Oxidized Starch.
- PAROVUORI, P., HAMUNEN, A., FORSELL, P., AUTIO, K., POUTANEN, K., 1995. Oxidation of potato starch by hydrogen peroxide. *Starch/Stärke*, 1995, 47, 19-23.
- POTZE, J., HIEMSTRA, P., 1963. Über den einfluss der reaktionsbedingungen auf die oxydation der kartoffelstärke mit hypochlorit. *Starch/Stärke*, 1963, 15, 217-225.
- WALKOWSKI, A., LEWANDOWICZ, G., 2004. Skrobie modyfikowane, właściwości technologiczne i zakres stosowania. *Przemysł Spożywczy*, 2004, 5, 49-51.
- WURZBURG, O. B. 1987. Modified starches properties and uses. Boca Raton Florida CRS Press Inc.
- ZHU, Q., SJOHOLM, R., NURMI, K., BERTOFT, E., 1998. Structural characterization of oxidized potato starch. *Carbohydrate Research*, 1998, 309, 213-218.

**Contact address:** Sławomir Pietrzyk, PhD, Department of Analysis and Evaluation of Food Quality, University of Agriculture, Balicka Street 122, 30-149 Krakow, Poland, e-mail: spietrzyk@ar.krakow.pl

## MIKROSKOPICKÉ METÓDY V ANALÝZE POTRAVÍN – PREHLAD MICROSCOPIC METHODS IN ANALYSIS OF FOODSTUFF – REVIEW

*Matej Pospiech, Bohuslava Tremlová, Zdenka Randulová, Zuzana Řezáčová Lukášková*

### ABSTRACT

Microscopic methods have a long tradition in the analysis of foodstuffs. They are mainly used for determination of the composite food ingredients, determination of the quality and arrangement of the food components, detection of foodstuffs adulteration, detection of risky food components and in case of using histometry, stereology and image analysis also for the quantification of food ingredients. The aim of this work is to show opportunities and benefits of food microscopy as an appropriate

investigative technique for supervisory authorities in the field of food safety and provide proper alternative for chemical, immunochemical and molecular biological analyses that are, in some cases, more expensive.

**Keywords:** microscopy, foodstuff, immunohistochemistry, adulteration

### ÚVOD

História potravinovej mikroskopie siaha už do roku 1850, kedy Arthur Hassall použil mikroskopickú metódu na odlišenie kávy a cikorky. V tej dobe nebolo možné spomenuté druhy od seba odlišiť žiadnou inou diagnostickou (chemickou) metódou. Postupne bola spomenutá metodika Hassalom rozpracovaná a umožnila odlišenie ďalších prídavkov do kávy (fazule, žalude, mandle). Na základe svojich výsledkov napísal v roku 1857 knihu Detekcia falšovania Potravín a Liečiv, čo predstavovalo prelomový krok a poskytlo rôzne postupy na odhalenie falšovania potravín. V roku 1909 boli Hassalove výsledky prehĺbené prácou Clayтона (1909) a doplnené prevažne o možnosti stanovenia tuku



a proteínov. V nasledujúcich rokoch boli vypracované ďalšie publikácie s touto tematikou. Medzi najznámejšie patria Analytická mikroskopia od Wallisa (1923) a Štruktúra a zloženie potravín od Winton a Wintona (1939). Obe spomenuté publikácie boli viac krát prepracované a patria k stále používaným publikáciám v oblasti mikroskopie potravín. V súčasnej dobe tiež existuje rada zahraničných publikácií zaoberajúcich sa štruktúrou potravín - Mikroštrukturálne princípy výroby a analýzy potravín od Aguilera (1990) alebo Potravinová mikroskopia od Flintovej (1994). Domácich prác zaoberajúcich sa mikroskopickou detekciou falšovania potravín nie je veľa. V Českej republike sa tejto problematike najviac približuje Mikroskopia mäsa a surovín živočíšneho pôvodu od Böhma a Plevy (1962) a zo súčasnej doby Histológia potravín od Tremlovej (1996). Obidve spomenuté práce pojednávajú len o potravinách živočíšneho pôvodu, poskytujú však dobrý základ pre sledovanie zloženia a štruktúry mäsových výrobkov a pre odhalenie falšovania týchto komodít.

Mikroskopia potravín poskytuje v oblasti štúdia potravín veľké možnosti. V súčasnej dobe je k dispozícii celá rada možností pre spracovanie a prípravu vzoriek a taktiež vyšetrovacích metód od klasických až po tie, ktoré využívajú najmodernejšie technické zariadenia. Mikroskopia (optická, svetelná, elektrónová alebo atómová) a ďalšie zobrazovacie techniky sú jedny z najvhodnejších techník pre hodnotenie štruktúry potravín. Sú to metódy, ktoré poskytujú údaje vo forme zobrazenia, čo je vhodnejšie ako číselné údaje. Avšak zobrazenia môžu byť ďalej prevádzané na číselné dáta, ktoré dovoľujú štatistické vyhodnotenie. Tieto techniky sú doplnením vizuálneho hodnotenia potravín bežne používaného ako konzumentmi, tak i spracovateľmi potravín (Kaláb et al., 1995).

Na základe mikroskopických zmien je totiž možné určiť, či došlo u výrobkov k technologickému opracovaniu, prípadne o aké opracovanie sa jedná. Mikroskopickým vyšetrením je tiež možné posúdiť kvalitu použitých surovín a suroviny použité vo výrobku. Práve táto možnosť otvára veľké pole pôsobnosti vo výskume, ale aj v hodnotení kvality potravín. Veľkú výhodu predstavuje aj v oblasti problematiky bezpečnosti potravín. Táto nabera v súčasnej dobe stále viac na dôležitosť, nakoľko do potravín sú často pridávané suroviny, ktoré v rôznej miere môžu negatívne ovplyvniť spotrebiteľa, technologické vlastnosti výrobku a v neposlednej rade aj jeho trvanlivosť. V dôsledku tlaku obchodných reťazcov na „nízke ceny“ sú do výrobku pridávané niektoré menej hodnotné suroviny a dokonca v niektorých prípadoch sa výrobca uchýľuje aj k falšovaniu danej potraviny a prítomnosť týchto surovín zámerné neuvádza alebo maskuje.

Súčasná možnosť potravinovej mikroskopie

Stanovenie kompozitných zložiek potravín

Stanovenie kvality a usporiadania jednotlivých zložiek potravín

Detekcia falšovania potravín a detekcia rizikových zložiek v potravinách

Kvantifikácia zložiek potravín

### 1) Stanovenie kompozitných zložiek potravín

Stanovenie kompozitných zložiek potravín mikroskopicky je možné rôznymi zobrazovacími technikami. Medzi najčastejšie patrí svetelná mikroskopia pre sledovanie

mikroštruktúry a transmisná elektrónová mikroskopia (TEM) spolu so skenovacou elektrónovou mikroskopiou (SEM) pre popis ultraštruktúry potravín. Svetelná mikroskopia zahŕňa celú radu modifikácií. Najpoužívanejšie sú samozrejme mikroskopia s prechádzajúcim slnečným respektíve umelým svetlom vo viditeľnom a UV spektre. Tento druh vyšetrenia je možné použiť napríklad v spojení s cieľným farbením zeleným trichromom na mikroskopickú charakteristiku rôznych druhov strojne oddeleného mäsa (Tremlová ai., 2006) a rovnako aj na stanovenie kolagénu pikro – sirius červenou (Flint a Pickering, 1984). Mikroskopické techniky nachádzajú uplatnenie aj u hotových potravín, napríklad, ako popisujú Böhma a Pleva (1962), u mäsových výrobkov, kde sú úspešne aplikované aj bežné prehľadné farbenia. Ultraštruktúrou mäsových výrobkov sa zaoberal Katsaras (1994) a pomocou SEM a TEM podrobne popísal vznik bielkovinovej siete, ktorá je nevyhnutná pre súdržnosť mäsových výrobkov.

Inou skupinou potravín živočíšneho pôvodu, kde mikroskopia našla uplatnenie, sú mliečne produkty. V tejto skupine je možné posudzovať ako tekuté, tak polotekuté (gelovité) komodity. Pre popis ultraštruktúry malo významné uplatnenie použitie TEM a SEM hlavne na objasnenie štruktúry vytvorenia gélovej matrix kaseinových micel spojených s tekutou zložkou u jogurtov (Modler and Kalab, 1983), u sušených mliek objasnila SEM kryštalizáciu laktózy a jej vplyv na znižovanie kvality počas dlhodobého skladovania (Roetman, 1979) a (Saltmarch and Labuza, 1980).

Potravinami živočíšneho pôvodu však možnosti mikroskopickej analýzy nekončia, dobré uplatnenie nachádzajú aj v oblasti potravín rastlinného pôvodu. U pekárenských výrobkov sa uplatňujú v popise vzájomných vzťahov medzi škrobom, bunečnými stenami, proteínovou matrix a rovnako aj samotnou štruktúrou zrna (Kaletunc a Breslauer, 2003).

### 2) Stanovenie kvality a usporiadania jednotlivých zložiek potravín

Na základe mikroskopických zmien je možné určiť, či došlo u výrobkov k technologickému opracovaniu, prípadne o aké opracovanie sa jedná. Mikroskopickým vyšetrením je tiež možné posúdiť suroviny použité vo výrobku, kvalitu týchto surovín a rovnako aj usporiadanie jednotlivých zložiek potraviny. Vzájomné usporiadanie zložiek potravín má významný vplyv na akosť finálneho výrobku. Rôzne prídavné látky sa môžu použiť nielen z dôvodu zlepšenia nutričného, chuťového či vzhľadového hľadiska, ale rovnako za účelom zlepšenia texturálnych vlastností výrobku. Na výslednú akosť a usporiadanie má tiež vplyv technológia spracovania potraviny. Mikroskopia potravín v tomto smere predstavuje účinný a v mnohých prípadoch nenahraditeľný nástroj. Významné uplatnenie nachádza v sledovaní homogenity rozptýlenia jednotlivých zložiek potraviny, napríklad škrobom, rastlinných proteínov, karagenanov, ale tiež u surovín živočíšneho pôvodu. U mliečnych výrobkov bola aplikovaná SEM na posúdenie vplyvu morfológie tukových kryštálikov na technologické vlastnosti ako je roztierateľnosť, tvrdosť a jemnosť margarínu a masla (Heertje and Leunis, 1997). Svetelná mikroskopia s cieľným farbením olejovou červenou bola úspešne použitá pri výbere vhodných náhrad (hydrokoloidov) za fosfátové soli v tavených

syroch s ohľadom na stabilitu tukovej fázy (Černíková ai., 2008; Award et al., 2002). U mäsových výrobkov nachádza uplatnenie napríklad v posudzovaní kvality vstupných surovín, ale aj finálnych výrobkov. U vstupných surovín nachádza uplatnenie pri sledovaní zmien v strojne oddelenom mäse pomocou polarizačnej mikroskopie (Branscheid, 2002; Branscheid et al., 2008), ale aj v prechádzajúcom svetle (Pickering, 1995).

