



Záverečná karta projektu

Názov projektu

Evidenčné číslo projektu

APVV-18-0039

Aplikácia fermentovaných bioproduktov a humínových látok vo výžive hydiny, nový prístup ku zlepšeniu zdravia zvierat a produkcii bezpečných a funkčných potravín

Zodpovedný riešiteľ **doc. MVDr. Slavomír Marcinčák, PhD.**

Príjemca **Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach**

Názov pracoviska, na ktorom bol projekt riešený

Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach
Ústav biotechnológie, Fakulta chemickej a potravinárskej technológie, Slovenská technická univerzita v Bratislave

Názov a štát zahraničného pracoviska, ktoré spolupracovalo pri riešení

Norwegian University of Life Sciences, Fakulta vedy a technológie, As, Nórsko
Výskumný ústav veterinárneho lékařství v.v.i., Brno, Česká republika

Udelené patenty/podané patentové prihlášky, vynálezy alebo úžitkové vzory, ktoré sú výsledkami projektu

PUV98-2023 – 20. júna 2023 Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach podala prihlášku úžitkového vzoru s názvom „Obohatené krmivo pre hydinu znižujúce antibiotickú rezistenciu baktérií s imunomodulačným účinkom a vplyvom na kvalitu kostí“ na Úrad priemyselného vlastníctva SR.

Najvýznamnejšie publikácie (knihy, články, prednášky, správy a pod.) zhrňujúce výsledky projektu – uveďte aj publikácie prijaté do tlače

1. Semjon, B., Bartkovský, M., Marcinčáková, D., Klempová, T., Bujňák, L., Hudák, M., Marcinčák, S. (2020). Effect of Solid-State Fermented Wheat Bran Supplemented with Agrimony Extract on Growth Performance, Fatty Acid Profile, and Meat Quality of Broiler Chickens. *Animals*, 10 (6), 942.
2. Bartkovský, M., Mudroňová, D., Marcinčáková, D., Klempová, T., Sesztáková, E., Maskal'ová, I., Jaďutková, I., Čertík, M., Hudák, M., Marcinčák, S. (2020). Effect of fungal solid-state fermented product enriched with gamma-linolenic acid and β -carotene on blood biochemistry and immunology of broiler chickens. *Polish Journal of Veterinary Sciences*, 247-254.
3. Mudroňová, D., Karaffová, V., Pešulová, T., Koščová, J., Maruščáková, I. C., Bartkovský, M., Marcinčáková, D., Ševčíková, Z., Marcinčák, S. (2020). The effect of humic substances on gut microbiota and immune response of broilers. *Food and Agricultural Immunology*, 31(1), 137-149.
4. Slaný, O., Klempová, T., Marcinčák, S., Čertík, M. (2020). Production of high-value bioproducts enriched with γ -linolenic acid and β -carotene by filamentous fungi *Umbelopsis isabellina* using solid-state fermentations. *Annals of Microbiology*, 70 (1), 1-11.
5. Klempová, T., Slaný, O., Šišmiš, M., Marcinčák, S., Čertík, M. (2020). Dual production of

