

Sledování účinků kyseliny sorbové a jejích solí na vybrané mikroorganismy izolované z potravin

Silvie Zajíčková

Bakalářská práce
2008



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav potravinářského inženýrství

akademický rok: 2007/2008

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Silvie ZAJÍČKOVÁ**

Studijní program: **B 2901 Chemie a technologie potravin**

Studijní obor: **Chemie a technologie potravin**

Téma práce: **Sledování účinků kyseliny sorbové a jejích solí na vybrané mikroorganismy izolované z potravin**

Zásady pro vypracování:

1. V teoretické části charakterizujte vlastnosti kyseliny sorbové a jejích solí, zaměřte se na prokázaný antibakteriální efekt a potravinářské využití.
2. Popište typickou mikroflóru povrchu drůbeže, zaměřte se na mikroorganismy způsobující kažení.
3. Provedte pokusy na stanovení účinků kyseliny sorbové a sorbanu draselného na bakterie *Pseudomonas fragi*, *Escherichia coli* a *Staphylococcus aureus* izolované z kuřecího povrchu.

Rozsah práce:

Rozsah příloh:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná/elektronická**

Seznam odborné literatury:

VELÍŠEK, J.: Chemie potravin 2, Tábor, 1999, ISBN 80-902391-4-5

Prof. Ing. Dr. KYZLINK, V., Dr. Sc.: Teoretické základy konzervace potravin, Nakladatelství technické literatury Alfa, Praha, 1988

JAY, M. J.: Modern food microbiology, sixth edition, An Aspen publication, 2000, ISBN 0-8342-1671-x

BŘEZINA, P.; KOMÁR, A.; HRABĚ, J.: Technologie zbožížalství a hygiena potravin živočišného původu II. část, 1. vydání, Vyškov, 2001, ISBN 80-7231-079-8

Vedoucí bakalářské práce:

Mgr. Magda Doležalová

Ústav potravinářského inženýrství

Datum zadání bakalářské práce:

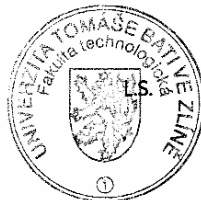
22. listopadu 2007

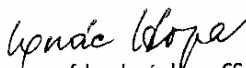
Termín odevzdání bakalářské práce:

31. května 2008

Ve Zlíně dne 12. května 2008


doc. Ing. Petr Hlaváček, CSc.
děkan




prof. Ing. Ignác Hoza, CSc.
vedoucí katedry

ABSTRAKT

Teoretická část této práce je zaměřena na obecnou charakteristiku chemické konzervace zejména pomocí organických kyselin a jejich solí. Tato aditiva je možno použít jako antimikrobiální látky nejen k povrchovému ošetření masa. Drůbeží maso, jako typicky neúdržná potravina se svou bohatou mikroflórou, je vhodným kandidátem pro dekontaminaci pomocí organických kyselin. Pro případ možnosti použití kyseliny sorbové či jejích solí je tedy prvním krokem zjistit jejich účinnost na drůbeží bakteriální izoláty. V této práci byly stanoveny minimální inhibiční koncentrace kyseliny sorbové a sorbanu draselného pro 3 druhy mikroorganismů izolovaných z chlazené drůbeže: *Escherichia coli*, *Pseudomonas fragi* a *Staphylococcus aureus*.

Klíčová slova: kyselina sorbová, sorban draselný, antimikrobiální účinky, drůbeží mikroflóra, *Escherichia coli*, *Pseudomonas fragi*, *Staphylococcus aureus*

ABSTRACT

The theoretical part is focused on general characteristics of chemical preservation, especially organic acids and their salts. These additives can be used as antimicrobial agents not only for the meat surface treatment. Fresh poultry meat is suitable for decontamination by organic acids because its shelf life is not too long.. For this possibility, it is efficient to observe antimicrobial activity against bacterial strains isolated from poultry. In this work, minimal inhibition concentrations (MIC) of sorbic acid and potassium sorbate were determined for 3 bacterial strains: *Escherichia coli*, *Pseudomonas fragi* and *Staphylococcus aureus* isolated from chilled chickens.

Keywords: sorbic acid, potassium sorbate, antimicrobial effect, chicken microflora, *Escherichia coli*, *Pseudomonas fragi*, *Staphylococcus aureus*

Ráda bych poděkovala Mgr. Magdě Doležalové za cenné rady, poskytnuté materiály, odborné vedení a veškerý čas, který mi během realizace mé bakalářské práce věnovala. Dále bych také chtěla poděkovat zaměstnancům Ústavu potravinářského inženýrství za vytvoření příznivého pracovního prostředí a doc. Mgr. Markovi Koutnému, Ph.D. za odborné rady a připomínky při praktickém zpracování této práce.

Prohlašuji, že jsem na bakalářské práci pracovala samostatně a použitou literaturu jsem citovala. V případě publikace výsledků, je-li to uvolněno na základě licenční smlouvy, budu uvedena jako spoluautorka.

Ve Zlíně, 1. 6. 2008

.....

Podpis

OBSAH

| | |
|---|-----------|
| ÚVOD..... | 9 |
| I TEORETICKÁ ČÁST | 10 |
| 1 CHEMICKÁ KONZERVACE..... | 11 |
| 1.1 ADITIVA..... | 11 |
| 1.2 CHEMICKÁ KONZERVAČNÍ ČINIDLA | 11 |
| 1.2.1 Konzervace potravin | 11 |
| 1.2.2 Organické kyseliny | 12 |
| 1.3 KYSELINA SORBOVÁ A JEJÍ SOLI | 14 |
| 1.3.1 Obecná charakteristika | 14 |
| 1.3.2 Antimikrobiální účinky kyseliny sorbové | 15 |
| 1.3.3 Potravinářské použití..... | 16 |
| 1.3.4 Další využití kyseliny sorbové | 17 |
| 1.3.5 Toxicita | 17 |
| 1.3.6 Sorban draselný | 18 |
| 2 DRŮBEŽÍ MIKROFLÓRA | 19 |
| 2.1 OBECNÁ CHARAKTERISTIKA DRŮBEŽÍHO MASA | 19 |
| 2.2 VLIVY PŮSOBÍCÍ NA JAKOST DRŮBEŽÍHO MASA | 19 |
| 2.3 MIKROFLÓRA DRŮBEŽÍHO MASA..... | 20 |
| 2.3.1 Počáteční mikroflóra | 20 |
| 2.3.2 Kontaminace během jatečného zpracování | 20 |
| 2.3.3 Mikroorganismy způsobující kažení..... | 21 |
| 2.3.3.1 <i>Pseudomonas</i> | 21 |
| 2.3.4 Patogenní mikroorganismy | 21 |
| 2.3.4.1 <i>Escherichia coli</i> | 21 |
| 2.3.4.2 <i>Salmonella</i> | 22 |
| 2.3.4.3 <i>Campylobacter</i> | 22 |
| 2.3.4.4 <i>Listeria monocytogenes</i> | 23 |
| 2.3.4.5 <i>Clostridium perfringens</i> | 23 |
| 2.3.4.6 <i>Clostridium botulinum</i> | 23 |
| 2.3.4.7 <i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> | 24 |
| 3 CÍL BAKALÁŘSKÉ PRÁCE | 25 |
| II PRAKTICKÁ ČÁST | 26 |
| 4 MATERIÁL A METODY | 27 |
| 4.1 PŘÍSTROJE, ZAŘÍZENÍ A POMŮCKY | 27 |
| 4.2 KULTIVAČNÍ PŮDY | 28 |
| 4.3 ROZTOKY A OSTATNÍ CHEMIKÁLIE | 28 |
| 4.4 POUŽITÉ BAKTERIÁLNÍ KMENY | 28 |
| 4.5 POUŽITÉ METODY STANOVENÍ..... | 29 |
| 4.5.1 Destičková metoda | 29 |

| | | |
|----------|--|-----------|
| 4.5.2 | Zkumavková metoda | 30 |
| 5 | VÝSLEDKY | 32 |
| 5.1 | SLEDOVÁNÍ ÚČINKŮ KYSELINY SORBOVÉ NA <i>ESCHERICHIA COLI</i> | 32 |
| 5.2 | SLEDOVÁNÍ ÚČINKŮ KYSELINY SORBOVÉ NA <i>PSEUDOMONAS FRAGI</i> | 33 |
| 5.3 | SLEDOVÁNÍ ÚČINKŮ KYSELINY SORBOVÉ NA <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i> | 34 |
| 5.4 | SLEDOVÁNÍ ÚČINKŮ SORBANU DRASELNÉHO NA <i>ESCHERICHIA COLI</i> | 34 |
| 5.5 | SLEDOVÁNÍ ÚČINKŮ SORBANU DRASELNÉHO NA <i>PSEUDOMONAS FRAGI</i> | 35 |
| 5.6 | SLEDOVÁNÍ ÚČINKŮ SORBANU DRASELNÉHO NA <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i> | 36 |
| 6 | DISKUZE | 38 |
| 6.1 | SROVNÁNÍ POUŽITÝCH METOD INHIBICE DANÝCH LÁTEK NA <i>ESCHERICHIA COLI</i> | 38 |
| 6.2 | SROVNÁNÍ POUŽITÝCH METOD INHIBICE DANÝCH LÁTEK NA <i>PSEUDOMONAS FRAGI</i> | 40 |
| 6.3 | SROVNÁNÍ POUŽITÝCH METOD INHIBICE DANÝCH LÁTEK NA <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i> | 42 |
| | ZÁVĚR | 44 |
| | SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY | 46 |
| | SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK | 50 |
| | SEZNAM OBRÁZKŮ | 51 |
| | SEZNAM TABULEK..... | 51 |
| | SEZNAM PŘÍLOH..... | 53 |

ÚVOD

V současné době jsou aditivní látky a alimentární nákazy bohatě diskutovanými tématy nejen mezi odbornou veřejností. Široká veřejnost je již dobře informovaná o nebezpečí nákaz z potravin, a tím stále více stoupá důraz na požadavky kvality a prodlužování skladovatelnosti potravin bez následné mikrobiální kontaminace. Na stoupající oblibu biopotravin a přírodních látek na úkor běžných potravin obsahujících aditiva reaguje také současný výzkum. Odborníci testují účinnost působení konzervačních látek v souvislosti s jejich zdravotní nezávadností a sledují jejich efektivitu v závislosti na různých fyzikálních a chemických faktorech. Především je testována účinná koncentrace sledované látky, pH, při kterém optimálně působí, vodní aktivita, a v neposlední řadě také toxicita dané konzervační látky. Obecné mínění, že všechna „ěčka“ vyskytující se v potravinách jsou pro náš organizmus škodlivá, je mylné.

Mnoho látek ze skupiny konzervantů plní v potravinách velmi důležité a nenahraditelné funkce bez toho, aniž by při tom nějak ovlivnily zdraví člověka. Důležité je především jejich působení proti růstu patogenních mikroorganismů, které mohou způsobit řadu onemocnění. Chemické látky, účelně přidávané do potravin kvůli svému antimikrobiálnímu účinku jsou přísně sledovány, aby nijak negativně neovlivňovaly zdraví konzumentů.

Se stoupající oblibou konzumace drůbežího masa souvisí také důraz na jeho hygienickou nezávadnost nejen během chovu, ale především při porážení, skladování a tepelné úpravě. Drůbeží maso je neúdržná potravina, a díky své hodnotě pH v rozmezí 5,7-6,7 je vhodným prostředím pro patogenní mikroorganismy. Pro zamezení kontaminace drůbežího masa jsou konzervační látky velmi důležité díky svým antimikrobiálním vlastnostem a v neposlední řadě také účinným prodlužováním skladovatelnosti neúdržných i jiných potravin. Při skladování je však důležité dodržovat požadovanou teplotu a dobu, po kterou je konzervační látka v potravine účinná.

Mezi běžně používané konzervační látky patří kyselina sorbová a její soli. V této práci bylo úkolem sledovat působení kyseliny sorbové a sorbanu draselného na tři bakteriální druhy, izolované z povrchu chlazené drůbeže.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 CHEMICKÁ KONZERVACE

1.1 Aditiva

Za cizorodé látky v potravinách jsou označovány látky, které nejsou jejich přirozenou složkou, jsou typickými potravinářskými přísadami nebo nejsou používány samostatně jako poživatiny [3].

Podle způsobu, jakým se cizorodé látky dostanou do potravin jsou rozděleny na dvě skupiny. První skupinu tvoří látky znečišťující, nebo-li kontaminanty, které se vyskytují v poživatinách náhodně. Druhou skupinou jsou cizorodé látky přídatné, které jsou přidávány do potravin úmyslně. Přídatné látky jsou též nazývány potravinovými aditivy.

Látky, které jsou záměrně přidávány do potravin musí splňovat veškeré zdravotnické požadavky. Zjišťuje se u nich nejen akutní toxicita (LD_{50}), ale také subchronická a chronická toxicita, karcinogenita, mutagenita nebo teratogenita. LD_{50} (lethal dose) je toxická dávka sledované látky, při které umírá 50 % intoxikovaných pokusných objektů.

Mezi potravinářská aditiva jsou řazeny látky prodlužující skladovatelnost potravin. Patří zde konzervační prostředky a antioxidanty včetně synergistů, dále látky upravující vzhled, což jsou různá barviva a bělidla, látky upravující fyzikální vlastnosti, kde řadíme zahušťovačidla, želírující prostředky, emulgátory, stabilizátory nebo čířidla, látky upravující vůni, což jsou arómata a esence, látky upravující chuť a v neposlední řadě také látky, které zvyšují biologickou hodnotu potravin [5].

1.2 Chemická konzervační činidla

1.2.1 Konzervace potravin

Konzervace potravin je důležitý technologický proces s hlavním cílem prodloužit údržnost a skladovatelnost potravin [4].