### 3) Detekcia falšovania potravín a detekcia rizikových zložiek v potravinách

Falšovanie potravín má za sebou už dlhú históriu. V tesnom závese za falšovaním sa vyvíjajú aj rôzne metódy na jeho odhalenie. Či už z dôvodu ochrany spotrebiteľa pred rizikovými zložkami (antinutričné látky, alergény, karcinogénne látky, mikrobiálne kontaminanty) alebo z dôvodu dodržiavania akostných a nutričných požiadaviek je nutné dozornými orgánmi kontrolovať najmä pridávanie menej kvalitných a nutrične nevyhovujúcich látok, ktoré bývajú v niektorých prípadoch cenovo výhodnejšie a môžu preto lákať výrobcov k ich neadekvátnemu používaniu. Za falšovanie sa rovnako môže považovať deklarácia iného zloženia než z akého je výrobok skutočne vyrobený. Dosť často môže dochádzať ku kombinácii viacerých aspektov falšovania. Možnosti detekcie sú samozrejme rôzne, ale s ohľadom na rozsah dostupnosti rôznych prídavných látok by najvhodnejšou metódou bolo vyšetrenie výrobku na všetky možné varianty falšovania, v ideálnom prípade jediným vyšetrením. Žiadna zo súčasných detekčných metód samozrejme takéto vyšetrenie neumožňuje. Najčastejšie používané metódy chemické či imunochemické dokážu vo väčšine prípadov jedným vyšetrením detegovať len jednu prímes či sledovanú vlastnosť. Práve v tejto oblasti predstavuje mikroskopia potravín veľmi silný nástroj ktorý umožňuje jedným vyšetrením detegované rôzne prímеси. U rastlinných surovín dochádza k falšovaniu prevažne už spomínanej kávy, ale rovnako časté je aj falšovanie mletého korenia (Zálešák, 1956; Komár, 2005; Archer, 1987; Curl, 1983). U mäsových výrobkov bolo mikroskopické vyšetrenie úspešne použité na dôkaz rastlinných prídavkov. Bežne použiteľné sú na dôkaz zemiakového škrobu, vlákniny, rastlinných proteínov (Horn, 1987; Lukášková, 2006; Pospiech, 2007). Vyšetrenie živočíšnych súčastí v mäsových výrobkoch je rovnako možné a ide najmä o vyšetrenie na strojovo oddelené mäso, ktorého použitie je u niektorých druhov mäsových výrobkov zakázané (Tremlová, 2006) alebo o mikroskopické vyšetrenie v kombinácii s imunologickými metódami na detekciu prídavku nervového tkaniva, ktoré nachádza významné uplatnenie pri identifikácii bovinnej spongiformnej encefalopatie (Wenisch, 1999; Koolmees, 2002).

### 4) Kvantifikácia zložiek potravín

Štúdium možností využitia histologických metód pre kvantitatívne stanovenie súčastí mäsových výrobkov a taktiež porovnávanie ich výsledkov s chemickými metódami bolo základom množstva prác publikovaných v 70. a 80. rokoch. Napríklad v práci Koolmeese a Bijkera (1985) boli diskutované výhody a nevýhody použitia histometrických a chemických metód pre stanovenie podielu kolagénneho väziva v mäsových výrobkoch, podľa autorov boli obidve metódy rovnako hodnotné a každá mala aj určité nedostatky. Histometrické vyšetrenie však

poskytovalo komplexnejší obraz o zložení výrobku. Pomocou histometrie a planimetrie bol stanovený tiež podiel hovädzieho mäsa (prátu) v modelových vzorkách (Schingnitz and Hildebrandt, 1985). Kvantitatívnu analýzu umožňujú rovnako aj metódy založené na štatistických výpočtoch označované súhrnne ako stereológia, ktoré boli úspešne aplikované napríklad na kvantifikáciu sójového textúrovaného proteínu (Flint, 1987). Medzi ďalšie v odbornej literatúre popisované mikroskopické kvantitatívne vyšetrenia patrí využitie obrazovej analýzy. Bolo použité pre hodnotenie mäsa a mäsových výrobkov ako metóda pre získavanie objektívnych a presných výsledkov, ktoré sú porovnateľné s údajmi zistenými chemickými metódami. Dochádza u nich totiž k vynechaniu chýb vzniknutých pri individuálnych posudzovaných rozdieloch hodnotiteľov. Diskutované aplikácie zahŕňajú napríklad objektívne stanovenie mramorovania mäsa (Albrecht et al., 1996) alebo meranie množstva parametrov u svalových vlákien, ktoré sú vhodné pre kontrolu kvality mäsa (Buche and Mauron, 1997). Pomocou obrazovej analýzy bolo určované množstvo sójového proteínu v pečenej paštike (Boutten et al., 1999) a ďalej bol stanovovaný obsah kolagénneho, elastického väziva a kostí v mäsových výrobkoch (Hildebrandt and Hirst, 1985), tzn. tkanív, ktoré ovplyvňujú kvalitu výrobku. Možnosť kvantitatívneho stanovenia súčastí potravín potvrdili v nedávnej dobe znovu Tremlová a Štarha (2002).

## LITERATÚRA

- ALBRECHT, E., WEGNER, J., ENDER, K., 1996. Eine neue Methode zur objektiven Bewertung der Marmorierung von Rindfleisch. *Fleischwirtschaft*, 1996, vol. 76, no. 1 p. 95 – 98.
- ARCHER, A. W., 1987. The adulteration of white pepper with rice starch. *Journal of the Association of public Analysts*, 1987, no. 25, p 43 – 46.
- AWAD, R. A., ABDEL-HAMID, L. B., EL-SHABRAWY, S. A., SINGH, R. K., 2002. Texture and Microtexture of Block Type Processed Cheese with Formulated Emulsifying Salt Mixtures. *Lebensmittel - Wissenschaft und Technologie*, 2002, vol. 35, No 1, p. 54 – 61.
- BOUTTEN et al., 1999. Quantification of Soy Proteins by Association of Immunohistochemistry and Video Image Analysis. *Food and Agricultural Immunology*, 1999, vol. 11, no. 1, p. 51 – 59.
- BUCHE, P., MAURON, D., 1997. Quantitative characterization of muscle fiber by image analysis. *Computer and Electronics in Agriculture*, 1997, vol. 16, no. 3, p 189 – 217.
- BRANSCHIED, V., JUDAS, M., WAGNER, H., TROEGER, K., 2008. Investigations on the characterisation of mechanically deboned broiler meat. *Fleischwirtschaft*, 2008 vol. 33, no. 11, p. 106 – 111.
- BRANSCHIED, V., 2002. Demonstration of bone particles in mechanically deboned meat by polarisation microscopy. *Fleischwirtschaft*, 2002 vol. 8, no. 7, p. 92 – 95.
- CLAYTON E. G. *A Compendium of Food – Microscopy*. 1rd ed. London: Balliere, Tindall and Cox, 1909. 418 p.
- CURL, C. L., FENWICK, G. R., 1983. On the determination of papaya seed adulteration of black pepper. *Food Chemistry*, 1983, vol. 12, p. 241 – 247.
- ČERNÍKOVÁ, M., BUŇKA, F., POSPIECH, M., TREMLOVÁ, B., PAVLÍNEK, V., BŘEZINA, P., 2008. Možnosti využiti nízkoesterifikovaného pektinu jako

substituentu fosfátových tavicích solí ve výrobě tavených sýrů. In *Konference Mléko a Sýry*, 2008, Praha, p. 256 – 261.

FLINT, O., 1994. *Food Microscopy*. 1rd ed. Oxford: BIOS Scientific Publishers Limited, 1994. 144 p. ISBN 1 - 872748 - 04 - X.

FLINT, O. F., 1998. Meech, M. V. Quantitative determination of texturised soya protein by a stereological technique. *The Analyst*, 1978, vol. 103, no. 1224, p. 252 – 258.

HASSALL, A. H., *Adulterations Detected in Food and Medicine*. London: Longmans, Green, Longman and Roberts, 1857. 712p.

HEERTJE, I., LEUNIS, M., 1997. Measurement of shape and size of fat crystals by electron microscopy. *Food Science and Technology-Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*. 1997, vol. 30, no. 2, p. 141 – 146.

HILDEBRANDT, G., HIRST, L., 1985. Determination of the collagen, elastin and bone content in meat products using television image analyse. *Journal of Food Science*, 1985, vol. 50, no. 3, p. 568 – 572.

HORN, D., 1987. Zum Nachweis pflanzlicher Eiweisszubereitungen in Fleischerzeugnissen mit histologischen Untersuchungsverfahren. *Fleischwirtschaft*. 1987, vol. 67 no. 5, p. 616 – 618.

BÖHM, R., PLEVA, V., 1962. *Mikroskopie masa a surovin živočišného původu*. 2 upr. vyd. Praha: Statní nakladatelství technické literatury, 1962. 220 s.

KALÁB, M., WOJTAS, P. A., MILLER, S. S. 1995. Microscopy and other imaging techniques in food structure analysis. *Trends in Food Sciences and Technology*, 1995, vol. 6, no. 6, p. 177 – 186.

KALETUNC, G., BRESLAUER., 2003. *Characterization of Cereals and Flour*. 1rd ed. New York: Marcel Dekker, Inc, 2003. 523 p. ISBN 0 - 8247 - 0734 -6.

KATSARAS, K., 1994. Mikroskopická štruktúra mäsových výrobkov. *Slovenský veterinársky časopis*, 1994, roč. 19, č. 5, s. 233 – 239.

KOMÁR, A., 2005. *Technologie, zbožiznalství a hygiena potravin*. IV část. 1. upr. vyd. Brno: univerzita obrany Brno, 2005, .142s. ISBN 80-7231-032-1.

KOOLMEES, P. A., BIJKER, P. G. H., 1985. Histometric and chemical methods for determining collagen in meat. *Veterinary Quarterly*, 1985, vol. 7, no. 2, p 84 – 90.

TERSTEEG, M. H. G., KOOLMEES, P. A., KNAPEN, F., 2002. Immunohistochemical detection of brain tissue in heated meat products. *Meat science*, 2002, vol. 61, no. 1, p. 67 – 72.

LUKÁŠKOVÁ Z., POSPIECH M., TREMLOVÁ B., RANDULOVÁ Z., 2008. Imunohistochemické stanovení rostlinných bílkovin v masných výrobcích In *Proteiny 2008*, Zlín, p. 97 – 100.

MODLER, H. W., KALAB, M., 1983. Microstructure of yoghurt stabilized with milk proteins. *Journal of Dairy*

*Science*, 1983, vol.66, p. 430 – 437.

PICKERING, P., EVANS, C. L., HARGIN, K. D., STEWART, C. A. 1995. Investigation of methods to detect mechanically recovered meat in meat products 3 microscopy. *Meat science*, 1995, vol. 40, no. 3, p. 319 – 326.

POSPIECH, M., TREMLOVÁ, B., RENČOVÁ, E., 2007. Dôkaz sójovej bielkoviny v tepelne opracovaných mäsových výrobcích mikroskopickými metódami. In *IX Konferencia mladých vedeckých pracovníkov s mezinárodní účastí*, 2007, Brno, p. 24 – 27.

ROETMAN, K., 1979. Crystalline lactose and the structure of spray – dried milk products as observed by scanning electron microscopy. *Milk Dairy Journal*, 1979 vol. 33, p. 1 – 11.

SCHINGNITZ, H., HILDEBRANDT, G. FORMSCHINKEN, 1985. Modellversuche zur Untersuchung und Beurteilung. *Fleischwirtschaft*, 1985, vol. 65, p. 169 – 172.

SALTMARCH M., LABUZA T. P., 1985. SEM investigation on the storage properties of spray dried whey. *Scanning Electron Microscopy*, 1980, vol. 3, p. 659 – 665.

TREMLOVÁ, B., ŠTARHA, P., POSPIECH, M., BUCHTOVÁ, H., RANDULOVÁ, Z., 2006. Histological analysis of different kinds of mechanically recovered meat. *Archiv für Lebensmittelhygiene*, 2006, vol. 57, no. 5/6, p. 85 – 91.

TREMLOVÁ, B., ŠTARHA, P., 2002. Die Bewertung der histologischen Methoden zum Nachweis der pflanzlichen Bestandteile in den Fleischerzeugnissen mit Rücksicht auf die Anwendung des Bild-Analyse-Systems In 43. *Arbeitstagung des Arbeitsgebietes „Lebensmittelhygiene“*. Garmisch : Partenkirchen, 2002, p. 838 – 842.

WALLIS T. E., 1923. *Analytical Microscopy: its Aim and Method*. 1st edn. London: Edward Arnold and Co. 1923. 215 p.

WENISCH, S., LUCKER, E., EIGENBRODT, E., LEISER, R., BULTE, M., 1999. Detection of central nervous tissue in meat products – An immunohistochemical approach. *Nutrition research*, 1999, vol. 19, no. 8, p. 1165 – 1172.

WINTON A. L., WINTON K. B., 1939. *The structure and Composition of Foods* 4st edn. New York: John Wiley and Sons, 1939. 225p.

ZÁLEŠÁK, H., MARUŠKA, J., 1956. *Zkoušení a posuzování potravin*. 1 vyd. Praha: Práce, 1956, s. 197 – 226.