- polyunsaturated fatty acids and beta-carotene with *Mucor wosnessenskii* by the process of solid-state fermentation using agro-industrial waste. *Journal of Biotechnology*, 311, 1-11.
6. Semjon, B., Marcinčáková, D., Koréneková, B., Bartkovský, M., Nagy, J., Turek, P., Marcinčák, S. (2020). Multiple factorial analysis of physicochemical and organoleptic properties of breast and thigh meat of broilers fed a diet supplemented with humic substances. *Poultry Science*, 99(3), 1750-1760.
7. Semjon, B., Dudriková, E., Jaďuttová, I., Bartkovský, M., Klempová, T., Marcinčáková, D., Slaný, O., Marcinčák, S. 2020. Effect of supplementation with solid-state fermented feed in the diet of laying hens on egg qualitative variables. In *Potravinárstvo Slovak Journal of Food Sciences*. - ISSN 1338-0230. - Vol. 14, no. (2020), p. 519-527.
8. BARTKOVSKÝ, Martin - SEMJON, Boris - REITZNEROVÁ, Anna - KOŽÁROVÁ, Ivona - NAĎ, Pavel - MARCINČÁK, Slavomír. Rozkladné zmeny tukov a kvalita mäsa brojlerových kurčiat po skrmovaní humínových látok a fermentovaného produktu. In *Lazarove dni výživy a veterinárnej dietetiky XIV.*. 1. vyd. - Košice : UVLF v Košiciach, 2021. ISBN 978-80-8077-711-1, s. 115-118.
9. KARAFFOVÁ, Viera - MUDROŇOVÁ, Dagmar - SEMJON, Boris - KLEMPOVÁ, Tatiana - SLANÝ, Ondrej - ČERTÍK, Milan - NAGY, Jozef - BARTKOVSKÝ, Martin - MARCINČÁK, Slavomír. Immune response and fatty acid profile of eggs from laying hens fed fermented feed rich in polyunsaturated fatty acids. In *Fermentation*. ISSN 2311-5637, 2022, vol. 8, no. 3, art. no. 98, p. [1-16]. (2021: 5.123 - IF, 31 - H-index, 0.721 - SJR, Q1 - SJR Best Q, Q2 - JCR Best Q).
10. HRÍKOVÁ, Simona - KOŽÁROVÁ, Ivona - HUDÁKOVÁ, Nikola - REITZNEROVÁ, Anna - NAGY, Jozef - MARCINČÁK, Slavomír. Humic substances as a versatile intermediary. In *Life*. ISSN 2075-1729, 2023, vol. 13, no. 4, art. no. 858, p. [1-25]. (2021: 3.253 - IF, 40 - H-index, 0.588 - SJR, Q2 - SJR Best Q, Q2 - JCR Best Q).
11. MARCINČÁK, Slavomír - SEMJON, Boris - MARCINČÁKOVÁ, Dana - REITZNEROVÁ, Anna - MUDROŇOVÁ, Dagmar - VAŠKOVÁ, Janka - NAGY, Jozef. Humic substances as a feed supplement and the benefits of produced chicken meat. In *Life*. ISSN 2075-1729, 2023, vol. 13, no. 4, art. no. 927, p. [1-13]. (2021: 3.253 - IF, 40 - H-index, 0.588 - SJR, Q2 - SJR Best Q, Q2 - JCR Best Q).
12. Bartkovský Martin, Marcinčáková Dana, Makiš Andrej, Klempová Tatiana, Semjon Boris, Roba Pavol, Marcinčák Slavomír. Effect of feeding of 10 % prefermented feed on fatty acid profile and oxidation changes in chicken breast meat. In *MASO INTERNATIONAL* 1, 2021, 11, 011–015;