K potlačení činnosti různých bakterií, kvasinek a plísní v potravinách a k uchování jejich výživové hodnoty se využívá různých způsobů konzervace. K omezení činnosti bakterií bývají potraviny nejčastěji uchovávány v chladu při teplotách +4 až +5 °C nebo jsou silně zmrazovány a uchovávány při teplotě -18 °C. Po rozmrazení ale podléhají rychlé zkáze, protože jsou poškozeny buňky, dochází k uvolňování buněčných šťáv a vzniku vhodného

prostředí pro množení mikrobů. Účinnou ochranou proti tomuto jevu je sušení, vymrazování vody, konzervace teplem či chladem nebo použití ultrazvuku či ionizujícího záření [7].

V neposlední řadě je důležitá také chemická konzervace, čímž se rozumí přidání malého množství čistých chemikálií u nichž bylo zjištěno, že v použité koncentraci neškodí lidskému zdraví, účinně potlačují rozvoj mikroorganismů a výrazně neovlivňují sensorické vlastnosti potravin [4].

Pokud chemická látka usmrcuje bakterie či plísně, hovoříme o baktericidním, respektive fungicidním účinku. Pokud je pouze omezen růst mikrobiální populace, hovoříme o bakteriostatickém, respektive fungistatickém účinku. Se stoupající koncentrací konzervační látky je růst mikroorganismů pomalejší a rychlost jejich odumírání se zvyšuje [5].

1.2.2 Organické kyseliny

Organické kyseliny tvoří základní složku ovoce a zeleniny. Při zpracování potravin se uplatňují především jako složky chuťové, aktivátory různých trávicích enzymů, bakteriostatické látky a také látky ovlivňující nemikrobiální procesy.

Při zpracování ovoce, které je téměř vždy zřetelně kyselé, se setkáváme hlavně s ovocnými kyselinami především jablečnou, citrónovou a vinnou. Čerstvá zelenina je na kyseliny chudá, a proto je řazena k potravinám, které jsou technologicky málo kyselé nebo nekyselé kromě reвенě a rajčat, jejichž pH je okolo 4,3. V houbách, které jsou také technologicky nekyselé, se objevuje kyselina šťavelová a fumarová. Maso je v čerstvém stavu méně kyselé než zelenina. Ihned po porážce kyselost masa zpravidla stoupne díky přechodnému zvýšení obsahu kyseliny mléčné, která je důležitým činitelem brzdícím nepříznivé mikrobiální procesy při zrání masa. Po zabíjení a vykrvení se přeruší přívod kyslíku do svalové tkáně, a tím se zvýší produkce kyseliny mléčné, čímž se svalová tkáň okyseluje [3].

Organické kyseliny, které jsou do potravin záměrně přidávány způsobují okyselení dané potraviny a snižují jejich hodnotu pH. Po snížení kyselosti potravin na hodnotu $\text{pH} < 4$ se zvyšuje účinnost některých jiných konzervačních zákroků. Je možno použít nižších termosterilačních teplot, protože nízké pH brání rozvoji sporulujících anaerobů. V některých případech může být účinek organických kyselin zesilován solením výrobku, příkladem může být marinování ryb [4].

Nejúčinnějšími látkami na konzervaci potravin jsou kyselina octová a v menší míře i kyselina mléčná. Další běžně používané konzervační kyseliny jsou kyselina sorbová, benzoová či p-hydroxybenzoová [3]. Těmito chemikáliemi konzervujeme především ovocné polotovary, které jsou určeny k výrobě marmelád, džemů nebo sirupů, z nichž se konzervační látka při tepelné úpravě na finální výrobek většinou vyvaří [4]. Pro povrchovou dekontaminaci masa se používá postřik kyselinou mléčnou, která není typickou chemickou přísadou, protože se vyprodukuje během posmrtné glykolýzy. Koncentrace v rozmezí 1-2% kyseliny mléčné i kyseliny citrónové účinně redukuje počet bakterií a prodlužuje dobu skladování. Důležité je ale věnovat pozornost teplotě, která by měla být shodná s teplotou ošetřovaných kusů. Předností kyseliny mléčné oproti kyselině citrónové je fakt, že hovězí a vepřové maso ošetřené kyselinou mléčnou podléhalo menším váhovým úbytkům než maso ošetřené kyselinou citrónovou [33].

V současné době se dává přednost kyselině sorbové před jinými konzervačními látkami z důvodu dostupnosti mnoha literárních údajů o její účinnosti [6].

Srovnání účinnosti organických a anorganických konzervačních látek na bakterie, kvasinky a plísně je uvedeno v tabulce (Tab. 1).

Tab. 1 Působení konzervačních látek na mikroorganismy (podle Lücka) [2].

| Konzervační látka | Bakterie | Kvasinky | Plísně |
|-----------------------------------|-----------------|-----------------|---------------|
| Dusitany | ++ | - | - |
| Siřičitany a oxid siřičitý | ++ | + | + |
| Mravenčí kyselina | + | ++ | ++ |
| Propionová kyselina | + | ++ | ++ |
| Sorbová kyselina | + | +++ | +++ |
| Benzoová kyselina | ++ | +++ | +++ |
| Estery 1-hydroxybenzoové kyseliny | ++ | +++ | +++ |
| Difenyl | - | ++ | ++ |

- = neúčinný; + = málo účinný; ++ = středně účinný; +++ = vysoce účinný

1.3 Kyselina sorbová a její soli

1.3.1 Obecná charakteristika

Kyselina sorbová je bílý krystalický prášek bez zápachu a silné chuti [9]. Její důležité fyzikální a chemické vlastnosti jsou uvedeny v tabulce (Tab. 2).

Tab. 2 Technický list kyseliny sorbové podle výrobce VIA-REK, spol. s.r.o [18].

| Znak jakosti | Garantovaná hodnota |
|------------------------------|------------------------|
| Kyselina sorbová | 99% |
| Bod tání | 132-135°C |
| Bod vzplanutí | 127°C |
| Vlhkost | max. 0,5% |
| Hustota | 1200 kg/m ³ |
| Hořlavost | hořlavá látka |
| Obsah aldehydů | max. 0,1% |
| Obsah těžkých kovů (jako Pb) | 0,001% |
| Obsah arsenu | 0,0003% |

Kyselina sorbová patří do skupiny organických alifatických nenasyčených mastných kyselin [2]. Její chemický název je kyselina 2,4 – hexadienová a ve své konfiguraci má dvě dvojně vazby: $\text{CH}_3\text{-CH=CH-CH=CH-COOH}$.

Přítomnost dvojných vazeb v molekule kyseliny způsobuje to, že za podmínek oxidace mastných kyselin a těžkých kovů je nestálá. Její nestálost je však daleko menší než nestálost nenasyčených mastných kyselin a tuků [8].

Kyselina sorbová a její soli jsou souhrnně nazývány sorbáty. Jako aditivní látka se kyselina sorbová označuje E200. Více se však jako aditiva používají její soli: E201 sorban sodný, E202 sorban draselný a E203 sorban vápenatý díky lepší rozpustnosti ve vodě [1]. Tyto sloučeniny jsou v potravinách přípustné v limitech, které nesmí přesáhnout 0,2 %. Stejně jako benzoan sodný jsou tyto látky více účinné v kyselých potravinách než v neutrálních [10].

1.3.2 Antimikrobiální účinky kyseliny sorbové

Antimikrobiální působení kyseliny sorbové bylo nezávisle na sobě zjištěno již v roce 1939 v Německu a v roce 1940 v USA. Od poloviny padesátých let začala její průmyslová výroba a od té doby se postupně začala používat po celém světě na konzervování potravin. V současné době také převládá snaha nahradit kyselinou sorbovou jiné konzervační látky.

Antimikrobiální působení kyseliny sorbové spočívá v brždění enzymatických systémů v buňce mikroorganismů. Aktivní forma kyseliny sorbové je nedisociovaná forma, která je 10-600krát účinnější než anion a používá se řádově v množství 200-2000 mg.kg⁻¹ [1]. Pouze jako nedisociovaná může vnikat do nitra buňky, stejně tak i další konzervační látky. V cytoplazmatické membráně dochází k disociaci molekuly, čímž se zvýší pH a oslabí se transmembránový gradient. To má za následek přerušení transportu aminokyselin [10].

Při pH okolo 3 je kyselina sorbová přibližně stejně účinná jako kyselina benzoová, při pH 4-5 je dokonce kyselina sorbová účinnější. Okolo pH 7 však podobně jako kyselina benzoová svou účinnost ztrácí [8].

Inhibiční koncentrace kyseliny sorbové pro plísňovou a kvasinkovou mikroflóru při pH ≤ 4,5 je 700 až 1000 mg.kg⁻¹ substrátu. Její protiplísňový účinek souvisí s neschopností plísní metabolizovat α,β-nenasycené dienové alifatické (2,4-alkadienové) sloučeniny. Sorbová kyselina může být dekarboxylována za vzniku 1,3-pentadienu, který již nemá protiplísňový účinek. Navíc se sensoricky nepříznivě projevuje petrolejovým zápachem, což je problém u sýrů povrchově ošetřených kyselinou sorbovou [5].

Významný inhibiční účinek má kyselina sorbová na plísně (např. *Aspergillus flavus*), které produkují mykotoxiny (např. aflatoxiny). Naopak neúčinná může být proti některým kvasinkám především z rodu *Candida* [5].

Bylo také zjištěno, že kyselina sorbová je dobře účinná na potlačení růstu vláknitých hub, např. *Aspergillus niger*. V kontrolních kulturách obsahujících vodu nebo acetaldehyd začaly spory *Aspergillus niger* klíčit mezi 6-12 hodinou, zatímco v kulturách, které obsahovaly 1 mM kyselinu sorbovou, nastalo klíčení spor mezi 12-18 hodinou. V kulturách, které obsahovaly 3 mM kyselinu sorbovou bylo klíčení spor zpožděno nejméně o 24 hodin [23].

Antimikrobiální účinnost kyseliny sorbové byla také prokázána proti *Staphylococcus aureus*, salmonelám, koliformním bakteriím a psychrotrofním sporulujícím bakteriím [10].

Obecně jsou grampozitivní kataláza pozitivní koky (např. *Staphylococcus*) citlivější ke kyselině sorbové než kataláza negativní koky (např. *Streptococcus*) a aerobní mikroorganismy jsou citlivější než anaerobní. Rezistence bakterií mléčného kvašení na kyselinu sorbovou je zvláště při pH 4,5 a výš, proto je také povoleno používání kyseliny sorbové jako fungistatikum v produktech, které podléhají mléčnému kvašení [10].

Dřívější výzkum potvrdil, že 0,2% kyselina sorbová účinně zastavuje klíčení spor *Clostridium botulinum* a navíc statisticky významně snižuje počet celkových aerobních bakterií v drůbežích produktech v průběhu 10 dnů skladování ve 27 °C [22].

Sorban draselný je nejvhodnější ochranná látka v pekařských výrobcích. V dané studii byl sorban draselný efektivnější než propionát sodný a benzoan sodný, a jako jediný potlačil růst plísní při a_w 0,9, pH 4,5 a pouhé 0,3% koncentraci. Nevýhodou sorbanu draselného je to, že jeho účinnost se snižuje při pH 5,5. Nepatrná inhibice byla pozorována při působení 0,03% sorbanu draselného v nízkých úrovních a_w na *Aspergillus* sp. a *P. corylophilum*. Sorban draselný je tedy vhodný jako konzervační látka proti xerofilním houbám v pekařských produktech blízko pH 4,5 bez ohledu na úroveň vodní aktivity. Aby byl sorban draselný dostatečně účinný v produktech s pH vyšším než 5,5 musí být zkombinován s nízkým obsahem vody (a_w 0,8) [24]. Další předností kyseliny sorbové a sorbanu draselného oproti propionovým a benzoovým solím je to, že v produktech nezanechávají zbytkovou pachut' [24].

Díky své nízké disociační konstantě ($1,73 \cdot 10^{-5}$) se může kyselina sorbová používat i v málo kyselých potravinách. Některé mikroorganismy mohou kyselinu sorbovou při své látkové výměně odbourat, navíc pokud se nepřidává jako konzervační látka ve vyžadované koncentraci a mikroorganismy jsou ve velké koncentraci ve stádiu rozmnožování. Z toho je patrné, že kyselina sorbová není vhodná na konzervaci silně kontaminovaných produktů, ale pouze na udržování hygienicky neškodných potravin s nízkým počtem zárodků [6].

1.3.3 Potravinářské použití

Tradičně se kyselina sorbová přidává do nápojů, kečupů, majonéz, margarínů, sýrů, mléčných výrobků, pekařských polotovarů, cukrovinek, masných výrobků, salátových zálivek, dresingů a nakládané zeleniny [1]. V posledních letech je také používána jako výborný prostředek potlačující vegetaci plísní, bakterií a kvasinek, které se vyskytují především v sýrech, šťávách, marmeládách, džemech, vínech či sušeném ovoci [8]. Byla také proká-

zána prodloužená skladovatelnost po použití kyseliny sorbové u čerstvého drůbežního masa, čerstvých ryb a produktů, které podléhají kažení.

Ověřila se také aplikace kyseliny sorbové do prostoru nad hladinou džemů k ochraně proti povrchovým plísním. Povrch džemu je pokryt papírovým obalem, který je napuštěný 4% roztokem kyseliny sorbové v etanolu nebo je tento roztok nastříkaný mezi hladinu a víčko. V konzervačních koncentracích tato kyselina neovlivňuje sensorické vlastnosti potravin, a proto jsou testovány možnosti jejího použití nejen při běžném zpracování ovoce a zeleniny, ale také k ochraně vykvašeného vína. Kyselina sorbová totiž zabraňuje transport sacharidů do kvasných buněk, a tím zastaví oxidaci a kvašení [9].

V roce 1998 byla nalezena kyselina sorbová i v salátech, v jemném pečivu a chlebech, a to i přesto, že její použití je v těchto výrobcích zakázáno. Kyselina sorbová se nesmí do salátů přidávat, protože by mohla maskovat přítomnost bakterií, které způsobují otravy jídla. V České republice je používání kyseliny sorbové povoleno jen pro vybrané druhy potravin, podobně je tomu v USA, kde je kyselina sorbová označována jako GRAS látka (Generally Recognized As Safe, tj. bezpečná látka nepodléhající regulaci) [1]. V zemích jako je Německo, Itálie a Nizozemí jsou kyselina sorbová a její soli schváleny u jistých druhů pekařských výrobků včetně chleba [12].

