

Mendelova univerzita v Brně

Agronomická fakulta

Ústav agrochemie, půdoznalství, mikrobiologie a výživy rostlin



Mikroflóra masných výrobků

Diplomová práce

Vedoucí práce:

Ing. Libor Kalhotka, Ph.D

Vypracovala:

Bc. Eva Burdová

Brno 2015

Zadání diplomové práce

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem práci *Mikroflóra masných výrobků* vypracovala samostatně a veškeré použité prameny a informace uvádím v seznamu použité literatury. Souhlasím, aby moje práce byla zveřejněna v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách ve znění pozdějších předpisů a v souladu s platnou *Směrnici o zveřejňování vysokoškolských závěrečných prací*.

Jsem si vědoma, že se na moji práci vztahuje zákon č. 121/2000 Sb., autorský zákon, a že Mendelova univerzita v Brně má právo na uzavření licenční smlouvy a užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona.

Dále se zavazuji, že před sepsáním licenční smlouvy o využití díla jinou osobou (subjektem) si vyžádám písemné stanovisko univerzity, že předmětná licenční smlouva není v rozporu s oprávněnými zájmy univerzity, a zavazuji se uhradit případný příspěvek na úhradu nákladů spojených se vznikem díla, a to až do jejich skutečné výše.

V Brně dne:.....

.....

podpis

PODĚKOVÁNÍ

Touto cestou bych ráda poděkovala Ing. Liboru Kalhotkovi, Ph.D. za odborné vedení a cenné rady při mikrobiologických analýzách i při tvorbě diplomové práce. Moje poděkování patří také celému Ústavu agrochemie, půdoznalství, mikrobiologie a výživy rostlin. Dále bych chtěla poděkovat Bc. Haně Jahodové, Ing. Miroslavu Jůzlovi, Ph.D. a celému Ústavu technologie potravin za spolupráci a za vzorky. V neposlední řadě bych také ráda poděkovala svým rodičům za podporu během studia.

ABSTRAKT

Tato diplomová práce popisuje důležité body ve výrobě jednotlivých skupin masných výrobků, které významně ovlivňují složení výsledné mikroflóry, zejména počáteční mikroflóru masa, tepelné opracování nebo fermentaci. Definuje saprofytickou mikroflóru a mikroorganismy způsobující alimentární onemocnění. Zabývá se mikroorganismy používanými v masné výrobě a jejich vývojem do budoucnosti. Navrhuje způsoby boje proti nežádoucím mikroorganismům v masných výrobcích. Součástí této práce je experimentální stanovení významných skupin mikroorganismů v tepelně opracovaných masných výrobcích, konkrétně v paštikách, v průběhu doby použitelnosti a po jejím vypršení. Z výsledků vyplývá, že ve společnosti, která produkuje výrobky analyzované v této diplomové práci, není problém při dodržování hygienických pravidel při výrobě, přepravě a skladování paštik.

KLÍČOVÁ SLOVA: paštiky, tepelně opracované masné výrobky, mikroorganismy

ABSTRACT

This diploma thesis describes important points in production of individual groups of meat products, which has significant effect on composition of microflora, especially the initial microflora of meat, heat treatment or fermentation. It defines saprophytic microflora and foodborne pathogens. It deals with microorganisms used in meat production and their improvements for the future. It suggests ways of combating undesirable microorganisms in meat products. Part of this work is experimental determination of the major groups of microorganisms in heat-treated meat products, specifically pates, during shelf life and after its expiration. The results shows that the company, that produces products examined in this thesis, has no problem with compliance to hygiene guidelines during manufacture, transportation and storage of pates.

KEYWORDS: pates, heat-treated meat products, microorganisms

Obsah

1 ÚVOD	8
2 CÍL PRÁCE	9
3 LITERÁRNÍ PŘEHLED	10
3.1 Mikroflóra masa	10
3.1.1 Primární (intravitální) a sekundární kontaminace masa	10
3.1.2 Mikroflóra čerstvého a chlazeného masa	12
3.1.3 Kažení masa: chemická stránka a symptomy	13
3.2 Saprophytická mikroflóra masa a masných výrobků.....	13
3.3. Mikroorganismy způsobující alimentární onemocnění se vztahem k masu a masným výrobkům	16
3.4 Mikroflóra surovin používaných v masné výrobě	21
3.5 Rozdělení masných výrobků	25
3.6 Masný polotovar.....	25
3.6.1 Mikroflóra masných polotovarů	26
3.7 Kuchyňský masný polotovar	29
3.8 Tepelně opracované masné výrobky	30
3.8.1 Zpracování a jeho efekt na mikroflóru	30
3.8.2 Kažení tepelně opracovaných masných výrobků	31
3.8.3 Mikroorganismy způsobující alimentární onemocnění u tepelně opracovaných masných výrobků	33
3.9 Polokonzervy.....	34
3.10 Trvanlivé tepelně opracované masné výrobky.....	35
3.11 Trvanlivé fermentované masné výrobky.....	35
3.11.1 Fermentované salámy	36
3.11.2 Trvanlivé tepelně neopracované masné výrobky: Sušené šunky	39
3.11.3 Trvanlivé tepelně neopracované masné výrobky: Sušené maso	41
3.12 Konzervy	41
3.13 Mikroorganismy používané ve výrobě.....	43
3.13.1 Vlastnosti startovacích kultur	43
3.13.2 Aplikace a složení startovacích kultur	45
3.13.3 Používané startovacích kultury.....	46
3.13.4 Funkční startovací kultury	48
3.14 Boj proti mikroorganismům	50
4 MATERIÁL A METODY ZPRACOVÁNÍ	53
4.1 Charakteristika výrobků	53
4.1.1 Jemná paštika.....	53
4.1.2 Hrubá paštika.....	55
4.2 Příprava laboratorních pomůcek	56

4.3 Postup mikrobiologické analýzy	57
4.4 Stanovované skupiny mikroorganismů	58
4.5 Složení a příprava živných půd	58
4.6 Způsob vyjádření výsledků	59
5 VÝSLEDKY A DISKUZE	61
5.1 Celkový počet mikroorganismů	65
5.2 Enterokoky	70
5.3 Koliformní bakterie	74
5.4 Sporující anaerobní bakterie	79
5.5 Kvasinky a plísňe	82
5.6 Zjišťování rozdílu počtu jednotlivých skupin mikroorganismů u paštik ve skle a v plastovém obalu.....	84
5.7 Zjišťování rozdílu počtu jednotlivých skupin mikroorganismů u hrubých a jemných paštik.....	85
6 ZÁVĚR	86
7 PŘEHLED POUŽITÉ LITERATURY	87
8 SEZNAM POUŽITÝCH TABULEK A OBRÁZKŮ	96
9 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	98

1 ÚVOD

Masné výrobky jsou zpracované výrobky získané zpracováním masa nebo dalším zpracováním takto zpracovaných výrobků, takže je z řezné plochy zřejmé, že produkt pozbyl znaků charakteristických pro čerstvé maso (NAŘÍZENÍ EP A RADY (ES) č. 853/2004).

Při snaze o prodloužení trvanlivosti masa bylo v minulosti vyvinuto značné množství různorodých masných výrobků (PIPEK, 1998). Ty se liší především kombinací základních surovin, velkým počtem pomocných látek a přísad, různým stupněm mělnění, volbou rozličných obalů, různými způsoby tepelného opracování (příp. jiného zpracování) a dalšími faktory (INGR, 2011).

Kvůli těmto rozdílům se liší i složení mikroflóry různých masných výrobků, které je mj. ovlivněno zejména chovatelským a zpracovatelským prostředím, druhem masa a surovin, zařízením, způsobem manipulace, zpracováním a balením a v neposlední řadě také teplotou skladování (FERNANDES, 2009; SPERBER, DOYLE, 2009; DIKEMAN, DEVINE, 2014).

Maso a masné výrobky jsou vhodným médiem pro růst mikrobiálních patogenů, které mohou představovat riziko pro lidské zdraví, a pro růst saprofytických mikroorganismů, které způsobují nežádoucí změny výrobků. Kontrola masa a masných výrobků má tedy zásadní význam (KERRY, KERRY, 2011).

Evropská unie vyžaduje, aby potravinářské výrobky neobsahovaly mikrobiální zátěž v takových úrovních, které by mohly představovat riziko pro lidské zdraví. Požadavky jsou stanoveny v NAŘÍZENÍ EP A RADY (ES) č. 2073/2005. Evropskou legislativou je také dána povinnost provozovatelů potravinářských podniků zavést a uplatňovat programy bezpečnosti potravin, založené na zásadách systému HACCP. Zavedení těchto strategií má za následek zlepšení bezpečnosti masných výrobků (NAŘÍZENÍ EP A RADY (ES) č. 852/2004).

Proti nežádoucím mikroorganismům se při výrobě fermentovaných masných výrobků používají mikroorganismy žádoucí – startovací kultury, které působí mikrobicidně a dodávají výrobkům typickou chuť. V současnosti je dále možné vyrobit probiotické masné výrobky s pozitivními účinky na zdraví za použití speciálních probiotických kmenů mikroorganismů (RAVISHANKAR, JAMUNA, 2015).

