

Možnosti prodloužení údržnosti mělněných mas

Bc. Alena Kadlíková

Diplomová práce
2008



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav potravinářského inženýrství

akademický rok: 2007/2008

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Alena KADLÍKOVÁ**
Studijní program: **N 2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Technologie, hygiena a ekonomika výroby potravin**
Téma práce: **Možnosti prodloužení údržnosti mělněných mas**

Zásady pro vypracování:

1. V teoretické části zpracujte literární rešerši týkající se charakteristiky a složení vepřového, hovězího a drůbežího masa a srovnajte jejich vlastnosti, popř. i s jinými druhy mas.
2. Dále se v teoretické části zabývejte různými vlivy působícími na jakost mělněného masa a jeho mikrobiální kontaminaci.
3. V praktické části provedte sledování dynamiky růstu mikroorganismů na mělněném mase.
4. Sledujte vliv látek, které by mohly inhibovat růst mikroorganismů a pomoci tak k prodloužení údržnosti mělněného masa.
5. Na základě teoretické části a výsledků praktické části formulujte návrhy a doporučení týkající se podmínek uchování mělněného masa.
6. Zhodnoťte využitelnost aplikovaných látek pro prodloužení údržnosti mělněného masa.

Rozsah práce:

Rozsah příloh:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

PIPEK, P. Základy technologie masa. 1. vydání. Vyškov: VVŠ PV, 1998. 56 s.

ŠILHÁNKOVÁ, L. Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology. 2. vydání. Praha:

VICTORIA PUBLISHING, a.s., 1995. ISBN 80-85605-71-6.

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

**STEINHAUSER, L. Hygiena a technologie masa. 1. vydání. Brno: LAST, 1995. 664 s. ISBN
80-900260-4-4.**

Vedoucí diplomové práce:

Mgr. Leona Buňková, Ph.D.

Ústav potravinářského inženýrství

Datum zadání diplomové práce:

22. listopadu 2007

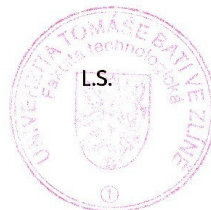
Termín odevzdání diplomové práce:


31. května 2008

Ve Zlíně dne 2. května 2008



doc. Ing. Petr Hlaváček, CSc.
děkan



uz. 
prof. Ing. Ignác Hoza, CSc.
vedoucí katedry

ABSTRAKT

Práce byla zaměřena na posouzení antimikrobních účinků vybraných fosfátů, které se běžně využívají v potravinářských technologiích. Byly testovány inhibiční účinky tří komerčně využívaných fosfátů a polyfosfátů lišících se délkou řetězce (690, S9 a HBS), které byly aplikovány na mēlněné vepřové maso. Pro sledování inhibičního působení použitých fosfátových solí na růst mikroorganismů v mēlněném mase byly zvoleny koncentrace těchto inhibičních látek v rozmezí 0 – 5 %. Účinky fosfátů byly sledovány plotnovou metodou na vybraných skupinách mikroorganismů (celkový počet mikroorganismů, koliformní bakterie, kvasinky a plísňe). Výsledky ukazují, že fosfáty 690 a S9, obsahující především orthofosfáty, difosfáty (pyrofosfáty) a polyfosfáty s krátkým řetězcem, nemají významný inhibiční vliv na růst mikroorganismů vyskytujících se v mēlněném mase. Inhibiční účinky vykazovala pouze sůl HBS (směs polyfosfátů s dlouhým řetězcem), která působila inhibičně na celkový počet mikroorganismů v koncentracích 0,3 % a vyšších. Antibakteriální efekt fosfátů vůči mikroflóře mēlněného masa roste se zvyšující se délkou polyfosfátového řetězce.

Klíčová slova: mēlněné vepřové maso, mikroorganismus, inhibiční látka

ABSTRACT

The work deals with sight on appreciation of antimicrobial effects of selected phosphates used in the food technology. There was testing inhibition effects of the three commercial exploited phosphates and polyphosphates varying in length of the chain (690, S9 and HBS). Phosphates and polyphosphates were applied on the grounded pork. For monitoring of inhibition effect of used phosphates salts on growth of microorganism in grounded pork was selection concentration of these inhibition matters at intervals 0 – 5 %. The effects of phosphates were monitoring by plate count method on selected groups of the microorganism (totally number of microorganism, coliforms, yeasts and moulds). The results indicate that phosphates 690 and S9 containing mostly orthophosphates, pyrophosphates and polyphosphates with short chain have not meaningful inhibition influence on the growth of microorganism. Inhibition effects indicated only the salt HBS (mixture polyphosphates with long chain), which function inhibitory on totally number of microorga-

nism in concentrations higher than 0,3%. Antibacterial effect of phosphates on microflora of grounded pork grow according to lenght of polyphosphates chain.

Keywords: grounded pork, microorganism, inhibition matters

Na tomto místě bych velice ráda poděkovala Mgr. Leoně Buňkové, Ph.D. za vedení, odborné rady, konzultace a čas, který mi při tvorbě této diplomové práce věnovala. A dále bych chtěla poděkovat Ing. Františku Buňkovi, Ph.D., za pomoc a odborné rady se statistickým vyhodnocením výsledků.

Prohlašuji, že jsem na bakalářské/diplomové práci pracoval(a) samostatně a použitou literaturu jsem citoval(a). V případě publikace výsledků, je-li to uvolněno na základě licenční smlouvy, budu uveden(a) jako spoluautor(ka).

Ve Zlíně

.....

..

Podpis diplomanta

OBSAH

ÚVOD	9
I TEORETICKÁ ČÁST	10
1 ZÁKLADNÍ POJMY	11
2 SLOŽENÍ MASA	12
2.1 HISTOLOGICKÁ STAVBA MASA	12
2.1.1 Svalová tkáň	12
2.2 CHEMICKÉ SLOŽENÍ MASA	13
2.2.1 Voda.....	14
2.2.2 Bílkoviny	16
2.2.3 Lipidy	17
2.2.4 Minerální látky	18
2.2.5 Extraktivní látky.....	19
2.2.6 Vitaminy	19
3 ASPEKTY KONZUMACE MASA	21
3.1 VÝZNAM MASA VE VÝŽIVĚ	21
3.1.1 Hovězí a telecí maso	22
3.1.2 Vepřové maso	23
3.1.3 Drůbeží maso	23
3.1.4 Srovnání vlastností drůbežího masa s masem jatečných zvířat	23
3.1.5 Ryby	24
3.1.6 Ostatní druhy masa.....	25
3.1.7 Uzenářské (masné) výrobky	25
4 MIKROBIOLOGIE MASA.....	27
4.1 MIKROORGANISMY V MASE.....	27
4.1.1 Bakterie způsobující kažení masa	29
4.1.2 Plísně	34
4.1.3 Kvasinky.....	34
5 FOSFÁTY JAKO INHIBIČNÍ LÁTKY.....	35
5.1 FOSFÁTY, POLYFOSFÁTY.....	35
5.1.1 Antimikrobní účinky fosfátů	36
5.1.2 Inhibiční účinek fosfátů na gramnegativní a grampozitivní bakterie	36
II PRAKTICKÁ ČÁST.....	39
6 CÍL DIPLOMOVÉ PRÁCE.....	40
7 ZAŘÍZENÍ, PŘÍSTROJE, CHEMIKÁLIE, ŽIVNÉ PŮDY A OSTATNÍ POMŮCKY, MASO.....	41
7.1 PŘÍSTROJE A ZAŘÍZENÍ.....	41
7.2 CHEMIKÁLIE A ŽIVNÉ PŮDY	41
7.3 MASO	43
7.3.1 Příprava mělněného masa	44

8	METODICKÁ ČÁST.....	45
8.1	RŮST MIKROORGANISMŮ BEZ INHIBIČNÍCH LÁTEK	45
8.1.1	Příprava vzorků	45
8.2	RŮST MO S POUŽITÍM INHIBIČNÍCH LÁTEK	45
8.2.1	Charakteristika inhibičních látek	46
8.2.2	Příprava vzorků s inhibičními látkami a sledování růstu MO	46
8.3	IDENTIFIKACE BAKTERIÍ.....	47
8.3.1	Příprava bakterií k identifikaci	47
8.3.2	Test na přítomnost katalasy	48
8.3.3	Gramovo barvení	48
8.3.4	KOH – test	49
8.3.5	Test na fermentaci glukosy (O/F test) a laktosy	49
8.3.6	Schopnost růstu MO při zvýšeném množství NaCl	51
8.3.7	Schopnost růstu MO při zvýšeném pH	51
8.3.8	ENTEROtest	51
9	VÝSLEDKY A DISKUSE.....	52
9.1	RŮST MO BEZ INHIBIČNÍCH LÁTEK	52
9.2	RŮST MO S POUŽITÍM INHIBIČNÍCH LÁTEK	53
9.2.1	Účinek soli HBS	54
9.2.2	Účinek tavicích solí S9 a 690.....	59
9.2.3	Účinek soli HBS na gram pozitivní bakterie.....	62
9.3	IDENTIFIKACE BAKTERIÍ.....	65
9.4	SOUHRNNÁ DISKUSE.....	73
	ZÁVĚR	75
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	76
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....	80
	SEZNAM OBRÁZKŮ	81
	SEZNAM TABULEK	82
	SEZNAM PŘÍLOH	84

ÚVOD

Maso má ve výživě člověka nezastupitelnou úlohu. Je velmi bohatým zdrojem řady nutričních látek potřebných pro zdravý růst a vývoj člověka. Nejvýznamnější jsou bezesporu bílkoviny obsahující všechny esenciální aminokyseliny.

Maso je vzhledem k vysokému obsahu vody, bílkovin a nízké kyselosti typickou neúdržnou potravinou a tudíž velmi náchylné k mikrobiálnímu napadení. Pokud jde o čerstvé maso, tak to obsahuje minimum mikroorganismů. Čím je starší, tím větší nebezpečí vzniká z hlediska kontaminace nežádoucími mikroorganismy. Stav masa z hlediska kontaminace mikroorganismy závisí také na krmení, podmínkách chovu a na celkovém zdravotním stavu zvířete.

Důležitým aspektem k uvedení masa na trh je bezpodmínečně jeho nezávadnost, jak po stránce zdravotní, tak po stránce mikrobiální.

Při uvádění do oběhu musí být maso uloženo odděleně od ostatních potravin. Úprava masa (bourání, porcování, balení) a manipulace s masem musí probíhat po dob z technologického hlediska nezbytně nutnou a teplota prostředí nesmí být vyšší než 12 °C [2].

Diplomová práce byla zaměřena na sledování dynamiky růstu mikroorganismů na čerstvém mēlněném vepřovém mase. Vzhledem ke snadnému napadení masa mikroorganismy byly do masa aplikovány vybrané inhibiční látky a byl sledován jejich vliv v různých koncentracích. Snahou bylo zajistit maximální inhibiční účinek těchto látek a prodloužení údržnosti masa.

TEORETICKÁ ČÁST

1 ZÁKLADNÍ POJMY

Dle vyhlášky Ministerstva zemědělství ČR č. 326/2001 Sb. v platném znění je maso definováno jako všechny části zvířat, které jsou vhodné k lidské spotřebě, o jejichž použitelnosti bylo rozhodnuto podle zvláštního právního předpisu [3].

Drůbežím masem jsou všechny požitelné části těl pocházejících z domácích druhů ptáků, patřících do rodů kur, krocán, perlička, kachna a husa, splňující požadavky zvláštního právního předpisu [3].

Rybami a ostatními vodními živočichy se rozumí ryby a ostatní vodní živočichové využitelné pro lidskou výživu [3].

Masným výrobkem se rozumí technologicky opracovaný výrobek obsahující jako převažující základní surovinu maso, o jehož použitelnosti bylo rozhodnuto podle zvláštního právního předpisu [3].

Čerstvým masem se rozumí maso s výjimkou drůbežního masa, včetně masa baleného vakuově nebo v ochranné atmosféře, k jehož uchování nebylo použito jiného ošetření než chlazení nebo zmrazení, splňující požadavky podle zvláštního právního předpisu [3].

Mleté maso je maso drobně posekané nebo rozemleté mlýnkem [3].

Vepřovým masem se rozumí maso prasat, hovězím maso mladého skotu, mladého býka, býka, volka, jalovice, krávy. Telecí maso je maso telat, skopové je maso ovcí [3].

2 SLOŽENÍ MASA

2.1 Histologická stavba masa

Struktura masa je tvořena buňkami uspořádanými do souborů (tkání). Tkáně v mase jsou soubory buněk stejných funkčně i morfologicky, mají společný původ. Prostor mezi buňkami vyplňuje mezibuněčná (základní) hmota, což je tekutá až tuhá hmota, obsahuje i vlákna (fibrily) a lamely [1].

V těle mnohobuněčných organismů rozlišujeme čtyři základní typy tkání, které se při stavbě jednotlivých částí organismu vzájemně kombinují [4]:

1. **Tkáň epitelová** (zevní pokryv těla, výstelka tělních dutin a dutin orgánů, smyslový a zárodečný epitel).
2. **Tkáň pojivová** (vazivo, chrupavka, kost).
3. **Tkáň svalová** (kosterní, hladká, srdeční svalovina).
4. **Tkáň nervová** (centrální a periferní nervový systém).

2.1.1 Svalová tkáň

Převážnou složku masa tvoří svalová tkáň [2]. Je to kontraktilní tkáň zvířat, má schopnost vykonávat pohyb. Základem její funkce je přeměna energie chemických vazeb na mechanickou práci [1].

Typy svalové tkáně

- Hladká svalová tkáň se vyskytuje především ve stěně dutých orgánů, cév a ústí žlázových vývodů. Tvoří stěny orgánů trávicího, dýchacího, močového a pohlavního aparátu. Základem hladkého svalstva je hladká buňka, štíhlá, vřetenovitého tvaru [6]. Tato svalová tkáň není ovladatelná vůlí [2].
- Příčně pruhovaná svalová tkáň je podstatou kosterních svalů. Kromě nich se vyskytuje jako stavební součást dalších orgánů, svalstva jazyka, hltanu, hrtanu a jícnu [6].

Základní stavební jednotkou příčně pruhované svaloviny je svalové vlákno. Je to soubuní válcovitého tvaru [7].

Na povrchu je svalové vlákno obalené buněčnou blánou sarkolemou, uvnitř se nachází sarkoplasma (cytoplazma). Téměř celý objem svalového vlákna vyplňují kontraktilní vlákna, myofibrily. Základní jednotkou myofibrily je sarkomer. Sarkomer je složen z tenkých aktinových a tlustých myosinových filament [2]. Filamenta jsou vláknité útvary uspořádané paralelně k ose myofibrily [1].

Při svalové kontrakci dochází ke klouzání či zasouvání tenkých aktinových filament a tlustých myosinových filament myofibril svalového vlákna. Celkovým výsledkem svalové kontrakce je zkrácení myofibrily, přičemž délka aktinových a myosinových filament se nemění [6].

Svalovina různých druhů zvířat i různé svaly téhož zvířete se barevně odlišují. Rozdíly mezi intenzivně červeným a bledě červeným masem jsou dány obsahem svalového barviva myoglobinu, ale i rozdílnou strukturou svalových vláken, která je ovlivněna jejich fyziologií [6].

2.2 Chemické složení masa

Celý jatečně opracovaný kus (ta část jatečných zvířat, která zůstává po odstranění kůže, krve, vnitřností, často i hlavy a částí končetin) obsahuje kromě svaloviny i tukovou tkáň, vaziva, chrupavky, kosti a jiné tkáně [1].

Složení masa kolísá v závislosti na druhu zvířete, plemeně, pohlaví, věku, způsobu výživy a liší se i jednotlivé svaly u téhož jedince [2].

Samotná libová svalovina se skládá z vody, bílkovin, tuků, minerálních látek, vitamínů a extraktivních látek. Sacharidů obsahuje na rozdíl od jiných potravin poměrně málo [1].

Důležitým kritériem je poměr obsahu vody a bílkovin, tzv. Federovo číslo, které u syrového masa bývá poměrně stálé a má hodnotu přibližně 3,5 [1]. U tučnějšího masa bývá poněkud vyšší. Lze ho využít k orientačnímu výpočtu složení masa. [5].

Důležitým ukazatelem je i poměr tuků a bílkovin (T/B) [2].

Tab. 1. Orientační složení masa (v %) a hodnoty indexových čísel [2;7].

Druh masa	voda	bílkoviny	tuky	minerálie	Federovo číslo	Podíl T/B
Vepřové maso						
libové	64,40	17,30	18,20	0,90	3,73	1,05
tučné	45,00	13,00	41,30	0,70	3,46	3,18
bůček	34,00	7,10	56,00	0,50	4,80	7,09
kýta	53,00	15,20	31,00	0,80	3,50	2,04
pečeně	58,00	16,40	25,00	0,90	3,50	1,52
plec	49,00	13,50	37,00	0,70	3,60	2,74
Hovězí maso						
jalovice	66,90	20,50	11,50	0,98	3,26	0,56
býci	73,90	21,90	3,10	1,17	3,40	0,14
plec	70,00	21,40	6,90	1,00	3,70	0,32
kýta	73,00	20,20	5,00	1,10	3,60	0,25
svíčková	72,00	19,30	7,40	1,00	3,70	0,38
roštěněc	67,00	20,60	10,30	1,00	3,30	0,49
Telecí maso	73,80	21,80	3,80	0,90	3,39	0,17
Skopové maso	60,00	16,20	23,00	0,80	3,70	1,42

2.2.1 Voda

Voda je hlavní složkou masa. V libové svalovině bývá obsaženo 70 až 75 % vody [2].

Z hlediska nutričního je bezvýznamná, má však velký význam pro senzoričnou, kulinární a především technologickou jakost masa [6].

Schopnost masa vázat vodu (tzv. vaznost) je jednou z nejvýznamnějších vlastností masa při jeho zpracování, poněvadž výrazně ovlivňuje kvalitu výrobků i ekonomickou efektivitu jejich produkce [6].

Voda je v libové svalovině vázána různým způsobem a různě pevně. Nejpevněji je vázána hydratační voda, další podíly vody jsou imobilizovány mezi jednotlivými strukturálními částmi svaloviny, zbytek je volně pohyblivý v mezibuněčných prostorech. Z hlediska techno-

logie se rozlišuje voda volná a vázaná, a to podle toho, zda z masa volně vytéká či nikoliv [1].

Přítomnost vody v mase lze popsat takto: [6]

Voda volná, volně vytékající z masa

Voda vázaná

- hydratační, vázaná na polární skupiny a to:

monomolekulárně – pravá hydratační voda

multimolekulárně

- imobilizována ve filamentech
- imobilizována mezi filamenty
- uzavřená v sarkoplazmatickém prostoru
- extracelulární, vázaná kapilárně.