1.3.4 Další využití kyseliny sorbové

Kyselina sorbová a její soli se rovněž používají jako konzervační látky v kosmetice a farmacii. Díky tomu byly testovány účinky těchto látek na pokožku a ukázalo se, že v koncentraci okolo 1 % způsobují podráždění sliznic a u citlivých lidí mohou vyvolat kopřivku [1].

1.3.5 Toxicita

Jako běžně používaná konzervační látka v potravinách není kyselina sorbová a její soli toxická. Důležité je dbát na její množství v potravinách, které nesmí přesáhnout nejvyšší povolenou hodnotu. Povolené množství kyseliny sorbové je u různých potravin odlišné (Tab. 3).

Tab. 3 Přehled chemických konzervačních látek v potravinách a jejich povolené mezní hodnoty v 1 kg [11].

| Kyselina sorbová a její soli - nejvyšší povolené množství (mg) | Poživatina |
|--|--|
| 200 | tokajské víno, sladké víno (ovocné i hroznové), ovocný rosol, limonády, Slovkola |
| 300 | ovocné sirupy typ A, C, limonádový sirup s příchutí |
| 400 | Ovocné sirupy pro limonádové automaty, kečup, rajský protlak |
| 800 | hořčice, nakládaná zelenina, ovocné šťávy – polotovary s výjimkou citrusových, zeleninové protlaky, tekuté a polotekuté cukrovinářské náplně |
| 1000 | tavené sýry, tvrdý sýr, cukrářské výrobky |

Kyselina sorbová a její nasycený analog kyselina kapronová byly použity jako krmivo pro štěňata v 4% koncentraci po dobu 90 dnů a neměly žádné negativní účinky. Kyselina sorbová je méně toxická než kyselina benzoová a při výzkumech je lépe snášena krysami než sorban draselný [9]. Člověk a ostatní živočichové metabolizují sorbovou kyselinu jako jiné mastné kyseliny, které se přirozeně vyskytují, proto z farmaceutického hlediska působí jako látka, která není tělu cizí. V lidském těle má životnost okolo 40-110 minut a za normálních podmínek je kompletně oxidována na CO₂ a H₂O [12]. Při 5% dávkách v potravě způsobila kyselina sorbová nejen zrychlený růst, ale i prodloužení doby života krysích samců, což bylo zdůvodňováno především zvýšeným přísunem kalorií, protože kyselina sorbová nejen že dodává tělu energii, ale také aktivně posiluje tělo před infekcemi [1]. Ty samé vlastnosti mají také její soli – sorbany [6].

1.3.6 Sorban draselný

Nejpoužívanější solí kyseliny sorbové je sorban draselný: CH₃CH=CHCH=CH-COOK.

Sorban draselný působí nejlépe v pH nižším než 5, malé účinnosti vykazuje i při pH 6,5 a zastavuje růst grampozitivních a gramnegativních bakterií. Sorban draselný je antimikrobiální látka s nízkou toxicitou a je charakteristický tím, že buňku nezabíjí, ale pouze zastaví její růst. Sorban draselný má hladinu LD₅₀ 3,800 mg.kg⁻¹ pro myši a 4,340 mg.kg⁻¹ pro krysy. Při špatné manipulaci či inhalaci může způsobit podráždění očí a kůže, jinak nebyly zjištěny žádné karcinogenní, teratogenní nebo mutagenní účinky [9].

2 DRŮBEŽÍ MIKROFLÓRA

2.1 Obecná charakteristika drůbežního masa

Hlavní předností drůbežního masa je jeho jemnost a lehká stravitelnost. Využívá se nejen v racionální, ale také v léčebné výživě [13]. Za posledních 20 let se produkce drůbežního masa celosvětově rychle zvýšila. Pro zpracování drůbežního masa byl rychlý přechod od ručního zpracování v 50. a 60. letech k dnes již téměř plně automatizovanému a mechanizovanému způsobu zpracování drůbeže. Tyto aspekty se významně podepsaly na zvýšené hygienické kvalitě konečného výrobku [16].

Majoritními složkami drůbežního masa jsou voda, bílkoviny a lipidy. Mezi minoritní složky patří nebílkovinné dusíkaté látky, vitamíny, sacharidy a v neposlední řadě také organické kyseliny. Poměrné zastoupení některých důležitých složek v drůbežím mase je uvedeno v tabulce (Tab. 4)

Tab. 4 Poměr zastoupení různých složek v kuřecím mase [11].

| druh | energetická hodnota [KJ] | bílkoviny [g] | tuk [g] | sacharidy [g] |
|---------------|--------------------------|---------------|---------|---------------|
| kuře-průměr | 473 | 13,5 | 6,4 | 0,3 |
| kuřecí prsa | 367 | 19,8 | 0,8 | 0,3 |
| kuřecí stehna | 393 | 16,1 | 3,1 | 0,3 |
| kuřecí játra | 501 | 19,9 | 3,9 | 1,2 |
| kuřecí srdce | 731 | 14,6 | 12,1 | 1,8 |

Obecně je obsah tuku v mase drůbeže, skotu a prasat dán poměrem 1:4:6 a obsah bílkovin ve stejných druzích masa v poměru 1,0:0,9:0,7. V drůbežím mase nalezneme větší počet plnohodnotných bílkovin, nižší podíl vaziva a také nižší obsah tuku. Co se týče drůbežního tuku, je tekutější než tuk u velkých hospodářských zvířat a obsahuje více esenciálních mastných kyselin [14].

2.2 Vlivy působící na jakost drůbežního masa

Průběh postmortálních změn se u drůbežního masa výrazně liší od postmortálních změn velkých jatečných zvířat. Autolýza zde probíhá podstatně rychleji a je patrný velký rozdíl

v průběhu autolýzy mezi prsní a stehenní svalovinou. Čím je vyšší hodnota glykogenu ve svalech, tím je maso křehčí. Hlavním hygienickým problémem poraženého drůbežního masa je především mikrobiální kontaminace. Může dojít také k sekundární mikrobiální kontaminaci vlivem znečištěné vody při chlazení drůbežích těl nebo ke kontaminaci během kuchání obsahem trávícího traktu [14].

2.3 Mikroflóra drůbežního masa

Drůbeží maso má skladbu živin optimální pro růst mikrobů. Vodní aktivita tkání se pohybuje v rozmezí 0,98-0,99 a pH svaloviny je 5,7-6,7. S prodlužující se dobou skladování drůbežního masa pH svaloviny stoupá. Drůbež může být kontaminována sezobáním exkrementů, vzájemným stykem, prachem nebo aerosolem neseným větracím vzduchem, vodou nebo krmivem [15].

2.3.1 Počáteční mikroflóra

Některé mikroorganismy (*Salmonella*, *Escherichia coli*, *Mycoplasma*, *Campylobacter*, *vibria* a enterokoky) mohou být přítomny již ve vaječnicích nebo vejcovodech živé drůbeže. Tyto mikroorganismy pak putují z vaječníků do vejce, kde jsou schopny penetrovat přes tvořící se skořápku, dosáhnout žloutku a nakazit vyvíjející se zárodek. Takto nakažená mláďata poté snadno roznášejí infekci na další drůbež. Nadměrné teplo, chlad a stres snižují odolnost drůbeže proti infekci. Přenosu patogenů během chovu drůbeže se dá předejít dodržováním předepsaných hygienických norem a důležité je zamezit přístup divokým ptákům, hlodavcům a plazům do chovné zóny [16].

2.3.2 Kontaminace během jatečného zpracování

V primární fázi jatečného zpracování drůbeže je zdrojem kontaminace peří, protože při paření se dostávají mikroorganismy do pařící vody. Ta pokud dostatečně neodtéká, je rezervoárem bakterií. Následně během škrubání dochází k přenosu mikroorganismů na další kusy, zejména salmonel. Největším a nejdůležitějším zdrojem kontaminace je však eviscerace, kdy dochází ke vzniku kontaminace z nástrojů, proto je důležité pracovní pomůcky řádně omývat a dezinfikovat [15].

2.3.3 Mikroorganismy způsobující kažení

Příčinou kažení drůbežího masa je zejména pomnožení pseudomonád (*Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida* a *Pseudomonas fragi*), zástupců rodu *Acinetobacter* a *Moraxella*. Tyto silně proteolytické mikroorganismy mají i lipolytickou aktivitu [15].

2.3.3.1 *Pseudomonas*

Pseudomonas fragi je gramnegativní aerobní bakterie a podílí se na kažení potravin. *P. fragi* je patogenní mikroorganismus významný svou silnou proteolytickou schopností, čímž umožňuje rozklad bílkovinných potravin. Vyskytuje se především na povrchu masa. Patří mezi psychofilní mikroorganismy, a proto může negativně působit na maso i při nízkých skladovacích teplotách [25].

Zvýšený výskyt pseudomonád o více než 2 % byl patrný na drůbeži skladované při teplotách 20-22 °C [16]. Během skladování byl zaznamenán zvýšený výskyt *P. fragi* oproti vzorkům s kontrolou než bezprostředně po porážce drůbeže. V následných studiích bylo prokázáno, že 30 % mikroorganismů izolovaných ze skladované drůbeže byly: *P. fragi*, *P. fluorescens* a *P. lundensis* [21]. Vysoká produkce lipázy *P. fragi* na drůbeži byla zjištěna v inkubačních teplotách 0-15 °C [16].

2.3.4 Patogenní mikroorganismy

Syrové nebo nedovařeného drůbeží maso je zdrojem řady patogenních mikroorganismů, které způsobují závažná onemocnění. Tyto mikroorganismy se mohou vyskytovat ve střevech a na kůži drůbeže. Jedná se především o *Escherichia coli*, salmonely, *Listeria monocytogenes*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium botulinum*, *Campylobacter* a v neposlední řadě také *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* [15]. Celosvětově jsou kampylobakteriózy a salmonelózy nejzávažnějšími onemocněními spojenými s drůbežími výrobky [16].

2.3.4.1 *Escherichia coli*

Escherichia coli patří do čeledi *Enterobacteriaceae* a nachází se především ve střevech člověka a teplokrevných živočichů. *E. coli* patří mezi gramnegativní tyčinky a je podmíněně patogenní mikroorganismus, které vyvolává především nemoci močových cest, průjmové infekce, zvláště u kojenců a malých dětí. Syntetizuje především některé důležité vitamíny

ny a zabraňuje růstu škodlivých bakterií, protože s nimi soutěží o živiny a kyslík, čímž je pro svého hostitele užitečná [17].

Co se týče *E. coli* a jejího výskytu na drůbeži bylo zjištěno, že více přežívá na volně rozmraženém drůbežím masu než na zmrazených kusech [16]. Bylo také zjištěno, že během paření drůbeže při teplotě 53 °C po dobu 128 sekund je množství enterobakterií, především *E. coli*, a psychrotrofních mikroorganismů výrazně sníženo, ale nepatrné zvýšení bylo zaznamenáno u aerobních mikroorganismů. Během paření při 60 °C po dobu 115 sekund se množství všech mikroorganismů výrazně snížilo nebo bylo zcela eliminováno [16].

2.3.4.2 *Salmonella*

Salmonella je gramnegativní fakultativně anaerobní bakterie patřící do čeledi *Enterobacteriaceae*. Všechny druhy *Salmonell* jsou patogenní a způsobují závažná střevní onemocnění. *Salmonella typhi* je původcem břišního tyfu, který může být v krajních případech i smrtelný. *Salmonella enteritidis* způsobuje u člověka salmonelózu, která se projevuje průjmami a zvracením [25].

Drůbež nakažená salmonelou může kontaminovat další poražené kusy z porážecího vybavení nebo přímo z pracovníka, který z poraženými kusy pracuje. Kontrola drůbeže na přítomnost salmonely musí být zahájena již na farmě před porážkou, protože při porážení a zpracování se již nedá odstranit. Rozsah křížové kontaminace však může být minimalizován dodržováním hygienických opatření během porážení a chlazení drůbeže. Příčinou propuknutí salmonelózy u člověka je především nepřiměřené provaření a zpracování kontaminovaných drůbežích produktů [16].

2.3.4.3 *Campylobacter*

Campylobacter je gramnegativní bakterie spirálovitého tvaru způsobující střevní onemocnění [25].

Campylobacter vyskytující se na kuřatech je příčinou bakteriální gastrointestinální lidské infekce. V posledních letech byla zaznamenána odolnost *Campylobacter* proti klinicky používaným antibiotikům. Nedostatečně provařené drůbeží maso je jedním z nejběžnějších zdrojů nákazy *Campylobacter*. Zvýšený výskyt tohoto mikroorganismu byl také zaznamenán na chlazených drůbežích výrobcích. Minimální infekční dávka není přesně známa,

ale několik set buněk vyskytujících se na kontaminované drůbeži je dostatečných k tomu, aby způsobily lidskou infekci. Výskyt *Campylobacter* je také ovlivněn klimatickými podmínkami [16].

2.3.4.4 *Listeria monocytogenes*

L. monocytogenes patří mezi grampozitivní nesporeující tyčinky, ale v živočišných tkáních se může vyskytovat i v téměř kokovité formě. *L. monocytogenes* je patogenní bakterie a u oslabených jedinců může vyvolat encefalitidu nebo onemocnění jater. Přenáší se především nepasterovaným mlékem a jinými potravinami [25].

Možnost pomnožení *L. monocytogenes* na drůbežím mase je ovlivněna stejnými faktory jako u jiných druhů mas. Výzkumy prokázaly, že nedošlo k pomnožení *L. monocytogenes* na kuřecích prsech skladovaných v 1 °C při pH 5,8. Při skladování v 6 °C v aerobně baleném mase bylo již patrné pomnožení tohoto patogena. Vyšší pH kuřecích stehen může také poskytovat příznivější podmínky pro výskyt *L. monocytogenes*. Stejně jako u předchozích mikroorganismů se může i tento patogen vyskytovat v nedovařeném drůbežím mase, a po konzumaci kontaminovaného masa může být zdrojem onemocnění listeriózy [16].