Uplatnenie výsledkov projektu

Výsledky získané v projekte majú vysoké uplatnenie v chovoch hydiny, hlavne v chove brojlerových kurčiat. Bol preukázaný pozitívny vplyv ako humínových látok, tak aj pripravených fermentovaných krmív na imunitný systém a črevnú mikrobiotu produkovaných kurčiat. Výsledky projektu potvrdili pozitívny vplyv fermentačných procesov na tuhej fáze na využitie vedľajších produktov ako krmiva vo výžive hydiny. Pomocou fermentačných procesov vláknitými hubami (*Cunninghamella*, *Mortierella*, *Actinomucor* a *Aspergillus*) sme vedľajšie produkty (kukuričný šrot, pšeničné otruby, ľanové výlisky) obohatili o významné mastné kyseliny (gama-linolénová - GLA, eikozapenaeénová - EPA, arachidonová, alfa-linolénová - ALA) a zvýšili ich využiteľnosť vo výkrme hydiny. Pšeničné otruby, kukuričný šrot ako aj ľanové výlisky predstavujú vedľajšie produkty v spracovaní poľnohospodárskych produktov a pre svoj vysoký obsah vlákniny nie sú vhodnou surovinou do krmných zmesí pre hydinu. Avšak fermentačným procesom sa znížil obsah nestráviteľnej vlákniny a zvýšil obsah enzýmov (proteáz a xylanáz), čo výrazne zlepšilo využiteľnosť takto pripraveného krmiva vo výkrme. Významným prínosom tohto projektu je aj zlepšenie technológie produkcie fermentovaného krmiva za účelom maximálnych koncentrácií mastných kyselín a enzýmov. Bol vyprodukovaný nový typ krmiva, ktorý využíva viacero substrátov, ako aj viacero vláknitých húb na fermentáciu. Výsledky našich experimentov potvrdili, že pripravené fermentované krmivo pridané do komerčných krmných zmesí v dávke 10 %, malo priaznivý vplyv na finálnu hmotnosť kurčiat, výrazne sa zlepšil profil mastných kyselín v tuku mäsa kurčiat a výrazne poklesol pomer n-6/n3 mastných kyselín v tuku kurčiat. Výsledky projektu potvrdzujú potenciál využitia fermentácie na tuhej fáze, ako

biotechnologického procesu na zhodnocovanie vedľajších produktov a následného uplatnenia fermentovaného produktu vo výžive hydiny. Získané výsledky sú cennými informáciami, ktoré sa využijú v ďalšom výskume pri produkcii nových typov fermentovaných produktov. Produkcia nového typu krmiva pomôže producentom potravín, zvlášť producentom výliskov olejnin, ktorý produkujú výlisky ako odpad, zhodnocovať tento odpad na produkt, ktorý bude možné aj finančne zhodnotiť a takto ušetriť náklady. Pre výrobcov krmív, fermentovaný produkt predstavuje novú surovinu s vysokým podielom významných mastných kyselín, ktorej zaradením do kŕmnych zmesí sa dosiahne aj vyšší podiel týchto mastných kyselín v produkovanom mäse kurčiat. Pre chovateľov brojlerových kurčiat je to možnosť produkovať nový typ kurčiat s vyšším podielom významných mastných kyselín v tuku mäsa, pričom takéto mäso budú môcť označiť ako funkčná potrava. Významné zistenia boli zaznamenané aj pri využití humínových látok vo výžive kurčiat. Zaradenie humínových látok do kŕmnych zmesí hydiny priaznivo ovplyvnilo imunitnú odpoveď kurčiat, zlepšilo mikrobiotru tráviaceho traktu a bol zaznamenaný výrazný pokles rezistencie na antibiotiká u izolovaných kmeňov z tráviaceho traktu hydiny. Na základe výsledkov projektu bol s partnerom projektu vyvinutý nový produkt na báze humínových látok, ktorý bude po registrácii komerčne dostupný.

Súhrn výsledkov riešenia projektu a naplnenia cieľov projektu v slovenskom jazyku (max. 20 riadkov)

Základným cieľom projektu bola produkcia funkčných a bezpečných potravín obohatených o nutrične významné látky. Tento cieľ bol realizovaný formou skrmovania pripravených fermentovaných produktov (bohatých na polynenasýtené mastné kyseliny, koenzým Q, chitozan, fenolové kyseliny a hydrolytické enzýmy, kyselina ferulová) a humínových látok brojlerovým kurčatám v polofarmových podmienkach. Následne boli otestované vlastnosti pridávaných zložiek na produkčné parametre, zdravotný stav a kvalitu produkovaného mäsa. V prvej časti projektu sme vybrali a otestovali najvhodnejších producentov bioaktívnych látok a enzýmov (*Cunninghamella* sp., *Actinomucor* sp., *Rhizopus* sp., *Mortierella* sp. a *Aspergillus* sp.) a optimalizovali sme fermentačné postupy prípravy najvhodnejších krmív, ktoré boli použité vo výkrme kurčiat. Keďže samotná príprava fermentovaných bioproduktov bola unikátna, dvojstupňová resp trojstupňová (s dvomi resp tromi druhmi vláknitých húb) bolo potrebné čo najideálnejšie nastaviť podmienky fermentácie.