Hydratační voda (krystalická), fyziologicky vázaná, je voda pevně vázaná na bílkoviny (váže se elektrostaticky na disociované skupiny a vodíkovými můstky na nedisociované hydrofilní skupiny) [2]. Jako hydratační se označuje taková voda, která je vázaná v mono- i v multimolekulární vrstvě na hydrofilní skupiny bílkovin [6].

Hlavní podíl v mase tvoří voda volná, avšak pouze její malá část je volně pohyblivá, zbývající část je imobilizovaná (znehyněná) [2].

Rozhodující podíl vody v mase (cca 70 %) je obsažen v myofibrilách, proto jsou za vaznost masa odpovědné především myofibrilární bílkoviny [6]. A to konkrétně myosin. Na vaznosti se v podstatě nepodílejí kolagenní bílkoviny [2].

Vaznost se obvykle vyjadřuje jako podíl vody vázané (hydratační a imobilizované) ku celkovému obsahu vody v mase. Závisí na pH, obsahu solí, průběhu posmrtných změn, rozmělnění a dalších faktorech [2].

Vaznost se zvyšuje s postupujícím rozmělněním, kdy dochází k uvolňování tkáně a bílkovinné struktury pak mohou lépe bobtnat. Bobtnání je jednak oddálení aktinových a myosinových filament a jednak i odpuzování peptidových řetězců myosinu v důsledku imobilizace

vody [2]. Rozmělněná libová svalovina je schopna imobilizovat 700 až 800 g vody na 100 g masných bílkovin [6].

Vaznost klesá rovnoměrně se stoupající teplotou do 45 °C, kdy dochází k prudkému poklesu vaznosti vlivem denaturace bílkovin [2].

Obsah vody v různých druzích a částech masa je znázorněn v tabulce 1. (kap. 2.2).

2.2.2 Bílkoviny

Bílkoviny jsou nejvýznamnější složkou masa z nutričního i technologického hlediska. Jejich obsah v mase je vysoký. Jde většinou o tzv. plnohodnotné bílkoviny obsahující všechny esenciální aminokyseliny (isoleucin, leucin, lysin, methionin, cystein, fenylalanin, tyrosin, threonin, tryptofan, valin) [7]. Bílkoviny jednotlivých částí masa se liší svým obsahem, poměrným zastoupením i vlastnostmi [6].

V čisté libové svalovině činí obsah bílkovin 18-22 % hm. Dělíme je podle jejich charakteru a vlastností, především rozpustnosti ve vodě a v roztocích solí a podle umístění v jednotlivých svalových strukturách [2].

- **Bílkoviny sarkoplasmatické** – jsou obsaženy v cytoplasmě svalových buněk a rozpustné ve vodě. Významné jsou myogen a myoglobin (červené svalové barvivo). Jsou tvořeny bílkovinou (globin) a barevnou skupinou tzv. hem, který má v molekule komplexně vázán atom dvojmocného železa [2].
- **Bílkoviny myofibrilární** – jsou obsaženy ve vlákně svalových buněk, rozpustné ve zředěných roztocích solí a technologicky jsou nejvýznamnější. Mezi významné patří myosin (45% všech bílkovin) a aktin. Uplatňují se významně při svalové kontrakci a posmrtných změnách [2]. Vážou největší podíl vody v mase, z čehož vyplývá jejich význam pro strukturu salámů [1].
- **Bílkoviny stromatické** – se vyskytují především v pojivových tkáních, tj. ve vazivech, šlachách, kůži, kostech apod., lze je však nalézt i ve svalové tkáni, kde tvoří různé membrány. Z výživového hlediska bývají stromatické bílkoviny označovány za neplnohodnotné, protože neobsahují všechny esenciální aminokyseliny [1]. Patří sem zejména kolagen, elastin a keratin a jsou nerozpustné ve vodě. Ko-

lagen při záhřevu bobtná a přechází postupně na želatinu (glutin) [2]. Želatina vytváří gely. Gel želatiny je síť makromolekul a micel, spojených mezi sebou van der Waalsovými silami nebo vodíkovými můstky. Při záhřevu na 45 °C se gel rozpouští. Vznik želatiny má velký význam v technologii masa. Je podstatou měknutí některých typů masa při tepelném opracování [1]. Elastin zajišťuje soudržnost svalových vláken v termicky zpracovaném mase [2]. Chemicky je velmi odolný, nerozpouští se ve vodě, v roztocích solí, ve zředěných kyselinách a zásadách [1]. Keratiny jsou rozsáhlou skupinou bílkovin, mechanicky a chemicky odolné, pružné [2]. Vyskytují se v rohovině, chlupch a jiných kožních produktech [1].

Obsah bílkovin v různých druzích a částech masa je znázorněn v tabulce 1. (kap. 2.2.).

2.2.3 Lipidy

Mezi lipidy v mase vysoce převažují tuky (triacylglyceroly) a to podílem zhruba 99 %. V malé míře jsou zastoupeny heterolipidy (zejména fosfolipidy) a pozornost zaujímá i cholesterol, což je sterol doprovázející tuky [6].

Rozložení tuku v těle zvířat je velmi nerovnoměrné. Malá část je uložena přímo uvnitř svaloviny (intramuskulární, vnitrosvalový) a dále tvoří tuk základ samostatné tukové tkáně (depotní, zásobní) [7]. Depotní tuky vytvářejí tukové tkáně (hřbetní, aj.), které se samostatně těží a zpracovávají na potravní nebo technické tuky [6].

Velký význam pro chuť a křehkost masa má tuk intramuskulární, který je mezi buňkami rozložen ve formě žilek a tvoří tzv. mramorování masa. Maso, které má vyvinuté mramorování je více ceněno než maso zcela libové [1].

Vyšší obsah tuku je v mase hodnocen negativně pro jeho vysoký energetický obsah a převahu nasycených mastných kyselin, zejména palmitové a stearové. Z nenasycených kyselin převládá monoenová kyselina olejová, zatímco nutričně významných polyenových mastných kyselin (linolová, linolenová, arachidonová) je obsaženo velmi málo [6].

Tab. 2. Obsah mastných kyselin v tucích hlavních druhů masa (v % mastných kyselin z celkové sumy mastných kyselin) [6].

Mastné kyseliny	Hovězí tuk	Vepřový tuk	Drůbeží tuk
<i>Palmitová</i>	24-32	25-35	24-27
<i>Stearová</i>	21-29	12-18	4-7
<i>Olejová</i>	39-50	41-51	37-43
<i>Linolová</i>	1,0-5,0	2,5-7,8	18-23
<i>Linolenová</i>	0,5-1,0	1,0-1,5	0,8-1,5
<i>arachidonová</i>	0,1-0,5	0,5-1,0	0,6-1,5

Kriticky je hodnocen obsah cholesterolu, který budí pozornost z aspektů nutričních a posléze zdravotních. Ve svalovině a tucích jatečných zvířat je ho obsaženo 50 – 100 mg/ 100 g tkáně, vyšší obsah je v játrech a ledvinách a nejvíce v mozku a míše. Cholesterol patří do skupiny sterolů, sám tukem není, ale tuky doprovází a bývá mezi ně nesprávně zařazován [6].

2.2.4 Minerální látky

Minerální látky tvoří zhruba 1 % hmotnosti masa. Obvykle bývají pod pojmem minerální látky řazeny všechny látky, které zůstávají v popelu po zpopelnění masa, tedy i mineralizované prvky jako síra a fosfor, které byly před spálením složkou organických látek (sirných aminokyselin, fosfolipidů aj.). Většina minerálních látek je rozpustná ve vodě a ve svalovině je přítomna ve formě iontů [7].

Maso je významným zdrojem draslíku, vápníku, hořčíku, železa a jiných prvků. Hovězí je navíc důležitým zdrojem zinku, maso ryb zase obsahuje hodně jodu [7].

2.2.5 Extraktivní látky

Extraktivní látky tvoří početnou a nesourodou skupinu látek zastoupených v masě ve velmi malém množství. Jejich společnou vlastností je extrahovatelnost vodou při zpracování masa při teplotách kolem 80 °C. Tyto látky mají podíl na tvorbě arómatu a chutnosti masa, jiné jsou součástí enzymů, některé mají významné funkce v metabolických a postmortálních procesech. Největší význam mají sacharidy, organické fosfáty a dusíkaté extraktivní látky [6].

Sacharidy jsou v živočišných tkáních obsaženy v malém množství, zastoupen je především glykogen [1]. Ve svalovině jatečných zvířat je obsaženo 0,3 – 0,9 % glykogenu, nejvíce v koňském masě [6]. Glykogen je významný z technologického hlediska. Podle toho, kolik je ho obsaženo ve svalu v okamžiku porážky, dojde k hlubšímu či menšímu okyselení tkáně, což má význam pro údržnost i pro vaznost. U vyčerpaných zvířat s nízkým obsahem glykogenu dochází jen k malému okyselení a maso je proto málo údržné [1].

Organické fosfáty jsou zastoupeny hlavně nukleotidy, nukleovými kyselinami a jejich rozkladnými produkty. Prakticky nejvýznamnějšími jsou nukleotidy na bázi adeninu. V kg svalové tkáně jsou obsaženy jen desetiny gramu nukleotidů. Adenosintrifosfát (ATP) je hlavní molekulou přenosu energie ve svalech. Po usmrcení jatečných zvířat se ATP postupně degraduje na ADP, AMP (di- a mono-) a dále na IMP (inosinmonofosfát), inosin a hypoxanthin a uvedené produkty odbourávání se podílejí na chutnosti tepelně upraveného masa [6].

Dusíkaté extraktivní látky jsou rovněž různorodou skupinou látek v masě. Největší význam mají volné aminokyseliny (taurin, glutamin, kyselina glutamová, glycin, lysin, alanin), peptidy (karnosin, anserin, glutathion) [6]. Při rozkladu masa nebo při některých technologických operacích vznikají biogenní aminy. Také při hnilobném rozkladu masa vzniká putrescin a kadaverin. Při zrání fermentovaných salámů vznikají histamin, tyramin a tryptamin dekarboxylací příslušných aminokyselin [1].

2.2.6 Vitaminy

Maso je významným zdrojem hydrofilních vitaminů skupiny B, které jsou bohatě obsaženy ve svalovině a ve vnitřnostech jatečných zvířat. Významný je obsah vitamínu B₁₂, který se vyskytuje pouze v potravinách živočišného původu. Obecně jsou bohatším zdrojem vita-

minů játra než kosterní svalovina. Lipofilní vitaminy jsou přítomné zejména v játrech a v tukových tkáních. Vitamin C je v masě obsažen jen ve zcela zanedbatelném množství [6].

S masem se dostávají do organismu vitaminy současně s bílkovinami, což je důležité pro syntézu a funkci některých enzymů [8].

3 ASPEKTY KONZUMACE MASA

Pro růst a vývoj zdravého organismu, nezávisle na druhu a společenství, je nezbytné naplnit základní nutriční požadavky. Stavba trávicího traktu člověka anatomicky i fyziologicky odpovídá možnostem využít maso zvířat jako součást stravy. V podmínkách střední Evropy, kde panuje mírné klima, tvoří odnepaměti maso zvířat přirozenou složku výživy člověka. Je totiž bohatým zdrojem řady nutričních látek, potřebných pro zdravý růst a vývoj člověka. Je taky významným zdrojem energie [7].

3.1 Význam masa ve výživě

Maso je významnou složkou naší denní stravy [7]. Důvodem konzumace jsou organoleptické vlastnosti, i když nutriční hodnota (plnohodnotné bílkoviny, vitaminy – zejména skupiny B, nenasycené mastné kyseliny, minerální látky, tuky) je nesporná. Výživná hodnota jednotlivých druhů tržních masa závisí především na poměru čisté svaloviny k méně hodnotným kostem, tukové tkáni a vazivu. Výživná hodnota čisté svaloviny závisí na poměru obsahu vody a sušiny [2].

Průměrná spotřeba masa u nás a ve vyspělých státech činí 80 – 100 kg ročně na osobu, což odpovídá čisté spotřebě 60 kg na osobu. Při vyšší konzumaci masa může docházet v trávicí soustavě k rozvoji hnilobné mikroflóry, tvorbě biogenních aminů, přebytku purinových bází, což vede k hyperglykémii a ukládání solí kyseliny močové v kloubech. Zvýšený příjem bílkovin má za následek zvýšený obsah jedovatého amoniaku vzniklého v důsledku odbourávání bílkovin, kterého se organismus snaží zbavit ve formě močoviny. Konzumací tukem bohatého masa se zvyšuje nadměrný podíl živočišných tuků a cholesterolu a tím i zdravotní rizika [2]. Při vysoké konzumaci masa bohatého na cholesterol se zvyšuje nebezpečí jeho ukládání na vnitřních stěnách cév a vzniku tzv. aterosklerózy. Doporučený denní příjem cholesterolu je maximálně 300 mg (s optimem 100 mg na každých 4200 kJ přijatých stravou) [10]. Riziko rakoviny souvisí s úpravou masa zbytečně vysokou teplotou (vznik heterocyklických aminů) [2].

3.1.1 Hovězí a telecí maso

Z nutričního hlediska nepatrně vyčnívá nad ostatní druhy mas hovězí a telecí maso. Mezi kompletní sadou v bílkovinách obsažených nezbytných aminokyselin mají významné zastoupení zejména arginin (důležitý pro tvorbu pojivové tkáně a pro růst) a histidin (je důležitým článkem v metabolismu purinových bází a nukleových kyselin, je nutný pro růst a tvorbu hemoglobinu), které jsou důležité zejména pro dětskou populaci. Hovězí a telecí maso může být i zdrojem velice významného lecitinu [11].

- Tuk: málo tučné (zejména telecí), průměr 8 % (libové hovězí nebo telecí cca 2 – 3 % tuku)
- Bílkoviny: poměrně vysoký obsah, cca 20 %
- Cholesterol: nízký obsah, 46 – 64 mg na 100 g masa
- Extraktivní látky: 5 – 7 %
- Vitaminy (rozpustné v tucích i ve vodě):
 - A – cca 10 mg na 100 g masa (denní potřebná dávka je 1000 mg vitamínu A)
 - D – cca 0,4 mg na 100 g masa (hovězí játra až 1,5 mg; denní potřebná dávka činí 2,5 mg vitamínu D)
 - B₁ – 0,1 mg na 100 g masa (denní potřebná dávka činí 1,1 mg)
 - B₂ – 0,15 až 0,22 mg na 100 g masa (denní potřebná dávka 1,5 mg)
 - Niacin – vysoký obsah, kolem 5 mg na 100 g masa (100 g hovězího nebo telecího masa hradí jednu třetinu potřebné dávky niacinu)
 - Kyselina pantothenová – 0,6 mg na 100 g masa (denní potřebná dávka 8 mg)
 - B₁₂ - vysoký obsah, 2 až 3 mg na 100 g masa (100 g hovězího nebo telecího masa uhradí téměř celou potřebnou denní dávku; hovězí játra mohou mít až 30-ti násobné množství vitamínu B₁₂ ve 100 g)
- Minerální látky: Fe (vyšší obsah), Zn (vyšší obsah), Ca, Na, K, Mg, P [11].

3.1.2 Vepřové maso

Vepřové maso je v průměru tučnější, a s tím také souvisí jeho větší energetická hodnota [11].

- Tuk: 10 až 60 %
- Bílkoviny: složení je stejné jako u masa hovězího, i když je poněkud nižší obsah aminokyselin leucinu, cysteinu, fenylalaninu a tryptofanu
- Cholesterol: obsah kolísá většinou mezi 70 mg (maso libové) a 85 mg (maso tučné)
- Biologicky cenné látky: obsah stejný či nepatrně nižší než v mase hovězím (nižší je zejména u masa tučného), avšak s výjimkou vitamínu B₁, kterého bývá ve 100 g vepřového masa až 0,75 mg [11].

3.1.3 Drůbeží maso

Všeobecným jevem současnosti je stále se zvyšující obliba drůbežního masa na úkor hlavně masa hovězího, ale i jiných druhů mas. Tato obliba je dána především výbornými dietetickými vlastnostmi kuřecího a krůtího „bílého masa“ [2].

Drůbeží maso obsahuje v průměru cca 25 % velmi hodnotných bílkovin a většinou velice málo tuku (kuřata, krůty). Cholesterol kolísá v dosti širokém rozmezí: u krůty je ho přibližně 35 mg a u kuřat cca 80 až 85 mg ve 100 g masa. Drůbeží maso je bohaté na extraktivní látky, hlavně na puriny a cholin, obsah u bílého masa činí až 10 %. Obsah vitaminů je jen ve stopách (s výjimkou niacinu) [11].

3.1.4 Srovnání vlastností drůbežního masa s masem jatečných zvířat

Mezi masem velkých jatečných zvířat a masem drůbeže existují obecně některé rozdíly. Obsah tuku v mase kura, skotu a prasat je uváděn v poměru 1 :4 : 6, obsah bílkovin ve stejných druzích masa v poměru 1,0 : 0,9 : 0,7. V drůbežím mase je vyšší podíl plnohodnotných bílkovin (především u hrabavé drůbeže v prsní svalovině bez kůže), nižší podíl vaziva (4 až 8 % kolagenu oproti hovězímu a vepřovému masu, kde je uváděno 7 až 25 % z celkových bílkovin), nižší obsah tuku (opět především v prsní svalovině hrabavé

drůbeže). Drůbeží tuk se vyznačuje vyšším zastoupením esenciálních mastných kyselin (více než 20 %, zatímco u velkých jatečných zvířat 2 až 7 %), což má z hlediska výživy člověka příznivý dopad, z hlediska technologického však může docházet ve větší míře k oxidaci [2].

Tab. 3. Srovnání průměrné energetické hodnoty ve 100g různých druhů mas [6].

Druh masa	Průměrná energetická hodnota [kJ/100g]
Krůtí maso	414
Slepičí maso	558
Kuřecí maso	473
Husí maso	1167
Kachní maso	972
Libové hovězí maso	444
Libové vepřové maso	897
Tučné vepřové maso	1790

3.1.5 Ryby

Nutriční hodnota rybího masa se odvozuje od jeho chemického složení. Bílkoviny mají vysokou biologickou hodnotu. Jsou velmi dobře stravitelné a využitelné. Obsahují výhodné podíly všech esenciálních aminokyselin [2].

Některé ryby jsou sice dosti tučné, avšak jejich tuk má vysokou biologickou hodnotu, neboť obsahuje značné množství nenasycených mastných kyselin (např. kyselina eikosapentaenová – významná pro prevenci srdečně-cévních nemocí). Např. úhoř má až 27 % tuku, losos 13 %, sled' a makrela 7 až 10 % tuku. Cholesterol cca 50 až 60 mg na 100 g rybího masa. Významný je obsah jódu (makrela 0,05 mg, sled' 0,47 mg, treska 0,15 mg na 100 g rybího masa). Z dalších minerálních látek to je fosfor (200 až 300 mg

na 100 g rybího masa) a fluor (treska 1 mg na 100 g). Z vitaminů jsou v rybím mase obsaženy vitaminy rozpustné v tucích (D – losos cca 10 mg, sled' 10 až 30 mg, úhoř 50 mg, jaterní tuk tuňáka cca 100 mg na 100 g; A – obsahují jak sladkovodní, tak i mořské ryby) [11].