2.3.4.5 *Clostridium perfringens*

Tento patogenní mikroorganismus produkující toxin patří mezi grampozitivní bakterie. Otrava nastává při silné kontaminaci potraviny touto bakterií při koncentraci 10^6 g⁻¹ buněk v potravíně. Toxin se tvoří při sporulaci, která probíhá ve střevním traktu člověka [25].

Primárním zdrojem kontaminace *C. perfringens* je půda a krmivo. *C. perfringens* se vyskytuje především na povrchu syrové drůbeže, ale obvykle v malých množstvích. Syrová drůbež je obvykle uskladněná v příliš nízkých teplotách pro růst *C. perfringens* [16].

2.3.4.6 *Clostridium botulinum*

C. botulinum patří také mezi grampozitivní bakterie. Produkuje nebezpečný toxin, který patří k nejúčinnějším jedům, protože 1 mg botulotoxinu představuje smrtící dávku pro 16000 lidí. Botulotoxiny jsou bílkovinné povahy, a proto se inaktivují při zvýšené teplotě. Příznaky otravy se projevují po 6 až 72 hodinách a v krajních případech končí smrtí [25].

C. botulinum typu C může být příčinou úmrtí v drůbežím stádu, ale lidský botulismus způsobený tímto mikroorganizmem nebyl prokázán. Přítomnost toxinu produkovaného *C. botulinum* typu C v mase čerstvě poražených kusů je velmi malá, protože je tento toxin citlivý na teplo a během vaření se eliminuje. Lidský botulismus a smrt však může způsobit *C. botulinum* typu A a B pokud je kontaminovaná drůbež nesprávně uvařená nebo skladovaná při vysokých teplotách [16].

2.3.4.7 *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus*

Staphylococcus aureus subsp. *aureus* jsou grampozitivní koky, které se často seskupují do tvaru hroznů. Mohou se vyskytovat i jednotlivě, ve dvojicích nebo malých shlucích. *S. aureus* se také někdy označuje jako zlatý stafylokok a je považován za striktního patogena [17]. Rozmnožuje se při teplotách 6,7–45,5°C a toxiny produkuje buď během svého rozmnožování nebo bezprostředně po něm. Je schopný zkvašovat mnoho cukrů za současné tvorby kyselin. Při zjišťování *S. aureus* se využívá jeho schopnosti rozmnožovat se v přítomnosti 10% NaCl. Pomnožení tohoto mikroorganismu v potravinách představuje riziko otrav, které mohou být v krajních případech i smrtelné [20].

Teplo během paření drůbežích kusů a vlhké prostředí vytváří příznivé podmínky pro růst *S. aureus*. Tento mikroorganismus vyskytující se na syrovém drůbežím mase se může skládat ze směsi kmenů, které přežily paření, a z kmenů, které se mohou vyskytovat na pařících a kuchacích zařízeních. Důležité je proto dodržovat hygienu, předejít nadměrnému hromadění páry a přístroje důkladně dezinfikovat. U živé drůbeže se také může *S. aureus* vyskytovat na pohmožděninách, poraněních nebo na povrchu kůže. Většina mikroorganismů je zničena během paření, avšak může také dojít k reinfekci dalšími kmeny *S. aureus* během kuchání. Důležité jsou také nízké skladovací teploty drůbežích produktů, kterými můžeme účinně předejít růstu *S. aureus* a ostatních mikroorganismů [16].

3 CÍL BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

V praktické části bylo hlavním cílem sledovat antibakteriální účinek kyseliny sorbové a sorbanu draselného na bakterie *Escherichia coli*, *Pseudomonas fragi* a *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus*, které byly izolované z povrchu chlazených kuřat.

II. PRAKTICKÁ ČÁST

4 MATERIÁL A METODY

4.1 Přístroje, zařízení a pomůcky

- Přístroj Tecan SUNRISE s SW Magellan, verze 3.11, Rakousko
- Spektrofotometr s diodovým polem, Libra S6
- Spekol
- Parní sterilátor – autokláv -H+P Varioklav
- Biologický termostat, 37°C, 30°C, Laboratorní přístroje Praha
- Váhy KERN 440.47N, max. 2000g
- Chladnička, Elektrolux
- UV zářič
- Aseptický očkovací box
- Mikrotitrační destičky
- Mikropipety, multikanálová pipeta
- Laboratorní sklo a další běžné laboratorní vybavení

4.2 Kultivační půdy

Tab. 5 Složení použitých kultivačních půd

| | MPB | 2x koncentrovaný MPB | MPA |
|------------------------------|------------|-----------------------------|------------|
| Beef extract [g/l] | 1,5 | 0,6 | 6,0 |
| Pepton [g/l] | 2,5 | 1,0 | 8,0 |
| NaCl [g/l] | 1,5 | 0,6 | 5,0 |
| Destilovaná voda [ml] | 500 | 1000 | 1000 |
| Agar [g/l] | - | - | 15 |

4.3 Roztoky a ostatní chemikálie

- Fyziologický roztok
 - 0,85% NaCl v destilované vodě byl sterilizován při 121°C 15 minut
- Kyselina sorbová (výrobce VIA-REK, spol. s.r.o)
 - 20% roztok kyseliny sorbové byl připraven navážením 8 g kyseliny sorbové a rozpuštěn ve 40 ml destilované vody, následně sterilováno
 - 0,2% roztok kyseliny sorbové byl připraven navážením 0,1 g kyseliny sorbové a rozpuštěn v 50 ml destilované vody, následně sterilováno
- Sorban draselný
 - 20% sorban draselný byl připraven navážením 8 g sorbanu draselného a doplněním 40 ml destilované vody, následně sterilováno

4.4 Použité bakteriální kmeny

Použité bakteriální kmeny byly poskytnuty Ústavem potravinářského inženýrství FT UTB ve Zlíně.

Tab. 6 Výsledky vybraných biochemických testů použitého kmene *E. coli*

| Použitý mikro-organismus | Kolonie | KAT | ONP | Ind | Lys | Orn |
|----------------------------|----------------|-----|-----|-----|-----|-----|
| <i>Escherichia coli</i> 66 | hladké, lesklé | + | + | + | + | - |

Tab. 7 Výsledky vybraných biochemických testů použitého kmene *P. fragi*

| Použitý mikro-organismus | Kolonie | KAT | Kas | Ure | Arg | Tyr |
|-----------------------------|----------------|-----|-----|-----|-----|-----|
| <i>Pseudomonas fragi</i> 19 | hladké, lesklé | + | - | - | - | + |

Tab. 8 Výsledky vybraných biochemických testů použitého kmene *S. aureus*

| Použitý mikro-organismus | Kolonie | YEP | CLF | Arg | Orn | Ure |
|--|----------------|-----|-----|-----|-----|-----|
| <i>Staphylococcus aureus subsp. aureus</i> 7 | hladké, lesklé | + | + | + | - | + |

4.5 Použité metody stanovení

4.5.1 Destičková metoda

Pomocí destičkové metody byla sledována účinnost kyseliny sorbové a sorbanu draselného na *E. coli*, *P. fragi* a *Staphylococcus aureus*. Byly použity 10%, 8%, 6%, 4%, 2%, 1% a 0,5% koncentrace sorbanu draselného a 0,1%, 0,05% a 0,025% koncentrace kyseliny sorbové.

Byla připravena suspenze bakterií ve sterilním fyziologickém roztoku a sledován zákal takto připravené suspenze na Spekolu na hodnotu 0,05. Do každé jamky byly pipetovány příslušné roztoky dle rozpisu (Tab. 9). Následně byla každá jamka zaočkována 20 μ l bakteriální suspenze. Celkový objem v jedné jamce byl 200 μ l.

Tab. 9 Pipetovaná množství pro pokus s *E. coli* při destičkové metodě

| | Pipetovaná množství roztoků pro sorban draselný | | | | | | |
|-----------------------|---|----|----|----|----|-----|-----|
| | 10% | 8% | 6% | 4% | 2% | KM | KB |
| Destilovaná voda [ml] | 50 | 60 | 70 | 80 | 90 | 100 | 120 |
| Sorban draselný [ml] | 50 | 40 | 30 | 20 | 10 | 0 | 0 |

Kontrolní jamky obsahovaly 80 μ l bujónu, 100 μ l vody a 20 μ l bakteriální suspenze, navíc byla provedena kontrola sterility bujónu. Následně byla destička vložena do přístroje Tecan a bylo zahájeno měření absorbance po dobu 24 hodin při 25 °C (P II., III., IV.)

Poté byla hodnocena minimální inhibiční koncentrace. MIC je nejmenší množství sledované látky, při které dojde k viditelné zástavě růstu bakteriální populace. MIC se stanovuje nejčastěji pomocí dilučních testů. Tyto testy slouží ke kvantitativnímu stanovení citlivosti. Princip této metody spočívá v tom, že sledovaná látka je v odstupňované koncentraci přidána do série vhodných tekutých či tuhých půd a následně je zaočkována standardním inokulem čisté kultury testovaného kmene. Po inkubaci se poté zjišťuje MIC sledované látky na příslušné mikroorganismy [26].

4.5.2 Zkumavková metoda

Byl sledován účinek kyseliny sorbové a sorbanu draselného na vybrané mikroorganismy izolované z potravin zkumavkovou metodou. Byly použity 12%, 10%, 6%, 4%, 2%, 1%, 0,05% a 0,025% koncentrace sorbanu draselného a 0,1%, 0,05%, 0,025%, 0,02% a 0,015% koncentrace kyseliny sorbové. Pro kontrolu bylo provedeno stanovení stejným způsobem bez použití kyseliny sorbové a sorbanu draselného.

Tab. 10 Pipetovaná množství pro pokus s *E. coli* při zkumavkové metodě

| | Zkumavky s 2,5 ml MPB pro 0,2% kyselinu sorbovou | | | | | | |
|-----------------------|--|--------|-------|--------|-------|-----|-----|
| | 0,05% | 0,025% | 0,02% | 0,015% | 0,01% | KM | KB |
| Destilovaná voda [ml] | 1,88 | 2,19 | 2,25 | 2,31 | 2,38 | 2,5 | 2,5 |
| Kyselina sorbová [ml] | 0,63 | 0,31 | 0,25 | 0,19 | 0,13 | 0 | 0 |

Byly připraveny vodné roztoky kyseliny sorbové a sorbanu draselného o příslušných koncentracích. K dvojnásobně koncentrovanému masopeptonovému bujónu byla přidána sus-

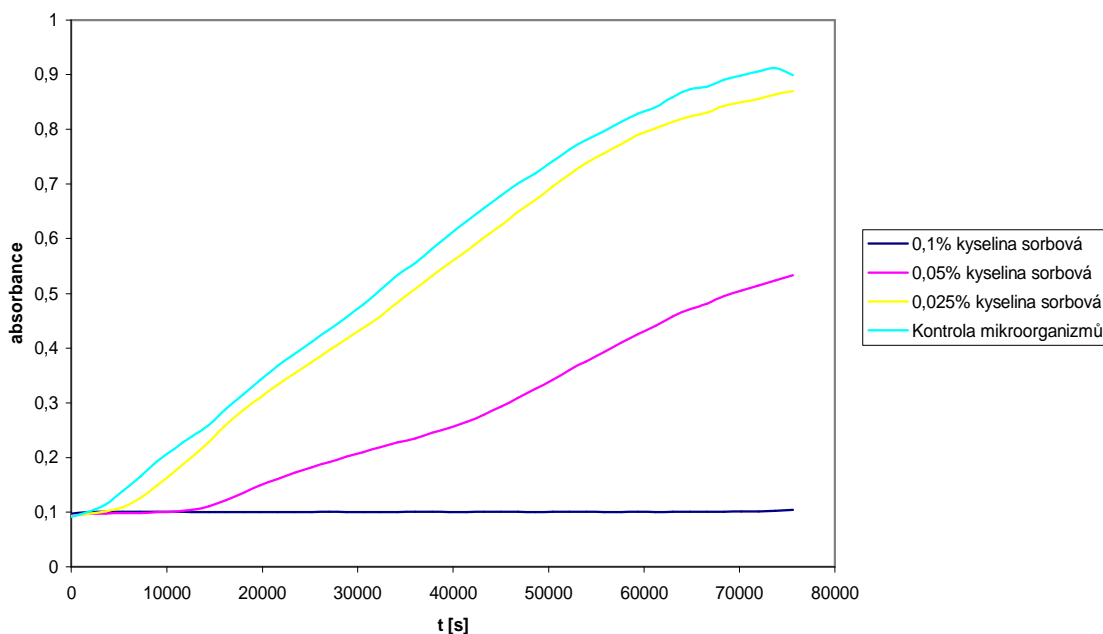
penze zkoumané kultury promíchána ve fyziologickém roztoku a upravena ve Spekolu na hodnotu absorpance 0,05. Pipetovaná množství jsou uvedena v tabulce (Tab. 10). Zkoumavky byly inkubovány při 30 nebo 37 °C dle růstových vlastností kultur po dobu 20 hodin (P I.).

5 VÝSLEDKY

5.1 Sledování účinků kyseliny sorbové na *Escherichia coli*

Vliv kyseliny sorbové na kmen *E. coli* byl nejdříve zkoumán destičkovou metodou a na základě výsledků z této metody byl pokus zopakován pomocí zkumavkové metody.

Při destičkové metodě bylo zjištěno, že 0,1% kyselina sorbová účinně potlačila růst *E. coli*, ale při nižších koncentracích 0,05% a 0,025% byla kyselina sorbová neúčinná. Jako minimální inhibiční koncentrace (MIC) kyseliny sorbové pro *E. coli* pomocí destičkové metody byla stanovena 0,1% koncentrace (Obr.1).