**Pod'akovanie:** Práca je podporovaná Výzkumným záměrem MŠMT č. 6215712402 (Veterinární aspekty bezpečnosti a kvality potravin).

**Kontaktná adresa:** MVDr. Matej Pospiech tel. 541 562 704, e-mail. mpospiech@vfu.cz VFU Brno, Ústav vegetabilních potravin a rostlinné produkce, Palackého 1 – 3, 612 42 Brno

### **INFLUENCE OF IRRADIATED WITH MICROWAVES ON COLOR OF POTATO MALTODEXTRINES WITH DIFFERENTIAL VALUE OF DEXTROSE EQUIVALENT (DE)**

*Izabela Przetaczek, Jacek Rożnowski, Teresa Fortuna*

### **ABSTRACT**

Color is a dominant feature of groceries, therefore the objective of the study was to investigate the effect of irradiated with microwaves on color of potato maltodextrines. The initial material for the study were commercial maltodextrines with differential DE. All of maltodextrines were irradiated with microwaves (440 W or 800 W), then were investigated range of color changing. The color of the samples was measured using a spectrophotometer X-Rite Incorporated (USA), type X-Rite Color i5 fitted with a 10 mm diameter and standard

observer 10° (CIE 1964). Maltodextrines` color was measured in CIELAB and SPEX system using illuminant D<sub>65</sub>. In general, the value of Dextrose Equivalent and power microwaves influenced on range of color changing. Irradiation at 800 W caused to rise of value of units a\* and b\* for all of maltodextrines and reduced lightness.

**Keywords:** maltodextrines, colour, irradiated with microwaves

**INTORUCTION**

Among all of humane senses, an eyesight is responsibility for making a decision about accept or not a groceries [Abdullah & al. 2001, Roźnowski 2006, Segnini & al. 1999]. Color perception belongs to a subjective impressions which comes into existence as a consequence influence impulses on eyesight. Color is perceived as a result of a irritation of receptors which are in a eye by electromagnetic radiation [Mielicki 1997]. In order to eliminate a subjective perception, electronic instruments are used during color analyses [Mendoza & al. 2006, Roźnowski 2006]. However, results of color analyses are depending on optical configuration and standard observer. The color parameters were defined by Commission Internationale de l'Éclairage –CIE in 1931 [PN-65-N-01252]. In order to standardization color scale and reduction restraints the CIE in 1976 recommended to use CIELAB or CIELCH color spaces. The spaces are created on opposite color theory – color can not be green and red and can not be blue and yellow in the same time [Chen & al. 2002, Du and Sun 2004, Russ 2005, Sangwine 2000, Yam and Papadakis 2004].

The present study was designed to investigate the effect of irradiated with microwaves on color of potato maltodextrines with differential Dextrose Equivalent (DE).

**MATERIALS AND METHOD**

The experimental material were maltodextrines (below called as a commercial maltodextrines) obtained from Przedsiębiorstwo Przemysłu Ziemniaczanego NOWAMYL S.A. in Łobez and one maltodextrine which was made in a laboratory from potato starch obtained from Przedsiębiorstwo Przemysłu Spożywczego PEPEES S.A. in Łomża. The commercial maltodextrines had three different Dextrose Equivalents (DE). One of them (below Cl- commercial maltodextrine which value of DE was the lowest) had DE = 7, another one had DE = 17,18 (below Cm- commercial maltodextrine which value of DE was middle) and the last one had DE = 20,75 (below Ch-commercial maltodextrine which value of DE was the highest). The maltodextrine which was made in a laboratory (below Lm-Laboratory maltodextrine which value of DE was middle) were used as a comparison and its dextrose equivalent amounted to 17,47. The laboratory maltodextrine was a product from hydrolyses which were researched by using BAN 480L enzyme α-Amylase (EC 3.2.1.1) 480 KNU/g (Novozymes –Denmark)

All of maltodextrines were irradiated with microwaves (440 W or 800 W). After that a color were investigated by using spectrophotometer X-Rite Incorporated (USA), type X-Rite Color i5. During analyses were using illuminant D<sub>65</sub>, geometry diffuse/8° and standard observer 10° (CIE 1964) with a 10 mm diameter. Maltodextrines` color were measured in SPEX system (specular excluded).

All of maltodextrines which were not been irradiated with microwaves were model samples.

A register of abbreviations which were used in this paper:

- Cl Commercial maltodextrine with the lowest value of Dextrose Equivalent,
- Cm Commercial maltodextrine with middle value of Dextrose Equivalent,
- Ch Commercial maltodextrine with the highest value of Dextrose Equivalent,
- Lm Laboratory maltodextrine with middle value of Dextrose Equivalent,
- N Native maltodextrine
- 440 W Maltodextrine which were irradiated with microwaves power 440 W
- 800 W Maltodextrine which were irradiated with microwaves power 800 W
- SPEX Specular excluded

**RESULTS AND DISCUSSION**

CIELAB color space are described by L\*, a\* and b\* parameters. Value of L\* shows a lightness, a\*- balance between green or red color and b\* characterizes a blue or yellow color [Chen & al. 2002, Du & Sun 2004, Roźnowski 2006, Russ 2005, Sangwine 200, Yam And Papadakis 2004].

Table 1. shows values of L\* for native maltodextrines and maltodextrines irradiated with microwaves 440 W or 800 W. Values of parameters a\* and b\* were presented in Figure 1.

Our experiments reveal that value of L\* parameter of all native maltodextrines were above 92, 86 and irradiated maltodextrines at 440 W did not bring significantly changing about value of this parameter. However, irradiation maltodextrines at 800 W revealed significantly difference (tab.1)

**Table 1.** Parameters of L\* for native maltodextrines and maltodextrines irradiated with microwaves 400 W or 800 W

Samples	Commercial maltodextrines			Laboratory maltodextrine
	Cl	Cm	Ch	Lm
Native	92,97	93,16	92,86	93,11
Irradiated with 400 W	92,88	93,17	92,75	92,20
Irradiated with 800 W	88,51	89,58	85,01	85,78

The largest changing were observed for commercial maltodextrine with the highest value of DE. The product of starch hydrolyzes with the DE = 20,75 indicated the highest value of parameters a\* and b\*. (Fig.1).

The positive value of parameter a\* points out displacement color to red spaces on color space axis. Based on obtained value of parameters a\* it was found that irradiated at 800 W made all of maltodextrines which were material for that analyses look like more red color. The highest value of parameter a\* were characteristic for commercial maltodextrine which DE was the highest. Among all of maltodextrines which were irradiated with microwaves 800 W, the lowest value of parameter a\* had commercial maltodextrine with middle Dextrose Equivalent (Fig.1).

Maltodextrines irradiated with microwaves 800 W

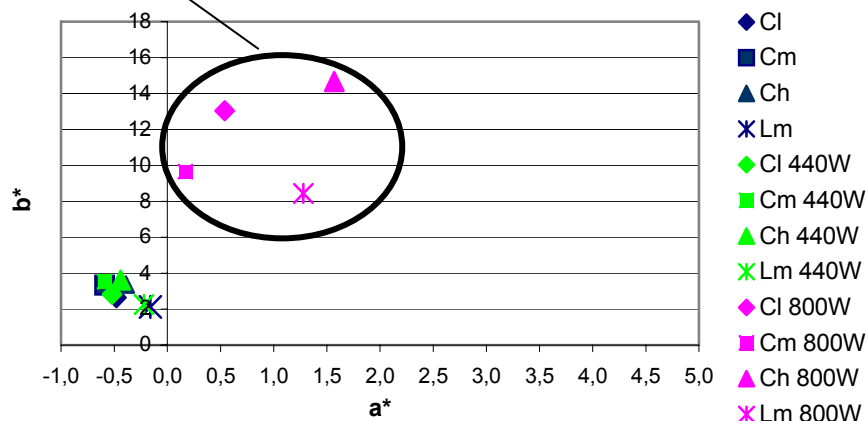


Figure 1.

Value of parameters a\* and b\* for native maltodextrines and irradiated with microwaves 440 W or 800 W

On the other hand, negative value of units a\* reveals greater contribute a greenness in tint. All of maltodextrines which were irradiated at 440 W showed slightly higher value of parameter a\* than native maltodextrines (Fig.1). Both native maltodextrines and irradiated with microwaves had positive value of units b\*. It means that color of them had not a blue pigment. Furthermore, irradiated maltodextrines at 440 W did not contribute changing of value of parameter b\*. However, increasing power to 800 W brought about significant rise of amount yellow pigment in maltodextrines which were modified with microwaves.

CONCLUSIONS

Value of colors` parameters were dependent on Dextrose Equivalent. Among commercial maltodextrines, this one with the highest DE had the highest value of units a\* and b\*. Maltodextrines modified by irradiation at 440 W did not change statistic significantly value of colors` parameters. Irradiation with microwaves 800 W caused value of maltodextrines a\* and b\* parameters to rise. Maltodextrines treated with 800 W microwaves showed much lower value of L\* parameter than non- irradiated maltodextrines.

REFERENCES

ABDULLAH, M. Z., GUAN, L. C., LIM, K. C., KARIM, A. A., 2001. The applications of computer vision system and tomographic radar imaging for assessing physical properties of food. *Journal of Food Engineering*, 61, 125-135.

CHEN Y. R., CHAO, K., KIM, M. S., 2002. Machine vision technology for agriculture applications. *Comput. Electron. Agric.*, 36, 173-191.

DU C. J., SUN D.W., 2004. Recent developments in the applications of image processing techniques for food quality evaluation. *Trends Food Science Technology*, 15, 230-249.

MENDOZA F., DEJMEK P., AGUILERA J. M., 2006. Calibrated color measurements of agricultural foods using image analysis. *Postharvest Biology and Technology*, 41, 285-295.

MIELICKI J., 1997. Zarys wiadomości o barwie. Fundacja Rozwoju Polskiej Kolorystyki, Łódź 1997. ISBN-83-908049-0-5 PN-65-N-01252 Liczbowe wyrażanie liczb.

ROŻNOWSKI J., 2006. Ocena barwy produktów spożywczych. *Laboratorium*, 5, 36-43.

RUSS J. C., 2005. Image Analysis of Food Microstructure. CRC Press LLC, New York, 369.

SANGWINE S. J., 2000. Colour in image processing. *Electron. Commun. Eg. J.*, 12, 211-219.

SEGNINI S., DEJMEREK P., ÖSTE R., 1999. A low cost video technique for color measurement of potato chips. *Lebensm. Wiss. U.-Technol.*, 32, 216-222.

YAM K. L., PAPADAKIS S. E., 2004. A simple digital imaging method for measuring and analyzing color of food surfaces. *Journal of Food Engineering*, 61, 137-142.

**Contact address:** dr inż. Izabela Przetaczek, dr Jacek Rożnowski, Prof. dr hab. Teresa Fortuna, Uniwersytet Rolniczy w Krakowie, Wydział Technologii Żywności, Katedra Analizy i Oceny Jakości Żywności, ul. Balicka 122, 30-149 Kraków

**Address of employer:** Uniwersytet Rolniczy w Krakowie, al. Mickiewicza 21, 31-120 Kraków

**DISTRIBUCE TOXICKÝCH PRVKŮ V ROSTLINÁCH BRAMBOR**  
**DISTRIBUTION OF TOXIC ELEMENTS IN POTATO PLANTS**

Otakar Rop, Pavel Valášek, Daniela Kramářová, Tünde Juríková

ABSTRACT

The target of our experiment was to monitor the content of arsenic, beryllium, cadmium, lead, nickel and mercury in potato plants. Concretely, the content of toxic elements in tops, tuber flesh and tuber peel was measured. The indicating plants were Impala, Krystala and Koruna variety. The highest content of toxic elements was statistically significant in tops. Within the tuber highest amount of toxic elements in peel was determined.