2 CÍL PRÁCE

Cílem této diplomové práce je:

- zpracovat literární rešerši na téma mikroflóra masných výrobků,
- charakterizovat mikroorganismy používané ve výrobě či podílející se na kažení masných výrobků,
- charakterizovat mikroorganismy způsobující alimentární onemocnění,
- popsat způsoby boje proti nežádoucím mikroorganismům,
- experimentálně stanovit významné skupiny mikroorganismů ve vybraných vzorcích,
- získaná data vyhodnotit, porovnat s údaji v literatuře a výsledky uvést v závěru práce.

3 LITERÁRNÍ PŘEHLED

3.1 Mikroflóra masa

Mnoha autory bylo potvrzeno, že syrové maso je vzhledem k jeho biologickému a chemickému složení náchylné k rychlému kažení způsobenému mikroorganismy (GÖRNER, VALÍK, 2004; TOLDRÁ, 2010; DOYLE, BUCHANAN, 2013; JAYASENA, JO, 2013). To je dále urychleno některými vnitřními faktory, zejména vhodným rozmezím pH a velmi příznivými hodnotami vodní aktivity masa (nad 0,85), které bakteriím vyhovují (JAYASENA, JO, 2013; KAMENÍK et al., 2014a).

Svalová tkáň savců se skládá z hlavně vody (75 %), proteinů (19 %) a tuků (2,5 %). Maso také obsahuje sacharidy (0,9 % glykogenu, 0,1 % glukózy a 0,2 % glykolytických meziproduktů). Dále jsou v maso přítomné neproteinové rozpustné organické nebo anorganické látky (2,3 %) a další minoritní složky, jako jsou vitamíny, pigmenty a chuťové látky (LAWRIE, LEDWARD, 2006). Obsah jednotlivých složek se liší dle druhu zvířat, plemene, věku a způsobu krmení (GÖRNER, VALÍK, 2004).

Biologicky jsou tyto složky využívány jako živiny pro mikroflóru masa. Svaly zdravých zvířat jsou v podstatě bez mikroorganismů, ale může dojít ke kontaminaci masa (CEMPÍRKOVÁ et al., 1997; STEINHAUSER et al., 2000; BLACKBURN, 2006). Úroveň, rozsah a typ kontaminace určují podmínky, za kterých jsou zvířata chována a porážena a jejich maso zpracováváno (TOLDRÁ, 2009; KAMENÍK et al., 2014a).

3.1.1 Primární (intravitální) a sekundární kontaminace masa

Maso zdravých jatečných zvířat v dobré tělesné kondici je ve většině případů prosté mikroorganismů, nebo jich obsahuje pouze malý počet. U nutně poražených zvířat je však mikrobiální obraz změněný. Z masa takovýchto zvířat byly nejčastěji izolované *Escherichia coli*, *Proteus* spp., *Staphylococcus aureus* a hemolytické streptokoky (CEMPÍRKOVÁ et al., 1997). Dále takto může být maso kontaminováno *Salmonella* spp. (zejména *S. typhimurium* a *S. cholerae*), *Listeria monocytogenes* nebo *Mycobacterium paratuberculosis* (LAWRIE, LEDWARD, 2006). Z intravitálních vlivů má na zhoršení mikrobiálního obrazu masa vliv zejména přeprava zvířat na jatka, ustájení na jatkách a zacházení se zvířaty před poražením (CEMPÍRKOVÁ et al., 1997).

K postmortální (sekundární) kontaminaci masa může dojít od okamžiku poražení jatečného zvířete ve všech fázích jatečného opracování a v průběhu všech dalších operací až do okamžiku spotřeby (STEINHAUSER et al., 1995).

Po omráčení zvířete následuje vykrvení, při kterém krev rychle proudí z cév a bakterie ze střev tak mohou být nasávány do krevního oběhu. Bakterie se ze střev (tlusté střevo obsahuje až $33 \cdot 10^{12}$ bakterií/g) dostávají do tkání a orgánů přes střevní sliznici díky aglutinaci bakterií pomocí cirkulujících protilátek a prostřednictvím fagocytózy (LAWRIE, LEDWARD, 2006). Takto může být maso kontaminováno bakteriemi *Salmonella* spp., *Clostridium perfringens*, *Clostridium botulinum* aj. (CEMPÍRKOVÁ et al., 1997).

Po vykrvení následuje opracování povrchu těla a bourání. Je-li aplikována správná výrobní a hygienická praxe, celkový počet bakterií se u hovězího, skopového a vepřového masa pohybuje v rozmezí 10^2 až $10^6/\text{cm}^2$ a počet *Enterobacteriaceae* mezi 10 až $10^3/\text{cm}^2$ (DIKEMAN, DEVINE, 2014). Mezi hlavní zdroje a způsoby kontaminace masa při těchto operacích podle JAY et al. (2005) patří: povrch kůže, zažívací trakt, nečisté ruce pracovníků a zařízení závodu. Podrobněji jsou tyto zdroje kontaminace popsány v následujících odstavcích.

Na jednom centimetru čtverečním kůže prasat může být 10^6 až 10^7 aerobních mezofilů, 10^3 až 10^4 *Enterobacteriaceae*, 10^2 až 10^3 spor *Bacillus* spp., 10^2 *Clostridium* spp. a 10^4 psychrotrofních mikroorganismů (KLINTH JENSEN et al., 2004). Studie provedená v Srbsku potvrdila přítomnost *Escherichia coli* O157 u 28 % vzorků kůže jatečně opracovaných hovězích těl (NASTASIJEVIC et al., 2007). Nože používané v procesu stahování kůží mají na ostří od 10^2 do 10^7 mikroorganismů/ cm^2 (KLINTH JENSEN et al., 2004). Mikroorganismy z kůže mohou do těla vstoupit přes vykrvovací vpich, při odštětínování, nebo přes řeznou ránu (JAY et al., 2005).

Mikroorganismy ze střevního obsahu mohou kontaminovat jatečně opracované tělo. Zejména důležitý je v tomto ohledu bachor u přežvýkavců, který obvykle obsahuje 10^{10} bakterií/g (JAY et al., 2005).

Jatečně opracované tělo může být dále znečištěno nedodržením principů hygieny pracovníků (JAY et al., 2005). Neumyté ruce po návštěvě toalety mohou mít za následek až 10^7 KTJ/ml patogenů za nehty pracovníků (DIKEMAN, DEVINE, 2014). Dokonce i při používání rukavic se mohou organismy přenést z jednoho jatečně upraveného těla na další. Nejlepším řešením z mikrobiologického hlediska je použít jednorázové rukavice oproti opětovně používaným rukavicím či holým rukám (BRIZIO, PRENTICE, 2014).

Mikroorganismy na nesterilním zařízení závodu mohou kontaminovat kusy masa, které jsou s ním v kontaktu (JAY et al, 2005). Do mikroflóry masa se tedy promítá i prostředí, ve kterém byla zvířata porážena a maso zpracováváno (JAY et al., 2005; KAMENÍK et al., 2014a). V tomto prostředí dobře přežívají zejména listerie (LARIVIÈRE-GAUTHIER et al., 2014; MARTÍN et al., 2014). Ve studii LARIVIÈRE-GAUTHIER et al. (2014) byla přítomnost *L. monocytogenes* pomocí multiplexní PCR zjištěna ve všech fázích výroby od jatek až po bourárnu. V bourárně byl zaznamenán výrazný pokles v rozmanitosti kmenů oproti jatkám.

Kompletně zamezit mikrobiální kontaminaci masa je prakticky nemožné. Proto je důležitá její kontrola. Není však radno spoléhat se na testování přítomnosti mikroorganismů pouze u konečného výrobku, ale musí se kontrolovat celý proces jako takový. Důležité je zejména důsledné proškolení zaměstnanců, hygiena prostředí a implementace systému HACCP (FORSYTHE, 2000; BLACKBURN, 2006).

3.1.2 Mikroflóra čerstvého a chlazeného masa

Mikrobiální počty čerstvého masa se pohybují v rozmezí 10^2 až 10^5 KTJ/cm², přičemž převažují mezofilní mikroorganismy. Pouze asi 10 % mikroorganismů je po vychlazení masa schopno pokračovat v růstu (SPERBER, DOYLE, 2009). Mikrobiální frakce, která je následně schopná vyvolat kažení masa je pak ještě menší (KAMENÍK et al., 2014a).

Mezi bakteriální rody, které se nejčastěji vyskytují na čerstvém mase, patří *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Enterococcus*, *Moraxella*, *Pseudomonas* (DOYLE, BUCHANAN, 2013), *Brochothrix*, *Flavobacterium*, *Psychrobacter*, *Staphylococcus*, *Micrococcus* a čeleď *Enterobacteriaceae* (KAMENÍK et al., 2014a). Z kvasinek a plísní se jedná o rody *Candida*, *Torulopsis*, *Cladosporium*, *Geotrichum*, *Monascus*, *Neurospora*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Sporotrichum* a *Thamnidium* (DOYLE, BUCHANAN, 2013).

Při zchlazování masa dochází ke změně zastoupení mikroorganismů ve prospěch psychrotrofních, aerobních, gramnegativních pohyblivých a nepohyblivých tyčinek, zejména *Pseudomonas* spp., *Acinetobacter* spp. a *Psychrobacter immobilis* (FORSYTHE, HAYES, 1998; ICMSF, 2005; BLACKBURN, 2006). Dle KLINTH JENSEN et al. (2004) lze dodat, že mezi aerobní psychrotrofní saprofytickou mikroflórou masa patří také rody *Moraxella*, *Flavobacterium*, *Aeromonas* a někteří zástupci čeledi *Enterobacteriaceae*.