Ďalšia časť projektu bola zameraná na aplikačné pokusy, kde fermentované produkty (10 %) spolu s humínovými látkami (0,5 – 0,7 %) boli pridávané do kŕmnych zmesí pre brojlerové kurčatá. Počas výkrmu boli sledované produkčné parametre a zdravotný stav kurčiat. Po jatočnom opracovaní kurčiat sme sledovali vplyv zložiek na imunitný systém, mikrobiológiu tráviaceho traktu a kvalitu a bezpečnosť produkovaného mäsa.

Fermentované krmivo zlepšilo zloženie mastných kyselín v prsnej a stehennej svalovine kurčiat. Toto zlepšenie je signifikantné na vzájomnom pomere n-6 a n-3 mastných kyselín, keď sme dokázali dosiahnuť hodnoty 5-6:1. Toto je celosvetovo odporúčaný pomer týchto kyselín vo výžive človeka. Na začiatku optimalizačného procesu výroby krmiva sme v prvom roku pokusu dosahovali hodnoty tohto pomeru 8-12:1. Mäso získané z posledného pokusu bolo výrazne obohatené o n-3 mastné kyseliny, najmä ALA, EPA a DHA.

Vo vykonaných experimentoch sme zaznamenali priaznivý vplyv humínových látok (0,6 %) ako aj kombinácie humínových látok (0,6 %) a fermentovaného krmiva (10 %) na finálnu hmotnosť a čiastočne aj konverziu krmiva. Postupným vylepšovaním fermentácie a nových kmeňov sme získali finálny fermentovaný produkt, ktorý výrazne naplnil aj tieto ukazovatele a kurčatá dosahovali najvyššiu hmotnosť aj priaznivú konverziu krmiva. Čo je podstatné vo všetkých experimentoch sme u pokusných skupín po skrmovaní fermentovaného krmiva dosiahli najvyššiu jatočnú výťažnosť tela, ale hlavne prsnej svaloviny. Výsledky štúdií v tomto projekte potvrdili, že prídavkom humínových látok a fermentovaného krmiva do kŕmnej zmesi, dochádza k zmenám črevnej mikrobioty kurčiat. Účinkom týchto látok došlo k väčšiemu alebo menšiemu zníženiu CPM, baktérií s čeľade Enterobacteriaceae, *E. coli*, *Clostridium* spp. a *Enterococcus* spp. Účinkom humínových látok pridávaných do kŕmnej zmesi došlo k výraznejšiemu zníženiu počtov baktérií s čeľade Enterobacteriaceae, *E. coli* a *Clostridium* spp. Prídavok fermentovaného krmiva do kŕmnej zmesi mal výraznejší vplyv na nižší počet baktérií *Enterococcus* spp. a vyšší počet *Lactobacillus* spp. Zo získaných výsledkov vyplýva, že fermentované krmivá použité pre výkrm brojlerových kurčiat ako aj suplementácia krmiva prídavkom humínových látok mala výrazne pozitívny vplyv na profily

antimikrobiálnej rezistencie najmä u Gram-negatívnych črevných baktérií *Escherichia coli*, čo sa prejavilo zvýšením počtu kmeňov, ktoré boli citlivé na všetky testované antimikrobiálne látky, zúžením spektra antibiotík, na ktoré bakteriálne kmene vykazovali fenotypovú rezistenciu a znížením počtu kmeňov rezistentných súčasne na viacero liečiv (vrátane multirezistentných kmeňov).