**Keywords:** potatoes, arsenic, beryllium, cadmium, lead, nickel, mercury

## ÚVOD

Brambory patří k plodinám, které jsou vůči zvýšenému obsahu cizorodých látek v půdě a atmosféře odolné. Při hodnocení negativních dopadů kontaminace prostředí na výnos je však třeba vycházet z toho, že výnos není rozhodujícím kritériem. Za daleko důležitější ukazatel jakosti je třeba považovat koncentrace cizorodých prvků v orgánech rostlin, které v částech určených pro konzum

důvodu se doporučuje používání hnojiv se síranovou formou (Richter, 1997). Na zvyšování obsahu kadmia v hlízách má vliv také zvyšující se množství sodíku v půdě. Podobně zvýšeným hnojením dusíkem (především amonnou formou) je stimulován příjem cizorodých látek (McLaughlin *et al.*, 1994). Vápnění je neefektivnějším prostředkem pro snižování fytotoxicity a obsahu těžkých kovů v bramborách, a to zejména na kyselých půdách

**Tabulka 1.** Agrochemická charakteristika použité zeminy

hodnota pH/KCl a průměrný obsah makroelementů (mg.kg <sup>-1</sup> )					
pH	dusík	fosfor	draslík	vápník	hořčík
6,80	17	33	122	2411	186
průměrný obsah toxických prvků (mg.kg <sup>-1</sup> )					
arsen	beryllium	kadmium	nikl	olovo	rtuť
1,37	0,62	0,21	13,11	19,58	0,01

**Tabulka 2.** Průměrný obsah toxických prvků v jednotlivých částech bramborové rostliny (mg.kg<sup>-1</sup> čerstvé hmoty) u odrůdy IMPALA

část rostliny	toxický prvek					
	arsen	beryllium	kadmium	olovo	nikl	rtuť
bramborová nať	0,110	0,044	0,050	0,251	0,610	0,019
slupky hlíz	0,009	0,004	0,020	0,060	0,030	0,008
dužnina hlíz	0,002	0,001	0,011	0,021	0,005	0,002

**Tabulka 3.** Průměrný obsah toxických prvků v jednotlivých částech bramborové rostliny (mg.kg<sup>-1</sup> čerstvé hmoty) u odrůdy KRYSTALA

část rostliny	toxický prvek					
	arsen	beryllium	kadmium	olovo	nikl	rtuť
bramborová nať	0,118	0,040	0,065	0,264	0,602	0,018
slupky hlíz	0,008	0,004	0,036	0,070	0,028	0,008
dužnina hlíz	0,002	0,001	0,013	0,020	0,009	0,002

**Tabulka 4.** Průměrný obsah toxických prvků v jednotlivých částech bramborové rostliny (mg.kg<sup>-1</sup> čerstvé hmoty) u odrůdy KORUNA

část rostliny	toxický prvek					
	arsen	beryllium	kadmium	olovo	nikl	rtuť
bramborová nať	0,106	0,049	0,069	0,238	0,614	0,020
slupky hlíz	0,010	0,004	0,037	0,064	0,027	0,010
dužnina hlíz	0,002	0,001	0,015	0,013	0,010	0,002

nesmějí překračovat limity platných hygienických směrnic (Purves *et al.*, 2004).

Při vysokém obsahu toxických prvků v prostředí dochází u brambor k jejich intenzivní kumulaci v jednotlivých pletivech. Potěšitelný je fakt, že se tyto látky hromadí mnohem více v nadzemních částech rostlin. Nejméně se potom ukládají v bramborových hlízách, tedy v konzumních orgánech (Rop, 2002).

Koncentrace toxických prvků v bramborových hlízách závisí kromě jejich obsahu v půdě a prostředí také na obsahu dalších látek. Nižší příjem cizorodých prvků byl zaznamenán na půdách s vysokým obsahem organické hmoty, kde dochází k vazbám na huminové kyseliny (Delschen a Werner, 1989). U brambor hnojených chloridovými formami draselných hnojiv byl zjištěn vyšší příjem zejména kadmia (Lodenus, 1989). I z tohoto

(Truby a Raba, 1990).

## MATERIÁL A METODIKA

Cílem měření bylo stanovit schopnost kumulace vybraných toxických prvků jednotlivými částmi bramborové rostliny. Konkrétně byly sledovány obsahy arsenu, berylia, kadmia, olova, niklu a rtuti.

Jako indikační plodiny byly zvoleny 3 odrůdy velmi raných brambor, a to IMPALA, KRYSTALA a KORUNA. Tyto odrůdy byly pěstovány ve vegetačních nádobách, které byly umístěny v kryté vegetační hale. Do každé nádoby bylo navažováno 10 kg stejné zeminy, jejíž agrochemická charakteristika je uvedena v tabulce 1.

Každá odrůda byla pěstována ve 20 opakováních. Bramborová nať a hlízy byly sklizeny v 90 dnech vegetace, kdy jsou v konzumní zralosti (Hamouz, 1994). Hlízy byly očištěny a zvlášť byly analyzovány slupky a

dužnina. Množství toxických prvků bylo měřeno také v nadzemní části. Sušina byla stanovena vysušením při  $105^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ . Pro zjištění obsahu toxických prvků bylo využito mineralizace na suché cestě, kdy získaný popel byl rozpuštěn v 10M  $\text{HNO}_3$  (pro stanovení arsenu v 6 M  $\text{HCl}$ ). Vlastní měření proběhlo na atomovém absorpčním spektrometru PHILIPS PU 9200X. Množství rtuti bylo stanoveno po mineralizaci in situ a proměření na atomovém absorpčním spektrometru pro stanovení rtuti AMA-254 (Novotný, 2000). Výsledky byly vyjádřeny v čerstvé hmotě. Výsledky chemických analýz byly zpracovány statisticky metodou analýzy variance (ANOVA). Pro vyhodnocení průkaznosti rozdílů byl použit Tukayův test při 5% hladině významnosti (Snedecor a Cochran, 1967).

### VÝSLEDKY A DISKUSE

Výsledky chemických analýz jsou uvedeny v tabulkách 2 - 4. Při porovnání výsledků chemických analýz je nejpatrnější vysoká kumulace toxických prvků v natí. Přitom nejvyšší obsahy byly zaznamenány u niklu, dále olova a arsenu. Nejnižší obsahy potom byly naměřeny u berylia a rtuti (Tab. 2 až 4). V hlízách se kumulovalo statisticky průkazně méně všech sledovaných prvků. Např. u niklu bylo jeho množství v natí odrůdy KORUNA na úrovni  $0,614\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  čerstvé hmoty, zatímco u slupky hlíz to bylo  $0,027\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  a v dužnině hlíz dokonce  $0,010\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ . Pro spotřebitele je důležitá také skutečnost, že právě slupky měly statisticky průkazně vyšší obsahy toxických prvků ve srovnání s dužninou, která je konzumní částí hlízy. Nejpatrnější byl tento fakt u odrůdy KORUNA v případě olova ( $0,064\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  ve slupce a  $0,013\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  čerstvé hmoty v dužnině).

Statistická průkaznost v kumulaci toxických prvků mezi odrůdami se neprokázala, s výjimkou kadmia. Toto potvrzuje výzkumy např. Bulinského (1991), který poukazuje na genetickou variabilitu odrůd brambor ve vztahu k množství kadmia v jejich pletivech. Toxické prvky jsou v dužnině bramborové hlízy rozmístěny poměrně rovnoměrně, přičemž zvýšený obsah se nachází ve slupce, a to v její vnější části (Hofele *et al.*, 1994). Všeobecně platí, že nejvyšší koncentrace cizorodých látek se vyskytují v malých hlízách. Čím je hlíza větší, tím více koncentrace těchto látek klesá (Davies a Crews, 1983).

Loupáním brambor se snižuje obsah většiny toxických prvků minimálně o 50 %. Podobně vařením nebo smažením se snižuje obsah toxických látek o 30 - 40 %. Přirozený obsah toxických prvků v hlízách, jestliže jsou tyto oloupany a kuchyňsky připraveny, popř. jsou vyřazeny nejmenší hlízy, nepředstavuje žádnou hrozbu pro zdraví člověka (Bokyouang, 1994). To se potvrdilo i v našem měření, kdy v žádném případě nebyly překročeny limitní hodnoty obsahu toxických prvků v bramborových hlízách dané českou a evropskou legislativou (Anonymus, 2001; Anonymus, 2004).

Pokud jsou půdy nadměrně kontaminovány některým toxickým prvkem, může tento způsobovat snížený či zvýšený příjem jiných živin nebo jiných toxických prvků. Také může dojít ke změnám v translokaci chemických sloučenin v hlízách a nadzemních částech. Velmi výrazně takto mohou působit zejména kadmium, arsen, olovo a beryllium (Rop, 2002).

I když brambory patří ve vztahu k toxickým prvkům k rostlinám odolným, jejich pěstování na kontaminovaných půdách s sebou přináší rizika zvýšeného obsahu těchto prvků v rostlinách. Stejně tak se může měnit chemická struktura i u jiných obsažených sloučenin. Proto je třeba hledat cesty, jak tyto prvky v půdě imobilizovat a omezit tak jejich příjem a ukládání v hospodářsky významných orgánech.

### ZÁVĚR

Brambory patří k rostlinám, které mohou ve zvýšeném množství hromadit toxické prvky. Za účelem našeho měření jsme stanovovaly jejich obsahy v natí bramborových rostlin a dále ve slupkách a dužnině bramborových hlíz. Ze spotřebitelského hlediska je potěšitelné, že nejvyšší množství toxických prvků se kumulovalo v nadzemních částech. Naopak nejméně to bylo v dužnině hlíz, a to i ve srovnání se slupkou. Loupání bramborových hlíz je tak významným faktorem snižování rizikových složek v potravním řetězci. U žádného vzorku brambor nebyly v hlízách překročeny limitní koncentrace toxických prvků dané českou a evropskou legislativou.

### LITERATURA

Commission Regulation (EC) No 466/2001 of 8 March 2001 setting maximum levels for certain contaminants on foodstuffs.

Vyhláška Ministerstva zdravotnictví ČR 305/2004 Sb., kterou se stanoví druhy kontaminujících a toxikologicky významných látek a jejich přípustné množství v potravinách.

BOKYOUANG, K., 1994. Survey on the natural content of heavy metal in potato and sweet potato and their cultivated soils. *RDA Journal of Agricultural Science, Soil and Fertilizer*, 36 (4), 1994, pp. 302 - 309.

BULINSKI, R., 1991. Ocena skazenia metalami ciezkimi krajowych ziemniakow pochodzacych z roznych rejonow Polski. *Roczniki Panstwowego Zakladu Higieny*, 42 (1), 1991, s. 351 - 360.

DAVIES, B. E., CREWS, H. M., 1983. The contribution of heavy metals in potato peel to dietary intake. *Science of the Total Environment*, 30 (6), 1983, pp. 261 - 264.

DELSCHEN, T., WERNER, W., 1989. Zur aussegekraft der Schwermetallsgrenzwerte in klarschlammgedungen Boden. Mitteilung: Einfluss verschiedener Bodenparameter auf die tolerierbaren, königwasserlöslichen Gesamtgehalte. *Landwirtschaftliche Forschung*, 42 (1), 1989, s. 29 - 39.

HAMOUI, K., 1994. Základy pěstování konzumních a průmyslových brambor. Praha, Ministerstvo zemědělství ČR, 1994, 56 s.

HOFELE, J., SIETZ, M., GROTE, M., JANSSEN, E., 1994. Investigations to the beryllium content of potatoes and soils. *Agrobiological Research*, 47 (3 - 4), 1994, pp. 273 - 279.

LODENIUS, M., H., 1989. Heavy metals in the soils: Interactions and long-term changes. In: *Ecological impact of acidification*, Budapest, 1989, pp. 131 - 136.

MCLAUGHLIN, M. J., PALMER, L. T., TILLER, K. G., BEECH, T. A., SMART, M. K., 1994. Increased soil-salinity causes elevated cadmium concentrations in field-grown potato tubers. *Journal of Environmental Quality*, 23 (5), 1994, pp. 1013 - 1018.

NOVOTNÝ, F., 2000. Metodiky chemických rozborů pro hodnocení kvality odrůd. Brno, ÚKZÚZ, 2000, 555 s.

PURVES, W., SADAVA, D., ORIANI, G. H., HELLER, H. C., 2004. Life: The Science of Biology. Sunderland, Sinauer Associates, 2004, 1121 pp.

RICHTER, R., 1997. Výživa a hnojení rostlin. Brno, MZLU, 1997, 158 s.