Výživová hodnota mořských ryb je vyšší než ryb sladkovodních [2].

3.1.6 Ostatní druhy masa

Maso skopové je poměrně dosti tučné (14 až 25 % tuku) [11].

Králičí maso patří k nejhodnotnějším druhům masa. Používá se v dietách pro svoji nízkou energetickou hodnotu vzhledem k malému obsahu tuku, který se pohybuje v rozmezí 3 až 6 %. Vysoký je rovněž i obsah esenciálních mastných kyselin. Maso obsahuje málo pojiv a je tudíž křehké [2].

3.1.7 Uzenářské (masné) výrobky

Masné výrobky jsou z nutričního hlediska méně vhodné potraviny než libová masa (snad s výjimkou šunky). Je to způsobeno tím, že většina těchto výrobků má vysoký obsah tuku. Poměr bílkovin a tuku – gothajský či tyrolský salám 1 : 4, špekáčky 1 : 3, šunkový salám 1 : 1, šunka 3 : 1 [11]. Obsah tuku kolísá od 9 % (dušená šunka) do 57 % (Poličan). V zahraničí se vyrábějí výrobky s nízkým nebo sníženým obsahem tuku (light). Výrobky zbavené tuku však ztrácejí chutnost, protože řada chuťových a aromatických látek je právě rozpustná v tucích. Energetická hodnota se pohybuje v rozsahu od 6840 kJ (dušená šunka) do 22 320 kJ (Poličan) na 1 kg výrobku [2].

Další nevýhodou uzenářských výrobků je vysoký obsah soli. Ta má sice na jedné straně určité konzervační účinky (zvyšuje trvanlivost) a schopnost udržet přidanou vodu (může zlepšit chuť výrobku), avšak na straně druhé je příčinou vysokého příjmu rizikového sodíku, čímž se zvyšuje nebezpečí hypertenze. Sůl se do uzenářských výrobků přidává většinou v množství kolem 3 g na 100 g výrobku, denní doporučená dávka kuchyňské soli je 5 g. Dát si k večeři 10 dkg špekáčků představuje vedle vysokého energetického příjmu (vysoký ob-

sah tuku) i vyčerpání denní doporučené dávky soli na 60 %, ostatní celodenní strava by pak musela být téměř neslaná [11].

4 MIKROBIOLOGIE MASA

Maso z jatečných zvířat, drůbeže a ryb je typickou neúdržnou potravinou a může tedy velmi rychle podléhat mikrobiálnímu kažení. Je to dáno látkovým složením masa, zejména vysokým obsahem vody a bílkovin a dále nízkou kyselostí, což činí z masa prostředí velmi vhodné pro rozvoj mikroorganismů [6]. Maso má vodní aktivitu 0,98 – 0,99, velice příhodnou pro pomnožování mikroorganismů. Obsah živin je bohatý na bílkoviny, pH bývá asi 7,0, ale může klesnout až na 5,0, podle obsahu kyseliny mléčné vznikající glykolýzou po porážce. Později opět stoupá v důsledku vývinu amoniaku při deaminačních procesech [9]. Tuto skutečnost je třeba velmi důsledně respektovat v celé zpracovatelské vertikále jatečných zvířat a masa, ale i při jeho oběhu v tržní síti a při jeho uchovávání v domácnostech a v zařízeních společného stravování [6].

Čerstvé maso obsahuje velice málo mikroorganismů. Jejich počet je vyšší, pokud zvíře před porážkou trpělo stresem nebo hladem a téměř nulový, jestliže zvíře bylo v dobrém stavu. Do svaloviny pronikají hlavně aerobní mikroorganismy, anaerobní v mnohem menší míře. Mikrobiální stav masa odráží i podmínky chovu, způsob ustájení, krmení a hlavně transport a manipulace před porážkou [9].

Kritickým bodem výroby je jateční zpracování, hlavně vykolování. Podle veterinárních předpisů nesmí uplynout od vykrvení do vynětí vnitřností doba delší než 30 minut. Je-li tato doba překročena začínají pronikat mikroorganismy z trávicího ústrojí do ostatních částí těla zvířete. Sekundární kontaminace může pocházet z obsahu střev nebo z povrchu kůže, kde jsou vysoké denzity různé mikroflóry. Uvádí se, že na povrchu kůže dosahuje počet mikrobů hodnot až $10^9 / \text{cm}^2$. Je samozřejmé, že velký význam má i celková čistota provozu, čistota náčiní a osobní hygiena [9].

4.1 Mikroorganismy v mase

Mikroorganismy, které způsobují skutečný rozklad neživých a dožívajících potravin, jsou zpravidla heterotrofní saprofyti. Organickou hmotu enzymově rozkládají a přeměňují, a to buď na úplně jednoduché zplodiny, nebo aspoň na látky energeticky chudší, z nichž některé použijí a některé uvolňují do prostředí [13].

Na mikroorganismy v mase lze pohlížet z několika aspektů. Tím základním je, zda mohou být člověku prospěšné, zda mu škodí tím, že kazí maso anebo zda mohou ohrožovat lidské zdraví nebo dokonce i život konzumentů [6].

V současnosti se příznivých vlastností mikroorganismů využívá v nových, resp. moderních biotechnologiích, do nichž lze zařadit např. i využití startovacích kultur při výrobě syrových trvanlivých salámů s vyšší kyselostí (např. salám Herkules). Protipólem prospěšných mikroorganismů jsou mikroorganismy patogenní, které vyvolávají onemocnění člověka přímo (salmonely) nebo produkcí toxinů (*Clostridium botulinum* – botulotoxin). Mezi oběma zmíněnými skupinami mikroorganismů se nachází početně největší skupina mikroorganismů, která bývá označována jako obecná či banální mikroflóra. Je nebezpečná především svým celkovým počtem, velkou adaptabilitou na nové podmínky a svou virulencí, takže její rozvoj na mase vede k mikrobiální proteolýze, tedy ke kažení či hnití masa [6].

Kažení masa vyvolávají proteolytické mikroorganismy, např. pseudomonády, a jak ukazují práce z poslední doby, značný význam má *Brochothrix thermophacta*, což je taxonomicky nejasný druh schopný růstu za aerobních i anaerobních podmínek při 1 °C [9]. Uplatňuje se nejen při kažení masa, ale i u vakuově balených masných výrobků [14].

V mase se mohou vyskytovat i salmonely, *Yersinia enterocolitica*, *Clostridium perfringens*, *Staphylococcus aureus* a někdy i *Clostridium botulinum* [9].

Hnití masa

Hniloba masa může mít podle druhu mikrobiálních původců dvě typické formy – aerobní a anaerobní [13].

Aerobní hniloba začíná na povrchu masa, proniká poměrně pozvolna do hlubších vrstev a má tři fáze. V první se mikroorganismy (aerobové) množí a maso nevykazuje zřetelné změny. Ve druhé fázi začíná maso páchnout, jeho barva se mění, objevují se zřetelné kolonie a povrch masa se rozpadá. Reakce se zvolna stává alkalickou. Uvnitř může být maso ještě zdravé. Teprve ve třetí fázi postupuje hniloba do hloubky a nastává energetický rozklad bílkovin za mohutného rozvoje tyčinkovitých bakterií [13].

Anaerobní hnití vyvolávají bakterie, které vnikly (zpravidla po krevních cestách) dovnitř masa. buď při porážce nebo z trávicího traktu. Jde o nemnohé druhy obligátních a fakultativních anaerobů [13].

Obě formy hniloby – aerobní a anaerobní – probíhají nejčastěji současně. Přitom se vlivem měnících se podmínek pozměňuje i charakter převládající mikroflóry [13].

4.1.1 Bakterie způsobující kažení masa

Acinetobacter – *Moraxella* je označení pro striktně aerobní skupinu gramnegativních tyčinek vyskytujících se velice často na povrchu čerstvého masa. K výživě využívají zejména aminokyseliny. Maso hlouběji nerozkládají, vytváří podmínky pro činnost dalších hnilobných bakterií zejména pseudomonád [7].

Aeromonas jsou gramnegativní tyčinky, na maso se dostávají ze zevního prostředí, rozkládají tuky i bílkoviny a to i při teplotách blízkých 0 °C [7].

Bacillus jsou grampozitivní, kataláza pozitivní tyčinky schopné tvořit velmi rezistentní spory, které se ničí až sterilizačními teplotami. V přírodě jsou značně rozšířené v půdě, vodě, prachu i zažívacím traktu lidí a zvířat. Rostou aerobně nebo fakultativně anaerobně. Mají lipolytické, proteolytické a sacharolytické vlastnosti a podílí se na kažení potravin. Jsou převážně mezofilní, jen *Bacillus stearothermophilus* je termofilní a roste až do teploty 65 °C. Dalšími zástupci jsou např. *B. anthracis* (patogenní pro lidi a zvířata), *B. cereus* (onemocnění z potravin), *B. subtilis* (v přírodě nejrozšířenější) [7; 15].

Campylobacter jsou gramnegativní mírně zahnuté pohyblivé tyčinky rostoucí v mikroaerofilním až anaerobním prostředí při teplotě 25 – 42 °C [7].

Typovým druhem rodu *Campylobacter* je *Campylobacter fetus* jako původce zmetání ovcí a dobytka. Jako podmíněný patogen někdy způsobuje u člověka infekce spojené s bakteriemií, nikdy však u zdravého [16].

Campylobacter jejuni se vyskytuje hlavně u drůbeže, *Campylobacter coli* u prasat. V přírodě jsou kampylobakterie velmi rozšířeny. Infekce nastává požitím infikované potravy, kravským mlékem nebo vodou, ale i kontaktem s nakaženými zvířaty. Zatímco na přelomu 80. a 90. let 20. století byla kampylobakteriíza v ČR neznámá, v roce 2000

bylo evidováno téměř 17 000 případů tohoto onemocnění [17]. U dospělých porážených kusů je *Campylobacter sp.* součástí střevní mikroflóry, aniž by vyvolával příznaky onemocnění [18].

Campylobacter jejuni a *Campylobacter coli* kolonizují drůbež nesmírně snadno. V 1 g stolice broilerů je běžně kolem 10^7 buněk kampylobakterů. Průmyslové zpracování napomáhá kontaminaci drůbežích produktů. Asi třetina kuřat v obchodech je kontaminována kampylobaktery. Aby však kampylobaktery přežily, musela by být připravená drůbež silně nedovařená nebo nepropečená, a proto se předpokládá, že ke kontaminaci dochází v kuchyni ze syrových kuřat. V menší míře může být v kuchyni zdrojem kampylobakterů syrové maso a vnitřnosti. Poměrná choulostivost kampylobakterů je našťástí zárukou toho, že se nepomnoží v potravinách uložených při pokojové teplotě [16].

Dobrá úroveň sanitace a především nezávadná provozní voda jsou základním předpokladem úspěšné prevence. K účinné inaktivaci kampylobakterů postačuje pasterace s výdrží delší než 16,5 s při teplotě vyšší než 63 °C [19].

Clostridium jsou grampozitivní sporotvorné tyčinky rostoucí v anaerobním prostředí v rozmezí teplot 10 – 45 °C [7]. Běžně se vyskytují v půdě, odpadech a produktech živočišného a rostlinného původu. Vyskytují se i jako saprofyty a komenzálové ve střevním ústrojí zvířat a člověka [14]. V potravinách se mohou uplatnit za anaerobních podmínek, kde rychle rozkládají bílkoviny, zpravidla za tvorby plynu, a jsou častými původci bombáží konzerv. Mezi klostridia patří řada druhů, z nichž některé jsou patogenní. Z hlediska alimentárních onemocnění jde zejména o *C. perfringens* a *C. botulinum* [7].

C. perfringens tvoří spory. Některé (typ A) produkují enterotoxin, který vzniká v tenkém střevě a vyvolává otravy z potravin způsobené toxiny (tzv. intoxikace). K infekci dochází po požití kontaminované potraviny, která byla nevhodně tepelně zpracována nebo prohřátá, např. hovězí maso nebo drůbež. Spory přežívají normální teplotu vaření, klíčí a množí se během ochlazení i zahřátí [20].

C. botulinum jsou půdní, saprofytické bakterie. V lidském střevě se jako komenzál nevyskytují, pokud se tam zjistí, znamená to nedávnou kontaminaci z potravy. Vyvolávají otravu nervového systému zvanou botulismus neboli otrava klobásovým jedem. Názvem *C. botulinum* se označují 4 biologicky odlišné skupiny klostridií, které produkují neurotoxin. [21].

Enterobacteriaceae je hygienicky a technologicky významná čeleď zahrnující rody *Escherichia*, *Edwardsiella*, *Citrobacter*, *Salmonella*, *Shigella*, *Serratia*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Hafnia*, *Proteus*, *Yersinia*, *Erwinia* a další. Jsou to gramnegativní aerobní až fakultativně anaerobní tyčinky, pohyblivé i nepohyblivé, nesporotvorné, proteolytické a lipolytické. Vyskytují se zejména v trávicím ústrojí a v okolí lidí a zvířat, znečišťují i odpadní vody a krmivo. Některé kmeny jsou patogenní. Jsou převážně mezofilní a některé druhy rostou i při chladírenských teplotách [7].

- Kmeny *Escherichia coli* jsou gramnegativní tzv. koliformní tyčinky a jsou to nejčastější bakterie aerobní saprofytické střevní flóry člověka a zvířat [16]. V posledních letech na sebe upoutává pozornost zejména serotyp O157 : H7, který produkuje toxiny tzv. verotoxiny. Tyto verotoxiny jsou zodpovědné za ničení částí sliznice tlustého střeva, což vede ke krvavým průjmům infikovaných jedinců [22].
- *Edwardsiella* je rod gramnegativních, fakultativně anaerobních tyčinkovitých bakterií. Tyto bakterie byly izolovány z vody a z krve, moči a stolice lidí a zvířat. Dosud jsou známy dva druhy: *Edwardsiella tarda* a *Edwardsiella hoshinae* [23].
- *Salmonella* jsou fakultativně anaerobní gramnegativní tyčinky, normálně se vyskytují ve střevě zvířat [16]. Optimální teplota růstu je 35 – 37 °C. Salmonely nepřežívají pasteraci s výdrží 10 minut při teplotě vyšší než 65 °C [19]. Vyskytuje se hojně u zvířat, zejména u drůbeže a prasat. Dále může být jejím zdrojem půda, hmyz, zvířecí výkaly, syrové maso a další. *Salmonella* způsobuje onemocnění salmonelózu, v Evropě je nejvíce onemocnění způsobeno bakterií *Salmonella enteritidis*. Zdrojem onemocnění je často tepelně nedostatečně opracované maso, masné výrobky, vejce a výrobky z nich. Salmonely se množí v každé potravíně, mají-li dostatek vlhkosti, přiměřenou teplotu a pH [24].
- *Shigella* jsou gramnegativní tyčky, jež nelze morfologicky odlišit od ostatních střevních tyček. Jsou velmi blízce příbuzné rodu *Escherichia* [16]. Shigely jsou patogenní pro člověka a primáty, u nichž vyvolávají úplavici, tzv. bacilární dysenterii. Zdrojem infekce je člověk, vzácně i kontaminovaná potravina. Bakterie jsou velmi citlivé na vlivy vnějšího prostředí, přesto je infekční dávka k propuknutí úplavice velmi nízká. Jde o typickou „nemoc špinavých rukou“. K nákaze dochází po konzumaci konta-

minovaných potravin např. drůbeže. Ke kontaminaci potravin dochází vodou kontaminovanou fekáliemi, kde byl primárním zdrojem shigel nemocný člověk [25].

- *Serratia* je rod gramnegativních fakultativně anaerobních pohyblivých tyčinkovitých bakterií. Vyskytují se ve vodě, v půdě, na rostlinách a v různých biologických materiálech. Je známo 7 druhů. Nejznámější je *Serratia marcescens*, fakultativní patogen produkující červený až růžový pigment prodigiosin [26].
- Druhy rodu *Enterobacter* (dříve *Aerobacter*) se pravděpodobně vyskytují přirozeně v půdě a ve vodě, ale lze je občas izolovat ze stolice a dýchacího ústrojí člověka [16].
- *Hafnia* byly dříve klasifikovány do rodu *Enterobacter* jako *Enterobacter alvei* a *Enterobacter hafniae*. Hybridizací DNA se však prokázalo, že tyto mikroorganismy patří do zvláštního rodu. Hafnie jsou ve stolici, v odpadních vodách, v půdě a v mléčných výrobcích. Př. *Hafnia alvei* je podmíněný patogen [16].

Lactobacillus jsou dlouhé nesporulující grampozitivní a kataláza negativní tyčinky. Rostou aerobně až mikroaerofilně v rozmezí teplot od 5 do 53 °C, vyžadují kyselé prostředí. Jsou přítomny v trávicím ústrojí lidí a zvířat, mají sacharolytické a lipolytické schopnosti, homofermentativní druhy jsou využívány jako kulturní mikroflóra při řízené fermentaci masných výrobků. Laktobacily jsou běžným komponentem mikroflóry masa a výrobků a mají významný vliv na jejich jakost [7].

Brochothrix jsou grampozitivní drobné tyčinky. Pro maso má význam zejména *Brochothrix thermosphacta*, fakultativní anaerob rostoucí při teplotě blízké 0 °C. Je častým účastníkem kažení masa a vakuově balených masných výrobků, často jako dominantní mikroorganismus [7].

Micrococcus jsou grampozitivní, kataláza pozitivní koky, v přírodě hojně rozšířené ve vodě, půdě, prachu a na pokožce zvířat a lidí. Jsou častým nálezem v mase a masných výrobcích jako saprofytická mikroflóra. Jsou mírně proteolytické a lipolytické, alimentární onemocnění nevyvolávají. Někteří zástupci se uplatňují jako žádoucí součást startovacích kultur při zrání výrobků a to pro svou schopnost urychlovat probarvovací reakce redukcí dusičnanu na dusitany a zvyšovat stabilitu barvy [7].

Pseudomonas jsou gramnegativní tyčinky rostoucí výhradně v rozmezí teplot 4 až 43 °C. V přírodě jsou značně rozšířené a vyskytují se i na kůži lidí a zvířat. Jsou značně rezistentní vůči desinfekčním prostředkům, většina druhů je silně proteolytická a lipolytická [7]. K zástupcům patří např. *Pseudomonas aeruginosa*, což je patogen člověka. V některých oblastech světa způsobuje infekce člověka také *Burkholderia mallei* a *Burkholderia pseudomallei*, které byly vyčleněny z rodu *Pseudomonas* [16].