3.1.3 Kažení masa: chemická stránka a symptomy

Během kažení probíhají v masě důležité fyzikálně chemické změny. Koncentrace nízkomolekulárních sloučenin (glukóza, kyselina mléčná, některé aminokyseliny, nukleotidy, močovina a ve vodě rozpustné proteiny) je dostatečná k podpoře masivního růstu mikroorganismů, který je nejčastější příčinou kažení (ROBINSON et al., 2000). Počáteční bakteriální metabolismus je založen právě na využití těchto nízkomolekulárních rozpustných sloučenin (PEARSON, DUTSON, 1994).

Prvním zdrojem energie pro mikroorganismy rostoucí na masě je glukóza, která je využívána téměř všemi skupinami bakterií (DOYLE, BUCHANAN, 2013). Obsah glukosy v masě určuje nástup negativních sensorických změn. V masě s vysokým pH a nedostatkem glukózy dochází ke kažení, už když bakterie dosáhnou počtu 10^6 KTJ/cm², ale u masa s normálním pH a s normálním obsahem glukózy dochází ke kažení až při více než 10^7 KTJ/cm² (KLINTH JENSEN et al., 2004; ICMSF, 2005).

Pokud je glukóza nebo její oxidační produkty vyčerpána, je katabolizována kyselina mléčná (ROBINSON et al., 2000). Laktát je metabolizován za aerobních i anaerobních podmínek. Třetím hlavním zdrojem energie pro bakterie jsou aminokyseliny (DOYLE, BUCHANAN, 2013). Jejich degradací vznikají zápachající sloučeniny obsahující sulfidy, amoniak a aminy (KAMENÍK et al., 2014a). Triacylglyceroly jsou štěpeny lipázami na glycerol a volné mastné kyseliny, což také vyúsťuje v nepříjemné pachy a chutě (PEARSON, DUTSON, 1994).

Obecně platí, že typické nežádoucí změny, které jsou výsledkem kažení masa, lze pozorovat při počtu bakterií kolem 10^7 na cm² nebo gram masa či masného výrobku, ale mírné negativní změny lze pozorovat už mnohem dříve, mezi 10^5 a 10^6 (FEINER, 2006). Dle INGR (2003) je maso znehodnoceno, dosáhne-li tzv. indexu hniloby, kdy se objeví typický zápach a oslizenutí, barva se změní v šedohnědou a počet mikrobů se zvýší až na 10^8 /g. Kažení masa postupuje od povrchového oslizenutí, přes povrchovou hnilobu až k hnilobě hluboké (SIMEONOVÁ et al., 2003).

3.2 Saprophytická mikroflóra masa a masných výrobků

Mezi bakteriální rody nejčastěji způsobující kažení masa a masných výrobků patří *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Moraxella*, *Psychrobacter*, *Aeromonas*, *Shewanella*, *Brochothrix*, *Clostridium*, *Carnobacterium*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* a *Weissella*. Na kažení se mohou také podílet někteří zástupci z čeledí *Enterobacteriaceae* a *Micrococcaceae* (BLACKBURN, 2006).

Největší vliv na složení saprofytické mikroflóry má teplota skladování a balicí atmosféra (BLACKBURN, 2006; KAMENÍK et al., 2014a), jak popisuje tabulka 1.

Tabulka 1 - Specifická saprofytická mikroflóra čerstvého masa skladovaného při teplotě 0 °C až 4 °C za různých balicích podmínek (BLACKBURN, 2006, upraveno)

Balicí atmosféra	Specifická kazící mikroflóra
vzduch	<i>Pseudomonas</i> spp.
< 50% CO ₂	<i>Enterobacteriaceae</i> , BMK
> 50% CO ₂ smíchaného s O ₂	<i>Brochothrix thermosphacta</i> , BMK
> 50% CO ₂	BMK
100% CO ₂	BMK
vakuové balení	BMK, <i>Brochothrix thermosphacta</i>

Legenda: BMK...bakterie mléčného kvašení

Aerobní saprofytická mikroflóra

Rod *Pseudomonas* obvykle tvoří 50 % saprofytické mikroflóry. Skládá se z pěti fylogenetických skupin na základě studia podobnosti rRNA. Nejdůležitější druhy způsobující kažení masa patří k první skupině, která zahrnuje jak fluorescenční druhy (*P. fluorescens*: biovary A až D, *P. putida*: biovar A a *P. lundensis*) tak nefluorescenční druhy (*P. fragi*: biovary 1 a 2). Psychrotrofní charakter pseudomonád a vysoká afinita pro kyslík jsou hlavním důvodem pro převládající růst na mase baleném ve vzdušné nebo vysoce kyslíkem modifikované atmosféře, skladovaném za nízkých teplotních podmínek (FORSYTHE, HAYES, 1998; ICMSF, 2005; BLACKBURN, 2006). Dominantní druh mezi pseudomonádami představuje *P. fragi*, a to dokonce bez ohledu na použitou balicí atmosféru masa. Všechny ostatní druhy vyžadují aerobní podmínky (KAMENÍK et al., 2014a). Mezi další druhy *Pseudomonas* spojené s kažením masa patří *P. stutzeri* a *P.* (nově *Burkholderia*) *cepacia* (BLACKBURN, 2006). Kvůli striktně aerobnímu charakteru pseudomonád je jejich růst omezen na povrch, do hloubky max. 3 až 4 mm (FORSYTHE, HAYES, 1998). Pseudomonády způsobují zápach a tvorbu slizu, pokud jejich počet přesáhne 10⁷/cm² (PEARSON, DUTSON, 1994). Pseudomonády primárně využívají glukózu, dokud je její obsah dostačující. Když je glukóza vyčerpána, zahájí proteolýzu a využívají dusíkaté sloučeniny a volné aminokyseliny jako substrát za vzniku zapáchajících sulfidů a esterů (ROBINSON et al., 2000).

V mase s vyšším pH (nad 5,8) nebo při vyšších skladovacích teplotách, se mohou pomnožit saprofytické bakterie *Acinetobacter* a *Moraxella*, které nemetabolizují hexózy, ale přímo štěpí aminokyseliny (PEARSON, DUTSON, 1994).

Fakultativně anaerobní saprofytická mikroflóra

Shewanella putrefaciens může být také součástí saprofytické mikroflóry podobným způsobem jako pseudomonády. Na rozdíl od nich ale využívá aminokyseliny serin a cystein, i když je k dispozici glukóza (DIKEMAN, DEVINE, 2014). Tvoří sirovodík, který v kombinaci se svalovým barvivem způsobuje zelené zbarvení masa. Vyhovují jí zejména vyšší hodnoty pH (KAMENÍK et al., 2014a).

Brochothrix thermosphacta je významná saprofytická bakterie masa a masných výrobků, která vykazuje extrémní morfologickou rozmanitost a je fakultativně anaerobní. Jedná se o grampozitivní bakterii, která má fermentativní metabolismus a produkuje L-laktát z glukózy. *B. thermosphacta* kazí zejména čerstvé maso s pH nad 5,8 (BLACKBURN, 2006). Roste spíše při teplotě skladování 5 °C, než při 0 °C (ICMSF, 2005).

Obecně platí, že *Enterobacteriaceae* jsou konkurenceschopnější proti aerobním tyčinkám ve vakuovém balení, než v balení se vzdušnou atmosférou. Mezi nejdůležitější saprofytické druhy čeledi *Enterobacteriaceae* patří *Serratia liquefaciens* (vyskytuje se nejčastěji), *Hafnia alvei* a *Enterobacter (Pantoea) agglomerans* (BLACKBURN, 2006; KAMENÍK et al., 2014a). *Enterobacteriaceae* využívají jako hlavní zdroj uhlíku zejména glukózu a glukózu-6-fosfát, po vyčerpání těchto zdrojů začíná degradace aminokyselin. Někteří členové produkují amoniak, volatilní sulfidy (např. H₂S) a zapáchající aminy (ROBINSON et al., 2000).

Bakterie mléčného kvašení (BMK) mohou také způsobovat kažení masa a masných výrobků, zejména při balení ve vakuu nebo v modifikované atmosféře. Nejvýznamnější jsou z hlediska kažení rody *Lactobacillus* (zejména *L. sakei*, *L. curvatus*), *Leuconostoc*, *Carnobacterium*, *Weissella* (především *W. viridescens* a *W. paramesenteroides*), *Lactococcus* (hlavně *L. raffinolactis*), *Enterococcus* a *Pediococcus* (BLACKBURN, 2006). Změny v senzorické kvalitě jsou způsobené akumulací konečných produktů metabolismu BMK a obvykle nastanou při dosažení počtu 10⁷ BMK/cm² (PEARSON, DUTSON, 1994).

Anaerobní saprofytická mikroflóra

Mezi mikroorganismy spojené s anaerobním kažením patří např. *Clostridium laramie* – anaerobní, psychrotrofní, sporulující tyčinka, která způsobuje tvorbu velkého množství plynu, výraznou proteolýzu a změnu barvy masa na růžovo-červenou a následně zelenou (PEARSON, DUTSON, 1994).