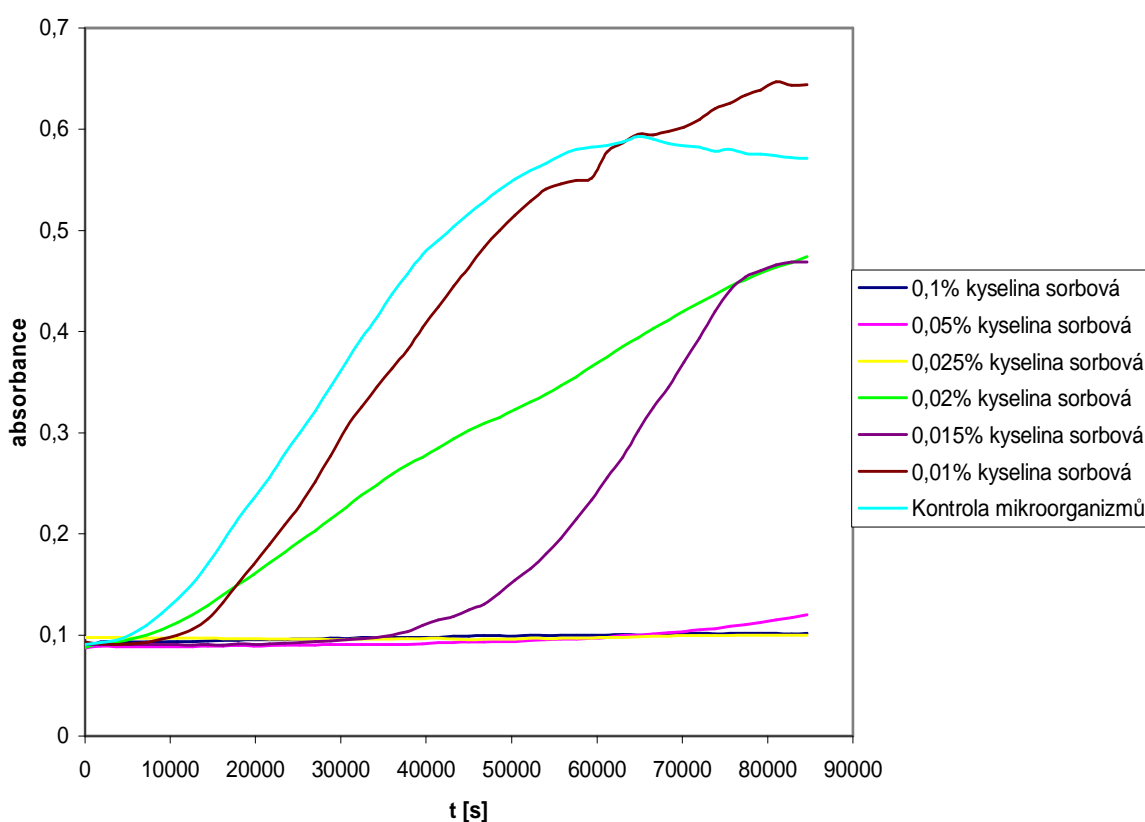
Obr 1. Vliv kyseliny sorbové na *E.coli* v průběhu 24 hodinové kultivace

Při zkumavkové metodě byla změřena absorbance u 0,1%, 0,05% a 0,025% kyseliny sorbové (Obr. 7).

Výsledky zkumavkové metody potvrdily výsledky destičkové metody. Kyselina sorbová je v koncentracích nižších než 0,1% neúčinná na bakterii *E. coli* izolovanou z masa.

5.2 Sledování účinků kyseliny sorbové na *Pseudomonas fragi*

Při sledování MIC kyseliny sorbové na *P. fragi* u destičkové metody byly použity i nižší koncentrace než při sledování MIC na *E. coli*. Kyselina sorbová byla na *P. fragi* účinná při koncentracích 0,1% a 0,05% a na rozhraní 0,02% a 0,025% se její účinnost postupně snižovala. V nejnižších koncentracích 0,015% a 0,01% byla kyselina sorbová na *P. fragi* zcela neúčinná (Obr. 2).

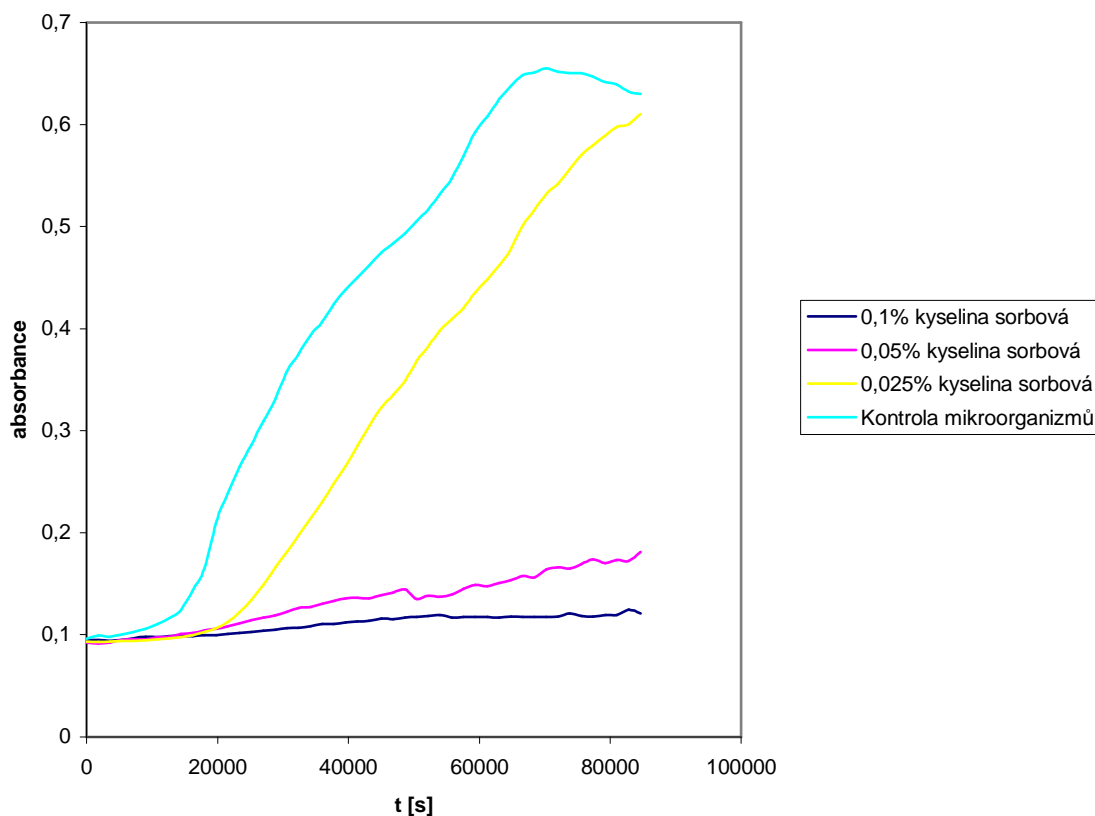


Obr. 2 Vliv kyseliny sorbové na *P. fragi* v průběhu 24 hodinové kultivace

Po vyhodnocení výsledků z destičkové metody byla účinnost kyseliny sorbové na *P. fragi* opět ověřena zkumavkovou metodou (Obr. 8). Výsledná MIC kyseliny sorbové na *P. fragi* izolovanou z drůbeže byla na základě obou metod stanovena při 0,05% koncentraci.

5.3 Sledování účinků kyseliny sorbové na *Staphylococcus aureus*

Účinnost kyseliny sorbové na *S. aureus* při destičkové metodě byla při 0,1 %. Mezní byla 0,05% koncentrace, při které byla kyselina sorbová účinná pouze částečně, a 0,025% kyselina sorbová na *S. aureus* nepůsobila (Obr. 3).

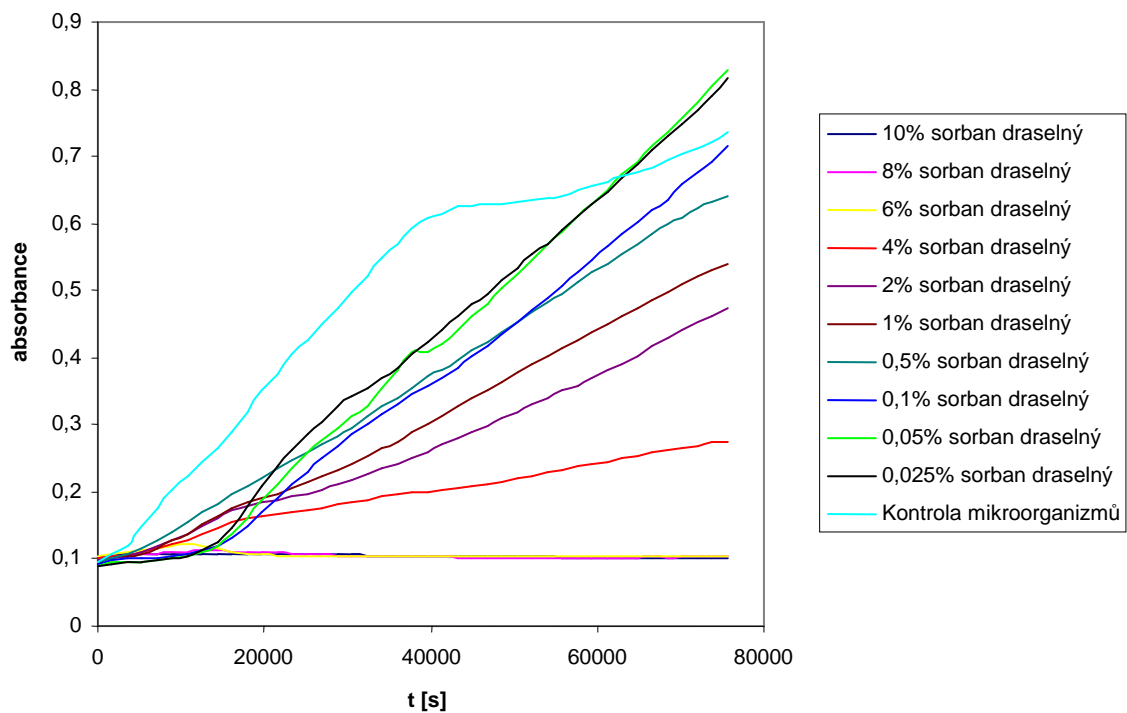


Obr. 3 Vliv kyseliny sorbové na *S. aureus* v průběhu 24 hodinové kultivace

Při zkumavkové metodě byla zjištěna velmi malá inhibice této bakterie kyselinou sorbovou i při vyšších koncentracích (Obr. 9). Příčinou mohla být vzdušná kontaminace vzorků. MIC kyseliny sorbové na *S. aureus* touto metodou tedy prokázána nebyla.

5.4 Sledování účinků sorbanu draselného na *Escherichia coli*

Při destičkové metodě bylo u sorbanu draselného zjištěno, že podobně jako kyselina sorbová je účinný při vyšších koncentracích. 10%, 8% a 6% sorban draselný zcela potlačil růst *E. coli*. Mezní byla 4% koncentrace, kdy začal sorban draselný svou účinností na *E. coli* ztrácet, a se snižujícími se hodnotami koncentrace byl na *E. coli* zcela neúčinný (Obr. 4).

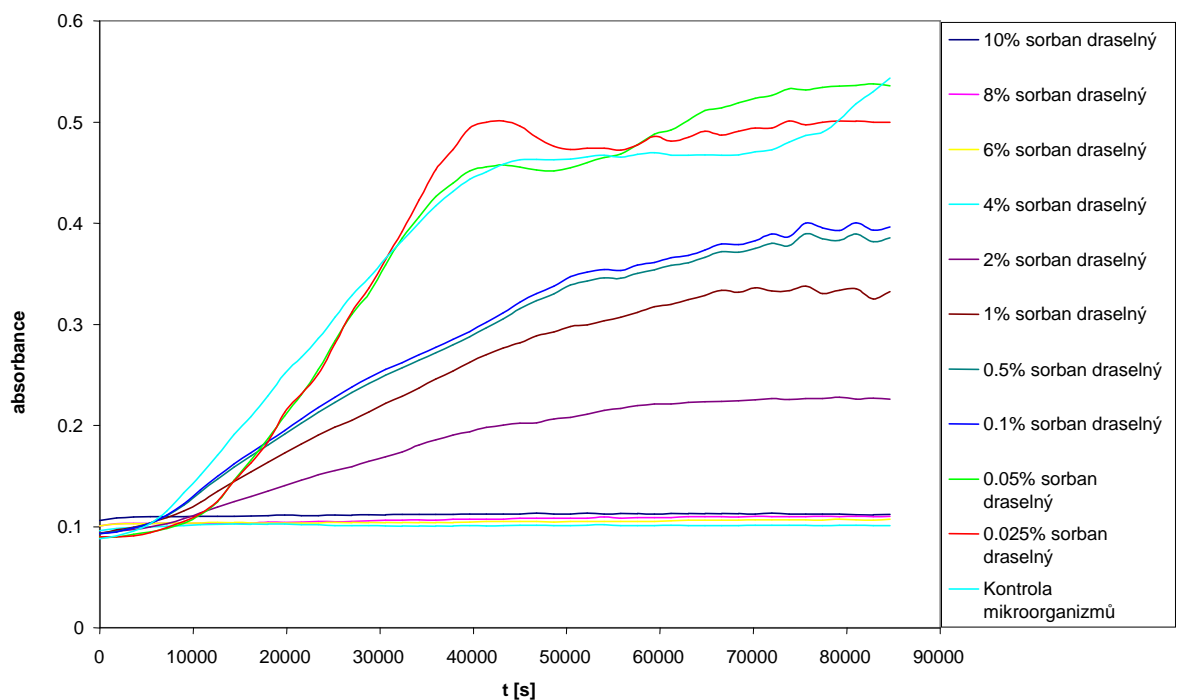


Obr. 4 Vliv sorbanu draselného na *E. coli* v průběhu 24 hodinové kultivace

Výsledky zkumavkové metody potvrdily MIC sorbanu draselného na *E. coli* už při 6% koncentraci (Obr. 10).