Staphylococcus jsou grampozitivní, kataláza pozitivní koky, rostoucí aerobně i fakultativně anaerobně. Optimální teplota růstu je 35 – 45 °C, mohou však růst i v rozmezí od 6,5 – 46 °C [7]. Jsou velmi odolné na vlivy zevního prostředí, produkují řadu enzymů a toxinů. Onemocnění „stafylokoková enterotoxikóza“ je vyvoláno enterotoxiny, které snesou 20-ti minutový var. Tyto enterotoxiny produkují bakterie druhu *Staphylococcus aureus*. Stafylokokové enterotoxiny patří do skupiny tzv. superantigenů s mohutným antigenním účinkem na imunitní systém infikovaného jedince. K nákaze stafylokokovou enterotoxikózou dochází alimentárně, požitím potravin (uzeniny, sekaná masa, smetanové omáčky, potraviny obsahující vejce), která byla kontaminována stafylokoky a po určitou dobu uchována za podmínek umožňujících namnožení mikroorganismů a produkci toxinů [27].

Staphylococcus aureus je bakterie, která se nachází na nosní sliznici u 20 – 40 % zdravých lidí a obvykle také na kůži, aniž způsobují onemocnění. Za určitých okolností, zvláště při poškození kůže, může vzniknout infekce. Mimo nemocnici obvykle k přenosu infekce nedochází. Pacienti v nemocnici jsou k infekci daleko vnímavější, protože jsou oslabeni nemocí nebo po operaci [28].

Streptococcus zahrnuje širokou skupinu grampozitivních, kataláza negativních kokovitých až ovoidních mikroaerofilních bakterií. Jsou značně odolné vůči zevním vlivům, teplotami 70 °C bývají často jen oslabeny a jsou tak častým nálezem nejen v surovinách, ale i v tepelně opracovaných výrobcích, v nichž se mohou v poměrně krátké době pomnožit do vysokých počtů a podílet se i na zelenání výrobků. Vyhovuje jim kyselé prostředí o pH nižším než 5,5. Jejich proteolytická aktivita je nízká, metabolickou činností se podílejí na okyselení masa a masných výrobků a jsou tak spolu s laktobacily významným antagonistou hnilobných bakterií [7].

4.1.2 Plísně

Plísně jsou heterotrofní mikroorganismy náležející mezi houby. Jsou přísně aerobní, rostou proto jen na povrchu potravin nebo ve vzduchových bublinách. U masa jejich podhoubí neproniká zpravidla hlouběji než 2 – 5 mm pod povrch. Na výživu jsou méně náročné než bakterie a mohou růst nejen v chladárnách při teplotách kolem 0 °C, ale i v mrazárnách do teploty –10 až –12 °C [7]. Pokud jde o citlivost plísní k vysokým teplotám, většina jich nepřežívá několikaminutové zahřívání na teplotu 70 až 75 °C. Pouze příslušníci rodů *Phialophora*, *Paecilomyces* a *Byssoschlamys* mohou někdy přežít i 10-ti minutové zahřívání při teplotě 80 °C [15].

Na mase jsou plísně častým nálezem a na skladovaných potravinách mohou způsobit vážné škody a to nejen změnou sensorických a nutričních vlastností, ale především tvorbou fyziologicky aktivních až výrazně toxických metabolitů – mykotoxinů. Vytvořené mykotoxiny jsou velmi rezistentní, často i vůči sterilačním teplotám [7].

Z velmi široké škály plísní bývají na mase zastoupeny zejména rody *Penicillium*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Mucor*, *Cladosporium*, *Rhizopus* a další [7].

4.1.3 Kvasinky

Kvasinky jsou jednobuněčné mikroorganismy náležející do kmene hub. Význam kvasinek jako mikroflóry masa je menší než u bakterií, i když jejich nález na mase a masných výrobcích je častý. Při velkém pomnožení mohou svou metabolickou činností rozložit potravinu tak, že vzniklé rozkladné produkty mohou ohrozit zdraví. Mezi významné zástupce vyskytující se na mase patří *Debaryomyces*, *Saccharomyces*, *Cryptococcus* a *Trichosporon* [7].

5 FOSFÁTY JAKO INHIBIČNÍ LÁTKY

Fosfáty se v potravinářství velmi často používají při výrobě tavených sýrů jako tavicí soli [33]. Tavicí soli jsou obvykle solemi vícesytných kyselin (fosforečné nebo citronové) s alkalickými kovy (sodíkem) [30].

V praxi se používají zejména sodné soli fosfátů a polyfosfátů. Fosfátové tavicí soli jsou dodávány jako směsi orthofosfátů, difosfátů a polyfosfátů v různém kondenzačním stupni [31].

Fosfátové tavicí soli mají schopnost měnit vápenaté ionty za sodné nebo za draselné. Schopnost výměny iontů stoupá u fosfátových tavicích solí od orthofosfátů k polyfosfátům [30]. Schopnost vazby vápenatých iontů může mít potenciál i z hlediska antimikrobiálních vlastností, neboť vápenaté ionty mohou stabilizovat buněčnou stěnu mikroorganismů [31].

5.1 Fosfáty, polyfosfáty

Fosfáty neboli fosforečnany (PO_4^{3-}) jsou soli kyseliny fosforečné (H_3PO_4) [32].

Polyfosfáty jsou nejčastěji sodné nebo draselné soli polyfosforečných kyselin s lineárním řetězcem a různým stupněm polymerace nebo soli cyklických polyfosforečných kyselin, které jsou vlastně oligomery kyseliny hydrogenfosforečné (meta-fosforečné) HPO_3 [29].

Fosfáty v potravinách významně ovlivňují vlastnosti proteinů. Jejich účinek je spojen především s úpravou podmínek prostředí, kde mohou způsobit změnu pH, iontové síly roztoku, odštěpení kationtů, atd. [36].

Přídavek fosfátů k potravinám ovlivňuje hydrataci bílkovin a polysacharidů a jejich koloidní vlastnosti [29]. Přidávání fosfátů do masných výrobků umožňuje zlepšit vaznost a emulgační schopnosti masa skladovaného delší dobu, především za mrazírenských podmínek. Polyfosfáty se během zpracování a skladování masných výrobků hydrolyzují na neškodný orthofosfát. Schopnosti polyfosfátu lépe vázat vodu se využívá také při výrobě konzervovaných šunek i jiných masných výrobků [33]. Polyfosfáty mají také určité antimikrobiální účinky [29].

5.1.1 Antimikrobní účinky fosfátů

Antimikrobní účinky fosfátů se projevují především na grampozitivní bakterie, některé mikromycety a kvasinky. U grampozitivních bakterií je inhibiční efekt závislý na délce řetězce fosfátů (fosfáty s delšími řetězci mají větší inhibiční účinky než fosfáty s kratšími řetězci), na teplotě a pH prostředí, počáteční populaci mikroorganismů nebo přidavku iontů kovů. U bakterií tvořících spory mají polyfosfáty navíc inhibiční vliv na germinaci spor [37].

Princip působení polyfosfátů s dlouhým řetězcem spočívá v chelataci především divalentních iontů kovů (Ca^{2+} a Mg^{2+}), které jsou esenciální pro udržení integrity buněčné stěny grampozitivních bakterií tím, že vytvářejí příčné můstky mezi molekulami teichoových kyselin buněčné stěny [37].

5.1.2 Inhibiční účinek fosfátů na gramnegativní a grampozitivní bakterie

Buňková L. a kol [37] zkoumali účinky komerčních fosfátových tavicích solí (HBS, S9 a 690) na sbírkové bakterie a bakterie izolované z tavených sýrů. Vybrány byly bakterie, které mohou kontaminovat potraviny, popř. mohou mít i klinický význam. Zvoleno bylo 8 gramnegativních bakterií (*Escherichia coli*, *Salmonella Typhimurium*, *Serratia marcescens*, *Proteus vulgaris*, *Citrobacter sp.*, *Klebsiella sp.*, *Pseudomonas fluorescens* a *Flavobacterium sp.*) a 8 grampozitivních bakterií (*Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus*, *Corynebacterium glutamicum*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus sphaericus* a *Bacillus stearothermophilus*). Bakterie byly kultivovány v masopeptonovém bujonu (MPB) 24 hodin při 30 °C nebo 37 °C (*B. stearothermophilus* při 45 °C). Růst mikroorganismů byl zjišťován spektrofotometricky měřením optické denzity buněk při vlnové délce 600 nm (OD_{600}). Minimální inhibiční koncentrace byla definována jako množství fosfátové tavicí soli nutné ke snížení optické denzity bakterií pod 0,075.

Výrazný inhibiční efekt zvolených tavicích solí na gramnegativní bakterie nebyl zjištěn. Výsledky působení zvolených tavicích solí na gramnegativní bakterie jsou zaznamenány v tabulce 4.

Tab. 4. Působení testovaných tavicích solí na gramnegativní bakterie ^x

	Kontrola (OD₆₀₀)	0.5% HBS	0.5% S9	0.5% 690
<i>Escherichia coli</i>	0.348	0	0	0
<i>Serratia marcescens</i>	0.788	0	+	+
<i>Salmonella</i> Typhimurium	0.308	+	+	+
<i>Proteus vulgaris</i>	0.976	0	0	+
<i>Citrobacter</i> sp.	0.632	+	0	+
<i>Klebsiella</i> sp.	0.320	0	+	0
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	0.423	++	++	+
<i>Flavobacterium</i> sp.	0.266	0	+	++

^xInhibiční efekt testovaných látek je vyjádřen pomocí procenta optické denzity (OD₆₀₀) inokulovaného bujony obsahujícího tavicí sůl (v uvedené koncentraci) vztažené vůči hodnotě optické denzity (OD₆₀₀) kontrolního vzorku bez tavicí soli inokulovaného danou kulturou; OD₆₀₀ ≤ 25 % +++; 25% < OD₆₀₀ ≤ 50 % ++; 50% < OD₆₀₀ ≤ 75 % +; OD₆₀₀ > 75 % 0.

Z tabulky 4. je patrné, že u žádné z testovaných tavicích solí nebylo dosaženo koncentrace, která by striktně inhibovala růst testovaných gramnegativních bakterií. Větší efekt byl pozorován pouze u gramnegativních aerobních, kataláza i oxidáza pozitivních tyčinek (*Ps. Fluorscens* a *Flavobacterium* sp.), u kterých došlo k poklesu hodnoty optické denzity buněk vůči kontrole o cca 55 %. U gramnegativních tyčinek z čeledi *Enterobacteriaceae* k výraznějšímu poklesu nárůstu nedošlo.

Prakticky zanedbatelné účinky byly zjištěny u gramnegativních bakterií, které byly získány z tavených sýrů. To může být vysvětleno tím, že tyto mikroorganismy byly izolovány z prostředí s tavicími solemi a mohou být k jejich přítomnosti lépe přizpůsobeny než testované sbírkové kmeny bakterií.

Výraznější inhibiční efekt komerčních fosfátových tavicích solí na grampozitivní bakterie vykazovala pouze HBS, což je tavicí sůl, která obsahuje polyfosfáty v nejvyšším kondenzačním stupni. Obecně platí, že čím více obsahují tavicí soli polyfosfáty s vysokým stupněm kondenzace, tím větší je jejich antibakteriální účinek. U tavicích solí S9 a 690 nebyl zaznamenán významný inhibiční účinek.

Tavicí sůl HBS byla schopna při koncentraci 0,1 % w/v inhibovat růst bakterií druhů *Bacillus sphaericus* a *B. stearothermophilus*, u kterých nebyl při této koncentraci pozorován prakticky žádný nárůst. U kmenů *Staphylococcus aureus*, *Corynebacterium glutamicum* a izolátů z tavených sýrů byla zaznamenána minimální inhibiční koncentrace této tavicí soli při 0,2 % w/v. U ostatních testovaných grampozitivních bakterií (*M. luteus*, *B. cereus*, *B. subtilis*, *B. brevis*) zastavovala tavicí sůl HBS jejich růst v koncentraci 0,3 % w/v [37].

PRAKTICKÁ ČÁST

6 CÍL DIPLOMOVÉ PRÁCE

Diplomová práce byla zaměřena na:

- Sledování dynamiky růstu mikroorganismů (MO) na čerstvém mēlněném vepřovém mase bez inhibičních látek.
- Sledování dynamiky růstu MO na čerstvém mēlněném vepřovém mase, do něhož byly aplikovány inhibiční látky (fosfátové soli): HBS, S9 a 690. Za tímto účelem byl sledován celkový počet mikroorganismů, růst koliformních bakterií a růst kvasinek a plísní.
- Identifikaci bakterií rostoucích na čerstvém mēlněném vepřovém mase.

7 ZAŘÍZENÍ, PŘÍSTROJE, CHEMIKÁLIE, ŽIVNÉ PŮDY A OSTATNÍ POMŮCKY, MASO

7.1 Přístroje a zařízení

Autokláv Varioklav

Sterilizátor Memmert

Biologický termostat Memmert

Vorwerk Thermomix TM 21

Analytické váhy

Základní laboratorní pomůcky

Automatické pipety Biohit, Hirschmann

Homogenizátor Stomacher

Chladnička

7.2 Chemikálie a živné půdy

Ethanol denaturovaný

Sterilní destilovaná voda

Masopeptonový agar (MPA)

Složení:

NaCl.....	3 g/l
Beef extrakt.....	3 g/l
Masový pepton.....	5 g/l
Agar.....	15 g/l
Voda.....	1000 ml

pH 6,8 – 7,0

MPA slouží ke stanovení celkového počtu MO.

Příprava:

Jednotlivé složky byly naváženy do infúzní láhve a poté byla dolita destilovaná voda. Obsah lahve byl protřepán a následně autoklávován. Nakonec byla půda nalita do připravených sterilních Petriho misek.

ENDO agar (HiMedia, Bombai, Indie)

Složení:

Laktosa.....	10 g/l
Basický fuchsin.....	0,5 g/l
Masový pepton.....	10 g/l
Siřičitan sodný.....	2,5 g/l
Hydrogenfosforečnan (di)draselný.....	3,5 g/l
Agar.....	15 g/l
Voda.....	1000 ml

Konečné pH (při 25 ° C) $7,5 \pm 0,2$

ENDO agar se používá pro detekci a rozlišení laktosa pozitivních a laktosa negativních koliformních bakterií.

Příprava:

Na 1000 ml živné půdy bylo naváženo 41,5 g ENDO agaru. ENDO agar byl navážen do infúzní láhve, poté byla dolita destilovaná voda. Obsah lahve byl protřepán a následně autoklávován. Nakonec byla půda nalita do připravených sterilních Petriho misek. Půdu je nutné skladovat v temnu.

GKCHA (HiMedia, Bombai, Indie)*Složení:*

Kvasničný extrakt.....	5 g/l
Dextrosa.....	20 g/l
Chloramfenikol.....	0,10 g/l
Agar.....	14,9 g/l
Voda.....	1000 ml

Tato půda slouží ke stanovení kvasinek a plísni.

Příprava:

Na 1000 ml živné půdy bylo naváženo 40 g GKCHA. Směs byla navážena do infúzní láhve, poté byla dolita destilovaná voda. Obsah láhve byl protřepán a následně autoklávován. Nakonec byla půda nalita do připravených sterilních Petriho misek.

Fyziologického roztok

Destilovaná voda	1000 ml
NaCl.....	8,5
g	

Příprava:

Chlorid sodný byl navážen do 1 l infúzní láhve a dolit destilovanou vodou. Poté byl fyziologický roztok autoklávován.

7.3 Maso

Pro sledování dynamiky růstu MO bylo použito vepřové maso, konkrétně vepřová kýta bez kosti. Pro každé stanovení bylo kupováno vždy čerstvé maso v běžné obchodní síti.

7.3.1 Příprava mēlněného masa

Při přípravě masa bylo postupováno tak, aby byly co nejvíce dodržovány podmínky sterilní práce.

Vepřová kýta bez kosti byla nejprve očištěna od případných blan a kůže a poté nakrájena na menší kousky. Nakonec byla rozemleta pomocí přístroje Vorwerk Thermomix TM 21. Z takto upraveného masa byly připravovány vzorky pro sledování růstu MO.

8 METODICKÁ ČÁST

8.1 Růst mikroorganismů bez inhibičních látek

Byla sledována dynamika růstu mikroorganismů v čerstvém mēlněném vepřovém mase. Byl stanoven celkový počet MO (CFU) v 1 g vzorku masa. Mēlněné maso bylo skladováno při chladírenské teplotě (6 ± 2 °C). Byly sledovány tyto skupiny MO: celkový počet mikroorganismů, koliformní bakterie a kvasinky a plísně. Pro růst MO byly použity půdy: MPA, ENDO a GKCHA. Vzorky byly odebírány v čase 0, 2, 4, 6 a 24 h.

8.1.1 Příprava vzorků

Bylo naváženo cca 8 g mēlněného masa do sterilního sáčku a přidáno 40 ml sterilního fyziologického roztoku. Vše bylo dáno na 5 - 10 minut třepat do homogenizátoru (Stomacher). Poté bylo pipetováno do sterilních zkumavek 0,9 ml sterilního fyziologického roztoku a 0,1 ml vzorku, což představuje ředění 10^{-1} . Ředění bylo prováděno desítkovou řadou až do ředění 10^{-5} . Tento postup byl prováděn vždy pro časy 0, 2, 4, 6 a 24 h.

Příslušná ředění byla pipetována po 0,1 ml na Petriho misky s MPA, ENDO agarem a GKCHA a rozetřena po povrchu půdy sterilní hokejkou. Pro každé ředění byla volena 2 opakování. Naočkované misky s MPA a ENDO agarem byly kultivovány v termostatu při teplotě 37 °C a po 24 hodinách kultivace byly odečteny vyrostené kolonie. Misky s GKCHA byly kultivovány při 25 ± 2 °C a vyrostené kolonie byly odečteny po 72 hodinách.

Celkové počty MO byly přepočteny na 1 g vzorku masa (CFU/ g).

8.2 Růst MO s použitím inhibičních látek

Byla sledována dynamika růstu MO v čerstvém mēlněném vepřovém mase, do kterého byly aplikovány fosfáty. Za účelem zjištění antibakteriálních účinků fosfátových solí byly vybrány fosfáty v různém kondenzačním stupni: HBS, S9 a 690. Byl stanoven celkový počet MO (CFU) v 1 g vzorku masa. Maso bylo skladováno při chladírenské teplotě (6 ± 2 °C). Pro růst MO byly použity půdy: MPA, ENDO a GKCHA.

V dalším experimentu byly sledovány účinky soli HBS na grampozitivní bakterie *Bacillus subtilis* a *Staphylococcus aureus*. Tyto bakterie byly aplikovány do čerstvého mēlněného vepřového masa spolu s HBS. Byl stanoven celkový počet těchto bakterií (CFU) v 1 g vzorku masa.

8.2.1 Charakteristika inhibičních látek

Jako inhibičních látky byly použity fosfáty v různém kondenzačním stupni.