Mezi nejnovější metody umožňující identifikaci bakterií způsobujících kažení patří kolorimetrický sensor array. Ve studii CHEN et al. (2014) byly testovány čtyři bakterie způsobující kažení masných výrobků: *Pseudomonas koreensis*, *Bacillus fusiformis*, *Acinetobacter guillouiae* a *Enterobacter cloacae*. Na C2 reverzní silikagelovou destičku se nanoslo 15 barviv, které odpovídaly na produkci bakteriálních volatilních organických složek změnou barvy.

Kvasinky a plísň

Kvasinky a plísň jsou hlavními mikroorganismy, které způsobují kažení u masa a masných výrobků s nízkou a_w a nízkým pH, při kterých už bakterie nemohou růst a u masa dlouhodobě skladovaného za aerobních či mikroaerofilních podmínek (PEARSON, DUTSON, 1997; ICMSF, 2005; DIKEMAN, DEVINE, 2014). Symptomy kažení jsou podobné symptomům kažení vyvolaným bakteriemi (PEARSON, DUTSON, 1994).

Zástupci rodu *Mucor*, *Rhizopus* a *Thamnidium* tvoří mycelium, které se jeví jako bílé nebo šedé porosty na povrchu masa. *Cladosporium herbarum* a *Cladosporium cladospories* tvoří tmavě zbarvené mycelium, které se jeví jako černé skvrny a může růst na mase i při $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$. *Penicillium* spp. a *Cladosporium* spp. tvoří na mase velké množství žlutých až zelených ploch. Bílé skvrny jsou obvykle způsobeny *Sporotrichum carnis* (FORSYTHE, HAYES, 1998).

3.3. Mikroorganismy způsobující alimentární onemocnění se vztahem k masu a masným výrobkům

Alimentární onemocnění lze rozdělit na infekce a intoxikace. Infekce jsou vyvolány bakteriemi, které se pomnoží v trávicím traktu člověka a vyvolají onemocnění. Intoxikace vznikají z pomnožení bakterií a produkce toxinů již v potravine (FORSYTHE, HAYES, 1998).

V roce 2012 nahlásilo 25 členských států Evropské unie 5363 ohnisek hromadných nákaz alimentárních onemocnění, což představuje 5% pokles oproti roku 2011. Z těchto

ohnisek bylo nakaženo 55453 lidí, ze kterých bylo 5118 hospitalizováno a 41 zemřelo (EFSA, 2014). Ačkoli zdrojem alimentárních onemocnění mohou být různé potraviny, maso a masné výrobky jsou jedním z nejvýznamnějších zdrojů (TOLDRÁ, 2009). Na hromadných nálezích z potravin v Evropě v roce 2012 měly podíl až 20 % (EFSA, 2014). Proto jsou v následujících podkapitolách charakterizována jednotlivá alimentární onemocnění se vztahem k masu a masným výrobkům a jejich původci.

Stafylokoková gastroenteritida

Stafylokoková gastroenteritida je zapříčiněna požitím potraviny, jež obsahuje enterotoxin(y), které produkují pouze některé stafylokokové druhy a kmeny. Nejvýznamnějším druhem je *Staphylococcus aureus*, což je grampozitivní fakultativně anaerobní mezofil, který roste v rozmezí od 7 do 48 °C, přičemž enterotoxin je produkován od 10 do 46 °C. Optimální teplota je 40 až 45 °C. *S. aureus* roste při koncentraci NaCl 7 až 10 %, některé kmeny dokonce i při 20% koncentraci. Optimální pH pro růst je 6 až 7, ale roste v rozmezí 4 až 9,8. Stafylokoky jsou oproti jiným nehalofilním bakteriím unikátní v tom, že rostou i při hodnotě a_w 0,83 za jinak optimálních podmínek (JAY et al., 2005).

Bylo identifikováno třináct stafylokokových enterotoxinů. Minimální množství enterotoxinu, které je schopno vyvolat onemocnění, je okolo 20 ng (JAY et al., 2005). Stafylokokové enterotoxiny jsou značně termorezistentní, snášejí až půlhodinový var a ani při sterilaci nedojde k jejich spolehlivé eliminaci (v závislosti na jejich koncentraci v potravine). Odolávají i působení proteáz a snášejí působení krátkovlnného ionizujícího záření (GÖRNER, VALÍK, 2004).

Příznaky alimentárního onemocnění zahrnují nevolnost, zvracení, křeče v břiše, průjem, pocení, bolest hlavy, vyčerpanost a někdy pokles tělesné teploty (JAY et al., 2005).

Alimentární onemocnění způsobené Clostridium perfringens

Původcem tohoto onemocnění je grampozitivní, sporulující, anaerobní tyčinka. Podle schopnosti produkovat určité exotoxiny se dělí na pět typů: typy A, B, C, D a E. Enterotoxin je syntetizován buňkami při sporulaci, přičemž vrchol tvorby je těsně před lyzí buňky, kdy se spolu se sporou uvolní i enterotoxin (JAY et al., 2005). Tento toxin je termolabilní. K inaktivaci dochází při teplotě 60 °C, dále působením enzymu pronázy, ale ne trypsinem, chymotrypsinem nebo papainem (STEINHAUSER et al., 1995).

C. perfringens je mezofil, s optimem mezi 37 a 45 °C. Nejnižší teplota růstu je kolem 20 °C, nejvyšší je asi 50 °C. Většina kmenů roste v rozmezí pH 5,5 až 8. Nejnižší hodnoty a_w pro růst a klíčení spor se pohybují mezi 0,97 až 0,95, ale k tvorbě spor dochází při vyšších hodnotách. Růst je inhibován při 5% koncentraci NaCl (JAY et al., 2005).

Příznaky onemocnění zahrnují především akutní bolest břicha a průjem, zvracení a horečka jsou vzácné. S výjimkou starších pacientů a oslabených osob je nemoc krátká, trvá přibližně den nebo i méně (JAY et al., 2005).

C. perfringens je ve vzorcích masa a v masných výrobcích možné rychle detekovat pomocí IMS-PCR. Tato metoda je schopná detekovat i 10 KTJ/g *C. perfringens* v masných vzorcích do 10 hodin, v porovnání s kultivačními metodami je tedy rychlejší a specifitější (ZHENG-YOU et al, 2010).

Botulismus

Botulismus je onemocnění způsobené požitím vysoce toxického exotoxinu, který je produkován v potravině některými kmeny *Clostridium botulinum*, což je grampozitivní, anaerobní a sporulující tyčinka. Na základě sérologické specifity jej dělíme na sedm typů: A, B, C, D, E, F a G. Typy A, B, E, F, G způsobují botulismus u člověka (JAY et al., 2005).

Teplota růstu proteolytických typů je od 13 do 48 °C a hodnota a_w musí být minimálně 0,93 až 0,95. Proteolytické kmeny mohou růst při vyšších koncentracích soli, než kmeny neproteolytické, jejichž růst je inhibován již při 3% koncentraci NaCl. Neproteolytické kmeny rostou od 3,3 do 48 °C a minimální hodnota a_w je 0,97. *C. botulinum* se množí v rozmezí pH od 4,6 do 9 a je citlivé na přítomnost nitrátů a organických kyselin. U proteolytických kmenů je D_{121} -hodnota 0,2 minut (STEINHAUSER et al., 1995).

LD_{50} toxinu *C. botulinum* pro člověka je asi 1 ng/kg tělesné hmotnosti. Toxin se tvoří uvnitř buněk za normálních podmínek. K uvolnění do prostředí dochází při lyzi buňky (JAY et al., 2005).

Onemocnění se projevuje dvojitým viděním, rozšířením zřítelnic, obtížemi při polykání a mluvení, celkovou ochablostí kosterního svalstva a paralýzou dýchání (HORÁČEK et al., 2000). Úmrtnost se pohybuje mezi 30 a 65 %. Léčba sestává z podání speciálního antiséra, jehož brzké podání zlepšuje prognózu (JAY et al., 2005).

Gastroenteritida způsobená Bacillus cereus

Bacillus cereus je grampozitivní fakultativně anaerobní tyčinka, schopná sporulace (STEINHAUSER et al., 1995). *B. cereus* má minimální teplotu růstu kolem 4 až 5 °C a maximální kolem 48 až 50 °C. Roste v rozmezí pH od 4,9 do 9,3 (JAY et al., 2005). *B. cereus* je producentem řady toxinů. Enterotoxin zvyšuje permeabilitu cév, má nekrotizující účinky a je letální pro myši. Emetický toxin je termorezistentní, acidorezistentní a odolný proti působení proteáz. Fosfolipáza C štěpí fosfatydlcholin, fosfatidylinositol a sfingomyelin. *B. cereus* také tvoří dva typy hemolyzinů (HORÁČEK et al., 2000). *Bacillus cereus* může vyvolat dvě formy alimentárního onemocnění: diaroický a emetický syndrom. Počet nutný k vyvolání emetického syndromu se zdá být vyšší než pro diaroický syndrom, je to asi $2 \cdot 10^9$ *B. cereus*/g (JAY et al., 2005).

Alimentární onemocnění způsobené Listeria monocytogenes

Listerie jsou grampozitivní, nesporulující, pravidelné tyčinky. Z glukózy a dalších fermentovatelných cukrů produkují kyselinu mléčnou, ale bez vývinu plynu. Mají několik peritrichálních bičků a při kultivaci ve 20 až 25 °C jsou pohyblivé (SEDLÁČEK, 2007).