ROP, O., 2002. Výskyt cizorodých prvků v bramborách. Farmář, 8 (5), 2002, s. 26 – 28.

SNEDECOR, G. W., COCHRAN, W. G., 1967. Statistical Methods. Iowa, Iowa State University Press, 1967.

TRUBY, P., RABA, A., 1990. Heavy-metal uptake by vegetables from waste-water field near Freiburg.

*Agrobiological Research*, 43 (2), 1990, pp. 139 – 146.

Vytvořeno s přispěním VZ MSM 7088352101

**Kontaktní adresa:** Ing. Otakar Rop, Ph.D., Ústav potravinářského inženýrství, Fakulta technologická, Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, náměstí T.G. Masaryka 275, 762 72 Zlín, rop@ft.utb.cz

### **DIAZINON AND SELENIUM INTERACTION AND EFFECT ON RAT SERUM CHOLINESTERASE ACTIVITY AFTER AN PERORAL ADMINISTRATION**

*Branislav Šiška, Robert Toman, Jozef Golian, Jana Slivkova, Stefan Kováč, Michal Bošiak, Lubomir Belej*

#### **ABSTRACT**

In this study the effect of selenium and diazinon after single and common administration were evaluated. Laboratory rats in the age of 6 weeks (weighting approximately 150 g) were randomly divided into 4 groups. Each group consisted of 10 males. Animals in the first group were administrated with diazinon (Sigma, USA) in the amount of 40 mg/L of drinking water during the time period of 90 days. Animals in the second group were administrated with selenium in the form of Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> (Sigma, USA) in the amount of 5 mg/L of drinking water during the time period of 90 days. Animals in the third group were given a common mixture of diazinon (Sigma, USA) in the amount of 40 mg/L of drinking water and selenium in the form of Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> (Sigma, USA) in the amount of 5 mg/L of drinking water during the time period of 90 days. The fourth group served only as a control group and was not administrated with any experimental substance. All of the animals had access to feed and drinking water *ad libitum*. 91 days after starting of the treatment period, all animals were sacrificed, blood samples were taken from hearts to the sterile tubes and then centrifuged at 3500 rpm for 20 minutes to the blood serum. Catalytic activity of cholinesterase was determined with the using of Bio-La-Test<sup>®</sup>. Principle of this method is based on the process in which cholinesterase splits butyrylthiocholineiodide to butyric acid and thiocholineiodide. Thiocholineiodide reacts with dithio-bis-nitrobenzic acid to form a yellow coloration.

We observed statistically significant changes of cholinesterase catalytic activity in all of the experimental groups in comparison to control group. Catalytic activity decreased from 3.69  $\mu$ kat/L in control group to 1.18  $\mu$ kat/L in diazinon treated group. On the other hand, cholinesterase catalytic activity increased from 3.69  $\mu$ kat/L in control group to 4.39  $\mu$ kat/L in selenium treated group. In contrast to previous experimental group, we detected significant depression of cholinesterase catalytic activity also in diazinon+selenium treated group. Cholinesterase activity declined from 3.69  $\mu$ kat/L in control group to 1.16  $\mu$ kat/

**Keywords:** diazinon, selenium, cholinesterase catalytic activity, laboratory rats

#### **INTRODUCTION**

Diazinon (O,O-diethyl O-2-isopropyl-6-methylpyrimidin-4-yl phosphorothioate) belongs to the group of organophosphate insecticides, used to control cockroaches, fleas and ants. It is also used to control a wide variety of sucking and leaf eating insects. It is used on rice, fruit trees, sugarcane, corn, tobacco, potatoes and on horticultural plants. Diazinon has veterinary use against fleas and ticks.<sup>[1]</sup>

Organophosphorus pesticides, including also diazinon have harmful effect on nervous system through the inhibition of acetylcholinesterase. Acetylcholinesterase is the enzyme, which is necessary in process for controlling of nervous signals transfer. Lack of acetylcholinesterase causes accumulation of acetylcholine. Accumulation of this neurotransmitter on the connections between nerves and muscles causes uncontrolled muscular contraction and algospasmus, between nerves and glands causes continual secretion of these glands, while acetylcholine cumulation between certain nerve cells in a brain causes sensory behavior disorders.<sup>[1-3]</sup>

Most frequently described symptoms of acute diazinon toxicity are headaches, nausea, vertigo, blurred vision, feeling of pressure in chest, respiration problems, muscular weakness or convulsions, diarrhea and vomiting. Typical symptoms of irritated nervous system are confuse, anguish, melancholy and insomnia. Symptoms of chronic poisoning are always connected with depression of cholinesterase activity.<sup>[2,4]</sup>

Selenium is a typical biogenous element, which is necessary for all living organisms. However, selenium could act also as a toxic element, especially when it is present in organism in the surplus. Due to this fact selenium was considered to be strictly toxic and scientists did not deal with the benefits of selenium. Selenium essentiality was scientifically proven for the first time in 1957.<sup>[5]</sup>

Selenium is widely used in various industries, mostly in glass industry and electronic industry and it has been frequently used also as a part of inorganic pigments.<sup>[6]</sup> Elementary selenium does not have any function in living organisms and it is not absorbed by gastrointestinal tract of humans and animals. All of the known effects of selenium are accomplished through the specific selenoenzymes, or selenoproteins as are for example selenocystein, selenomethionin, or some another selenium compounds. Selenoenzymes protect cells against oxidative damage and act also the important role in the metabolic processes of the living organism through the changing of thyroid gland hormone thyroxin to its biological active form triiodothyronine. It has been proven that various selenium



compounds have also protective effect against certain kinds of a cancer. In spite of long term research, the mechanism of selenium caused protective effect against cancer diseases is still not cleared.<sup>[7-9]</sup>

Humans are probably not so sensitive for effect of increased amounts of selenium in comparison with animals. Irritation of eyes, nose and throat, digestive difficulties, vomiting, increased body temperature, sleepiness, psychoneurological symptoms, convulsion and death as the result of interrupted respiration are typical symptoms of acute selenium poisoning. Chronic toxicity of selenium compounds is usually linked with airways inflammation, pulmonary oedema, hemorrhage, dermatitis, dedentition, arthritis, depilation, headaches, psychoneurological symptoms and paralysis.<sup>[6, 10-11]</sup>

A lot of studies have mentioned that effects of various toxic compounds are dependent not only on their dose but also on mutual interactions with other compounds.<sup>[12-14]</sup>

The aims of the present work were to determine catalytic activity of cholinesterase in samples of blood serum after single peroral administration of diazinon, single peroral administration of selenium and common peroral administration of both substances in order to finding of some potential interaction between diazinon and selenium.

**MATERIAL AND METHODS**

Experiment was realized in the accredited breeding and experimental laboratory in the Department of Veterinary Disciplines of the Slovak Agricultural University. Laboratory rats (*Rattus norvegicus sp.*) were chosen as the experimental animal. Animals were fed with the special feed pellets M3 (Machal – Czech Republic) for laboratory mice and rats *ad libitum*. Drinking water was also accessible *ad libitum*. Rats were housed in plastic cages and exposed to 12-h light:12-h dark cycle, at room temperature of 18-22 °C.

Diazinon, purity 99%, was obtained from Sigma-Aldrich, USA. Sodium Selenite, purity 98%, was purchased from the same company.

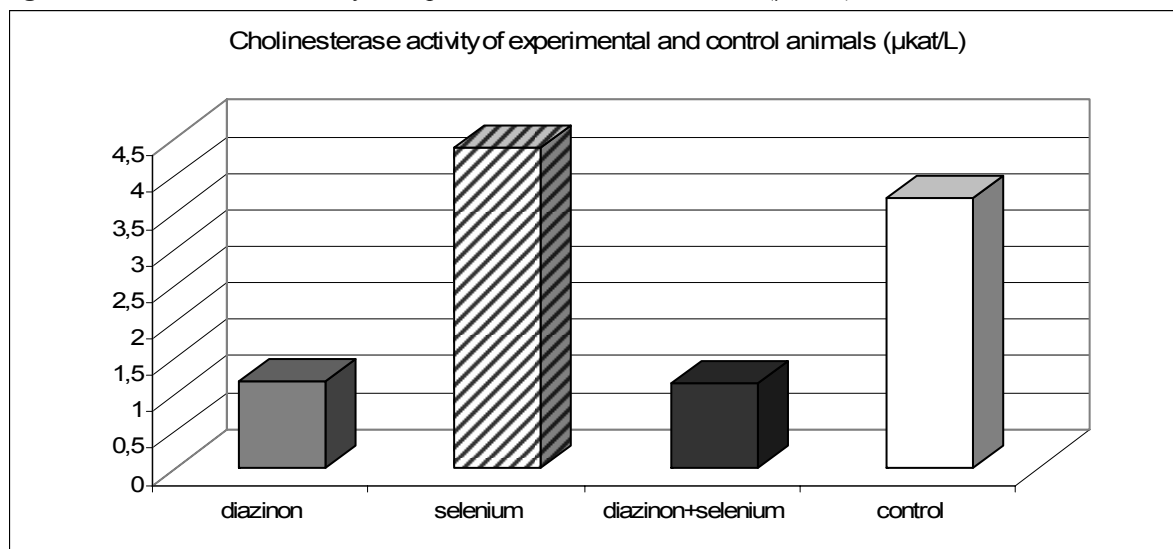
first group were administrated with Diazinon (Sigma, USA) in the amount of 40 mg/L of drinking water during the time period of 90 days. Animals in the second group were administrated with selenium in the form of Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> (Sigma, USA) in the amount of 5 mg Se/L of drinking water during the time period of 90 days. Animals in the third group were given a common mixture of diazinon (Sigma, USA) in the amount of 40 mg/L of drinking water and selenium in the form of Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> (Sigma, USA) in the amount of 5 mg Se/L of drinking water during the time period of 90 days. The fourth group served only as a control group and was not administrated with any experimental substance. All of the animals had access to feed and drinking water *ad libitum*.

91 days after starting of the treatment period, all animals were sacrificed, blood samples were taken from hearts to the sterile tubes and then centrifuged at 3500 rpm for 20 minutes to the blood serum.

Catalytic activity of cholinesterase was determined using the Bio-La-Test<sup>®</sup> (Lachema, CZ). This assay is based on the method published by Knedel and Böttger in 1967.<sup>[15]</sup> Principle of this method is based on the process in which cholinesterase splits butyrylthiocholineiodide to butyric acid and thiocholineiodide. Thiocholineiodide reacts with dithio-bis- nitrobenzoic acid to form a yellow coloration. Reaction mixture consists of non-hemolytic blood serum and butyrylthiocholineiodide and dithio-bis-nitrobenzoic acid (warmed at 37 °C). The catalytic concentration of the enzyme is determined from the increase of absorbance of the incubation mixture between 30 and 90 seconds after start of the reaction at wavelength 405 nm. Data of the mean absorbance are calculated per 1 minute. Results of cholinesterase catalytic activity are presented in µkat/L.

Basic statistical characteristics – arithmetic mean, standard deviation and variation coefficient were calculated for cholinesterase catalytic activities of each group. Obtained data were then processed in order to determinate statistical significance of the results. The F-test two sample for

**Figure 1** – Cholinesterase activity of experimental and control animals (µkat/L)



Laboratory rats (*Wistar*) in the age of 6 weeks (weighting approximately 150 g) were randomly divided into 4 groups. Each group consisted of 10 males. Animals in the

variances was used to compare the population variances. The Student’s t-test (two sample assuming equal

variances) was finally used for establishment of statistical significance.

**RESULTS AND DISCUSSION**

No deaths were observed in any of the experimental groups. Experimental animals from group 2 did not show any visible change of the behaviour in comparison with control group. On the other hand, behaviour of experimental animals from group 1 and group 3 was changed. These experimental rats were much more equanimous in comparison with control animals. This symptom could be probably connected with the depression of cholinesterase catalytic activity. Results of the determination of cholinesterase catalytic activity are presented in Table 1. Changes of cholinesterase catalytic activity were observed in each group of experimental animals in comparison with control animals. We observed statistically significant decrease of cholinesterase catalytic activity in group 1 from 3.69 µkat/L in control group to 1.18 µkat/L in group 1. In contrary, we detected significant increase (p<0.05?) of cholinesterase catalytic activity in selenium treated animals from 3.69 µkat/L in control group

itself but also in co-administration with selenium. This result is important due to the fact that selenium administration did not prevent against diazinon induced injury.