Aplikácia nového typu fermentovaného krmiva vo výžive kurčiat predstavuje ďalšiu z možností, ako obohatiť mäso o významné mastné kyseliny pričom výsledkom je funkčná potravina s priaznivým účinkom na ľudské zdravie. Humínové látky predstavujú perspektívnu zložku krmiva s priaznivým vplyvom na zdravie zvierat a tiež na bezpečnosť produkovaného mäsa.

Súhrn výsledkov riešenia projektu a naplnenia cieľov projektu v anglickom jazyku (max. 20 riadkov)

The main objective of the project was to produce functional and safe foods enriched with nutritionally important substances. This objective was realized by feeding prepared fermented products (rich in polyunsaturated fatty acids, coenzyme Q, chitosan, phenolic acids and hydrolytic enzymes, ferulic acid) and humic substances to broiler chickens under semi-farm conditions. Subsequently, the properties of the added ingredients on production parameters, health status and quality of meat produced were tested.

In the first part of the project, we selected and tested the most suitable producers of bioactive substances and enzymes (*Cunninghamella* sp., *Actinomyces* sp., *Rhizopus* sp., *Mortierella* sp. and *Aspergillus* sp.) and optimized the fermentation procedures for the preparation of the most suitable feedstuffs used in the fattening of chickens. Since the preparation of the fermented bioproducts itself was unique, two-step or three-step (with two or three species of filamentous fungi, respectively), it was necessary to adjust the fermentation conditions as ideally as possible.

Another part of the project focused on application trials where fermented products together (10%) with humic substances (0.5 - 0.7%) were added to compound feeds. During the fattening of poultry (broiler chickens and laying hens), production parameters and health status of the chickens were monitored. After the chickens were slaughtered, the effect of the ingredients on the immune system, the microbiology of the digestive tract and the quality of the meat produced was monitored.

Fermented feed improved the fatty acid composition in the breast and thigh muscles of the experimental chickens. This improvement is significant on the relative ratio of n-6 and n-3 fatty acids, where we were able to achieve values of 5-6:1. This is the globally recommended ratio of these acids in human nutrition. At the beginning of the optimization process of feed production, in the first year of the experiment, we achieved values of this ratio of 8-12:1. The meat obtained from the last trial was significantly enriched in n-3 fatty acids, especially ALA, EPA and DHA.

In the experiments carried out, we observed a beneficial effect of humic substances (0.6%) as well as of the combination of humic substances (0.6%) and fermented feed (10%) on better final weight and partly on feed conversion. Gradual improvement of the fermentation and new strains resulted in a final fermented product that significantly fulfilled these parameters and the chickens achieved both the highest weight and a favourable feed conversion. Importantly, in all experiments, we obtained the highest body, but especially breast muscle yield in the experimental groups after feeding the fermented feed. The results of the studies in this project confirmed that the addition of humic substances and fermented feed to the feed mixture, changes in the intestinal microbiota of the chickens. The effect of these substances was a greater or lesser reduction in CPM, Enterobacteriaceae, *E. coli*, *Clostridium* spp. and *Enterococcus* spp. The effect of humic substances added to the compound feed was a greater reduction in Enterobacteriaceae, *E. coli* and *Clostridium* spp. The addition of fermented feed in the compound feed had a significant effect on lower *Enterococcus* spp. and higher *Lactobacillus* spp. The results obtained show that fermented feed used for broiler chicken fattening as well as feed supplementation with humic substances had a significantly positive effect on antimicrobial resistance profiles, especially for Gram-negative *Escherichia coli* enteric bacteria. This was reflected by an increase in the number of strains that were sensitive to all antimicrobials tested, a narrowing of the spectrum of antibiotics to which bacterial strains showed phenotypic resistance, and a reduction in the number of strains simultaneously resistant to multiple drugs (including

multidrug resistant strains).

The application of a new type of fermented feed in chicken nutrition represents another possibility to enrich meat with important fatty acids, resulting in a functional food with beneficial effects on human health. Humic substances represent a promising feed ingredient with a beneficial effect on animal health and also on the safety of the meat produced.