Listerie rostou ve velkém teplotním rozmezí mezi 0 až 45 °C. Jsou odolné vůči vyšším teplotám, ale při teplotách nad 70 °C jsou zničeny za několik minut. Mrazírenské teploty je konzervují. *Listeria monocytogenes* roste i v prostředí 10 % NaCl a snáší pH od 5,5 do 9. Pro rozmnožování je nutná hodnota a_w nad 0,95. Listerie jsou do určité míry citlivé na působení organických kyselin a přítomnost mikroflóry produkující kyselinu mléčnou (STEINHAUSER et al., 1995).

Zdraví jedinci jsou vysoce odolní proti infekci *L. monocytogenes*, u náchylných lidí se onemocnění projevuje různými příznaky. Nejčastějšími komplikacemi jsou zánět mozkových blan a sepse (JAY et al., 2005).

EFSA (2009) uvádí, že v EU se počet hlášených úmrtí způsobených nákazami alimentárního původu v letech 2005 až 2006 více než zdvojnásobil. Takto vysoký počet onemocnění a úmrtí nastal především kvůli velkému ohnisku nákazy listeriózy v České republice, kdy 120 lidí onemocnělo a 17 jich zemřelo (EFSA, 2009). Za období leden až prosinec 2014 bylo hlášeno v České republice 37 případů listeriózy, což je nejvíce od roku 2008 (WWW.SZU.CZ).

Alimentární onemocnění způsobené *Salmonella*

Salmonely jsou gramnegativní nesporulující tyčinky fermentující glukózu za produkce plynu, ale obvykle nefermentují laktózu ani sacharózu. Minimální teploty růstu jsou kolem 4 až 8 °C, optimální teplota je 37 °C. Rostou v rozmezí pH od 4 do 9. Minimální hodnota a_w vhodná pro růst je 0,94; pod tuto hodnotu se sice nemnoží, ale přežívá. Doporučená teplota pro zničení salmonel je záhřev na teplotu 70 °C ve všech částech potravin po dobu 10 minut (HULÁNKOVÁ, 2013).

Dle EFSA (2014) se výskyt salmonelózy v Evropské unii v roce 2012, stejně jako v předchozích letech (2008 až 2012) snižoval. Převládajícím sérovarem byla v roce 2012 stejně jako v předcházejících letech *S. enteritidis*, v menší míře pak *S. typhimurium* (EFSA, 2014). V ČR bylo za rok 2014 hlášeno 13633 případů, což je nejvíce od roku 2007. Salmonelóza je druhé nejčastější onemocnění z potravin po kampylobakterióze (WWW.SZU.CZ).

Alimentární onemocnění způsobené *Escherichia coli*

Escherichia coli je fakultativně anaerobní, nesporulující, gramnegativní tyčinka z čeledi *Enterobacteriaceae*. Ačkoli je *E. coli* většinou neškodný komenzál, existuje mnoho patogenních kmenů, které mohou způsobit řadu onemocnění u lidí a zvířat (MOTARJEMI, ADAMS, 2006).

Podle přítomnosti toxinů a dalších faktorů virulence se dělí na: enteropatogenní, enteroinvazivní, enterotoxigenní, enterohemorhagická (MAČÁK, 2008), enteroagregativní a difuzně adherentní *E. coli*. Tato bakterie roste od 7 °C do 46 °C, přičemž optimum je 35 až 40 °C. Snáší pH 4,4 až 9. Minimální a_w pro růst je 0,95. Patogení *E. coli* snáší koncentraci NaCl až 8,5 % (STEINHAUSEROVÁ, 2014).

Kampylobakteriíza

Kromě *Campylobacter jejuni* je známo několik dalších druhů rodu *Campylobacter*, které způsobují průjem u lidí, např. *C. coli* a *C. intestinalis*, ale *C. jejuni* je z nich nejvýznamnější. *C. jejuni* je spirálovitě zakřivená tyčinka, která má bičík na jednom nebo obou koncích buňky. Je oxidázopozitivní a katalázopozitivní. *C. jejuni* je mikroaerofilní, pro růst tedy vyžaduje pouze malé množství kyslíku (3 až 6 %) (JAY et al., 2005).

Růstová teplota je v mikroaerofilním prostředí od 30 do 40 °C. V chladírenských teplotách je *C. jejuni* schopen přežít i několik dnů, mrazírenské teploty snáší relativně dobře. Množí se jen v úzkém rozmezí pH od 6 do 9,5 a v přítomnosti NaCl od 2 do 3 %.

Při snížení a_w pod 0,95 nebo v přítomnosti organických kyselin je devitalizován během několika hodin. Je také značně citlivý k běžně používaným dezinfekčním prostředkům a k UV záření (STEINHAUSER et al., 1995).

Příznaky onemocnění mohou být následující: bolesti břicha nebo křeče, průjem, nevolnost, bolest hlavy a horečka. Většinou trvají 1 až 4 dny. U těžších případů se může ve stolici objevit krev, průjem může připomínat ulcerózní kolitidu a bolesti břicha se mohou zaměnit s akutním zánětem slepého střeva (JAY et al., 2005).

V roce 2012 bylo EFSA nahlášeno devatenácti členskými státy celkem 501 hromadných nákaz alimentárních onemocnění vyvolaných bakterií *Campylobacter*. Ve srovnání s rokem 2011, kdy bylo nahlášeno celkem 596 ohnisek, jde o pokles (EFSA, 2014). V roce 2014 bylo v ČR hlášeno 20902 případů kampylobakterií. Jde o nejrozšířenější alimentární onemocnění (WWW.SZU.CZ).

Yersinióza

Yersinie jsou gramnegativní fakultativně anaerobní tyčinky. Jsou pohyblivé díky peritrichálním bičíkům, pokud rostou při teplotě pod 30 °C. Fermentují glukózu a další sacharidy bez tvorby (nebo pouze malého množství) plynu. Optimální teplota růstu je 27 až 30 °C (SEDLÁČEK, 2007). Z rodu *Yersinia* jsou pro člověka a zvířata patogenní *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis* a později objevená *Y. enterocolitica* (HORÁČEK et al., 2000).

Alimentární onemocnění způsobené Shigella

Shigella je další rod z čeledi *Enterobacteriaceae*, který může způsobit alimentární onemocnění. Zkvašuje glukózu za tvorby kyselin, ale bez tvorby plynu. Do potravin se dostává výhradně sekundární kontaminací (JAY et al., 2005). Za rok 2014 bylo v ČR hlášeno 92 případů (WWW.SZU.CZ).

3.4 Mikroflóra surovin používaných v masné výrobě

Maso

Hlavní složkou masných výrobků je maso a vedlejší masné produkty (TOLDRÁ, 2010). Počet bakterií v masě použitém pro masné výrobky by měl být co možná nejnižší (DIKEMAN, DEVINE, 2014). To platí zejména o mikrobiologickém stavu syrových materiálů (masa a tuku), určených pro fermentované tepelně neopracované masné výrobky, kde může velké množství bakterií negativně ovlivnit fermentaci a výsledný výrobek by nemusel být bezpečný (FEINER, 2006).

Za optimální počet mikroorganismů pro fermentované masné výrobky je považována hodnota mezi 10^2 a 10^3 /g masa. Hodnota nad 10^5 mikroorganismů/g masa by měla být vnímána jako maximální hranice. Počet *Enterobacteriaceae* celkově by měl být méně než 10^4 /g masa (FEINER, 2006). Tepelně neopracované masné výrobky (dle VYHLÁŠKY č. 159/2014 Sb. jsou určené k přímé spotřebě bez další úpravy a neproběhlo u nich tepelné opracování surovin ani výrobku) se smějí vyrábět pouze ze surovin, které byly zmrazeny nejméně na -5 °C v jádře po dobu 48 hodin (STEINHAUSER et al., 1995). Toto opatření je důležité zejména kvůli inaktivaci parazitů (*Trichinella spiralis*), neboť tepelně neopracované masné výrobky mohou být původcem humánní trichinelózy (KAMENÍK et al., 2014a).

Pro tepelně opracované masné výrobky je vyhovující počet mikroorganismů mezi 10^2 a 10^4 na gram výrobku. Nízký počáteční stav bakterií pomáhá udržovat nízký počet bakterií v průběhu výrobního procesu a značně zvyšuje životnost produktu (FEINER, 2006).

Ve studii porovnávající dobu údržnosti vepřového masa podle tříd kvality (PSE, DFD) bylo zjištěno, že ihned po porážce a po vychlazení na 4 °C se tyto odchylky masa z mikrobiologického hlediska neliší, počáteční kontaminace byla ovlivněna zejména zpracovatelským prostředím. Avšak 25 dní po porážce se celkový počet mikroorganismů (CPM) u DFD masa výrazně zvýšil, u PSE masa došlo pouze k mírnému zvýšení. Bylo tedy prokázáno, že DFD maso má horší mikrobiologický obraz oproti PSE masu (FAUCITANO et al., 2010). Je to způsobeno nedostatečným okyselením v průběhu rigor mortis. Proto by se DFD maso mělo používat pouze v omezeném množství. U tepelně neopracovaných výrobků se nemá používat vůbec, stejně jako PSE maso, které je ale nevhodné z technologického hlediska (STEINHAUSER et al., 1995; FEINER, 2006).