- ✓ HBS – směs polyfosfátů s vysokým kondenzačním stupněm a orthofosfátů.
- ✓ S9 – směs polyfosfátů (nižší stupeň polymerace než HBS) a orthofosfátů.
- ✓ 690 – směs orthofosfátů a difosfátů.

8.2.2 Příprava vzorků s inhibičními látkami a sledování růstu MO

Do rozmēlněného vepřového masa byly postupně přidávány fosfáty v různých koncentracích.

V případě HBS šlo o koncentrace: 0,1 %, 0,2 %, 0,3 %, 0,5 %, 0,7 %, 1 %, 2 %, 5 %.

U solí S9 a 690 to byly koncentrace: 3 % a 5 %.

U experimentu, kde byly sledovány účinky HBS na růst bakterií *B. subtilis* a *S. aureus* byly použity koncentrace 0,3 %, 0,5 %, 1 % a 3 % HBS.

Z takto připraveného mēlněného masa (popřípadě masa, do kterého byly kromě solí aplikovány také bakterie *B. subtilis* a *S. aureus*) bylo odebráno 8 g vzorku do sterilního sáčku a přidáno 40 ml sterilního fyziologického roztoku. Vše bylo dáno na 5 – 10 minut třepat do homogenizátoru (Stomacher). Poté bylo pipetováno do sterilních zkumavek 0,9 ml sterilního fyziologického roztoku a 0,1 ml vzorku, což představuje ředění 10^{-1} . Tento postup byl prováděn vždy pro každou koncentraci fosfátu.

Z takto připraveného vzorku byla provedena ředění, která byla naočkována na Petriho misky s MPA, ENDO agarem a GKCHA. V případě, kdy byly kromě solí aplikovány i bakterie byla ředění očkovaná pouze na MPA. Pro každé ředění byla volena 2 opakování. Naočkované misky s MPA a ENDO agarem byly kultivovány v termostatu při teplotě 37 °C a po 24

hodinách kultivace byly odečteny vyrostené kolonie. Misky s GKCHA byly kultivovány při teplotě 25 ± 2 °C a vytvořené kolonie byly odečteny po 72 hodinách. Celkové počty MO byly přepočteny na 1 g vzorku masa (CFU/ g).

Pro přesnější analýzu výsledků bylo provedeno statistické vyhodnocení pomocí programu UNISTAT verze 5.5.

8.3 Identifikace bakterií

Současně užívané klasifikační systémy jsou založeny na tvaru buňky, typu stěny a metabolismu. Jako identifikační biochemické znaky byly vybrány takové schopnosti, které jsou dobře zjištělné a jsou poměrně stálé [34].

Nejdůležitější a bezpodmínečnou podmínkou při jakémkoli identifikačním postupu je, abychom studovaný kmen měli v čisté kultuře [34].

Pro potřebu klinických a potravinářských laboratoří byly pro rychlou identifikaci vybraných skupin mikroorganismů vyvinuty biochemické testy. Tyto testy zjišťují schopnost organismů syntetizovat určité enzymy. Pro diagnostiku reakce se užívá celá řada indikátorů, které při pozitivní reakci výrazně mění barvu media. V současnosti se nepřipravují půdy pro tyto testy individuálně, ale využívají se soubory testů dodávané různými výrobci. Půdy jsou dodávané nadávkované, vysušené a sterilní [34].

8.3.1 Příprava bakterií k identifikaci

K identifikaci byly náhodně vybrány kolonie bakterií rostoucí na MPA a ENDO agaru. Tyto kolonie byly sterilní kličkou přeočkovány na MPA půdu. Po kultivaci v termostatu při 37 °C vyrostly čisté kultury bakterií, které byly využity k biochemickým a fyziologickým testům. Podmínkou bylo použití vždy 24 hodin čerstvých kultur. Získané bakterie byly pro lepší orientaci označeny čísly od 1 do 38.

8.3.2 Test na přítomnost katalasy

Většina aerobních bakterií tvoří enzym katalasu, který rozkládá toxický peroxid vodíku na vodu a molekulární kyslík. Anaerobní bakterie tento enzym netvoří [34].

Postup:

24 hodin stará kultura bakterií byla sterilní kličkou odebrána a přenesena na podložní sklíčko s kapkou 3 % roztoku peroxidu vodíku (H_2O_2). Pozitivní reakce se projevila vyvíjením plynu ve formě bublinek.

8.3.3 Gramovo barvení

Podle tohoto testu bylo zjištěno zda jde o grampozitivní (G^+) či gramnegativní (G^-) bakterie. Grampozitivní bakterie mají řadu společných fyziologických vlastností, odlišujících je od gramnegativních bakterií (např. citlivost k některým antibiotikům, aniontovým povrchově aktivním látkám a jedovatým barvivům). Bylo zjištěno, že všechny tyto vlastnosti jsou odrazem rozdílu složení buněčných stěn G^+ a G^- bakterií [15].

Barvení podle Grama je jednou z nejdůležitějších diagnostických metod při určování rodů a druhů bakterií. V podstatě jde o barvení fixovaného preparátu a následné moření buněk jodovým roztokem, čímž vzniká komplex barvivo-jod-buněčné složky. Tento komplex lze z buněk některých rodů nebo druhů mikroorganismů vyplavit ethanolem nebo acetonem [34].

Jako grampozitivní se označují ty bakterie, jejichž usmrcené buňky po obarvení Gramovým barvicím roztokem a moření jodovým roztokem neztrácejí toto barvivo působením rozpouštědel (aceton, ethanol). U gramnegativních bakterií je toto barvivo z obarvených buněk uvedenými rozpouštědly vyplavováno, takže se buňky odbarví [15].

Stářím kultury se většinou grampozitivnost ztrácí, a proto používáme 24 hodin staré kultury. Buňky některých druhů mikroorganismů jsou však i v mladé kultuře někdy G^+ a někdy G^- a jsou proto označovány jako gramlabilní. Podstata rozdílného chování G^+ a G^- mikroorganismů při Gramově barvení nebyla dosud s konečnou platností vysvětlena [34].

Postup:

24 hodin stará kultura bakterií byla odebrána sterilní kličkou, přenesena na podložní sklíčko a v kapce destilované vody rozetřena. Následně byl nátěr zkoušené kultury usušen a zafixován plamenem.

Poté byl zafixovaný nátěr barven:

- 15 – 20 s čerstvě přefiltrovaným roztokem krystalové violeti,
- Lugolovým roztokem 15 – 20 s.

Preparát byl opláchnut acetonem a vodou a dobarven karbolfuchsinem po dobu 1 minuty. Nakonec byl opláchnut vodou, usušen a mikroskopován s imerzí. G^+ druhy byly zbarveny fialově a G^- červeně.

8.3.4 KOH – test

KOH - test je rychlý test ke zjištění G^+ a G^- bakterií a je založen na rozdílném složení buněčné stěny těchto bakterií.

Postup:

24 hodin stará kultura bakterií byla odebrána sterilní kličkou, přenesena na podložní sklíčko a rozetřena v kapce 3 % roztoku KOH. Pozitivní reakce se projevila tím, že při pomalém odtahování kličky směrem vzhůru se tvořila viskózní hmota táhnoucí se ve formě nitky. Pozitivní reakci vykazují G^- bakterie. U G^+ bakterií se tato viskózní hmota netvoří, neboť silná peptidoglykanová vrstva jejich buněčné stěny je k účinkům louhů odolná.

8.3.5 Test na fermentaci glukosy (O/F test) a laktosy

Bakterie byly podrobeny testu na fermentaci glukosy (O/F test) a testu na fermentaci laktosy. Bylo sledováno využívání těchto cukrů za aerobních a anaerobních podmínek, přičemž k vytvoření anaerobního prostředí bylo použito pár kapek parafinového oleje.

Jako indikátor byla u obou testů použita bromtymolová modř:

- bromtymolová modř
- 0,1 N NaOH
- destilovaná voda

Fermentace glukosy (O/F) test

Příprava média (agaru):

Do živné půdy pro celkový počet MO (MPA) byla přidána glukosa. Množství přidané glukosy činilo 10 g na 1000 ml MPA. Jako indikátor byla přidána bromtymolová modř. Po důkladném rozpuštění glukosy bylo medium rozlito do zkumavek a autoklávováno.

Postup:

Zkumavky s médiem byly pomocí sterilní jehly zaočkovány bakteriemi. Vždy jednu kulturu bakterií do dvou zkumavek, přičemž jedna zkumavka z těch dvou byla zakápnuta parafinovým olejem, čímž bylo vytvořeno anaerobní prostředí. Naočkované zkumavky byly kultivovány za aerobních i anaerobních podmínek po dobu 24 hodin.

Fermentace laktosy

Příprava média:

Do živné půdy pro celkový počet MO (MPA) byla přidána laktosa. Množství přidané laktosy činilo 10 g na 1000 ml MPA. Jako indikátor byla přidána bromtymolová modř. Po důkladném rozpuštění laktosy bylo medium rozlito do zkumavek a autoklávováno.

Postup:

Zkumavky s médiem byly pomocí sterilní jehly zaočkovány bakteriemi. Bakterie byly kultivovány za aerobních podmínek po dobu 24 hodin.

8.3.6 Schopnost růstu MO při zvýšeném množství NaCl

V rámci tohoto experimentu byl sledován růst bakterií na MPA s přidavkem chloridu sodného. MPA bylo připraveno klasickým způsobem a navíc bylo přidáno 7 % NaCl. Takto připravené MPA bylo autoklávováno a poté rozlito na Petriho misky. Na půdy byly očkovány pomocí sterilní kličky 24 hodin staré čisté kultury bakterií. Po 24 hodinách kultivace byl sledován nárůst bakterií.

8.3.7 Schopnost růstu MO při zvýšeném pH

Pomocí tohoto testu byl sledován růst bakterií na MPA při pH 9,7. MPA bylo připraveno klasickým způsobem a poté upraveno pH pomocí NaOH na 9,7. Takto upravené MPA bylo autoklávováno a poté rozlito na Petriho misky. Na půdy byly očkovány pomocí sterilní kličky 24 hodin staré čisté kultury bakterií. Po 24 hodinách kultivace byl sledován nárůst bakterií.

8.3.8 ENTEROtest

ENTEROtest je test určený pro identifikaci koliformních bakterií. Jde o nadávkované, vysušené a sterilní půdy dodávané výrobcem.

Pro identifikaci byl použit ENTEROtest 16 Pliva - Lachema. Jde o dehydratovaná diagnostická média, která jsou seřazená na destičce na výšku v sloupcích označených písmeny H až A ve dvou po sobě následujících řádcích. Na jedné destičce lze otestovat 6 kmenů pomocí 16-ti testů: sirovodík, lyzin, indol, ornitin, ureáza, fenylalanin, eskulín, Simmons citrát, malonát, inozitol, adonidol, celobiósa, sacharósa, sorbitol, trehalósa, manitol [35].

Postup:

Z 24 hodin staré čisté kultury koliformních bakterií byla připravena ve fyziologickém roztočce suspenze. Do jamek ENTEROtestu bylo pipetováno 0,1 ml důkladně homogenizované suspenze. K testům na sirovodík, lyzin, indol, ornitin a ureáza byly přidány 2 kapky parafinového oleje. Poté byly destičky s naočkovanými řadami vloženy do PE sáčku, aby nedošlo k vyschnutí inokula a inkubovány 24 hodin při 37 °C. Nakonec byl test vyhodnocen pomocí přiložené barevné stupnice a bakterie identifikovány pomocí software TNW6 (Lachema).

9 VÝSLEDKY A DISKUSE

9.1 Růst MO bez inhibičních látek

Byla sledována dynamika růstu MO v čerstvém vepřovém mase bez použití inhibičních látek. Celkové počty MO byly přepočteny na 1 ml vzorku masa (CFU/ ml). Výsledky byly statisticky vyhodnoceny počítačovým programem UNISTAT verze 5.5. Rozdíly v počtu MO v závislosti na čase byly vyhodnoceny analýzou jednorozměrných dat pomocí Wilcoxonova testu. Výsledky byly testovány na 5 % hladině významnosti.

Tab. 5. Celkové počty MO v čerstvém mletém vepřovém mase (průměr ± S.D.)*

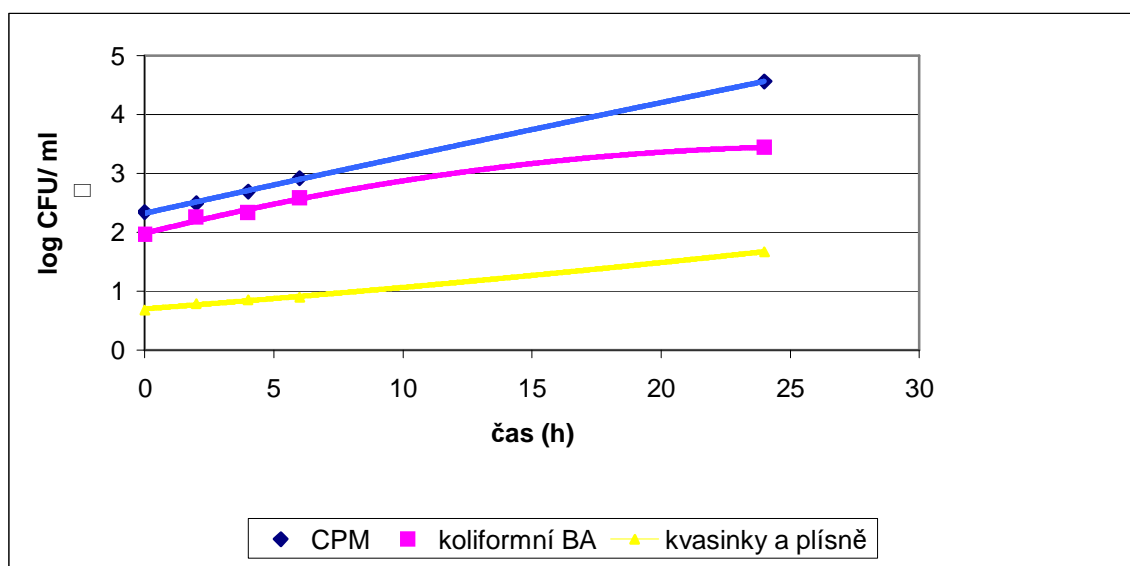
Počet mikroorganismů je uveden v log CFU/ g masa.

MO	Čas (h)				
	0	2	4	6	24
CPM	2,30 ± 0,25 ^a	2,45 ± 0,26 ^a	2,68 ± 0,26 ^b	2,78 ± 0,33 ^b	4,18 ± 0,68 ^c
Koliformní BA	1,62 ± 0,87 ^a	1,85 ± 0,72 ^a	2,14 ± 0,64 ^{a,b}	2,31 ± 0,81 ^b	3,12 ± 0,64 ^c
Kvasinky a plísňe	0,83 ± 0,43 ^a	1,02 ± 0,34 ^a	0,89 ± 0,36 ^a	1,01 ± 0,27 ^a	1,48 ± 0,60 ^a

* V tabulce 5. byly uvedeny výsledky mikrobiologických analýz, které byly statisticky vyhodnoceny. Horní indexy značí určitý statistický rozdíl. Nemají-li průměry v řádku (vliv času na počet MO) žádné společné písmeno, pak se počet MO na daném řádku signifikantně liší ($P < 0,05$).

Mikrobiologický rozbor prokázal, že čerstvé mēlněné vepřové maso je závislé na době zpracování. Podle vyhlášky Ministerstva zdravotnictví 294/ 1997 Sb. splňují hodnoty CFU/ ml mikrobiologické limity i po 24 hodinách.

Statistické vyhodnocení prokázalo, že s rostoucím časem roste celkový počet MO a počet koliformních bakterií. Zatímco kvasinky a plísňe se v mase téměř nevyskytovaly.



Obr. 1. Dynamika růstu MO na čerstvém mēlněném vepřovém mase

Obrázek 1 znázorňuje závislost počtu MO na čase. Je patrné, že s rostoucím časem roste i počet mikroorganismů rostoucích na čerstvém vepřovém mēlněném mase. Největší počet kolonií byl zaznamenán na MPA, což je půda pro celkový počet MO (CPM), zatímco kvasinky a plísňe se v čerstvém mase vyskytovaly jen nepatrně.

9.2 Růst MO s použitím inhibičních látek

Byla sledována dynamika růstu MO na čerstvém vepřovém mēlněném mase za použití vybraných inhibičních látek: HBS, S9 a 690. Celkové počty MO byly přepočteny na 1 g vzorku masa (CFU/ g). Výsledky byly statisticky vyhodnoceny počítačovým programem UNISTAT verze 5.5. Rozdíl v počtu MO v závislosti na čase a na koncentraci inhibičních

látek byly vyhodnoceny analýzou jednorozměrných dat pomocí Wilcoxonova testu. Výsledky byly testovány na 5 % hladině významnosti.

9.2.1 Účinek soli HBS

Do čerstvého mēlněného vepřového masa byla aplikována fosfátová sůl HBS, což je směs polyfosfátů s vysokým kondenzačním stupněm a v menší míře směs orthofosfátů.

Tab. 6. Celkové počty MO na čerstvém mēlněném vepřovém masa s přidavkem 0,1 %, 0,2 %, 0,3 %, 0,5 %, 0,7 %, 1 %, 2 %, 5 % HBS.*

Počet mikroorganismů je uveden v log CFU/ g masa.

CPM (průměr ± S.D.)			
Čas (h)	kontrola	0,1%	0,2%
0	1,96 ± 0,45 ^a A	1,75 ± 0,46 ^a A	1,74 ± 0,20 ^a A
1	2,13 ± 0,43 ^a A,C	1,91 ± 0,55 ^a A	1,91 ± 0,36 ^a A
4	2,24 ± 0,44 ^a B,C	2,14 ± 0,07 ^{a,c} A	2,15 ± 0,56 ^{a,c} A
24	2,79 ± 0,51 ^a B,D	3,03 ± 0,15 ^{a,c} B	3,03 ± 0,04 ^{a,c} B

Čas (h)	0,3%	0,5%	0,7%
0	2,20 ± 0,46 ^a A	2,28 ± 0,70 ^a A	1,92 ± 0,25 ^a A
1	2,25 ± 0,63 ^a A	2,24 ± 0,68 ^a A	2,09 ± 0,45 ^a A,C
4	2,21 ± 0,72 ^{a,c} A	1,89 ± 0,56 ^{b,c} A	1,94 ± 0,36 ^{a,c} A
24	2,10 ± 0,64 ^{b,c,d} A	2,67 ± 0,93 ^{a,d} A,B	2,53 ± 0,47 ^{a,d} B,C

Čas (h)	1%	2%	5%
0	1,82 ± 0,30 ^a A	1,90 ± 0,29 ^a A	1,99 ± 0,25 ^a A
1	1,91 ± 0,51 ^a A	1,88 ± 0,44 ^a A	2,00 ± 0,52 ^a A
4	1,85 ± 0,29 ^{b,c} A	1,95 ± 0,31 ^{a,c} A	1,94 ± 0,52 ^{a,c} A
24	2,14 ± 0,46 ^{b,d} A	2,18 ± 0,29 ^{b,d} A	2,06 ± 0,24 ^{b,d} A

* V tabulce 6. byly zaznamenány výsledky účinku tavící soli HBS aplikované do čerstvého mletého vepřového masa. Horní indexy v řádku značí závislost CPM na koncentraci soli, velká písmena ve sloupci závislost CPM na čase. Nemají-li průměry v řádku (rozdíl mezi koncentracemi v čase) žádné společné písmeno, pak se počet MO na daném řádku signifikantně liší ($P < 0,05$). Nemají-li průměry ve sloupci (závislost jednotlivých koncentrací na čase) žádné společné písmeno, pak se počet MO v daném sloupci signifikantně liší ($P < 0,05$).