The protective effect of selenium against lead induced harmful impact on the activity of acetylcholinesterase had been studied on laboratory rats. The authors of this study observed positive influence of selenium administration on acetylcholinesterase inhibition caused by lead. This protective effect was not detected only during acute studies, but also in chronic experiments. [21] These finding are at variance with the results of our experiment, because cholinesterase catalytic activity in experimental group, that were administrated with diazinon+selenium, was even lower in comparison with a control group. It means that although selenium was able to increase catalytic activity of cholinesterase by itself, it was unable to prevent depression of cholinesterase activity caused by selenium.

Also another authors observed that in case of mixed intoxication with selenium and diazinon the ultrastructural

**Table 1** – Cholinesterase activity of experimental and control animals (µkat/L)

Group of animals	Cholinesterase activity X ± SD	Variation coefficient (%)
group 1 – diazinon	1.18 ± 0.33 ***	28
group 2 – selenium	4.39 ± 0.88 *	20
group 3 – diazinon+selenium	1.16 ± 0.20 ***	17
group 4 – control group	3.69 ± 0.53	14

X – arithmetic mean, SD – standard deviation, \* p-value<0.05, \*\*\* p-value<0.001

to 4.39 µkat/L in group 2. On the other hand, experimental animals from group 3 had significantly decreased levels of cholinesterase catalytic activity – from 3.69 µkat/L in control group to 1.16 µkat/L in group 3. These results are easily observable from Figure

Organophosphorus compounds irreversibly inhibit the enzyme acetylcholinesterase resulting in excessive accumulation of acetylcholine, leading to the paralysis of cholinergic transmission in the central nervous system, autonomic ganglia, parasympatic nerve endings, some sympathetic nerve endings and neuromuscular junction. [16] This implication is in accordance with our observations. Muscular weakness, confuse and lethargy were typical symptoms that were observed on experimental animals in our assay. Diazinon is well known to exert its toxic effects by inhibiting cholinesterase activity in plasma, erythrocytes and brain [17-20]. During the experiment on laboratory rats, diazinon significantly reduced pseudoacetylcholinesterase activity. [18]

According to a large number of experiments, selenium is a relatively protective factor or antagonistic element against harmful impact of various toxicants. In the past years, increasing considerations has been given to the interactions occurring in the organism between toxic and essential substances. [21]

In our study, there was demonstrated that diazinon significantly reduced cholinesterase activity not only by

changes were even more intensive than those induced by one factor only. [22]

On the other hand, selenium administrated with mercury and arsenic reduced or reversed the inhibition of acetylcholinesterase activity caused by these elements. This effect is probably mediates through the ability of some selenium compounds such as cysteine, selenocysteine etc. to bind heavy metals such as mercury, nickel, cadmium, lead, arsenic and reduce their toxicity. [23-25]

An increasing number of researchers have pointed out that the effects of toxic substances depend not only on their administration levels but also on the interaction with other substances. The effect of certain substance in the mixture with another one could not be the same, but the second substance could reacts as the antagonist, or synergist. Selenium will either increase or decrease toxicity of various xenobiotics, including pesticides, depending on its amounts introduced into an organism. [22] Also in our opinion, this fact is strongly affected not only by the dose of administrated selenium but also on the co-administrated substance. According to recent findings, diazinon toxicity is particularly related not only with acetlylcholinesterase inhibition, but also with oxidative stress. [1] Also selenium administrated into organism in higher amounts is able to induce oxidative stress and toxicity. [26] Toxicity of selenium occurs due to its prooxidant ability to catalyze

the oxidation of thiols and simultaneously generates superoxide.<sup>[8]</sup> Thus, selenium is probably able to affect the atom of sulphur in the molecule of diazinon and amplifies the diazinon toxicity.

### CONCLUSION

Cholinesterase catalytic activity of laboratory rats that were administered to diazinon during 90 days significantly decreased. Catalytic activity of those animals that were administered to selenium during 90 days significantly increased and those, that were administered to common mixture of diazinon and selenium significantly decreased.

According to our observations we could conclude that selenium administration did not prevent diazinon induced depression of cholinesterase activity. Further studies are needed to display the exact mechanism of selenium and diazinon interactions.

### REFERENCES

- ÜNER, N., ORUÇ, E. Ö., SEVGILER, Y., ŞAHİN, N., DURMAZ, H., USTA, D., 2006. Effect of diazinon on acetylcholinesterase activity and lipid peroxidation in the brain of *Oreochromis niloticus*. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 2006, 21, 241-245.
- TOMLIN, C.D.S. THE PESTICIDE MANUAL., 1997. A World Compendium. Farnham: *British Crop Protection Council*, 1997, 1606.
- KOUSBA, A.A., POET, T.S., TIMCHALK, CH. 2006. Age-related brain cholinesterase inhibition kinetics following in vitro incubation with chlorpyrifos-oxon and diazinon-oxon. *Toxicol. Sci.* 2006, 95, 147-155.
- GALLO, M.A., LAWRYK, N.J., 1991. Organic phosphorus pesticides. In *Handbook of Pesticide Toxicology*, Hayes, W. J. Jr., Laws, E. R. Jr., Academic Press: New York, 1991, 3-5.
- MOSNACOVA, J., 2003. Selenium in foods. Food Research Institute: Bratislava, 2003, 36.
- MERIAN, E., 1991. Metals and Their Compounds in the Environment. VCH Verlagsgesellschaft: Weinheim, 1991, 1438.
- BEHNE, D., KYRIAKOPOULOS, A., 2001. Mammalian selenium-containing proteins. *Annu. Rev. Nutr.* 2001, 21, 453-473.
- YU, R., YANG, CH., CHEN, X., 2006. DNA damage, apoptosis and C-myc, C-fos, and C-jun overexpression induced by selenium in rat hepatocytes. *Biomed. Environ. Sci.* 2006, 19, 197-204.
- CSER, M. A., SZIKLAILASZLO, I., MENZEL, H., LOMBECK, I., 1996. Selenium and glutathione peroxidase activity in Hungarian children. *J. Trace Elem. Med. Biol.* 1996, 10, 167-173.
- YOUNG, V. R., 1981. Selenium: A case for its essentiality. *New Engl. J. Med.* 1981, 304, 1228-1230.
- GLOVER, J., LEVANDER O., PARIZEK, J., VOUK, V., 1979. Selenium. In *Handbook of the Toxicology of Metals*. Friberg, L., Nordberg, G.F., Vouk, V.B, Elsevier/North Holland Biochemical Press: Amsterdam, 1979, 557-577.
- CABAÑERO, A.I., MADRID, Y., CÁMARA, C., 2005. Effect of animal feed enriched with Se and clays on Hg bioaccumulation in chickens: In vivo experimental study. *J. Agric. Food Chem.* 2005, 53, 2125-2132.
- JOHNSTON, D., WALKER, CH., DAWSON, A., 1994. Interactive effect between ebi fungicides (prochloraz, propiconazole and penconazole) and op insecticides (dimethoate, chlorpyrifos, diazinon and malathion) in the

hybrid red-lagged partridge. *Environ. Toxicol. Chem.* 1994, 13, 615-620.

WALKER, CH., JOHNSTON, G. O., 1993. Dawson, A. Enhancement of toxicity due to the interaction of pollutants at the toxicokinetic level in birds. *Sci. Total Environ.* 1993, 1, 525-531.

KNEDEL, M., BÖTTGER, R., 1967. Eine kinetische methode zur beder aktivitat der pseudocholinesterase (acetylcholinacyl 3.1.1.8). *J. Mol. Med.* 1967, 45, 325-327.

VISHWANANTHAN, R., SRINIVASAN, V., 1964. Treatment of OP compound poisoning. *J. Indian Med. Assoc.* 1964, 43, 494-497.

TOMOKUNI, K., HASEGAWA, T., 1985. Diazinon concentrations and blood cholinesterase activities in rats exposed to diazinon. *Toxicol. Lett.* 1985, 25, 7-10.

KALANDER, Y., UZUNHISARCIKLI, M., OGUCTU, A., ACIKGOZ, F., 2006. Kalandar, S. Effect of diazinon on pseudocholinesterase activity and haematological indices in rats: The protective role of Vitamin E. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 2006, 22, 46-51.

DAVIES, D. B., HOLUB, B.J., 1980. Toxicological evaluation of dietary diazinon in the rat. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 1980, 9, 637-650.

SHIN, S. W., CHUNG, N. I., KIM, J. S., CHON, T. S., KWON, O. S., LEE, S. K., KOH, S. CH., 2001. Effect of diazinon on behaviour of japanese medaka (*Oryzias latipes*) and gene expression of tyrosine hydroxylase as a biomarker. *J. Environ. Sci. Health* 2001, B36, 783-795.

ANI, M., MOSHTAGHIE, A. A., AGHADAVOOD, M., 2007. Protective effects of selenium and zinc on the brain acetylcholinesterase activity in lead intoxicated rat. *Res. Pharm. Sci.* 2007, 2, 80-84.

SZAREK, J., PRZYBYLSKA-GORNOWICZ, B., ZASADOWSKI, A., FABCZAK, J., 1997. Effects of a mixed administration of selenium and diazinon on the ultrastructure of hepatocytes in rat. *Scan. J. Lab. Anim. Sci.* 1997, 24, 6-10.

DEMERDASH, E., 2001. Effect of selenium and mercury on the enzymatic activities and lipid peroxidation in brain, liver and bloods of rat. *J. Environ. Sci. Health* 2001, B36, 489-499.

ROY, S., CHATTORAJ, A., BHATTACHARYA, S., 2006. Arsenic-induces changes in optic tectal histoarchitecture and acetylcholinesterase – acetylcholine profile in *Channa punctatus*: amelioration by selenium. *Comp. Biochem. Physiol.* 2006, C144, 16-24.

CHEN, J., BERRY, J., MARLA, M., 2003. Selenium and selenoproteins in the brain and brain disease. *J. Neurochem.* 2003, 86, 1-12.

ZHONG, W., OBERLEY, T. D., 2001. Redox-mediated effect of selenium on apoptosis and cell cycle in the LNCaP human prostate cancer cell line. *Cancer Res.* 2001, 61, 7071-7078.

**Acknowledgement:** This research is supported by a grant from Scientific Grant Agency of Ministry of Education of the Slovak Republic and Slovak Academy of Sciences, VEGA 1/3475/06.

Kontaktná adresa: Ing. Branislav Šiška, Katedra hygieny a bezpečnosti potravín FBP, SPU, Trieda A. Hlinku 2,949 76 Nitra

**Contact address:** Ing. Branislav Šiška, Katedra hygieny a bezpečnosti potravín, FBP SPU Nitra, e-mail: branislav.siska@gmail.com

**VPLYV VONKAJŠÍCH FAKTOROV  
NA TVORBU BIOFILMU  
BAKTERIÁLNYCH  
KONTAMINANTOV  
EFFECT OF EXTERNAL FACTORS  
ON BIOFILM FORMED BACTERIAL  
CONTAMINANTS**

Katarína Urdová, Janka Koreňová

**ABSTRACT**

Results of effect of temperature (20°C, 37°C) and time of incubation (1, 3, 6, 8 days) on biofilm formation by technological bacterial contaminants on polystyrene microtitre-plate in this study are presented.

Temperature of incubation 20°C supported of biofilm formation by G<sup>-</sup> bacteria. 18 - 24 hours was optimal time of incubation bacterial suspension for obtain highest biomass of biofilm.

**Keywords:** biofilm, *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, crystal violet

**ÚVOD**

Adhézia a následná kolonizácia baktérií na povrchoch vo forme biofilmu môže spôsobovať ich odolnosť voči sanitálnym procesom a stávajú sa dôležitým zdrojom bakteriálnej kontaminácie priamo z výrobného prostredia (Bagge, 2004; Lindsay, 2002; Ammor 2004; Sharma, 2004).