Mechanicky separované maso

Pro tepelně opracované masné výrobky je široce používáno mechanicky separované maso (MSM) (PIPEK, 1998; FEINER, 2006). To by mělo mít nízký počet bakterií, nesmí být žluklé (zvláště důležité pro kuřecí MSM) a mělo by obsahovat jen velmi málo částic kostí (FEINER, 2006). Ve studii provedené JELENA et al. (2013) mikrobiologické zkoušky MSM zjistily u 5 % vzorků přítomnost *Salmonella* spp. a 23 % a 5 % vzorků MSM bylo nevyhovujících, pokud jde o počet *Escherichia coli* a celkový počet mikroorganismů (CPM).

HECER a ULUSOY SÖZEN (2011) experimentálně prokázali, že ponechání drůbežích hrudních kostí po dobu 10 minut před separací v 0,2 a 0,3% kyselině mléčné a v 1 a 2% laktátu sodném je úspěšná metoda pro dekontaminaci MSM. Doba použitelnosti byla takto prodloužena o 1 den při teplotě 4 °C.

Tuky

Tuky, vzhledem k jejich nízkému obsahu bílkovin a vody, nepředstavují vhodné prostředí pro množení mikroorganismů, které se na nich vyskytují. Ke kontaminaci tuku dochází především při oddělování tuku od masitých částí a při manipulaci s ním. Nežádoucí jsou zejména lipolytické bakterie. U dlouho skladovaných tuků za zvýšené vlhkosti může dojít k plesnivění (CEMPÍRKOVÁ, 1997). Mikrobiální vlastnosti sádla by měly být shodné s požadavky na maso (KAMENÍK, 2012). Vysoký počet mikroorganismů negativně ovlivňuje žluknutí, chuť, trvanlivost a stabilitu zbarvení konečného výrobku (FEINER, 2006). Ve studii provedené BOVOLENTA et al. (2008) byl hodnocen vyšší přídavek tuku (30 % oproti 10 %) do fermentovaného salámu z mikrobiologického hlediska. Nižší obsah tuku významně zvýšil výskyt mikrokoků. Mezi výskytem CPM, BMK, enterokoků, enterobakterií, gramnegativních bakterií a kvasinek a plísní nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl.

Vedlejší masné produkty

Vedlejší masné produkty, jako jsou játra, ledviny, srdce, jazyky aj. z hovězího dobytka, prasat a ovcí, se liší od kosterního svalstva v tom, že mají vyšší pH a více glykogenu. Většina těchto produktů obsahuje na povrchu do $1,6 \cdot 10^4$ mikroorganismů/cm², přičemž dominují mikrokoky, streptokoky a koryneformní bakterie (JAY et al., 2005).

Technické a ochucující složky

Kromě masných složek pochází mikroorganismy také z technických a ochucujících složek, např. z přidávaných proteinů, soli a koření (TOLDRÁ, 2010).

V některých vařených mělněných masných výrobcích lze nalézt i více než 14 % sojového proteinu, který mírně zvýší pH výrobku (FEINER, 2006). Proteinové deriváty jsou významným zdrojem mikrobiologické zátěže (JAY et al., 2005). Sojová mouka obsahuje vyšší CPM ($5 \cdot 10^6$ /g) oproti texturovanému sojovému proteinu ($4 \cdot 10^3$ /g). Stejně tak je u sojové mouky vyšší počet sporulujících aerobních bakterií, počet koagulázopozitivních stafylokoků a počet sulfitredukujících klostridií. Texturovaný

sojový protein však obsahuje větší počet plísní ($1,6 \cdot 10^5/\text{g}$) proti sojové mouce (MOLDOVANU, LASLO, 2010).

Sůl může být kontaminována zejména halofilními mikroorganismy, např. *Halobacterium salinarum* a *Staphylococcus aureus*, ale i rody *Bacillus* a *Micrococcus* (CEMPÍRKOVÁ et al., 1997). Sůl ale snižuje a_w a inhibuje růst mikroorganismů způsobujících kažení, napomáhá částečnému rozpuštění myofibrilním bílkovinám a dává výrobkům charakteristickou slanou chuť (KAMENÍK, 2012; TOLDRÁ, 2010). Většina soli se v masné výrobě uplatňuje ve formě solících směsí, dusičnanových, nebo převažujících dusitanových (STEINHAUSER et al., 1995). U nás, stejně jako v dalších evropských státech, je obsah přidávaného dusitanu sodného nebo dusitanu draselného (E 250, resp. E 249) legislativně limitován dle VYHLÁŠKY MZ č. 122/2011 Sb., a to množstvím 150 mg/kg masného výrobku.

Zastoupení mikroorganismů v koření je rozdílné nejen podle jeho druhu, ale i podle místa získávání, hygienické úrovně zpracování, skladování apod. (CEMPÍRKOVÁ et al., 1997; DIKEMAN, DEVINE, 2014). Na koření se běžně mohou vyskytovat aerobní i anaerobní sporotvorné mikroby, které se do něj dostávají z půdy. Dále byly izolovány koliformní bakterie, bakterie z rodu *Micrococcus*, *Streptococcus*, *Pseudomonas* a plísně (CEMPÍRKOVÁ et al., 1997; GÖRNER, VALÍK, 2004). Záchyt spor *Clostridium perfringens* v koření je až 80 % (KAMENÍK et al., 2014a). Vysoký stupeň kontaminace koření může představovat v masné výrobě velký problém. Mezi dekontaminační metody patří ozáření, tepelné zpracování, použití etylenoxidu; nebo vysokého tlaku (DIKEMAN, DEVINE, 2014).

Mnoha studii bylo prokázáno, že výtažky z rostlin mají široké spektrum antimikrobiální aktivity proti různým rodům bakterií a plísní (LU et al., 2010; JAYASENA, JO, 2013; MITH et al., 2014).

Do fermentovaných masných výrobků se přidávají také sacharidy. Ty stimulují BMK, které snížením pH zabrání růstu hnilobných bakterií, které nízké pH netolerují. Používají se jednoduché cukry (glukóza), oligosacharidy (sacharóza, laktóza,...) i polysacharidy (nejčastěji v podobě modifikovaných škrobů, dextrinů aj.) (PIPEK, 2008). Udává se, že přibližně 1 % cukru sníží během fermentace pH o 1 jednotku. Přídavkem glukono-delta-laktonu se podpoří okyselení (TOLDRÁ, 2002). O startovacích kulturách je pojednáno v kapitole o mikroorganismech podílejících se na výrobě.

Obaly masných výrobků

Z mikrobiologického hlediska je také důležitý obal masného výrobku. Z přírodních střev je možno izolovat velmi různorodé spektrum bakterií, např. aerobní sporotvorné bakterie, mikrokoky a koliformní bakterie. I po technologické úpravě je počet mikrobů $10^9/g$ a víc. Při několikaměsíčním skladování se počet mikrobů v solených střevech sníží a nejvíce jsou zastoupeny aerobní a anaerobní sporotvorné mikroorganismy. Z mikrobiologického hlediska je proto výhodnější použít střeva umělá (CEMPÍRKOVÁ et al., 1997).

3.5 Rozdělení masných výrobků

Dle současné platné legislativy, konkrétně dle VYHLÁŠKY MZE č. 159/2014 Sb. lze masné výrobky rozčlenit do skupin uvedených v tabulce 2. Definice jednotlivých skupin budou uvedeny v následujících kapitolách.

Tabulka 2 - Členění masných výrobků (VYHLÁŠKA MZE č. 159/2014 Sb.)

Druh	Skupina
Masný výrobek	Tepelně opracovaný
	Tepelně neopracovaný
	Trvanlivý tepelně opracovaný
	Trvanlivý fermentovaný
	Masný polotovar
	Kuchyňský masný polotovar
	Konzerva
	Polokonzerva

HUI (2012) dělí masné výrobky podle podmínek skladování do dvou skupin. První skupina zahrnuje netrvanlivé masné výrobky, které musí být až do okamžiku spotřeby uchovávány chlazené (či mražené), aby se zabránilo růstu saprofytických a patogenních mikroorganismů. Do druhé skupiny patří trvanlivé masné výrobky, které mohou být skladovány při teplotě a vlhkosti okolí.

3.6 Masný polotovar

Masný polotovar je maso tepelně neopracované, u kterého zůstaly zachovány vnitřní buněčná struktura masa a vlastnosti čerstvého masa a k němuž byly přidány potraviny, koření přípravky nebo přídatné látky. Je určen k tepelné kuchyňské úpravě před spotřebou a splňuje požadavky zvláštních právních předpisů; za masný polotovar

se považuje i výrobek z mletého masa s přidavkem jedlé soli vyšším než 1 % hmotnostní (VYHLÁŠKA MZE č. 159/2014 Sb.). Do této kategorie výrobků patří např. tepelně neopracované mleté maso a tepelně neopracovaná balená výseková masa upravené jako masné polotovary (SPERBER, DOYLE, 2009).

Dle NAŘÍZENÍ EP A RADY (ES) č. 853/2004 mohou být pro přípravu masných polotovarů použity následující suroviny:

- čerstvé maso pocházející z kosterního svalstva
- pokud masný polotovar zřetelně není určen ke konzumaci bez předchozí tepelné úpravy:
 - maso získané mletím nebo zdrobněním čerstvého masa z kosterního svalstva
 - strojně oddělené maso (SOM), pokud splňuje mikrobiologická kritéria pro mleté maso přijatá v souladu s NAŘÍZENÍM EP A RADY ES č. 2073/2005.