V čase 0 a 1 h nebyl shledán u žádné koncentrace významný statistický rozdíl v působení jednotlivých koncentrací HBS, což vypovídá o tom, že k tomu, aby začal působit inhibiční účinek HBS je potřeba delší doby působení této soli. V čase 4 h byl již mírný inhibiční účinek pozorován, a to v koncentracích 0,7 %, 1 %, 2 % a 5 %, přičemž nejvýznamnější byl statistický rozdíl při koncentraci 1 % HBS. V čase 24 h byl vliv HBS pozorován již od koncentrace 0,3 %, přičemž největšího inhibičního účinku bylo dosaženo při 1 %, 2 % a 5 % HBS.

Při pozorování závislosti růstu MO na čase bylo pozorováno, že v masě bez přídavku HBS počet MO s časem rostl, kdežto působením HBS zejména u vyšších koncentrací tato závislost platná není. Zejména u koncentracích 1 %, 2 % a 5 % nebyl nárůst MO pozorován a z toho plyne, že inhibičního účinku HBS lze dosáhnout použitím vyšších koncentrací (v našem případě 1 %, 2 % a 5 %).

Tab. 7. Celkové počty enterobakterií koliformních bakterií na čerstvém mēlněném vepřovém mase s přidavkem 0,1 %, 0,2 %, 0,3 %, 0,5 %, 0,7 %, 1 %, 2 %, 5 % HBS.*

Počet bakterií je uveden v log CFU/ g masa.

Koliformní BA (průměr ± S.D.)			
Čas	kontrola	0,1%	0,2%
0	1,05 ± 0,29 ^a A	1,11 ± 0,25 ^a A	1,22 ± 0,31 ^a A
1	1,28 ± 0,62 ^a A	1,45 ± 0,16 ^a B	1,30 ± 0,27 ^a A
4	1,34 ± 0,58 ^a A	1,47 ± 0,27 ^a B	1,71 ± 0,25 ^a B
24	2,02 ± 0,85 ^a B	2,31 ± 0,16 ^a B,C,D	2,37 ± 0,13 ^a B,C

Čas	0,3%	0,5%	0,7%
0	1,37 ± 1,29 ^{a,c} A	2,60 ± 0,01 ^{b,c} A	1,02 ± 0,64 ^a A
1	1,37 ± 1,12 ^{a,c} A	1,64 ± 0,99 ^{a,c} B,C	1,30 ± 0,58 ^a A
4	1,70 ± 1,08 ^{a,c} A	1,71 ± 1,42 ^{a,c} A,C	1,25 ± 0,60 ^{a,c} A
24	2,16 ± 1,29 ^{a,c} A	2,06 ± 1,38 ^{a,c} A,C	2,13 ± 0,66 ^{a,c} B

Čas	1%	2%	5%
0	1,15 ± 0,64 ^a A	0,64 ± 0,40 ^a A	0,65 ± 0,40 ^a A
1	1,46 ± 0,68 ^{a,c} A	0,81 ± 0,25 ^{a,c,d} A	0,39 ± 0,10 ^{b,c} A
4	1,52 ± 0,40 ^{a,c} A	0,67 ± 0,43 ^{b,c} A	0,67 ± 0,43 ^{b,c} A
24	2,07 ± 0,83 ^{a,c} A	1,26 ± 0,42 ^{b,c} A	1,10 ± 0,38 ^{b,c,d} A,B

* V tabulce 7. byly zaznamenány výsledky účinku soli HBS na koliformní bakterie. Horní indexy v řádku značí závislost počtu koliformních bakterií na koncentraci soli, velká pís-

mena ve sloupci závislost na čase. Nemají-li průměry v řádku (rozdíly mezi koncentracemi v čase) žádné společné písmeno, pak se počet MO na daném řádku významně liší ($P < 0,05$). Nemají-li průměry ve sloupci (závislost jednotlivých koncentrací na čase) žádné společné písmeno, pak se počet MO v daném sloupci významně liší ($P < 0,05$).

V čase 0 h byl shledán významný statistický rozdíl pouze u koncentrace 0,5 %, ale počet mikroorganismů, oproti kontrolnímu vzorku, který nebyl ošetřen fosfáty, nebyl inhibován. V čase 1 h byl významný statistický rozdíl shledán u koncentrace 0,3 %, 0,5 %, 1 %, 2 % a 5 % a v čase 4 h to bylo u koncentrace 0,3 %, 0,5 %, 0,7 %, 1 %, 2 % a 5 %, přičemž nejvýznamnější byl statistický rozdíl shledán u koncentrace 2 % v čase 1 h, 2 % a 5 % v čase 4h. V čase 24 h byl významný statistický rozdíl pozorován ve všech koncentracích kromě 0,2 % a nejvýznamněji se projevil u koncentrace 5 %.

U masa bez přídavku HBS (kontrola) v závislosti nárůstu MO na čase byl markantnější rozdíl pozorován až v čase 24 h. U jednotlivých koncentrací HBS v závislosti na době působení vykazovala inhibiční účinek pouze koncentrace 0,3 %, 1 % a 2 %.

Tab. 8. Celkové počty kvasinek a plísní na čerstvém mletém vepřovém masu s přídavkem 0,1 %, 0,2 %, 0,3 %, 0,5 %, 0,7 %, 1 %, 2 %, 5 % HBS.*

Počet mikroorganismů je uveden v log CFU/ g masa.

Kvasinky a plísně (průměr ± S.D.)			
Čas	kontrola	0,1%	0,2%
0	0,84 ± 0,37 ^a A	0,82 ± 0,35 ^{a,c} A	0,67 ± 0,26 ^{a,c} A
1	1,03 ± 0,36 ^a A	0,65 ± 0,34 ^{a,c} B	0,81 ± 0,32 ^{a,c} A
4	0,87 ± 0,55 ^a A	0,53 ± 0,37 ^{a,c} B	0,64 ± 0,28 ^{a,c} B
24	1,37 ± 0,53 ^a B	1,46 ± 0,43 ^a B,C,D	1,66 ± 0,09 ^a B,C

Čas	0,3%	0,5%	0,7%
0	1,47 ± 0,36 ^{b,d} A	1,41 ± 0,46 ^b A	0,76 ± 0,30 ^a A
1	1,45 ± 0,56 ^{a,c} A	1,14 ± 0,61 ^{a,c} B,C	0,63 ± 0,13 ^{b,c,d} A
4	1,49 ± 0,77 ^{a,c} A	1,56 ± 0,78 ^{b,c,f} A,C	0,24 ± 0,28 ^{b,c} A
24	2,46 ± 0,27 ^{b,c} A	2,01 ± 0,98 ^{a,c,d} A,C	1,38 ± 0,74 ^{a,d} B

Čas	1%	2%	5%
0	0,67 ± 0,41 ^{a,c} A	0,71 ± 0,33 ^{a,d,e} A	0,45 ± 0,17 ^{b,c,e,f} A
1	0,73 ± 0,23 ^{a,c} A	0,61 ± 0,39 ^{a,c} A	0,39 ± 0,10 ^{b,c} A
4	0 ± 0 ^{b,c,d,e} A	0,66 ± 0,50 ^{a,c} A	0,52 ± 0,33 ^{a,c,f} A
24	1,66 ± 0,46 ^a A	0,58 ± 0,29 ^{b,d} A	0,82 ± 0,32 ^{b,d} A,B

* V tabulce 8. byly zaznamenány výsledky účinku tavící soli HBS na kvasinky a plísně. Horní indexy v řádku značí závislost počtu kvasinek a plísní na koncentraci soli, velká písmena ve sloupci závislost na čase. Nemají-li průměry v řádku (rozdíly mezi koncentracemi v čase) žádné společné písmeno, pak se počet MO na daném řádku významně liší ($P < 0,05$). Nemají-li průměry ve sloupci (závislost jednotlivých koncentrací na čase) žádné společné písmeno, pak se počet MO v daném sloupci významně liší ($P < 0,05$).

V čase 0 h byl shledán významný statistický rozdíl ve všech koncentracích HBS kromě koncentrace 0,7 %. V časech 1 h a 4 h už byl významný statistický rozdíl ve všech koncentracích a v čase 24 h v koncentracích 0,3 %, 0,5 %, 0,7 % 2 % a 5 %.

U vzorku masa bez přídavku HBS (kontrola) nebyl v časech 0, 1, 4 h pozorován výrazný nárůst MO, ten byl zaznamenán až v čase 24 h. Srovnáním s kontrolou tedy vyplývá, že inhibiční vliv fosfátové soli HBS byl zaznamenán u koncentrace 0,3 % a 2 %. Naopak u koncentrace 0,1 %, 0,2 % a 0,5 % byl pozorován ještě větší nárůst MO než ve vzorku masa bez soli.

9.2.2 Účinek tavicích solí S9 a 690

Do čerstvého mēlněného vepřového masa byly aplikovány fosfátové soli S9 a 690.

S9 je směs polyfosfátů s nižším stupněm polymerace než HBS. 690 je směs orthofosfátů a difosfátů.

Tab. 9. Celkové počty MO na čerstvém mēlněném vepřovém masa s přidavkem 3 % a 5 % S9 a 690.*

Počet mikroorganismů je uveden v log CFU/ g masa.

CPM (průměr ± S.D.)			
Čas	kontrola	690 3%	690 5%
1	2,09 ± 0,17 ^a A	2,28 ± 0,15 ^{a,c} A	2,45 ± 0,41 ^{a,c} A
4	2,29 ± 0,25 ^a A	2,35 ± 0,35 ^{a,c} A	2,31 ± 0,23 ^a A
24	2,87 ± 0,27 ^a B	2,57 ± 0,36 ^a A	2,67 ± 0,33 ^a A

Čas	S9 3%	S9 5%
1	2,43 ± 0,11 ^{b,c} A	2,82 ± 0,55 ^{b,c} A
4	2,65 ± 0,46 ^{a,c} A	2,77 ± 0,36 ^{b,c} A
24	2,66 ± 0,32 ^a A	2,76 ± 0,31 ^a A

* V tabulce 9. byly zaznamenány výsledky účinku fosfátových solí 690 a S9 na celkový počet MO. Horní indexy v řádku značí závislost CPM na koncentraci solí, velká písmena ve sloupci závislost na čase. Nemají-li průměry v řádku (rozdíly mezi koncentracemi v čase) žádné společné písmeno, pak se počet MO na daném řádku signifikantně liší ($P < 0,05$). Nemají-li průměry ve sloupci (závislost jednotlivých koncentrací na čase) žádné společné písmeno, pak se počet MO v daném sloupci signifikantně liší ($P < 0,05$).

Statistickým vyhodnocením nebyly prakticky shledány rozdíly mezi solemi 690 a S9 a to ani po delší době působení. V čase 24 h si lze všimnout, že se účinky obou solí vyrovnaly.

Určitého, i když nepatrného inhibičního účinku na celkový počet mikroorganismů bylo dosaženo u obou solí.

Tab. 10. Celkové počty enterobakterií koliformních bakterií na čerstvém mletém vepřovém mase s přidavkem 3 % a 5 % S9 a 690.*

Počet bakterií je uveden v log CFU/ g masa.

Koliformní BA (průměr ± S.D.)			
Čas	kontrola	690 3%	690 5%
1	1,23 ± 0,33 ^a A	1,36 ± 0,22 ^a A	1,41 ± 0,48 ^{a,c} A
4	1,46 ± 0,33 ^a A	1,32 ± 0,20 ^a A	1,30 ± 0,44 ^a A
24	2,24 ± 0,44 ^a B	2,16 ± 0,18 ^a B	1,90 ± 0,31 ^a A

Čas	S9 3%	S9 5%
1	1,43 ± 0,22 ^a A	1,77 ± 0,20 ^{b,c} A
4	1,33 ± 0,19 ^a A	1,69 ± 0,22 ^{a,b,c} A
24	2,00 ± 0,22 ^a B	2,21 ± 0,26 ^a B

* V tabulce 10. byly zaznamenány výsledky účinku tavících solí 690 a S9 na koliformní bakterie. Horní indexy v řádku značí závislost počtu koliformních bakterií na koncentraci soli, velká písmena ve sloupci závislost na čase. Nemají-li průměry v řádku (rozdíly mezi koncentracemi v čase) žádné společné písmeno, pak se počet MO na daném řádku signifikantně liší ($P < 0,05$). Nemají-li průměry ve sloupci (závislost jednotlivých koncentrací na čase) žádné společné písmeno, pak se počet MO v daném sloupci signifikantně liší ($P < 0,05$).

Statisticky významný rozdíl byl v čase 0 h zaznamenán u obou solí v koncentraci 5 %, v čase 4 h pouze v koncentraci 5% soli S9 a v čase 24 h již žádný rozdíl nebyl shledán.

Pokud jde o inhibiční efekt na koliformní bakterie, tak ten vykazovala pouze fosfátová sůl 690 a to v koncentraci 5 %.

Tab. 11. Celkové počty kvasinek a plísní na čerstvém mēlněném vepřovém mase s přídavkem 3 % a 5 % S9 a 690.*

Počty mikroorganismů jsou uvedeny v log CFU/ g masa.

Kvasinky a plísně (průměr ± S.D.)			
Čas	kontrola	690 3%	690 5%
1	0,79 ± 0,38 ^a A	0,08 ± 0,15 ^{b,c} A	0,56 ± 0,45 ^{a,c} A
4	0,69 ± 0,33 ^a A	0,23 ± 0,29 ^a A	0,91 ± 0,71 ^a A
24	1,31 ± 0,77 ^a A	1,31 ± 0,77 ^a A	0,86 ± 0,40 ^a A

Čas	S9 3%	S9 5%
1	0,60 ± 0,54 ^{a,c} A	0,40 ± 0,62 ^{a,c} A
4	0,65 ± 0,60 ^a A	0,33 ± 0,47 ^a A
24	0,72 ± 0,49 ^a A	0,72 ± 0,38 ^a A

* V tabulce 11. byly zaznamenány výsledky účinku tavících solí 690 a S9 na kvasinky a plísně. Horní indexy v řádku značí závislost počtu kvasinek a plísní na koncentraci soli, velká písmena ve sloupci závislost na čase. Nemají-li průměry v řádku (rozdíly mezi koncentracemi v čase) žádné společné písmeno, pak se počet MO na daném řádku signifikantně liší ($P < 0,05$). Nemají-li průměry ve sloupci (závislost jednotlivých koncentrací na čase) žádné společné písmeno, pak se počet MO v daném sloupci signifikantně liší ($P < 0,05$).

Při sledování účinku fosfátových solí 690 a S9 v koncentracích 3 a 5 % nebyl shledán významný statistický rozdíl a to ani po delší době působení solí.

Celkově lze konstatovat, že inhibiční efekt na kvasinky a plísňe nebyl prokázán.

9.2.3 Účinek solí HBS na grampozitivní bakterie

Do čerstvého mēlněného vepřového masa byla aplikována tavicí sůl HBS spolu s grampozitivními bakteriemi *Bacillus subtilis* a *Staphylococcus aureus*. Pro tento experiment byly použity koncentrace 0,3 %, 0,5 %, 1 % a 3 % HBS. Pro růst bakterií byla použita živná půda MPA.

Tab. 12. Celkové počty MO v čerstvém mēlněném vepřovém masa bez přídavku tavicí soli HBS a bez přídavku BA.*

Počty mikroorganismů jsou uvedeny v log CFU/ g masa.

Kontrola	
Čas (h)	
1	4
3,21 ± 0,80 ^a	3,46 ± 0,84 ^a

* Horní indexy značí určitý statistický rozdíl. Nemají-li průměry v řádku (vliv času na počet MO) žádné společné písmeno, pak se počet MO na daném řádku signifikantně liší ($P < 0,05$).

V tabulce 12. nebyl shledán významný statistický rozdíl v počtu MO rostoucích na mēlněném vepřovém masa bez přídavku solí v čase 1 a 4 h.

Tab. 13. Celkové počty bakterií *Bacillus subtilis* na čerstvém mēlněném vepřovém mase s přidavkem 0,3 %, 0,5 %, 1 % a 3 % HBS.*

Počty bakterií jsou uvedeny v log CFU/ g masa.

<i>B. subtilis</i> (průměr ± S.D.)					
Čas (h)	Bez soli	0,3%	0,5%	1%	3%
1	2,93 ± 1,12 ^a A	3,32 ± 0,35 ^a A	3,22 ± 0,51 ^a A	3,16 ± 0,33 ^a A	3,19 ± 0,19 ^a A
4	3,49 ± 0,42 ^a A	3,62 ± 0,55 ^a A	3,49 ± 0,53 ^a A	3,35 ± 0,57 ^a A	3,84 ± 0,75 ^a A

* V tabulce 13. byly zaznamenány výsledky účinku soli HBS aplikované do čerstvého mēlněného vepřového masa uměle kontaminovaného bakterií *Bacillus subtilis*. Horní indexy v řádku značí závislost růstu *B. subtilis* na koncentraci soli, velká písmena ve sloupci závislost jednotlivých koncentrací na čase. Nemají-li průměry v řádku (rozdíly mezi koncentracemi v čase) žádné společné písmeno, pak se počet MO na daném řádku signifikantně liší ($P < 0,05$). Nemají-li průměry ve sloupci (závislost jednotlivých koncentrací na čase) žádné společné písmeno, pak se počet MO v daném sloupci signifikantně liší ($P < 0,05$).

Statistické vyhodnocení neshledalo žádný významný rozdíl. Účinek fosfátové soli HBS na gram pozitivní bakterii *Bacillus subtilis* byl ve všech koncentracích stejný a ani s časem se neměnil. Lze tedy konstatovat, že inhibiční účinek HBS na bakterii *Bacillus subtilis* nebyl prokázán. Příčinou může být to, že gram pozitivní bakterie *B. subtilis* je vůči soli odolnější než jiné, např. gram negativní bakterie.

Tab. 14. Celkové počty bakterií *Staphylococcus aureus* na čerstvém mēlněném vepřovém mase s přídavkem 0,3 %, 0,5 %, 1 % a 3 % HBS.*

Počty bakterií jsou uvedeny v log CFU/ g masa.