5.5 Sledování účinků sorbanu draselného na *Pseudomonas fragi*

Při sledování MIC sorbanu draselného na *P. fragi* pomocí destičkové metody způsobil inhibici mikroorganismu už 2% sorban draselný, narozdíl od *E. coli*, kde byla mezní až 4% koncentrace. (Obr. 5).

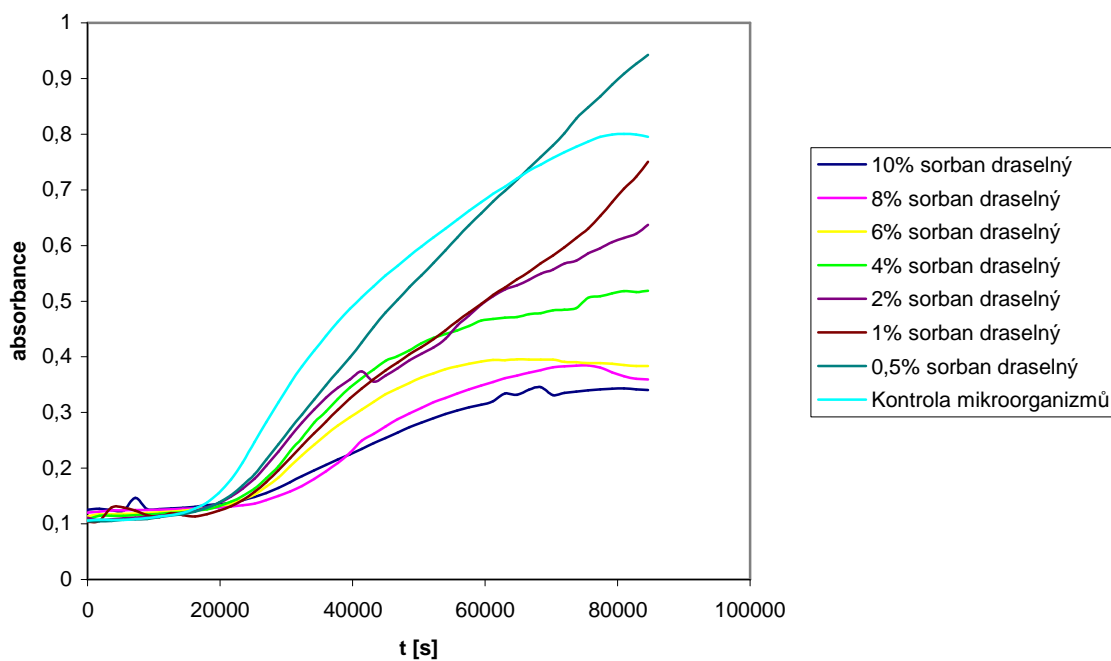


Obr. 5 Vliv sorbanu draselného na *P. fragi* v průběhu 24 hodinové kultivace

Zkumavkovou metodou byly ověřovány mezní 4%, 2% a nižší koncentrace. Na základě výsledků z obou metod byla stanovena MIC sorbanu draselného na *P. fragi* při 4% koncentraci (Obr. 11).

5.6 Sledování účinků sorbanu draselného na *Staphylococcus aureus*

Pomocí destičkové metody bylo zjištěno, že sorban draselný nepůsobí na *S. aureus* ani při nejvyšší 10% koncentraci. Narozdíl od testovaných gramnegativních bakterií, kdy byl sorban draselný účinný ještě při 2 nebo 4 % (Obr. 6).



Obr. 6 Vliv sorbanu draselného na *S. aureus* v průběhu 24 hodinové kultivace

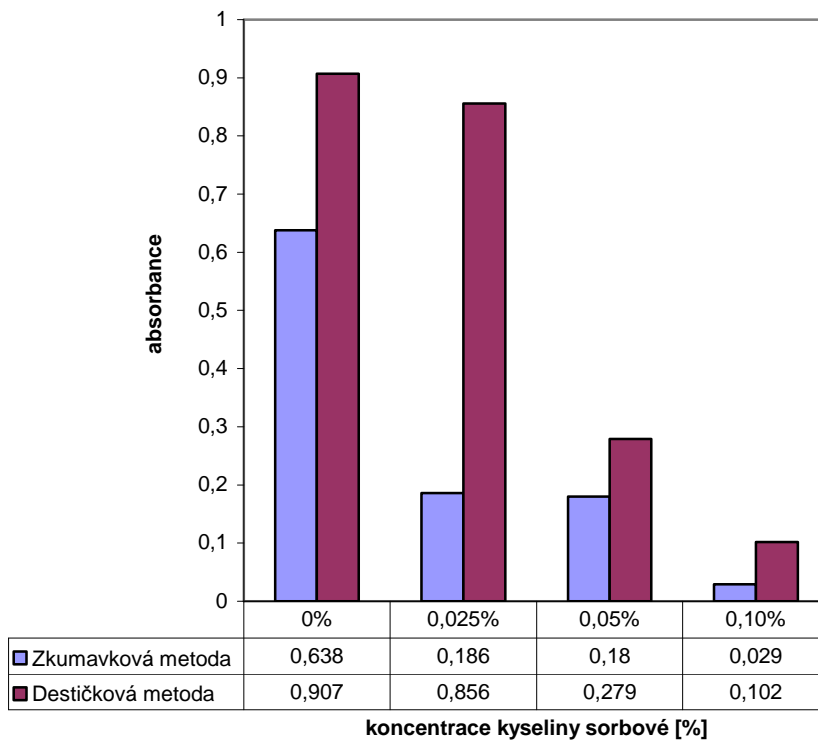
Při zkumavkové metodě byly použity 10% i vyšší koncentrace, ale z důvodu vzdušné kontaminace nemohly být výsledky vyhodnoceny (Obr. 9). Podobně jako u kyseliny sorbové ani u sorbanu draselného nebyla stanovena MIC na *S. aureus* zkumavkovou metodou.

6 DISKUZE

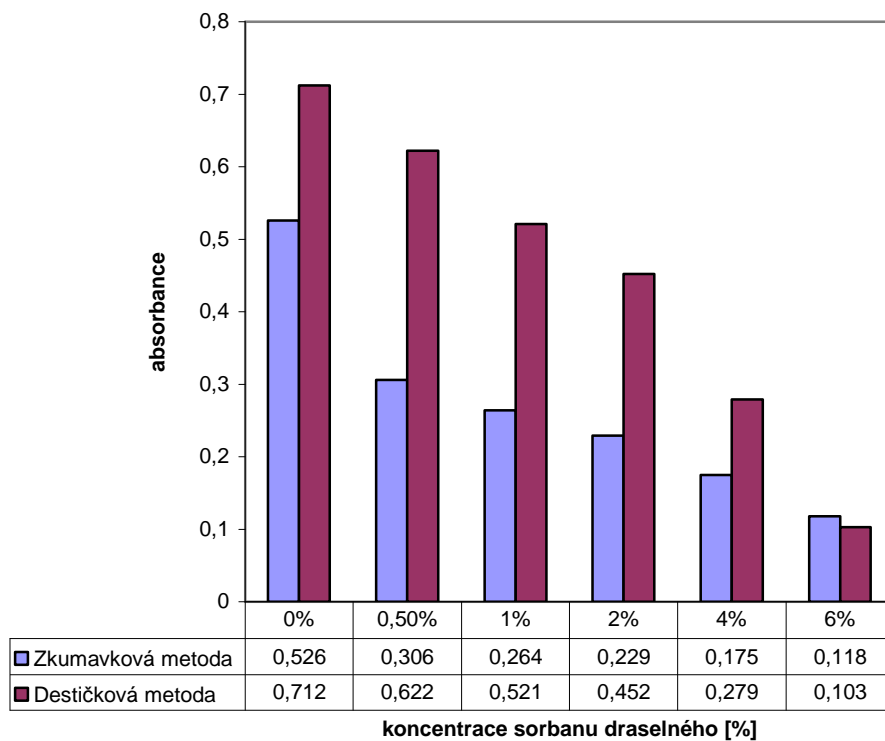
6.1 Srovnání použitých metod inhibice daných látek na *Escherichia coli*

Při stanovení inhibice kyseliny sorbové a sorbanu draselného byla použita destičková a zkumavková metoda. Výhodou destičkové metody byla menší spotřeba materiálu, lepší uspořádání sledovaných látek a v neposlední řadě také větší přesnost výsledků než při zkumavkové metodě. Nevýhodou destičkové metody může být případné riziko kontaminace při automatickém promíchávání destičky v přístroji Tecan. Výhodou zkumavkové metody je možnost vnesení stanovených výsledků do misek, čímž by byly získány přesnější výsledky, ale z důvodu větší pracnosti nebylo stanovení provedeno. Nevýhodou zkumavkové metody byla větší spotřeba materiálu. Při této metodě také nebylo možné získat hodnoty absorbance každých 30 minut jako u destičkové metody.

Při stanovení antimikrobiálních účinků kyseliny sorbové a sorbanu draselného na *E. coli* je z grafů patrné, že přesnější výsledky byly získány pomocí destičkové metody (Obr. 7, 10). Rozdíly v hodnotách absorbance u použitých metod mohly být způsobeny odlišnou teplotou kultivace. Z výsledků je také patrné, že kyselina sorbová je účinná již v 0,1 % na rozdíl od sorbanu draselného, který inhibuje růst *E. coli*. až v 6 %.



Obr. 7 Rozdíly v účinnosti použitých metod pro stanovení MIC kyseliny sorbové na *E. coli*

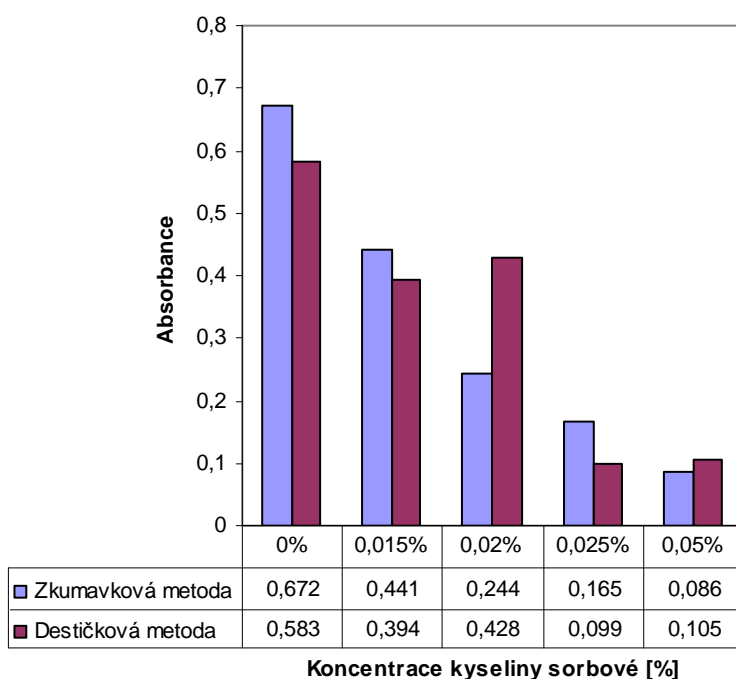


Obr. 10 Rozdíly v účinnosti použitých metod pro stanovení MIC sorbanu draselného na *E. coli*

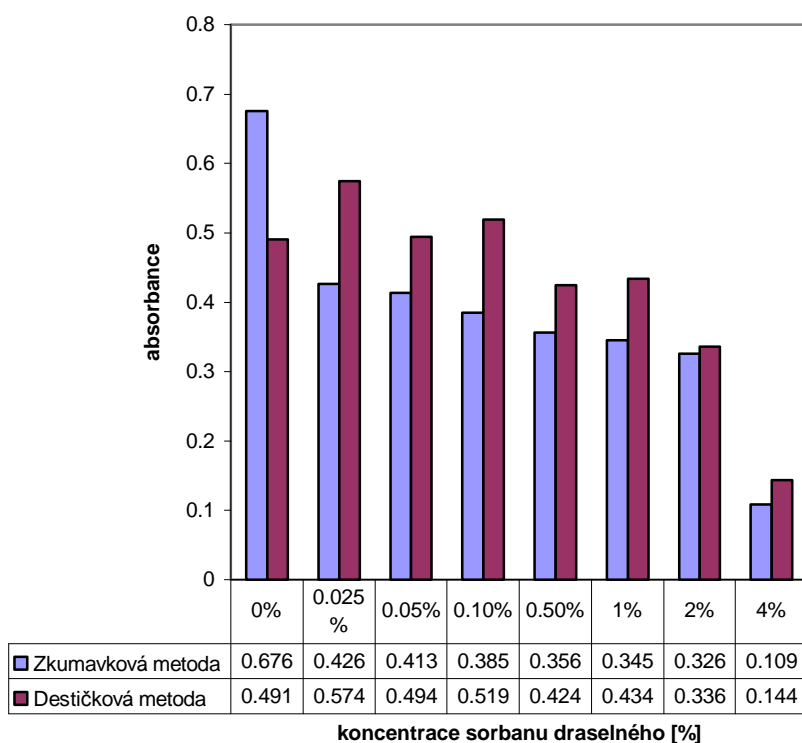
Výzkumy testující kyselinu sorbovou prokázaly její antimikrobiální účinnost na *E. coli* přítomnou v sýru skladovaném v 7 °C. Účinné množství kyseliny sorbové bylo 500 mg/kg [27]. Účinnost sorbanu draselného v kombinaci s kyselinou octovou byla zjišťována na patogenní kmen *E. coli* O157:H7 v mletém hovězím mase. Při skladování v 10 °C působila tato směs na *E. coli* O157 účinně. Ve 20 °C byla kombinace sorbanu draselného a kyseliny octové méně efektivní, než při 10 °C [30].