Masné polotovary by se měly dle dnes už neplatné VYHLÁŠKY MZE č. 202/2003 Sb. balit a uvádět do oběhu:

- chlazené, to znamená zchlazené co nejrychleji na vnitřní teplotu nižší než 2 °C – pokud byly připraveny z mletého masa, nižší než 7 °C – pokud byly připraveny z čerstvého masa, nižší než 4 °C – pokud byly připraveny z drůbežního masa, a nižší než 3 °C – pokud obsahují vnitřnosti;
- anebo hluboce zmrazené, to znamená zchlazené co nejrychleji na vnitřní teplotu nižší než -18 °C.

3.6.1 Mikroflóra masných polotovarů

Mikroflóra masných polotovarů je dána kvalitou použitého masa a nemasných surovin (DIKEMAN, DEVINE, 2014). K zajištění mikrobiální stability masných polotovarů aplikují výrobci „překážkový efekt“: kombinaci soli, aditiv s konzervačním účinkem, skladování při chladírenských teplotách, příp. balení v modifikované atmosféře. Jako další významnou překážku lze uplatnit také použití ochranných kultur (BALÁŠ, 2014).

Mikrobiologický obraz výsekového baleného masa upraveného jako masný polotovar tedy sestává z aerobních psychrotrofních bakterií (*Pseudomonas* spp., *Moraxella* spp., *Psychrobacter* spp. a *Acinetobacter* spp.) a psychrotrofních bakterií z čeledi *Enterobacteriaceae* (SPERBER, DOYLE, 2009).

Mikroflóra mletého masa je kromě kvality surovin závislá také na zpracování. CPM mletého masa se pohybuje kolem $4 \cdot 10^4$ KTJ/g. Během mletí jsou mikroorganismy z povrchu masa distribuovány dovnitř (ICMSF, 2005). Při mělnění a míchání díla se zvětšuje povrch masa, čímž může také snadněji docházet ke kontaminaci z vnějšího prostředí (BALÁŠ, 2014). Zvyšuje se také teplota masa, což může vyústit nejen v pomnožení psychrotrofních, ale i mezofilních mikroorganismů. Proto je důležité teplotu během mletí a po ukončení mletí kontrolovat. Také je třeba řádně sanitovat mlecí zařízení, aby nepředstavovalo zdroj patogenních mikroorganismů (ICMSF, 2005).

NAŘÍZENÍ EP A RADY ES č. 2073/2005 uvádí, že na konci výrobního procesu musí být u masných polotovarů počet aerobních mikroorganismů ve třech z pěti vzorků do $5 \cdot 10^5$ KTJ/g, zbylé dva vzorky mohou obsahovat max. $5 \cdot 10^6$ KTJ/g.

Kažení masných polotovarů

Saprophytická mikroflóra masných polotovarů je podobná saprophytické mikroflóře masa. Skládá se zejména z pseudomonád. Předpokládá se, že důvodem, proč je tento rod tak trvale spojen s aerobním kažením masa za nízkých teplot, je jeho schopnost tvořit biofilm a uplatňovat quorum sensing (JAY et al., 2003). Hojně zastoupené jsou také psychrotrofní *Enterobacteriaceae*, zejména *Citrobacter freundii*, *Proteus vulgaris*, *Hafnia alvei* a zástupci rodu *Rahnella* (KAMENÍK et al., 2014a).

Mikroorganismy způsobující alimentární onemocnění v masných polotovarech

NAŘÍZENÍ EP A RADY (ES) č. 2073/2005 stanovuje mikrobiologická kritéria pro mleté maso a polotovary pouze u *E. coli* a *Salmonella*. V těchto masných výrobcích se však podobně jako v mase dle dostupné literatury vyskytují i další patogenní bakterie. Ty nejvýznamnější z nich jsou popsány níže.

NAŘÍZENÍ EP A RADY (ES) č. 2073/2005 uvádí kritéria hygieny výrobního procesu, vztahující se na konec výrobního procesu. Kritéria jsou uvedena v tabulce 3.

Tabulka 3 – Kritéria hygieny výrobního procesu (NAŘÍZENÍ EP A RADY (ES) č. 2073/2005)

Kategorie potravin	Mikroorganismus	n	c	m	M
mleté maso	<i>E. coli</i>	5	2	50 KTJ/g	500 KTJ/g
polotovary	<i>E. coli</i>	5	2	500 KTJ/g nebo KTJ/cm ²	5000 KTJ/g nebo KTJ/cm ²

Legenda: n...počet jednotek tvořících vzorek, c...počet jednotek vzorků, jejichž hodnoty převyšují m nebo leží mezi m a M.

Ve studii KALIN, ÖNGÖR (2014) byla zkoumána přítomnost *E. coli* O157:H7 ve vzorcích mletého masa. Tato bakterie byla zjištěna u 7,5 % vzorků. Pozitivní izoláty byly dále zkoumány na přítomnost genů pro virulenci, stx₁ byl stanoven u jednoho izolátu, stx₂ u tří izolátů a oba stx₁ a stx₂ byly nalezeny v jednom izolátu. HONG et al. (2014) se zabýval využitím bakteriofágů k redukci počtu této bakterie v mletém hovězím masa. Směs tří bakteriofágů snížila počet *E. coli* u mletého hovězího masa skladovaného při 24 °C po dobu 24 hodin, i u masa skladovaného při 4 °C. Nicméně výskyt a vznik fágově rezistentních bakterií by mohl omezit účinnost fágových produktů. Enterohemorhagická *E. coli* O157:H7 se dá imunomagneticky izolovat z mletého hovězího masa a následně identifikovat pomocí MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie s následným porovnáním s databázemi molekulových hmotností. Jde o rychlou a snadnou metodu, která trvá 25 minut (OCHOA, HARRINGTON, 2005).

Kritéria týkající se *Salmonella* spp. stanovuje NAŘÍZENÍ EP A RADY (ES) č. 2073/2005. Tato kritéria jsou uvedena v tabulce 4 a vztahují se na produkty uvedené na trh během doby údržnosti.

Tabulka 4 – Kritéria pro salmonely v mletém masa a polotovarech (NAŘÍZENÍ EP A RADY (ES) č. 2073/2005)

Kategorie potravin	Mikroorganismus	Limit
mleté maso a polotovary ke spotřebě za syrova	<i>Salmonella</i>	nepřítomnost v 25 g
mleté maso a polotovary z drůbežního masa ke spotřebě po tepelné úpravě	<i>Salmonella</i>	nepřítomnost v 25 g
mleté maso a polotovary z jiného než drůbežního ke spotřebě po tepelné úpravě	<i>Salmonella</i>	nepřítomnost v 10 g

Salmonella byla izolována z 56,7 % vzorků mletého hovězího masa z Mexika. Převládající byly *S. anatum*, *S. agona*, *S. infantis* a *S. typhimurium*. Všechny izoláty byly testovány na citlivost vůči antimikrobiálním léčivům. Nejčastěji byla pozorována odolnost proti tetracyklinu, ale 27 % izolátů bylo multirezistentních, zejména *S. anatum* a *S. typhimurium* (CABRERA-DIAZ et al., 2013).

U 29 % vzorků masných polotovarů z tržní sítě byla přítomna DNA alespoň jednoho z těchto mikroorganismů: *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* a *Mycobacterium avium* subsp. *avium*. Tyto

bakterie jsou hlavními původci mykobakteriálních infekcí u hospodářských zvířat. *M. avium subsp. paratuberculosis* je původcem paratuberkulózy (Johnova nemoc) u přežvýkavců a může být přítomen v mléce, mase a orgánech infikovaných zvířat (LORENCOVÁ et al., 2014). Studie ukazují možné spojení mezi touto bakterií a Crohnovou chorobou (DOYLE, BUCHANAN, 2013), diabetem mellitus 1. typu a roztroušenou sklerózou u lidí (LORENCOVA et al., 2014).

V masných polotovarech lze také nalézt *Clostridium perfringens*, jehož zvýšené koncentrace jsou připisovány zejména kořenící směsi (KAMENÍK, et al., 2014a). Jeho význam spočívá v tom, že při následném tepelném opracování mohou spory přežít a při nedodržení teplot mohou vyklíčit a způsobit alimentární onemocnění. *S. aureus* je také často izolován z masných polotovarů, avšak i při nedodržení teplot neroste natolik (kvůli vysoké a_w), aby produkoval dostatečné množství toxinu, které by způsobilo alimentární onemocnění. Počty listerií jsou většinou do 100 KTJ/g. I přesto, že infekční dávka není jasná, následné odpovídající tepelné opracování listerie zničí. Růst patogenních sérotypů *Y. enterocolytica* je v přítomnosti normální mikroflóry omezen (ICMSF, 2005).

3.7 Kuchyňský masný polotovar

Kuchyňský masný polotovar vyhláška definuje jako částečně tepelně opracované upravené maso nebo směsi mas, přídatných a pomocných látek, popřípadě dalších surovin a látek určených k aromatizaci, určené k tepelné kuchyňské úpravě (VYHLÁŠKA MZE č. 159/2014 Sb.).