Niektoré mikroorganizmy majú prirodzene vyššiu

tendenciu produkovať biofilm ako iné, ale zároveň nie je vylúčená schopnosť priľnavosti na tuhý povrch každého mikroorganizmu za vhodných podmienok (Wirtanen, 2005). Vhodné podmienky predstavuje druh materiálu tuhého povrchu, teplota prostredia (4° až 37 °C), čas tvorby biofilmu ( 18h až niekoľko dní), vplyv prísunu čerstvých živín (Boruckii, 2003; Toledo-Arana, 2001; Chavant, 2004; Ryu, 2005).

Cieľom našej práce bolo zistiť vplyv teploty a doby inkubácie na tvorbu biofilmu bakteriálnymi izolátmi z potravinárskych výrobní v laboratórnych podmienkach na priehľadnom polystyréne..

**MATERIÁL A METÓDY**

4 kmene G<sup>+</sup> baktérií *Staphylococcus sp.*, tri G<sup>-</sup> baktérie čeľade *Enterobacteriaceae* a 1 kmeň rodu *Pseudomonas aeruginosa* boli izolované z pracovných povrchov ovčiarских a mäsiarskych výrobní. Po 24 hodinovej tvorbe biofilmu pri 37°C boli kmene klasifikované ako silne tvoriace, slabo tvoriace biofilm a netvoriace biofilm, podľa zodpovedajúcej hodnoty absorbancie nameranej po kvantifikácii metódou farbenia s kryštálovou violeťou (Koreňová, 2008), (tab. 1).

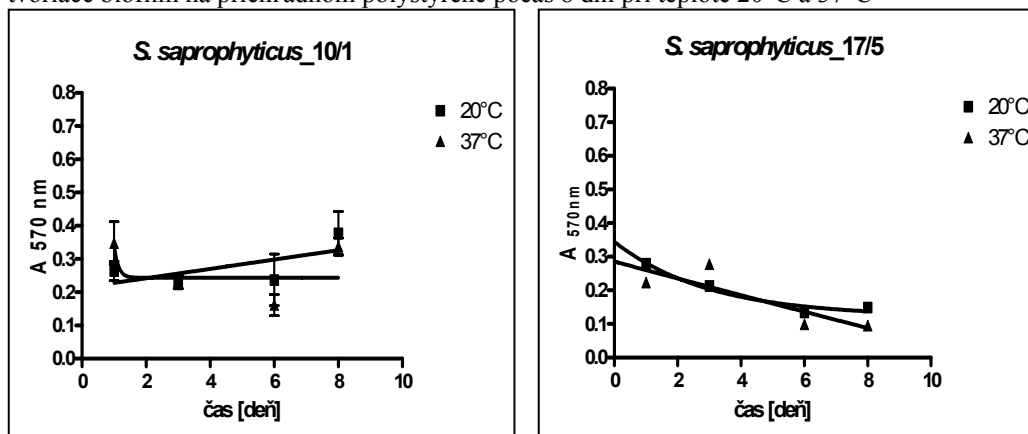
Ako vzorky tuhého materiálu boli použité 96-jamkové mikrotitračné platničky z priehľadného polystyrénu. Po nanosení štandardnej bakteriálnej suspenzie (10<sup>8</sup> b/ml) prebiehala tvorba biofilmu počas inkubácie 1, 3, 6 a 8 dní pri teplote 37 °C a 20 °C.

Na kvantifikáciu biofilmu bola použitá spektrofotometrická metóda farbenia s kryštálovou violeťou. Skúšané povrchy s biofilmom sa oplachovali tlmivým roztokom PBS na odstránenie voľných buniek. Adherované bunky sa farbili prídavkom 1% etanolickeho

**Tab. 1:** Klasifikácia baktérií podľa hodnoty absorbancie (A 570 nm) nameranej po kvantifikácii biofilmu metódou farbenia s kryštálovou violeťou po 24 hodinách kultivácie pri 37°C.

Tvorba biofilmu	Zodpovedajúce hodnoty A 570 nm po 24h	Kmene G <sup>+</sup> baktérií	Kmene G <sup>-</sup> baktérií
Silne tvoriace	> 0,1	<i>Staphylococcus saprophyticus</i> 10/1; 17/5	<i>Escherichia coli</i> 7/KS <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 2/13
Slabo tvoriace	0,04 – 0,09	<i>Staphylococcus aureus</i> 4/3	<i>Escherichia coli</i> 5/5
Netvoriace	< 0,039	<i>Staphylococcus saprophyticus</i> 7/2	<i>Citobacter sp.</i> 2/9

Obr.1, 2: Kvantita biomasy biofilmu vytvoreného G<sup>+</sup> baktériami, klasifikovanými ako silne tvoriace biofilm na priehľadnom polystyréne počas 8 dní pri teplote 20°C a 37°C

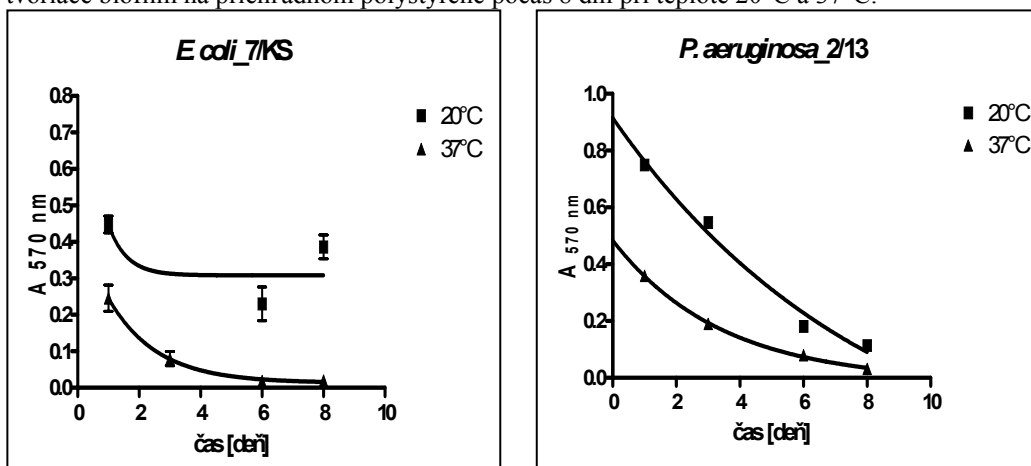


roztoku kryštálovej violete. Po odstránení voľného farbiva oplachmi vodou sa naviazané farbivo rozpustilo v etanolovo – acetónovej zmesi (80 : 20) a zmerala sa absorbancia ( $A_{570 \text{ nm}}$ ) na spektrofotometri ELx808IU (BioTek, Winooski, Vermont, USA) (Toledo- Arana, 2001).

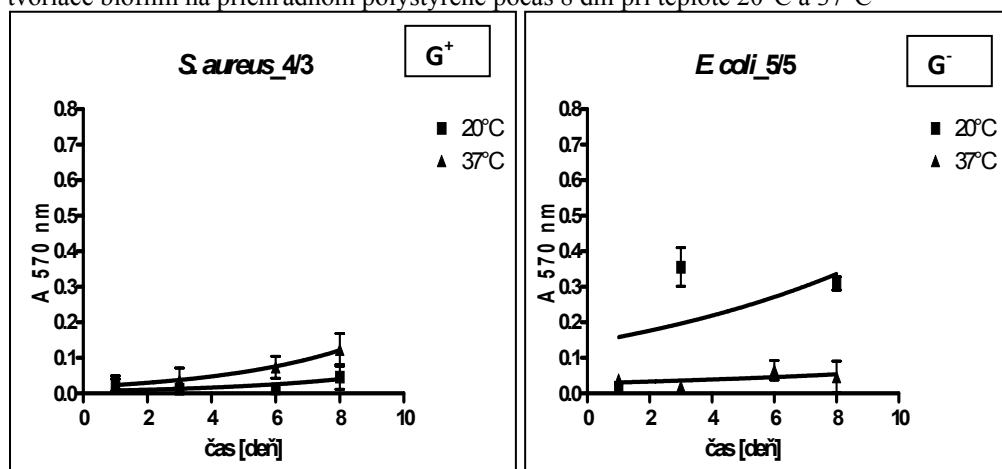
### VÝSLEDKY A DISKUSIA

Z výsledkov skúšania vyplýva, že kvantita biomasy biofilmu v závislosti od teploty a času je individuálna pre každý kmeň. Všeobecne je však možné povedať, že u  $G^+$  kmeňov stafylokokov silne tvoriacich biofilm je pri  $37^\circ\text{C}$  aj  $20^\circ\text{C}$  rovnaká a so stúpajúcou dĺžkou doby kultivácie má tendenciu mierne klesať (Obr. 1, 2). Tento jav je potvrdený údajmi z literatúry, so záverom, že kultivácia biofilmu stafylokokov dlhšia ako 24 hodín môže

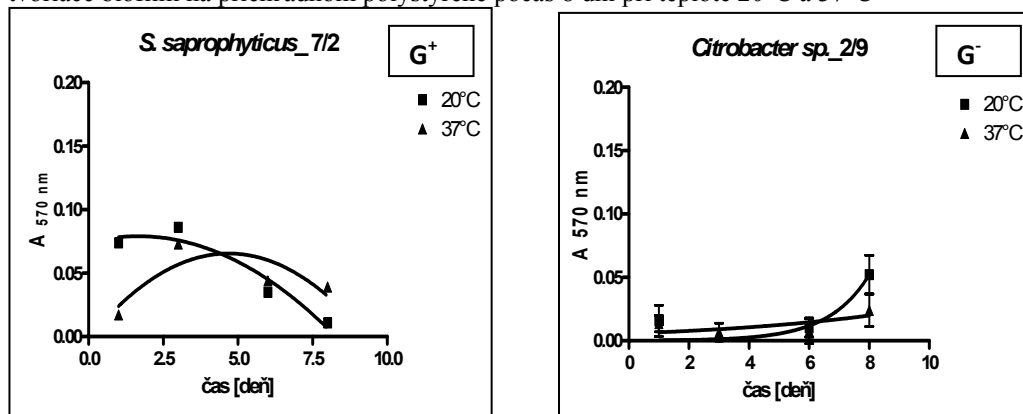
Obr.3, 4: Kvantita biomasy biofilmu vytvoreného  $G^-$  baktériami, klasifikovanými ako silne tvoriace biofilm na priehľadnom polystyréne počas 8 dní pri teplote  $20^\circ\text{C}$  a  $37^\circ\text{C}$ .



Obr.5 a 6: Kvantita biomasy biofilmu vytvoreného baktériami klasifikovanými ako slabó tvoriace biofilm na priehľadnom polystyréne počas 8 dní pri teplote  $20^\circ\text{C}$  a  $37^\circ\text{C}$



Obr.7 a 8: Kvantita biomasy biofilmu vytvoreného baktériami klasifikovanými ako slabó tvoriace biofilm na priehľadnom polystyréne počas 8 dní pri teplote  $20^\circ\text{C}$  a  $37^\circ\text{C}$



sposobovať nehomogenitu a neskôr odlučovanie biofilmu od povrchu, čo vedie k falošne negatívnym výsledkom (Hola, 2006, Růžička 2006). Pre skúšané G<sup>-</sup> baktérie bola zaznamenaná výrazne vyššia tvorba biomasy biofilmu pri 20 °C, taktiež klesajúca v čase (Obr. 3, 4).

G<sup>+</sup> kmeň vyhodnotený po 24 hodinovej kultivácii ako slabotvoriaci biofilm so stúpajúcou dĺžkou doby kultivácie, ani v závislosti od teploty podstatne nezvyšuje kvantitu biofilmu, zatiaľ čo skúšaná G<sup>-</sup> baktéria slabotvoriaca biofilm preukazuje stúpajúcu kvantitu utvoreného biofilmu v čase pri teplote 20 °C (Obr. 5, 6).

Kmene G<sup>+</sup> a G<sup>-</sup> baktérií netvoriace biofilm po 24 hodinách kultivácie, pri oboch skúšaných teplotách po ôsmich dňoch kultivácie vykazujú mierne zvýšenie, alebo zníženie adherovanej biomasy. Nameraná absorbancia po farbení biofilmu však nedosahuje hodnoty, ktoré by boli z hľadiska tvorby biofilmu zaujímavé (Obr. 7, 8).