6.2 Srovnání použitých metod inhibice daných látek na *Pseudomonas fragi*

Stanovené MIC kyseliny sorbové i sorbanu draselného na *P. fragi* jsou nižší než MIC obou látek na *E. coli* což je patrné i z grafů (Obr. 8, 11). Z výsledků lze usoudit, že byly pomocí obou metod prokázány antimikrobiální účinky kyseliny sorbové i sorbanu draselného na gramnegativní bakterie.



Obr. 8 Rozdíly v účinnosti použitých metod pro stanovení MIC kyseliny sorbové na *P. fragi*



Obr. 11 Rozdíly v účinnosti použitých metod pro stanovení MIC sorbanu draselného na *P. fragi*

Účinky kyseliny sorbové byly sledovány na sladkém pečivu. Pečivo ošetřené 25 μm vrstvou 6% kyseliny sorbové po 40 dnech skladování v 8 ± 1 $^{\circ}\text{C}$ mělo významně snížené počty psychrotrofních mikroorganismů. Sladké pečivo ošetřené 70 μm vrstvou 3-6% kyseliny sorbové při stejných podmínkách mělo výrazně snížený počet všech aerobních mikroorganismů [28].

Při výzkumu s nasolenými olivami byla testována účinnost sorbanu draselného na pseudomonády. Po nasolení byly olivy ponořeny v sorbanu draselném (0,01 g/ml) po dobu 10 minut a skladovány ve 20 $^{\circ}\text{C}$ 180 dnů. Po uplynutí tohoto časového intervalu sorban draselný nepotlačil růst kvasinek, ale inhibičně působil na pseudomonády a *S. aureus*. [30].

Kombinace bakteriostatik byla také testována na čerstvém ovčím a kozím mase skladovaném v 5-7 $^{\circ}\text{C}$. Směs složená ze sorbanu draselného, octanu sodného, citronanu sodného a laktátu sodného v 2,5% koncentraci s 5% chloridem sodným byla sprejována v množství 3 kg/cm^2 ošetřovaného masa. Směs bakteriostatik účinně potlačila růst pseudomonád a *Bacillus* sp. po 6 dnech skladování [31]

6.3 Srovnání použitých metod inhibice daných látek na *Staphylococcus aureus*

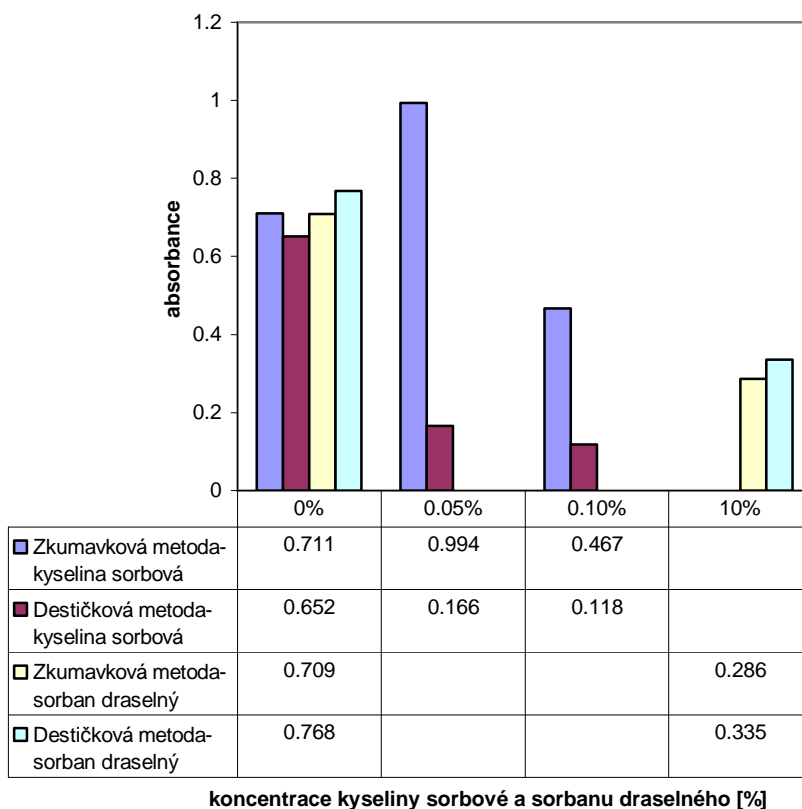
Pro stanovení MIC kyseliny sorbové na *S. aureus* byly získány přesnější výsledky z destičkové metody. MIC na *S. aureus* byla stanovena u 0,1% kyseliny sorbové (Obr. 9).

Rozdíly v účinnosti při použití různých metod uspořádání pokusu mohly být způsobeny odlišnými teplotami kultivace. Při destičkové metodě byla kultivační teplota 25 °C a při zkumavkové metodě byla použita teplota 37 °C, což je optimální teplota růstu pro bakterie *S. aureus*.

V dřívější studii byla testována kyselina sorbová (500-530 mg/kg), která v této koncentraci potlačila růst *S. aureus* v sýru skladovaném při 20 °C po dobu 2 dnů [29].

Při výzkumu účinnosti sorbanu draselného na bakterie *S. aureus* byly použity vepřové jitrnice skladované při 37±1 °C. Bylo zjištěno, že 1% sorban draselný snížil počty koliformních bakterií a potlačil růst *S. aureus* ještě po 9 dnech skladování. [32]. Také byly provedeny pokusy na kuřecích stehnech, které byly ponořeny do 2,5% a 5% roztoku sorbanu draselného. Na kuřecích stehnech, které byly ošetřeny 5% sorbanem draselným se snížil počet mezofilů o 0,5 až 1,2 log CFU/g ve srovnání s kontrolními stehny, které byly ošetřeny pouze destilovanou vodou. Díky působení sorbanu draselného byla prodloužena skladovatelnost čerstvé drůbeže nejméně o 2 dny. Bylo také prokázáno, že sorban draselný nemá žádné nepříznivé účinky na sensorickou jakost drůbežího masa [19].

Antimikrobiální účinky sledovaných látek na *S. aureus* byly v této práci minimální ve srovnání s použitými gramnegativními mikroorganismy. Na základě výsledků lze konstatovat, že MIC sorbanu draselného nebyla prokázána na grampozitivní bakterie. Sorban draselný má při nízkých koncentracích (0,3 %) antifugální efekt na *Aspergillus* sp. [24]. Nízké hodnoty koncentrace však nejsou účinné na bakterie, což bylo prokázáno i v této práci.



Obr. 9 Rozdíly v účinnosti použitých metod pro stanovení MIC kyseliny sorbové a sorbanu draselného na *S. aureus*

ZÁVĚR

Byla sledována MIC kyseliny sorbové a sorbanu draselného na vybrané druhy mikroorganismů pomocí destičkové a zkumavkové metody. Pro stanovení byly použity tyto mikroorganismy: *Escherichia coli*, *Pseudomonas fragi* a *Staphylococcus aureus*, které byly izolovány z chlazené drůbeže. Bylo zjištěno, že pro stanovení je vhodnější destičková metoda díky převažujícím výhodám, především co se týče spotřeby materiálu a většího množství výsledků, které byly pomocí této metody získány.

- Při destičkové metodě byla pro sledování růstu *E. coli* použita 0,1-0,025% kyselina sorbová a 10-0,5% sorban draselný. MIC kyseliny sorbové na *E. coli* byla pomocí této metody stanovena u 0,1 %. Pro sorban draselný byla MIC na *E. coli* stanovena při 6 %.
- Pro sledování růstu *P. fragi* pomocí destičkové metody byla použita 0,1-0,01% kyselina sorbová a 10-0,025% sorban draselný. MIC na *P. fragi* byla stanovena při 0,05% koncentraci kyseliny sorbové a 4% koncentraci sorbanu draselného.
- Pro sledování růstu *S. aureus* pomocí destičkové metody byly použity stejné koncentrace jako při sledování růstu *E. coli* u kyseliny sorbové i sorbanu draselného. MIC kyseliny sorbové na *S. aureus* byla stanovena při nejvyšší 0,1% koncentraci. U sorbanu draselného nebyla MIC na *S. aureus* stanovena, protože i při nejvyšších použitých koncentracích nezpůsobil sorban draselný celkovou inhibici růstu *S. aureus*.
- Pomocí zkumavkové metody byly ověřovány mezní inhibiční koncentrace kyseliny sorbové a sorbanu draselného. MIC kyseliny sorbové i sorbanu draselného na *E. coli* se shodovaly s výsledky z destičkové metody.
- Pro sledování růstu *P. fragi* u zkumavkové metody byly použity nižší koncentrace kyseliny sorbové v rozmezí 0,05-0,015%. Pro sorban draselný byly použity koncentrace v rozmezí 4-0,05%. MIC kyseliny sorbové a sorbanu draselného se opět shodovaly s výsledky z destičkové metody.
- Při sledování růstu *S. aureus* pomocí zkumavkové metody byla použita 0,1% a 0,05% kyselina sorbová a 10% sorban draselný. Při stanovení byly použity i vyšší koncentrace u obou sledovaných látek, ale z důvodu vzdušné kontaminace nemohly být výsled-

ky objektivně vyhodnoceny. Pomocí této metody nebyla prokázána MIC na *S. aureus* ani u jedné sledované látky.

- Na základě výsledků z obou metod byly prokázány antimikrobiální účinky kyseliny sorbové i sorbanu draselného na gramnegativní bakterie. Nejmenší MIC obou látek byla stanovena u *P. fragi*. 0,1% kyselina sorbová inhibovala růst grampozitivní bakterie *S. aureus*, ale sorban draselný nebyl účinný ani při vysokých koncentracích. Díky účinnosti kyseliny sorbové v kyselém pH byly prokázány její antimikrobiální účinky při nízkých hodnotách koncentrace ve srovnání ze sorbanem draselným, u kterého byly prokázány antimikrobiální účinky až v rozmezí 2-4 %. Sorban draselný je při nízkých koncentracích zřejmě účinný pouze na kvasinky a plísňe.

Závěrem lze konstatovat, že ačkoli byla kyselina sorbová špatně rozpustná, prokázala antibakteriální účinky proti sledovaným bakteriím už v rozmezí 0,05–0,1 %. Sorban draselný působil na gramnegativní bakterie až od 4% koncentrace a na grampozitivní *S. aureus* nepůsobil antibakteriálně vůbec. Pro použití k dekontaminaci masa se tedy jeví vhodnější aplikace kyseliny sorbové.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] *Wikipedie, otevřená encyklopedie: Organické kyseliny* [online]. [cit. 2007-12-10]. Dostupný z WWW: <http://cs.wikipedia.org/wiki/kyselina_sorbov%c3%A1>.
- [2] VELÍŠEK, J., *Chemie potravin 2*, Tábor, 1999. ISBN 80-902391-4-5.
- [3] ROP, O., VALÁŠEK, P., HOZA, I., *Teoretické principy konzervace potravin I., hlavní konzervářské suroviny*. 1. vyd. Zlín: Univerzita Tomáše Bati, 2005. 130 s. ISBN 8073183390.
- [4] HRABĚ, J., KOMÁR, A., *Technologie, zbožiznalství a hygiena potravin rostlinného původu III.část*. Vyškov: VVŠ PV, 2003. 163 s. ISBN 8072311077.
- [5] DAVÍDEK, J., JANÍČEK, G., POKORNÝ, J., *Chemie potravin*. 1. vyd. Praha, 1983. 629 s.
- [6] DRDÁK, M., *Technológia rastlinných neúdržných potravín*. Bratislava: Alfa, 1989. 301 s.
- [7] ROSYPAL, S., HOĐÁK, K., ROSYPALOVÁ, A., *Obecná mikrobiologie (Biologie bakterií II.)*. 1. vyd. Praha, 1972.
- [8] KYZLINK, V., *Teoretické základy konzervace potravin*. Praha: Alfa, 1988.
- [9] OMRI, *Potassium Sorbate* [online]. [cit. 2008-03-18]. Dostupný z WWW: <http://www.omri.org/Ksorbate_final.pdf>.
- [10] JAY, J., M., *Modern Food Mikrobiology*. 6st ed. Las Pegas: An Aspen Publication, 2000. ISBN 0-8342-1671-X.
- [11] ŽÁČEK, Z., ŽÁČEK, A., *Potravinářské tabulky*. Praha: Státní pedagogické nakladatelství, 1994. ISBN 80-04-24457-2.
- [12] BLACKBURN, C. de W., *Food spoilage microorganisms*. England: Woodhead publishing in food science. SBN 0849391563.
- [13] BOBIŠ, L., RUDOHRADSKÁ, A., *Hydina a zverina vo výžive*. 1. vyd. Bratislava: Alfa, 1990. ISBN 80-05-00370-6.

- [14] BŘEZINA, P., KOMÁR, A., HRABĚ, J., *Technologie, zbožížnalství a hygiena potravin živočišného původu II. Část*. Vyškov: VVŠ PV, 2001. 91 s. ISBN 80-7231-079-8.
- [15] GROSSMANN, M., *Mikrobiologie v hygieně*. 1. vyd. Vyškov, 1998. 90 s. ISBN 80-7231-037-2.
- [16] *International Commission on Microbiological Specifications for Foods, Microorganisms in Foods 6*. 2st ed. New York: Plenum Publishers, 2005. 766 s. ISBN 0-306-48675-X.
- [17] KLABAN, V., *Svět mikrobů - malý mikrobiologický slovník*. 1. vyd. Hradec Králové: Gaudeamus, 1999. 303 s. ISBN 8070416394.
- [18] *Technický list kyseliny sorbové* [online]. [cit. 2008-04-20]. Dostupný z WWW: <<http://www.trigacolor.cz/eos/dokumentace/Technick%C3%A9%20listy/Viarek/>>.
- [19] GONZÁLEZ- FANDOS, E., DOMINGUEZ, J., L., Effect of potassium sorbate washing on the growth of *Listeria monocytogenes* on fresh poultry. *Food Control*. 2007, roč. 18, č. 7, s. 842-846.
- [20] ŠILHÁNKOVÁ, L., *Mikrobiologické zkoumání potravin*. 1. vyd. Praha: VŠCHT, 1987. 104 s.
- [21] ARNAUT- ROLLIER, I., ZUTTER, de L., HOOFF, van J., Identities of the *Pseudomonas* spp. in flora from chilled chicken. *International Journal of Food Microbiology*. 1999, roč. 48, č. 2, s. 87-96.
- [22] SOFOS, J., N., BUSTA, F., F., ALLEN, C., E., Sodium Nitrite and Sorbic Acid Effects on *Clostridium botulinum* Spore Germination and Total Microbial Growth in Chicken Frankfurter Emulsions During Temperature Abuse. *Applied and environmental Mikrobiology*. 1979, roč. 37, č. 6, s. 1103-1109.
- [23] PLUMRIDGE, A., HESSE, S., J., A., WATSON, J., A., LOWE, K., C., STRATFORD, M., ARCHER, D., B., The Weak Acid Preservative Sorbic Acid Inhibits Conidial Germination and Mycelial Growth of *Aspergillus niger* through Intracellular Acidification. *Applied and Environmental Mikrobiology*. 2004, roč. 70, č. 6, s. 3506-3511.