<i>S. aureus</i> (průměr ± S.D.)			
Čas	Bez soli	0,3%	0,5%
1	3,70 ± 0,57 ^a A	4,29 ± 0,69 ^{b,c} A	4,09 ± 0,53 ^{b,c} A
4	4,20 ± 0,60 ^a B	4,20 ± 0,72 ^a A	4,72 ± 0,82 ^a B

Čas	1%	3%
1	3,86 ± 0,66 ^{a,c} A	4,07 ± 0,66 ^{a,c} A
4	4,45 ± 0,68 ^a B	4,01 ± 0,64 ^{a,b} A

* V tabulce 14. byly zaznamenány výsledky účinku tavící soli HBS aplikované do čerstvého mēlněného vepřového masa uměle kontaminovaného bakterií *Staphylococcus aureus*. Horní indexy v řádku značí závislost růstu *S. aureus* na koncentraci soli, velká písmena ve sloupci závislost jednotlivých koncentrací na čase. Nemají-li průměry v řádku (rozdíly mezi koncentracemi v čase) žádné společné písmeno, pak se počet MO na daném řádku významně liší ($P < 0,05$). Nemají-li průměry ve sloupci (závislost jednotlivých koncentrací na čase) žádné společné písmeno, pak se počet MO v daném sloupci významně liší ($P < 0,05$).

V čase 1 h byl pozorován významný statistický rozdíl ve všech použitých koncentracích HBS, zatímco v čase 24 h statistický rozdíl nebyl mezi jednotlivými koncentracemi shledán.

Inhibiční účinek fosfátové soli HBS na grampozitivní bakterii *Staphylococcus aureus* byl pozorován při koncentraci 0,3 % a 3 %. Koncentrace 0,5 % a 1 % inhibiční účinek nevykázaly.

9.3 Identifikace bakterií

Náhodně vybrané kolonie bakterií rostoucí na MPA a ENDO agaru byly podrobeny testům za účelem jejich identifikace. Výsledky byly zaznamenány do tabulky 15. Bakterie byly pro lepší orientaci označeny čísly od 1 do 38, přičemž 1 až 23 jsou bakterie izolované z MPA a 24 až 38 jsou bakterie izolované z ENDO agaru. Plus (+) v tabulce značí, že byl test pozitivní, minus (-), že byl negativní. V případě Gramova barvení bylo testem zjištěno, zda jde o grampozitivní či gramnegativní bakterie a jejich tvar (koky, tyčinky, kokotyčinky).

Tab. 15. Výsledky vybraných biochemických a fyziologických testů izolovaných bakterií, (+ pozitivní reakce, - negativní reakce).

BA	Fermentace glukosy		Fermentace laktosy	katalasa	KOH-test	Gramovo barvení	Vliv pH*	Vliv NaCl**
	Aerobní prostředí	Anaerobní prostředí						
1	+	+	+	+	-	G ⁺ tyčinky	+	-
2	+	+	+	+	+	G ⁻ tyčinky	+	-
3	-	-	-	-	-	G ⁺ kokotyčinky	-	-
4	-	-	+	+	-	G ⁺ tyčinky	+	-
5	+	-	-	+	-	G ⁺ tyčinky	+	+
6	+	-	-	+	-	G ⁺ koky	+	+
7	+	+	+	+	-	G ⁺ koky	+	+
8	+	-	-	+	-	G ⁺ koky	+	+
9	-	-	+	+	-	G ⁺ tyčinky	+	-
10	+	+	-	+	-	G ⁺ koky	+	+
11	+	+	+	-	+	G ⁻ kokotyčinky	+	-
12	+	-	+	-	+	G ⁻ tyčinky	+	+
13	+	+	+	+	-	G ⁺ koky	+	+
14	+	+	-	+	-	G ⁺ koky	+	+
15	+	+	+	+	+	G ⁻ tyčinky	+	-

* schopnost růstu při pH 9,7

** schopnost růstu při 7 % NaCl

BA	Fermentace glukosy		Fermentace laktosy	katalasa	KOH- test	Gramovo barvení	Vliv pH*	Vliv NaCl**
	Aerobní prostředí	Anaerobní prostředí						
16	+	+	+	+	-	G ⁺ kokotyčinky	+	-
17	-	-	-	-	-	G ⁺ tyčinky	-	-
18	+	-	+	+	+	G ⁻ tyčinky	+	-
19	-	-	-	-	-	G ⁺ kokotyčinky	-	-
20	+	+	-	-	+	G ⁻ tyčinky	+	-
21	+	-	+	-	-	G ⁺ tyčinky	+	-
22	+	-	+	+	-	G ⁺ tyčinky	+	-
23	-	-	-	+	-	G ⁺ koky	+	+
24	+	+	+	+	+	G ⁻ kokotyčinky	+	-
25	+	+	+	+	+	G ⁻ tyčinky	+	-
26	+	+	+	+	+	G ⁻ kokotyčinky	+	+
27	+	-	+	+	+	G ⁻ tyčinky	+	-
28	+	+	+	-	+	G ⁻ kokotyčinky	+	-
29	+	+	+	+	+	G ⁻ kokotyčinky	+	-
30	+	-	+	+	+	G ⁻ tyčinky	+	+

* schopnost růstu při pH 9,7

** schopnost růstu při 7 % NaCl

BA	Fermentace glukosy		Fermentace laktosy	katalasa	KOH- test	Gramovo barvení	Vliv pH*	Vliv NaCl**
	Aerobní prostředí	Anaerobní prostředí						
31	+	+	+	+	+	G ⁻ kokotyčinky	+	+
32	+	+	+	+	+	G ⁻ tyčinky	+	+
33	+	+	+	-	+	G ⁻ kokotyčinky	+	-
34	+	-	+	+	+	G ⁻ tyčinky	+	-
35	+	+	+	+	+	G ⁻ tyčinky	+	-
36	+	-	+	+	+	G ⁻ tyčinky	+	-
37	+	-	-	+	+	G ⁻ tyčinky	+	-
38	+	-	-	+	+	G ⁻ tyčinky	+	-

* schopnost růstu při pH 9,7

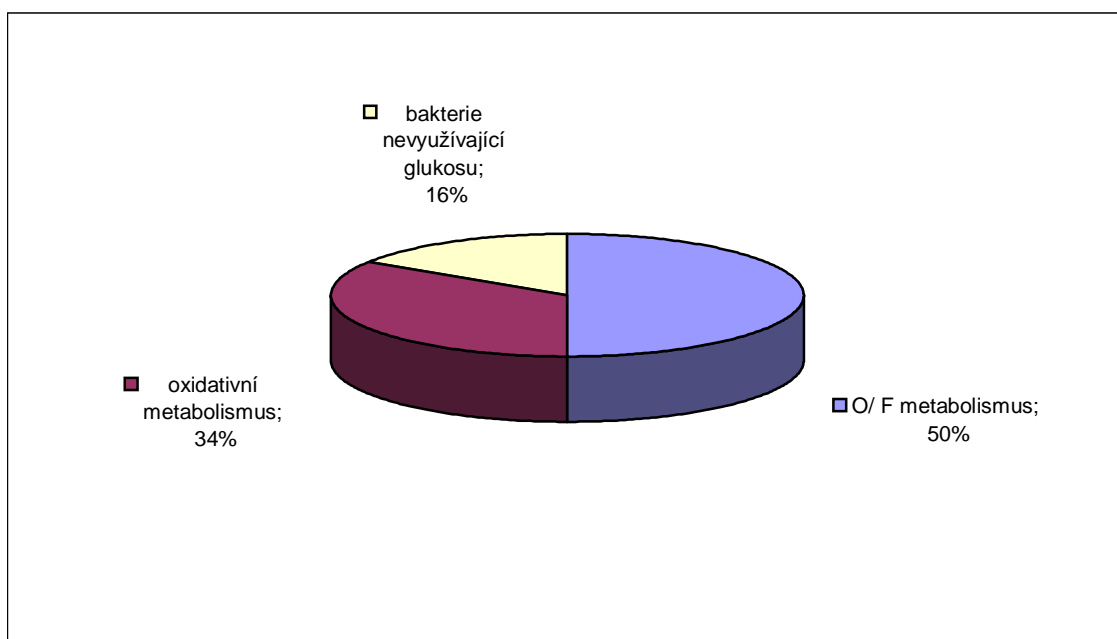
** schopnost růstu při 7 % NaCl

Fermentace glukosy (O/F test)

Bakterie byly sledovány za aerobních a anaerobních podmínek prostředí a platí:

- Aerobní (+) a anaerobní (+) = oxidativní, fermentativní typ metabolismu (O/ F).
- Aerobní (+) a anaerobní (-) = oxidativní metabolismus.
- Aerobní (-) a anaerobní (+) = fermentativní metabolismus.
- Aerobní (-) a anaerobní (-) = bakterie nevyužívají glukosu.

Z tabulky 15. je patrné, že bakterie izolované z ENDO agaru (24 – 38), pravděpodobně enterobakterie, jsou za aerobních podmínek oxidativní. Zda je reakce pozitivní či negativní bylo zjištěno změnou barvy media. V případě fermentace bylo zabarvení media oranžové či žluté, barva media v případě negativní reakce zůstala nezměněna.



Obr. 2. Grafické znázornění O/ F testu.

Zároveň bylo také zjištěno (obr. 2.), že 50 % ze všech 38 zkoumaných bakterií mělo O/ F typ metabolismu, 34 % bakterií mělo oxidativní typ metabolismu a zbytek, 16 % bakterií, nevyužívalo glukosu vůbec. Z toho plyne, že žádná ze zkoumaných bakterií se nevyznačovala pouze fermentativním typem metabolismu.

Fermentace laktosy

Sledovány za aerobních podmínek prostředí a platí:

- (+) = bakterie zkvašují laktosu
- (-) = bakterie nezkvašují laktosu

Zda je reakce pozitivní či negativní bylo zjištěno změnou barvy media. V případě fermentace bylo zbarvení media oranžové či žluté, negativní reakce se změnou brvy media neprojevila.

Z celkového počtu 38 zkoumaných bakterií (tab. 15.) zkvašovalo laktosu 26 BA, tedy většina.

Katalasa

Enzym katalasa je produkován většinou bakterií, což je patrné i z tab. 15. Kromě 9 bakterií byla většina BA katalasa pozitivní. To znamená, že tvořily enzym katalasu a pozitivní reakce se projevila vyvíjením plynu ve formě bublinek.

KOH-test

Tímto rychlým testem bylo potvrzeno, zda jde o grampozitivní (G^+) či gramnegativní (G^-) bakterie. V případě pozitivní reakce, která se projevila tvorbou táhnoucí se viskózní hmoty ve formě nitky, se jednalo o gramnegativní (G^-) bakterie.

Z tabulky 15. je patrné, že většina bakterií izolovaných z MPA vykazují negativní reakci, tzn., že jsou grampozitivní (G^+). Naproti tomu bakterie izolované z ENDO agaru (v tab. 15. 24 – 38) byly všechny tímto testem určeny jako gramnegativní (G^-), což koresponduje i s tím, že většina grampozitivních bakterií na této půdě neroste.

Gramovo barvení

Gramovým barvením bylo zjištěno, zda se jedná o grampozitivní (G^+) či gramnegativní (G^-) bakterie. Bakterie byly pozorovány pod mikroskopem s imerzí. Jako G^+ bakterie byly označeny ty, které byly zbarveny fialově až modře. Jako G^- byly označeny ty, které byly

zbarveny červeně. Dále byl pod mikroskopem pozorován tvar bakterií a určeno, zda jde o koky, tyčinky nebo kokotyčinky. Z tabulky 15.) je zřejmé, že velká většina bakterií izolovaných z MPA byla G^+ a všechny bakterie izolované z ENDO agaru (24 – 38) byly G^- .

Vliv pH

Byla sledována schopnost bakterií růst v prostředí se zvýšeným pH (9,7). pH živné půdy MPA se pohybuje v rozmezí 6,8 – 7 a při tomto pH jsou všechny zkoumané BA schopny normálně růst. Zvýšení pH nezpůsobilo žádnou výraznou změnu, pouze kmeny bakterií 3, 17 a 19 (tab. 15.) nebyly schopny při pH 9,7 růst.

Vliv NaCl

Byl sledován růst bakterií s přidavkem chloridu sodného. Z tabulky 15. je patrné, že na růst některých bakterií se projevuje inhibiční efekt chloridu sodného. Při zvýšené koncentraci NaCl byl pozorován růst zejména G^+ bakterií, které jsou obecně odolnější k vyšším koncentracím NaCl. Příkladem mohou být rody *Staphylococcus* *Enterococcus*, které se mezi halotolerantní bakterie [39].

ENTEROtest

Pro ENTEROtest byly použity pouze koliformní bakterie (tab. 15. 24–38). Test byl vyhodnocován dle barevné poznávací stupnice. Bakterie byly testovány na sirovodík, lyzin, indol, ornitin, ureázu, fenylalanin, eskulín, Simmons citrát, malonát, inozitol, adonidol, celobiósu, sacharózu, sorbitol, trehalósu a manitol.

Výsledky ENTEROtestu byly vyhodnoceny pomocí identifikačního počítačového programu, díky kterému byly identifikovány konkrétní bakteriální kmeny.

Tab. 16. Výsledky ENTEROtestu 16.

BA	Identifikovaný kmen	výskyt
24	<i>Serratia rubidaea</i>	prostředí
25	<i>Serratia marcescens</i>	prostředí
26	<i>Enterobacter amnigenus</i>	voda, půda
28	<i>Escherichia coli inactive</i>	trávicí trakt obratlovců
29	<i>Buttiauxella gaviniae</i>	voda, půda
31	<i>Serratia proteamaculans</i>	zvířata, rostlinný materiál
32	<i>Serratia marcescens</i>	prostředí
33	<i>Buttiauxella brennerae</i>	měkkýši
34	<i>Pragia fontium</i>	voda
35	<i>Hafnia alvei</i>	voda, půda, zvířata, potraviny
37	<i>Edwardsiella ictaluri</i>	voda, ryby

V tabulce 16. jsou zaznamenány identifikované bakterie i s nejčastějším místem výskytu. Několik kmenů se pomocí ENTEROtestu 16 nepodařilo spolehlivě identifikovat (27, 30, 36, 38). Pro spolehlivější identifikace by bylo třeba použít ENTEROtest 24 nebo další dodatekové testy, na které však naše laboratoř není zařízena.

Z tabulky je také patrné, že většina izolovaných bakterií se vyskytuje běžně v prostředí, a tudíž může kontaminovat mēlněné maso. Většina těchto bakterií je také považována za nepatogenní nebo podmíněně patogenní, s výjimkou *E. coli*, z nichž mohou být některé kmeny patogenní. V našem případě identifikovaná bakterie (tab. 16. BA 28) *E. coli inactive* je považována za nepatogenní. Nejlépe a nejpresněji byla identifikována bakterie *Buttiauxella brennerae*, jejíž nejčastější místo výskytu jsou měkkýši.

9.4 Souhrnná diskuse

Byly zkoumány účinky komerčních fosfátových solí (HBS, 690 a S9), jež byly aplikovány, za účelem zjištění jejich inhibičního účinku, do čerstvého mēlněného vepřového masa.

Bylo zjištěno, že výraznějšího inhibičního efektu dosáhla pouze fosfátová sůl HBS (s vysokým stupněm kondenzacem fosfátů), kterou tvoří směs polyfosfátů s dlouhým řetězcem, a to pouze na růst celkového počtu mikroorganismů. Účinek HBS na enterobakterie (*G⁻ BA*) rostoucí na ENDO agaru a na kvasinky a plísně rostoucí na půdě GKCHA byl téměř zanedbatelný, stejně tak i na grampozitivní bakterie *B. subtilis* a *S. aureus*. Tyto výsledky jsou mírně v rozporu s jinými pracemi [40 - 44], ve kterých bylo zjištěno, že v laboratorních podmínkách při kultivaci grampozitivních bakterií (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Clostridium* sp.) dochází k jejich inhibici. Tyto rozdíly mohou být způsobeny tím, že maso je komplexnější matrice než kulturační půda pro mikroorganismy a navíc je známo, že v maso jsou přítomny enzymy fosfatázy, které mohou případně polyfosfáty degradovat. Tímto lze vysvětlit i celkovou nízkou antibakteriální aktivitu těchto látek na mikroflóru mēlněného masa.

Inhibiční účinek fosfátových solí 690 a S9 (s nižším stupněm polymerace) s krátkým řetězcem byl prakticky nulový. Pouze nepatrná inhibice byla zjištěna u celkového počtu mikroorganismů. Enterobakterie a kvasinky a plísně na přítomnost těchto solí inhibičně nereagovaly. Lze tedy konstatovat, že většího inhibičního účinku bylo dosaženo použitím soli s delším polyfosfátovým řetězcem (HBS). Soli s krátkým řetězcem inhibiční účinek nevykazovaly.

Molins a kol. [38] zkoumali vliv fosfátů na růst aerobních mezofilních a psychrotrofních bakterií a vliv fosfátů na *Staphylococcus aureus*, který byl uměle naočkován. Vliv fosfátů pozorovali v chlazené syrové klobáse, která byla uchována po dobu 7 dní v prostředí s teplotou 5 °C. Žádná významná inhibice fosfátů nebyla pozorována.

Dickson kol. [12] zkoumali antimikrobiální vliv fosforečnanu sodného na bakterie uměle očkované do hovězí tkáně. Tkáň kontaminovaná bakteriemi *Salmonella Typhimurium*, *Listeria monocytogenes* a *Escherichia coli* O157 : H7 byla ponořena do 8, 10 a 12 % roztoku fosforečnanu sodného při teplotě 25, 40 a 55 °C a to celkem třikrát. Na redukci počtu bakterií v libové či tukové tkáni neměla koncentrace roztoku velký vliv. Celkově však fosforečnan sodný způsobil menší redukci počtu bakterií na libové tkáni. Větší redukce počtu bakte-

rií byla pozorována na tukové tkáni. Větší redukce bakterií byla dosažena, pokud teplota roztoku fosforečnanu sodného vzrostla.

U bakterií izolovaných z čerstvého vepřového mletého masa byly provedeny některé biochemické a fyziologické testy, kterými bylo zjištěno, že šlo pravděpodobně o nepatogenní bakterie, které však mohou způsobovat jeho kažení.

ZÁVĚR

Tato diplomová práce byla zaměřena na hledání možnosti prodloužení údržnosti čerstvého mēlněného vepřového masa. Byl sledován růst mikroorganismů v mase v závislosti na čase. Z důvodu typické neúdržnosti masa a jeho snadné kontaminaci nežádoucími mikroorganismy byly do masa aplikovány komerčně využívané fosfáty a polyfosfáty (HBS, 690 a S9) lišící se délkou řetězce a sledovány jejich účinky. Bakterie vyskytující se v mase byly podrobeny biochemickým a fyziologickým testům a identifikovány. Účinek HBS na enterobakterie a kvasinky a plísňe byl téměř zanedbatelný.