### ZÁVER

Kmene baktérií silne tvoriace biofilm preukazovali rovnaký priebeh tvorby biomasy biofilmu v čase 1 - 8 dní, resp. mierny pokles tvorby biomasy. Teplota podporujúca tvorbu biofilmu u G<sup>-</sup> baktérií je 20 °C. Kmene baktérií slabotvoriace biofilm preukazovali mierny vzostup tvorby biomasy biofilmu v čase 1 - 8 dní, pre G<sup>-</sup> baktérie teplota podporujúca tvorbu biofilmu je 20 °C. Kmene baktérií netvoriace biofilm preukazovali nevýznamný mierny vzostup absorbancie za 8 dní kultivácie pre G<sup>-</sup> baktérie pri 20 °C.

### LITERATÚRA

AMMOR, S., CHEVALLIER, I., LAGUET, A., LABADIE, J., TALON, R., DUFOUR, E., 2004. Investigation of the selective bactericidal effect of several decontaminating solutions on bacterial biofilms including useful, spoilage and/or pathogenic bacteria. *Food Microbiology*, 21, 2004, pp. 11-17.

BAGGE, D., HJELM, M., JOHANSEN, CH., HUBER, I., GRAM, L., 2001. *Shewanella putrefaciens* adhesion and biofilm formation on food processing surfaces. *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 2001, pp. 2319-2325.

BORUCKI, M. K., PEPPIN, J. D., WHITE, D., LOGE, F., CALL, D. R., 2003. Variation in biofilm formation among strains of *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 2003, pp. 7336-7342.

HOLA V., RUZICKA F., VOTAVA, M., 2006. Dynamic of biofilm formation in relation to nutrition, temperature and time. *Scripta medica*, 79, 2006 pp. 167-171.

CHAVANT, P.- GAILLARD – MARTINIE, B.-HEBRAUD, M., 2004. Antimicrobial effect of sanitizers against planktonic and sessile *Listeria monocytogenes* cells according to the growth phase. *FEMS Microbiology Letters*, 236, 2004, pp. 241-248.

KOREŇOVÁ, J., LOPAŠOVSKÁ, J., KUČHTA, T., 2008. Comparison of three microtitre plate-based methods for quantification of biofilm formation ability of bacteria contaminating food technologies. *Journal of Food and Nutrition Research*, 47, 2008, pp. 100-104.

LINDSAY, D., BRÖZEL, V. S., MOSTERT, J. F., VON HOLY, A., 2002. Differential efficacy of a chlorine dioxide - containing sanitizer against single species and binary biofilms of a dairy - associated *Bacillus cereus* and a *Pseudomonas fluorescens* isolate. *Journal of Applied Microbiology*, 92, 2002, pp. 352-361.

RŮŽICKA, F., 2006. Detekce tvorby biofilmu u stafylokoků a její význam v diagnostice. Dizertační práce vypracována na Mikrobiologickém ústavu LF a FN u sv. Anny v Brně, 2006, 115 s.

RYU, J. H., BEUCHAT, L. R., 2005. Biofilm formation and sporulation by *Bacillus cereus* on a stainless steel surface and subsequent resistance of vegetative cells and spores to chlorine, chlorine dioxide, and a peroxyacetic acid – based sanitizer. *Journal of Food Protection*, 68, 2005, pp. 2614-2622.

SHARMA, M., ANAND, S. K., 2002. Characterization of constitutive microflora of biofilms in dairy processing lines. *Food Microbiology*, 19, 2002, pp. 627-636.

TOLEDO - ARANA, A., VALLE, J., SOLANO, C., ARRIZUBIETA, M. J., CUCARELLA, C., LAMATA, M., AMORENA, B., LEIVA, J., PENADÉS, J. R., LASA, I., 2001. The enterococcal surface protein, Esp, is involved in *Enterococcus faecalis* biofilm formation. *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 2001, pp. 4538-4545.

WIRTANEN, G., SALO, S., 2007. Biofilm formation in food processes. In: Microbial Contaminants and Contamination Routes in Food Industry. 1st Open seminar arranged by Safoodnet. FP6-022808-2006, Jan 22., 23. 2007, Espoo, Finland

**Kontaktná adresa:** Ing. Janka Koreňová, Výskumný ústav potravinársky Bratislava, Biocentrum, Kostolná 7, 900 01 Modra, tel.: 00421 33 690 57 21, [korenova@vup.sk](mailto:korenova@vup.sk)

## Potravinárstvo

**ALICA BOBKOVÁ, RADOSLAV ŽIDEK, ERIKA FLIMELOVÁ,  
MAREK BOBKO, MICHAELA FIKOVÁ**  
VYUŽITIE PCR METÓDY NA DŮKAZ FALŠOVANIA Mlieka A Mliečnych  
VÝROBKOV ..... 1

**MICHAL BOŠIAK , RADOSLAV ŽIDEK , JOZEF GOLIAN**  
KVANTIFIKÁCIA SÓJE V POTRAVINÁCH POUŽITÍM REAL-TIME PCR..... 3

**JOZEF ČAPLA, PETER ZAJÁC, JOZEF GOLIAN, VLADIMÍR  
VIETORIS**  
TVORBA BIOFILMOV NA POVRCHOCH Z NEREZOVEJ OCELI V PROSTREDÍ  
POTRAVINÁRSKEHO PRIEMYSLU..... 5

**RÓBERT GERMUŠKA, MIRIAM VLČÁKOVÁ, SILVIA TÓTHOVÁ**  
MOŽNOSTI DETEKcie REZIDUÍ ROPNÝCH LÁTKOV V SLNEČNICOVOM OLEJI  
..... 7

**MÁRIA GREIFOVÁ, EVA KRAJČOVÁ, GABRIEL GREIF, JOLANA  
KAROVIČOVÁ, MARCELA KONTOVÁ, MARTIN TOMAŠKA**  
ANTIMIKROBIÁLNA AKTIVITA LAKTOBACILOV IZOLOVANÝCH ZO  
SUROVÉHO OVČIEHO A KRAVSKÉHO Mlieka ..... 10

**KRISTÝNA HLADKÁ, FRANTIŠEK BUŇKA, VENDULA  
PACHLOVÁ, PETRA VOJTÍŠKOVÁ, NATÁLIA KOSIBOVÁ,  
STANISLAV KRÁČMAR**  
MOŽNOSTI VYUŽITÍ DIKARBOXYLOVÝCH KYSELIN JAKO NÁHRADY  
TAVICÍCH SOLÍ PŘI VÝROBĚ TAVENÝCH SÝRŮ ..... 13

**IVANA ŠIMONOVÁ, JOLANA KAROVIČOVÁ, VLADIMÍR  
MASTIHUBA**  
VYUŽITIE ENZÝMOVÝCH PREPARÁTOV NA STANOVENIE INULÍNU..... 16

**MARCELA KONTOVÁ, MIROSLAV KOLOŠTA, MÁRIA  
GREIFOVÁ, GABRIEL GREIF, MARTIN TOMÁŠKA**  
KYSLOMLIEČNE KULTÚRY S PROTEKTÍVNÝMI VLASTNOSTAMI AKO  
PROSTRIEDKOV NA ZVÝŠENIE ZDRAVOTNEJ BEZPEČNOSTI SYROV..... 18

**JANKA KOREŇOVÁ**  
STANOVENIE ODOLNOSTI BAKTERIÁLNYCH BUNIEK VIAZANÝCH  
V BIOFILME VOČÍ DEZINFEKANTOM S VYUŽITÍM OVERENÝCH  
INŠTRUMENTÁLNYCH METÓD ..... 20

**ROMAN LABUDA, MICHAEL SULYOK, KRISTINA  
STEFANIKOVA, MARTINA SPODNIAKOVA**  
MOLD CHEESES OF ROQUEFORT TYPE; ARE THESE DAINTIES SAFE  
ENOUGH? ..... 23

**ROMAN LABUDA, GUENTHER JAUNECKER, MARTIN  
FREUDENSCHUSS, GEORG HÄUBL, MICHAEL SULYOK, GEORG  
MITTERER,**

FULLY LABELED STABLE ISOTOPE STANDARDS OF U-<sup>[13C17]</sup>-  
AFLATOXINS; A NEW SOLUTION FOR MORE PRECISE LC-MS ANALYSES  
..... 25

**ANDREA LAUKOVÁ, RENÁTA SZABÓOVÁ, VIOLA  
STROMPFOVÁ, MONIKA SIMONOVÁ, RUDOLF ŽITŇAN**  
CITLIVOSŤ *YERSINIA LIKE* BAKTÉRIÍ IZOLOVANÝCH Z RÝB KU  
ANTIMIKROBIÁLNYM SUBSTANCIÁM ..... 28

**ANDREA LAUKOVÁ, MONIKA SIMONOVÁ, VIOLA  
STROMPFOVÁ**  
BAKTERIOCIN PRODUKUJÚCI KMEŇ *STAPHYLOCOCCUS XYLOSUS*  
S03/1M/1/2, PERSPEKTÍVNE ADITÍVUM ..... 31

**VENDULA PACHLOVÁ, FRANTIŠEK BUŇKA, LEONA BUŇKOVÁ,  
EVA WEISEROVÁ, KRISTÝNA HLADKÁ, PETRA VOJTÍŠKOVÁ,  
STANISLAV KRÁČMAR**  
VLIV PRŮBĚHU ZRÁNÍ NA OBSAH VYBRANÝCH SLOŽEK  
V PŘÍRODNÍM SÝRU EIDAMSKÉHO TYPU..... 33

**SŁAWOMIR PIETRZYK, LESŁAW JUSZCZAK, TERESA FORTUNA,  
MICHAŁ DRUŹKOWSKI**  
THE INFLUENCE OF OXIDATION METHODS ON CONTENT OF MINERAL  
ELEMENTS IN STARCHES ..... 36

**MATEJ POSPIECH, BOHUSLAVA TREMLOVÁ, ZDENKA  
RANDULOVÁ, ZUZANA ŘEZÁČOVÁ LUKÁŠKOVÁ**  
MIKROSKOPICKÉ METÓDY V ANALÝZE POTRAVIN – PREHĽAD ..... 38

**IZABELA PRZETACZEK, JACEK ROŹNOWSKI, TERESA FORTUNA**  
INFLUENCE OF IRRADIATED WITH MICROWAVES ON COLOR OF POTATO  
MALTODEXTRINES WITH DIFFERENTIAL VALUE OF DEXTROSE  
EQUIVALENT (DE)..... 41

**OTAKAR ROP, PAVEL VALÁŠEK, , DANIELA KRAMÁŘOVÁ,  
TÜNDE JURÍKOVÁ**  
DISTRIBUCE TOXICKÝCH PRVKŮ V ROSTLINÁCH BRAMBOR ..... 43

**BRANISLAV ŠIŠKA, ROBERT TOMAN, JOZEF GOLIAN, JANA  
SLIVKOVA, STEFAN KOVÁČ, MICHAL BOŠIAK, LUBOMIR BELEJ**  
DIAZINON AND SELENIUM INTERACTION AND EFFECT ON RAT SERUM  
CHOLINESTERASE ACTIVITY AFTER AN PERORAL ADMINISTRATION .... 46

**KATARÍNA URDOVÁ, JANKA KOREŇOVÁ**  
VPLYV VONKAJŠÍCH FAKTOROV NA TVORBU BIOFILMU BAKTERIÁLNYCH  
KONTAMINANTOV ..... 50

# **auto**HACCP

*solution for ultimate hygiene*

Automatizácia potravinárskych prevádzok [www.xml4sd.com](http://www.xml4sd.com)



**MEDIASPOL**, s.r.o.

Import a export potravín do Ruskej federácie [www.mediaspol.sk](http://www.mediaspol.sk)

[www.senzorika.com](http://www.senzorika.com)

**H A C C P**  

---

**C O N S U L T I N G**  

---

**ISO 22000, IFS, BRC**

**HACCP**

**akreditované školenia**

**posudzovanie návrhov etikiet**

**poradenstvo pre CZ firmy s SK potravinárskou legislatívou**

**registrácia potravín**

**CD - aktualizovaný Potravinový kódex SR**

0908 164 361, 0904 138 562

[www.haccp.szm.sk](http://www.haccp.szm.sk)