- [24] GUZNOT, M., E., RAMOS, A., J., SANCHES, V., MARÍN, S., Study of benzoate, propionate and sorbate salts as mould spoilage inhibitors on intermediate moisture bakery products of low pH (4,5-5,5). *International Journal of Food Microbiology*. 2005, s. 161-168.
- [25] ŠILHÁNKOVÁ, L., *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology*. 2. vyd. Praha: Victoria Publishing, 1995. ISBN 80-85605-71-6.
- [26] LOCHMANN, O., *Základy antimikrobní terapie*. 2. vyd. Praha: Triton, 1999. ISBN 80-72254-005-X.
- [27] BROCKLEHURST, T., F., LUND, M., B., Microbiological changes in cottage cheese varieties during storage at +7°C. *Food Mikrobiology*. 1985, roč. 2, č. 3, s. 207-233.
- [28] SILVEIRA, M., F., A., SOARES, N., F., F., GERALDINE, R., M., ANDRADE, N., J., BOTREL, D., A., GONCALVES, M., P., J, Active film incorporated with sorbic acid on pastry dough conservation. *Food Control*. 2007, roč.18, č. 9, s. 1063-1067.
- [29] SIMS, G., R., GLENISTER, D., A., BROCKLEHURST, T., F., LUND, M., B., Survival and growth of food poisoning bacteria following inoculation into cottage cheese varieties. *International Journal of Food Mikrobiology*. 1989, roč. 9, č. 3, s. 173-195.
- [30] PANAGOUE, E., Greek dry-salted olives: Monitoring the dry-salting process and subsequent physico-chemical and microbiological profile during storage under different packing conditions at 4 and 20 C. *LWT - Food Science and Technology*. 2006, roč. 39, č. 4, s. 323-330.
- [31] AHMED, S., N., CHATTOPADHYAY, U., K., SHERIKAR, A., T., WASKAR, V., S., PATURKAR, A., M., LATHA, C., MUNDE, K., D., PATHARE, N., S., Chemical sprays as a method for improvement in microbiological quality and shelf-life of fresh sheep and goat meats during refrigeration storage (5–7°C). *Meat Science*. 2003, roč. 63, č. 3, s. 339-344.

- [32] THOMAS, R., ANJANEYULU, A., S., R., KONDAIAH, N., Effect of hot-boned pork on the quality of hurdle treated pork sausages during ambient temperature (37 ± 1 °C) storage. *Food Chemistry*. 2008, roč. 107, č. 2, s. 804-812.
- [33] PIPEK, P., FÍLA, P., JELÍNKOVÁ, J., BRYCHTA, J., MIYAHARA, M., Technological Aspects of Acid Decontamination of Carcasses. *Chemické listy*. 2004, roč. 98, s. 865-869.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

| | |
|-------|---|
| a_w | Aktivita vody |
| CFU | Colony forming units (kolonie tvořící jednotka-KTJ) |
| MPA | Masopeptonový agar |
| MPB | Masopeptonový bujón |
| MIC | Minimální inhibiční koncentrace |
| KAT | Důkaz produkce katalázy |
| ONP | Důkaz produkce β – galaktosidázy |
| Ind | Důkaz produkce indolu |
| Lys | Dekarboxylace lysinu |
| Orn | Dekarboxylace ornitinu |
| Kas | Důkaz produkce kaseinu |
| Ure | Důkaz produkce ureázy |
| Arg | Dekarboxylace argininu |
| Tyr | Dekarboxylace tyrosinu |
| YEP | Důkaz produkce žlutého pigmentu |
| CLF | Přítomnost srážecího faktoru (clumping factor) |

SEZNAM OBRÁZKŮ

| | |
|--|----|
| Obr. 1. Vliv kyseliny sorbové na <i>E. coli</i> v průběhu 24 hodinové kultivace | 32 |
| Obr. 2 Vliv kyseliny sorbové na <i>P. fragi</i> v průběhu 24 hodinové kultivace..... | 33 |
| Obr. 3 Vliv kyseliny sorbové na <i>S. aureus</i> v průběhu 24 hodinové kultivace | 34 |
| Obr. 4 Vliv sorbanu draselného na <i>E. coli</i> v průběhu 24 hodinové kultivace | 35 |
| Obr. 5 Vliv sorbanu draselného na <i>P. fragi</i> v průběhu 24 hodinové kultivace..... | 36 |
| Obr. 6 Vliv sorbanu draselného na <i>S. aureus</i> v průběhu 24 hodinové kultivace | 37 |
| Obr. 7 Rozdíly v účinnosti použitých metod pro stanovení MIC kyseliny sorbové na <i>E. coli</i> | 39 |
| Obr. 8 Rozdíly v účinnosti použitých metod pro stanovení MIC sorbanu draselného na <i>E. coli</i> | 39 |
| Obr. 9 Rozdíly v účinnosti použitých metod pro stanovení MIC kyseliny sorbové na <i>P. fragi</i> | 43 |
| Obr. 10 Rozdíly v účinnosti použitých metod pro stanovení MIC sorbanu draselného na <i>P. fragi</i> | 39 |
| Obr. 11 Rozdíly v účinnosti použitých metod pro stanovení MIC kyseliny sorbové a sorbanu draselného na <i>S. aureus</i> | 41 |

SEZNAM TABULEK

| | |
|---|----|
| Tab. 1 Působení konzervačních látek na mikroorganismy (podle Lücka) [2] | 13 |
| Tab. 2 Technický list kyseliny sorbové podle výrobce VIA-REK, spol. s.r.o [18] | 14 |
| Tab. 3 Přehled chemických konzervačních látek v potravinách a jejich povolené mezní hodnoty v 1 kg [11]..... | 18 |
| Tab. 4 Poměr zastoupení různých složek v kuřecím mase [11]..... | 19 |
| Tab. 5 Složení použitých kultivačních půd..... | 28 |
| Tab. 6 Výsledky vybraných biochemických testů použitého kmene <i>E. coli</i> | 29 |
| Tab. 7 Výsledky vybraných biochemických testů použitého kmene <i>P. fragi</i> | 29 |
| Tab. 8 Výsledky vybraných biochemických testů použitého kmene <i>S. aureus</i> | 29 |
| Tab. 9 Pipetovaná množství pro pokus s <i>E. coli</i> při destičkové metodě..... | 30 |
| Tab. 10 Pipetovaná množství pro pokus s <i>E. coli</i> při zkumavkové metodě | 30 |

SEZNAM PŘÍLOH

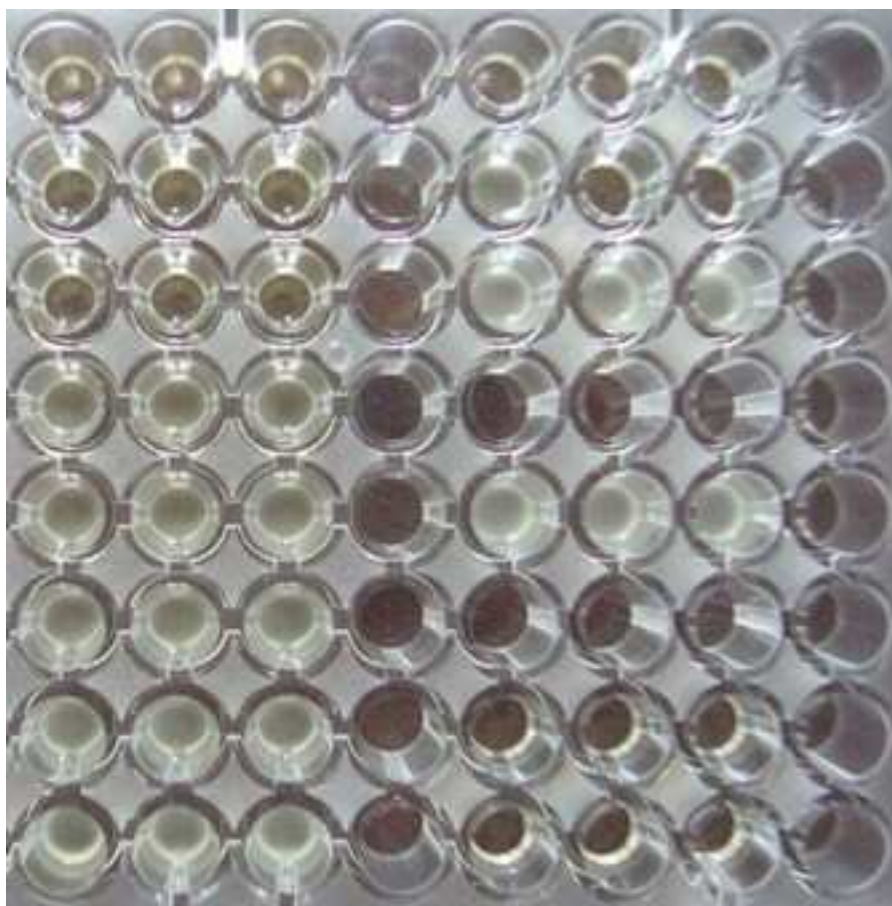
| | | |
|--------------|---|----|
| P I | Stanovení inhibiční koncentrace sorbanu draselného na <i>E. coli</i> pomocí zkumavkové metody | 54 |
| P II | Stanovení inhibiční koncentrace kyseliny sorbové a sorbanu draselného na <i>E. coli</i> pomocí destičkové metody | 55 |
| P III | Stanovení inhibiční koncentrace kyseliny sorbové a sorbanu draselného na <i>P. fragi</i> pomocí destičkové metody..... | 56 |
| P IV | Stanovení inhibiční koncentrace kyseliny sorbové a sorbanu draselného na <i>S. aureus</i> pomocí destičkové metody..... | 57 |



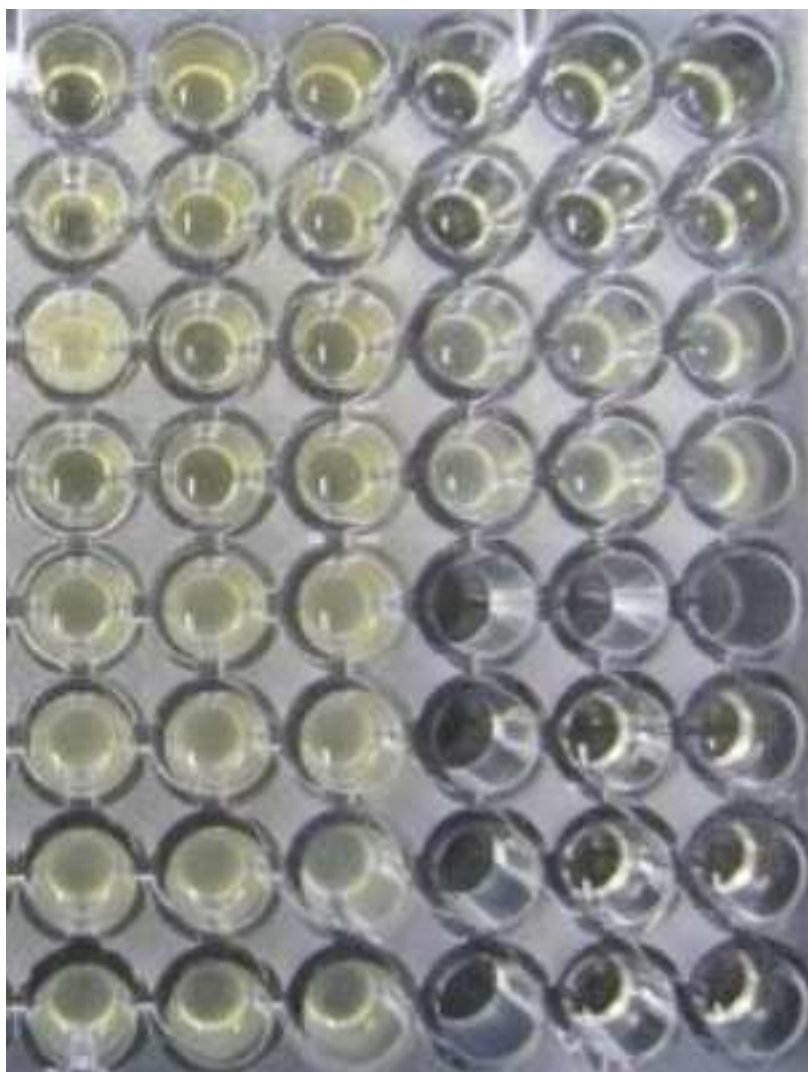
PI Stanovení inhibiční koncentrace sorbanu draselného na *E. coli* pomocí zkumavkové metody



P II Stanovení inhibiční koncentrace kyseliny sorbové a sorbanu draselného na *E. coli* pomocí destičkové metody



P III Stanovení inhibiční koncentrace kyseliny sorbové a sorbanu draselného na *P. fragi* pomocí destičkové metody



P IV Stanovení inhibiční koncentrace kyseliny sorbové a sorbanu draselného na *S. aureus* pomocí destičkové metody