Závěrem lze konstatovat, že bylo provedeno:

- Sledování růstu mikroorganismů bez použití inhibičních látek na čerstvém vepřovém mēlněném mase. Výsledky potvrdily, že počet mikroorganismů s rostoucím časem roste. Mikrobiologické limity vycházející z vyhlášky Ministerstva zdravotnictví 294/1997 Sb. nebyly překročeny ani po 24 hodinách.
- Sledování růstu mikroorganismů s použitím inhibičních látek (HBS, 690, S9). Při aplikaci fosfátové soli HBS byly pozorovány výrazné inhibiční účinky na celkový počet mikroorganismů zvláště použitím vyšších koncentrací této soli. Účinek HBS na enterobakterie a kvasinky a plísňe byl téměř zanedbatelný, stejně tak i na grampozitivní bakterie *Bacillus subtilis* a *Staphylococcus aureus*. Inhibiční vliv fosfátových solí 690 a S9 na celkový počet mikroorganismů, enterobakterie i kvasinky a plísňe se jevil prakticky nulový.
- Identifikace bakterií. Provedením řady biochemických a fyziologických testů byly zjištěny určité znaky a vlastnosti, kterými se bakterie izolované z vepřového mēlněného masa vyznačují. Bylo zjištěno, že se pravděpodobně nejednalo o patogenní bakterie. Vyšším pomnožením by však mohlo hrozit nebezpečí kažení masa, čímž by bylo ohroženo zdraví konzumenta.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] PIPEK, P. *Základy technologie masa*. 1. vydání. Vyškov: VVŠ PV, 1998. 56 s. ISBN 80-7231-010-0.
- [2] BŘEZINA, P., KOMÁR, A., HRABĚ, J. *Technologie, zbožížnalství a hygiena potravin živočišného původu*. II. Část. Vyškov: VVŠ PV, 2001. ISBN 80-7231-079-8.
- [3] *Vyhláška ministerstva zemědělství ČR č. 326/2001 Sb.*, kterou se provádí § 18 písm. a), d), g), h), i) a j) zákona č. 110/1997 Sb., o potravinách a tabákových výrobcích a o změně a doplnění některých souvisejících zákonů, ve znění pozdějších předpisů, pro maso, masné výrobky, ryby, ostatní vodní živočichy a výrobky z nich, vejce a výrobky z nich.
- [4] *Histologie pro bakalářské studium* [online]. [cit. 2008-02-24]. Dostupné na WWW: <http://www.lf3.cuni.cz/miranda2/export/sites/www.lf3.cuni.cz/cs/pracoviste/histologie/vyuka/studijni-materialy/CPHKAN1/studijni-materialy/histologie-pro_bakalare.doc>.
- [5] *Technologie masa* [online]. [cit. 2008-03-07]. Dostupné na WWW: <<http://web.vscht.cz/pipekp/ppv.doc>>.
- [6] INGR, I. *Produkce a zpracování masa*. 1. vydání. Brno: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, 2004. 202 s. ISBN 80-7157-719-7.
- [7] STEINHAUSER, L. *Hygiena a technologie masa*. 1. vydání. Brno: LAST, 1995. 664 s. ISBN 80-900260-4-4.
- [8] PIPEK, P. *Technologie masa I*. 2. Vydání. Praha: VŠCHT, 1991. 172 s. ISBN 80-7080-106-9.
- [9] GROSSMANN, M. *Mikrobiologie v hygieně*. 1. vydání. Vyškov: VVŠ PV, 1999. 90 s. ISBN 80-7231-037-2.
- [10] NOVÁK, V., BUŇKA, F., *Základy ekonomiky výživy*. 1. vydání. Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2005. ISBN 80-7318-262-9.

- [11] *Jíst, či nejíst maso?* [online]. [cit. 2008-04-03]. Dostupné na WWW: <<http://www.dtest.cz/index.php?action=2&pclanky=3&pplaneid=21&pkategorieid=28>>.
- [12] DICKSON, J. S., CUTTER, C. G. N., SIRAGUSA, G. R. (1994). Antimicrobial Effect of Trisodium Phosphate against Bacteria Attached to Beef Tissue. *Journal of Food Protection*, 57: 952 – 955.
- [13] KYZLINK, V. *Základy konzervace potravin*. 2. vydání. Praha: SNTL, 1980. 516 s.
- [14] VAŘEJKA, F; MRÁZ, O; SMOLA, J. *Speciální veterinární mikrobiologie*. 1. vydání. Praha: Státní zemědělské nakladatelství, 1989. 264 s.
- [15] ŠILHÁNKOVÁ, L. *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology*. 2. vydání. Praha: VICTORIA PUBLISHING, a.s., 1995. ISBN 80-85605-71-6.
- [16] GREENWOOD, D., SLACK, R., PEUTHERER, J. F., *Lékařská mikrobiologie*, Praha, 1999. ISBN 80-7169-365-0.
- [17] HANULÍKOVÁ, A. *Campylobacter*. [cit. 2008-04-05]. Dostupné na WWW: <http://www.szpi.gov.cz/cze/informace/article.asp?id=54158&chapter=3&cat=2191&preview=&ts=3ec16>.
- [18] STEINHAUSEROVÁ, I., POVOLNÁ, L., HEJLOVÁ, Š. Výskyt termofilních druhů *Campylobacter* sp. na porážce a u porážené drůbeže. *Veterinářství*. 2002, roč. 52, č. 12, s. 553 – 556.
- [19] JIČÍNSKÁ, E., HAVLOVÁ, J., *Patogenní mikroorganismy v mléce a mlékárenských výrobcích*, Praha, 1995. ISBN 80-85120-47-X.
- [20] HANULÍKOVÁ, A. *Clostridium perfringens*. [cit. 2008-04-06]. Dostupné na WWW: <<http://www.szpi.gov.cz/cze/informace/article.asp?id=54158&chapter=7&cat=2191&preview=&ts=5ec11>>.
- [21] *Clostridium botulinum*. [cit. 2008-04-10]. Dostupné na WWW: <http://www.biotox.cz/toxikon/bakterie/bakterie/clostridium_botulinum.php>.
- [22] HANULÍKOVÁ, A. *Escherichia coli*. [cit. 2008-04-10]. Dostupné na WWW: <<http://www.szpi.gov.cz/cze/informace/article.asp?id=54158&chapter=4&cat=2191&preview=&ts=9ec88>>.

- [23] *Edwardsiella*. [cit. 2008-04-10]. Dostupné na WWW: <<http://encyklopedie.seznam.cz/heslo/38822-edwardsiella>>.
- [24] HANULÍKOVÁ, A. *Salmonella spp.* [cit. 2008-04-11]. Dostupné na WWW: <<http://www.szpi.gov.cz/cze/informace/article.asp?id=54158&chapter=1&cat=2191&preview=&ts=3ec7>>.
- [25] HANULÍKOVÁ, A. Rod *Shigella* [cit. 2008-04-13]. Dostupné na WWW: <<http://www.szpi.gov.cz/cze/informace/article.asp?id=54158&chapter=6&cat=2191&preview=&ts=8ec40>>.
- [26] *Encyklopedie: Serratia* [online]. [cit. 2008-04-13]. Dostupné na WWW: <http://encyklopedie.seznam.cz/heslo/93171-serratia>.
- [27] HANULÍKOVÁ, A. *Staphylococcus aureus*. [online]. [cit. 2008-04-13]. Dostupné na WWW: <<http://www.szpi.gov.cz/cze/informace/article.asp?id=54158&chapter=8&cat=2191&preview=&ts=3ec66>>.
- [28] *Směrnice pro kontrolu výskytu kmenů Staphylococcus aureus* [online]. [cit. 2008-04-13]. Dostupné na WWW: <http://www.cls.cz/dokumenty/dp_mrsa.doc>.
- [29] VELÍŠEK, J. *Chemie potravin 2*. Vydání 2. upravené. Nakladatelství OSSIS, 2002. 320 s. ISBN 80-86659-01-1.
- [30] BUŇKA, F. Diplomová práce : *Statistické vyhodnocení výsledků změn sensorické jakosti u tavených sýrů*.: VVŠPV Vyškov, 2001
- [31] ČECHOVÁ, L., NOVÁKOVÁ, A., BUŇKA, F.: Vliv přísady různých druhů tavicích solí na růst vybraných mikroorganismů. In: *Sborník XVI. Konference mladých mikrobiologů, Tomáškovy dny, 7.-8.6.2007*, Brno, s. 9.
- [32] *Wikipedie, otevřená encyklopedie: Fosfáty* [online]. [cit. 2008-04-22] Dostupný z WWW: <<http://cs.wikipedia.org/wiki/Fosf%C3%A1t>> .
- [33] DAVÍDEK, J., JANÍČEK, G., POKORNÝ, J. *Chemie potravin*. Vydání 1. Praha: vydalo SNTL. ISBN 04-815-83.
- [34] DEMNEROVÁ, K. *Laboratorní cvičení z mikrobiologie*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 1993. ISBN 80-7080-184-0.
- [35] ENTEROtest 16. PLIVA-Lachema Diagnostika s.r.o. Brno.

- [36] MOLINS, R. A. (1991). Phosphates in food. Boca Raton: CRC Press, 261 s. ISBN 0-8493-4588-X.
- [37] BUŇKOVÁ, L., PLEVA, P., BUŇKA, F. Antibakteriální účinky fosfátových tavících solí na vybrané mikroorganismy kontaminující tavené sýry. Sborník přednášek semináře Mléko a sýry 2008, VŠCHT Praha, 2008. v tisku.
- [38] MOLINS, R. A., KRAFT, A. A., OLSON, D. G. (1985). Effect of Phosphates on Bacterial Growth in Refrigerated Uncooked Bratwurst. *Journal of Food Science*. 50: 531 – 532.
- [39] SEDLÁČEK, I. *Taxonomie prokaryot*. Brno: MU, 2007. 270 s.
- [40] LEE, R.M., HARTMAN, P.A., OLSON, D.G. and WILLIAMS, F.D. (1994). Bactericidal and bacteriolytic effects of selected food-grade phosphates, using *Staphylococcus aureus* as a model system. *Journal of Food Protection* 57: 276-283.
- [41] LEE, R.M., HARTMAN, P.A., STAHR, H.M., OLSON, D.G. and WILLIAMS, F.D. (1994). Antibacterial mechanism of long-chain polyphosphates in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Food Protection* 57: 289-294.
- [42] MAIER, S.K., SCHERER, S. and LOESSNER, M.J. (1999). Long-chain polyphosphate causes cell lysis and inhibits *Bacillus cereus* septum formation, which is dependent on divalent cations. *Applied and Environmental Microbiology*, 65: 3942-3949.
- [43] ZAIKA, L.L., SCULLEN, J. and FANELLI, J.S. (1997). Growth inhibition of *Listeria monocytogenes* by sodium polyphosphate as affected by polyvalent metal ions. *Journal of Food Science* 62: 867-872.
- [44] BORCH, E. and LYCKEN, L. (2007). Influence of long-chain polyphosphate and heat treatment on *Clostridium cochlearium* and *Clostridium sporogenes* isolated from processed cheese spread. *Journal of Food Protection* 70: 744-747.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

T/ B	Poměr tuků a bílkovin.
ATP	Adenintrifosfát.
ADP	Adenosindifosfát
AMP	Adenosinmonofosfát
IMP	Inosinmonofosfát
MPA	Masopeptonový agar
ENDO agar	Půda pro růst koliformních bakterií
GKCHA	Půda pro růst kvasinek a plísní
MO	Mikroorganismus
BA	Bakterie
NaCl	Chlorid sodný
KOH	Hydroxid draselný
CFU	Celkový počet mikroorganismů
HBS, 690, S9	Fosfátové soli
G ⁺	Grampozitivní bakterie
G ⁻	Gramnegativní bakterie
O/ F	Oxidativní/ fermentativní

SEZNAM OBRÁZKŮ

- Obr. 1. Dynamika růstu MO na čerstvém mēlněném vepřovém mase.....54
- Obr. 2. Grafické znázornění O/ F testu.....70

SEZNAM TABULEK

Tab. 1.	Orientační složení masa (v %) a hodnoty indexových čísel.....	14
Tab. 2.	Obsah mastných kyselin v tukách hlavních druhů masa (v % mastných kyselin z celkové sumy mastných kyselin)	18
Tab. 3.	Srovnání průměrné energetické hodnoty ve 100g různých druhů mas.....	24
Tab. 4.	Působení testovaných tavicích solí na gramnegativní bakterie.....	37
Tab. 5.	Celkové počty MO v čerstvém mēlněném vepřovém mase (průměr ± S.D.)..	53
Tab. 6.	Celkové počty MO na čerstvém mēlněném vepřovém mase s přidavkem 0,1 %, 0,2 %, 0,3 %, 0,5 %, 0,7 %, 1 %, 2 %, 5 % HBS.....	55
Tab. 7.	Celkové počty enterobakterií koliformních bakterií na čerstvém mēlněném vepřovém mase s přidavkem 0,1 %, 0,2 %, 0,3 %, 0,5 %, 0,7 %, 1 %, 2 %, 5 % HBS.....	57
Tab. 8.	Celkové počty kvasinek a plísni na čerstvém mēlněném vepřovém mase s přidavkem 0,1 %, 0,2 %, 0,3 %, 0,5 %, 0,7 %, 1 %, 2 %, 5 % HBS.....	58
Tab. 9.	Celkové počty MO na čerstvém mēlněném vepřovém mase s přidavkem 3 % a 5 % S9 a 690.....	60
Tab. 10.	Celkové počty enterobakterií koliformních bakterií na čerstvém mēlněném vepřovém mase s přidavkem 3 % a 5 % S9 a 690.....	61
Tab. 11.	Celkové počty kvasinek a plísni na čerstvém mēlněném vepřovém mase s přidavkem 3 % a 5 % S9 a 690.....	62
Tab. 12.	Celkové počty MO v čerstvém mēlněném vepřovém mase bez přidavku tavicí soli HBS a bez přidavku BA.....	63
Tab. 13.	Celkové počty bakterií <i>Bacillus subtilis</i> na čerstvém mēlněném vepřovém mase s přidavkem 0,3 %, 0,5 %, 1 % a 3 % HBS.....	64
Tab. 14.	Celkové počty bakterií <i>Staphylococcus aureus</i> na čerstvém mēlněném vepřovém mase s přidavkem 0,3 %, 0,5 %, 1 % a 3 % HBS.....	65

Tab. 15. Výsledky vybraných biochemických a fyziologických testů izolovaných bakterií.....	67
Tab. 16. Výsledky ENTEROtestu 16.....	73

SEZNAM PŘÍLOH

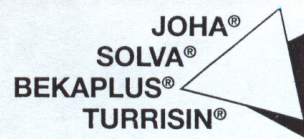
Příloha P I: Fosfátová sůl HBS

Příloha P II: Fosfátová sůl S9

PŘÍLOHA P I: FOSFÁTOVÁ SŮL HBS

JOHA® HBS

Product No: 7 7091



Emulsifying salt with bacteriostatic effect for the manufacture of processed cheese and processed cheese preparations

Composition	E 452 sodium polyphosphate, E 339 sodium orthophosphate
Specification	P ₂ O ₅ content (%): 69.0 ± 1.0 pH(1%, slurry): 6.0 ± 0.5
Specific properties	pH-shift : 0/-0.1 ion exchange capacity: xxx creaming action: o (to x) (o= none, x= slight, xx= medium strong; xxx= very strong)
Application	When used at an appropriate addition rate, JOHA HBS prevents the germination of bacterial spores. The recommended addition rate is between 0.3 – 1.0 % calculated on the quantity of raw material to be processed. JOHA HBS is used together with other JOHA emulsifying salts.
Health and safety	Please find these information in the material safety data sheet.
Storage	The product should be stored under cool, dry conditions. Protect from humidity.
Packaging	Paper sacks with polythene liner; 25 kg net; 1000 kg shrink-wrapped on Europallets.

© Copyright 03.1998

This information based on our present state of knowledge and is intended to provide general notes on our products and their uses. It should not therefore be construed as guaranteeing specific properties of the products described or their suitability for a particular application. No legal liability shall be derived from it. Any existing industrial property rights must be observed. The quality of our products is guaranteed under our General Conditions of Sale.

Technical Service Dairy

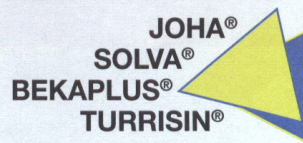
BK Giulini Chemie GmbH & Co. OHG
Werk Ladenburg
Dr.-Albert-Reimann-Straße 2
D-68526 Ladenburg
Telefon: (06203) 77-173/148/327
Telefax: (06203) 77-471/403



PŘÍLOHA P II: FOSFÁTOVÁ SŮL S9

JOHA® S 9

Produkt-Nr. 7 7007



Schmelzsatz zur Herstellung von Schmelzkäse und Schmelzkäsezubereitungen

Deklaration	E 452 Natriumpolyphosphat, E 339 Natriumorthophosphat
Spezifikation	P ₂ O ₅ -Gehalt (%): 59,7 ± 1,0 pH-Wert (1%): 9,0 ± 0,3
Spezielle Eigenschaften	pH-Verschiebung: + 0,1 / + 0,3 Ionenaustauschvermögen: xx Kremierung: xx (0= keine; x= schwach; xx= mittelstark; xxx= stark)
Anwendung	JOHA S 9 wird zur Herstellung von streichfähigen und schnittfesten Schmelzkäsezubereitungen eingesetzt. Die Zugabemenge liegt zwischen 2,8 % und 3,2 %, berechnet auf die eingesetzte Rohware.
Arbeitssicherheit und Umweltschutz	Diese Informationen sind dem DIN-Sicherheitsdatenblatt zu entnehmen.
Lagerung	Kühl und trocken lagern; vor Luftfeuchtigkeit schützen.
Verpackung	Papiersack mit Polyethyleninnensack 25 kg netto; 1000 kg geschrumpft auf Europalette.

© Copyright April 1998

Diese Angaben entsprechen dem heutigen Stand unserer Kenntnisse und sollen über unsere Produkte und deren Anwendungsmöglichkeiten informieren. Sie haben somit nicht die Bedeutung, bestimmte Eigenschaften der Produkte oder deren Eignung für einen konkreten Einsatzzweck zuzusichern. Eine rechtliche Verbindlichkeit kann daraus nicht abgeleitet werden. Etwa bestehende gewerbliche Schutzrechte sind zu berücksichtigen. Eine einwandfreie Qualität gewährleisten wir im Rahmen unserer Allgemeinen Verkaufsbedingungen.

Technischer Service Milchwirtschaft

BK Giulini Chemie GmbH & Co. OHG
Werk Ladenburg
Dr.-Albert-Reimann-Straße 2
D-68526 Ladenburg
Telefon: (06203) 77-173/148/327
Telefax: (06203) 77-471/403