Tyto kuchyňské masné polotovary jsou pouze lehce tepelně opracované pro dosažení vařeného nebo smaženého vzhledu, ale maso je v centru ponecháno v podstatě syrové. Jedná se např. o bleskově smažené výrobky (částečně tepelně opracované nugety a hamburgery). Ke změně barvy masa z červené na šedou spojené s vařením, dochází při teplotách blížících se 60 °C, v závislosti na době ohřevu. Teplota v rozmezí 40 až 60 °C, zejména při krátkém působení, ale neodstraní ani vegetativní poměrně termosenzitivní bakterie. Mnoho mikrobů tedy přežije; včetně těch patogenních, které byly popsány v předchozích kapitolách. Výrobky, které jsou pouze mírně zahřáté, mohou také obsahovat přežívající parazity (např. *Trichinella spiralis* a *Toxoplasma*) (ICMSF, 2005). V roce 2014 byly v ČR hlášeny 2 případy trichinózy a 146 případů toxoplazmózy (WWW.SZU.CZ).

Znepokojení vyvolává to, že částečně tepelně opracované výrobky se mohou spotřebiteli jevit zcela uvařené nebo usmažené a i přes správné označení mohou být zaměněny za plně tepelně opracované (ICMSF, 2005).

3.8 Tepelně opracované masné výrobky

Tepelně opracovaný masný výrobek vyhláška definuje jako výrobek, u kterého bylo ve všech částech dosaženo minimálně tepelného účinku odpovídajícího působení teploty plus 70 °C po dobu 10 minut (VYHLÁŠKA MZE č. 159/2014 Sb.).

3.8.1 Zpracování a jeho efekt na mikroflóru

Mezi nejdůležitější fáze zpracování z mikrobiologického hlediska patří tepelné opracování, chlazení a případné krájení. Dle PEARSON a GILLET (1996) existují tři způsoby tepelného opracování masa: využití suchého tepla, využití vlhkého tepla a mikrovlnný ohřev. V praxi se často používají kombinace více metod, např. část procesu může být suché teplo a část vlhké teplo.

Velké množství tepelně opracovaných masných výrobků je uzených. Uzení má zásadní vliv na barvu, chuť, vzhled a trvanlivost konečného produktu. Po naplnění díla do obalových střívek se výrobky nejprve suší (50 až 60 °C) a ihned poté se udí (při 65 až 70 °C). Následně se tepelně opracují v páře při 72 až 73°C (FEINER, 2006; TOLDRÁ, 2010).

V současné době je rozšířené použití tekutého kouře (kondenzovaný udicí kouř s odstraněnými karcinogenními polyaromatickými uhlovodíky). Za antimikrobiální vlastnosti, chuť a barvu kouře jsou odpovědné fenoly, karbonyly a organické kyseliny. Některé patogeny, např. *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp., *Escherichia coli* a *Staphylococcus* spp., jsou citlivé na působení tekutého kouře (LINGBECK et al., 2014).

Teplota vaření se používá o 6 až 10 °C vyšší než cílová teplota jádra. Tento rozdíl zajišťuje poměrně rychlý nárůst teploty jádra, což je důležité, neboť produkt by měl projít rozmezím 7 až 55 °C tak rychle, jak jen je to možné, aby nedocházelo k nadměrnému růstu bakterií. Výrobky se obvykle tepelně zpracovávají při konstantní teplotě (FEINER, 2006). S vědomím, že tyto procesy tepelného opracování nezničí bakteriální spory, je nutné dodržovat specifické požadavky na následné chlazení, které musí být rychlé. Nejdůležitější je překonat kritickou oblast 20 až 40 °C, kdy může docházet k pomnožení případně přeživších mikroorganismů, nebo k vyklíčení sporulujících bakterií (KOZÁK, 2010).

Tepelně opracované maso může být chlazeno pomocí vody nebo studeným vzduchem. Použije-li se studená voda, měla by být chlorovaná a musí mít kvalitu pitné vody, aby se zabránilo rekontaminaci (FERNANDES, 2009). Pokud není použita proudící voda (vodní lázně), dochází ke zvýšení mikrobiologického rizika, protože teplo podporuje bakteriální růst, a to zejména pokud jsou použita přírodní střívka. Chladicí voda je do určité míry vždy kontaminována a bakterie tak mohou způsobit zkrácení doby použitelnosti a povrchové oslizení (FEINER, 2006).

Mikroflóra chlazených masných výrobků bude dále záviset na tom, zda je výrobek ještě zpracováván po tepelném opracování a na teplotě a času skladování. Kažení výrobků tepelně opracovaných v obalu je obvykle způsobeno mikroorganismy přežívajícími tepelné opracování. Kažení výrobků, které jsou baleny a je s nimi manipulováno až po vaření, závisí na mikrobiální kontaminaci pocházející z následné manipulace (ICMSF, 2005). Tepelně opracované masné výrobky mohou být následně krájeny (např. vepřová pečeně) a mikroflóra plátků se bude skládat z mikroorganismů vyskytujících se na zařízení použitém pro krájení, ke kterému dochází při teplotě přibližně 10 °C, proto bude mikroflóra psychrotrofní (FERNANDES, 2009).

3.8.2 Kažení tepelně opracovaných masných výrobků

Tepelně opracované masné výrobky nesolené solící směsí

Červeně zabarvené kmeny *Serratia* mohou způsobit barevné změny tepelně opracovaného masa uloženého za tepla (tj. asi při 15 až 18 °C) (FERNANDES, 2009).

Tvorba fialového slizu na hovězím pečeném mase je ukazatelem kažení způsobeného *Chromobacterium violaceum* (dnes *Janthinobacterium lividum*). Povrch pečené drůbeže a masa s kostí pečených v horkovzdušných troubách může vykazovat rozsáhlé vysušení, což může vést k nárůstu plísní během dlouhého skladování při nízkých teplotách. Nejčastějšími rody jsou *Penicillium*, *Mucor*, *Aspergillus*, *Cladosporium* a *Thamnidium*. Kvasinky, zejména z rodů *Candida* a *Torula*, mohou být také přítomny ve významných počtech na povrchu masa a tuku (FERNANDES, 2009).

Masová náplň většiny výrobků v obalovém střívku a masových koláčů, které jsou rozšířené zejména ve Velké Británii, je chráněna před rekontaminací těstem nebo obalem a jediné přítomné mikroorganismy jsou ty, které přežijí proces vaření/pečení. To mohou být termorezistentní kmeny *Enterococcus* nebo *Lactobacillus*, které produkují sliz, slabé kyseliny a příležitostně plyn, pokud jsou přítomné heterofermentativní druhy *Lactobacillus*. Větším problémem jsou však rody *Bacillus*

a *Clostridium*, jejichž spory by mohly vyklíčit, pokud je maso skladováno za tepla, při teplotách nad 20 °C. Výrobky v obalovém střívkku jsou náchylné na vnějším povrchu také ke kvasinkám, zejména k rodům *Candida*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Galactomyces*, *Pichia*, *Rhodotorula* a *Torulaspora* (FERNANDES, 2009).

Tepelně opracované masné výrobky solené solící směsí

Tyto výrobky obsahují před tepelným opracováním asi 125 mg dusitanů/kg. Patří mezi ně takové produkty jako paštika, slanina, šunky a jemně mělněné masné výrobky v obalových střívcích (ICMSF, 2005). Kažení těchto výrobků může být dle FERNANDES (2009) následující:

- Povrchové osliznutí: Mikroflóra izolovaná ze slizu je tvořena kvasinkami a BMK, jako je *B. thermosphacta*, *Weissella viridescens*, *Lactobacillus* a *Enterococcus*. Oslizlost začíná jako jednotlivé kolonie na vlhkém povrchu, které později vytvoří rovnoměrnou vrstvu nazelenalého slizu, obvykle na povrchu obalu (FERNANDES, 2009). Ve studii slizu z párků, autoři studie zjistili, že 275 ze 353 izolátů byly bakterie a 78 byly kvasinky. Nejrozšířenější izolát byl *Brochothrix thermosphacta* (JAY, et al., 2005).
- Kysnutí: Kysnutí způsobují laktobacily, *B. thermosphacta* a enterokoky pod obalem masa (FERNANDES, 2009).
- Žluté zbarvení: To je způsobeno růstem *Enterococcus casseliflavus*. Ten roste mezi 4,4 až 10 °C a může přežít teplotu 71,1 °C po dobu 20 minut, ale ne 30 minut. Druhý žlutě pigmentovaný druh enterokoků je *E. mundtii* (JAY et al., 2005; FERNANDES, 2009).
- Zelenání: To může být způsobeno růstem producentů H₂O₂, který reaguje s nitrosohemochromem a vytváří nazelenalý oxidovaný porfyrin, jako jsou *Lactobacillus fructovorans* a *Lactobacillus jensenii*. *Weissella viridescens*, *Leuconostoc*, *Enterococcus faecium* a *Enterococcus faecalis* mohou také způsobovat zelenání v jádru výrobků snížením oxido-redukčního potenciálu, což umožňuje akumulaci H₂O₂ (FERNANDES, 2009). Povrchové zelenání tepelně opracovaných masných výrobků se začíná objevovat po 3 až 5 dnech. Zelenání způsobené mikroorganismy se liší od chemického nebo kovového zelenání tím, že se šíří po celém výrobku (FEINER, 2006). Navzdory zelenému zbarvení není známo, že by měl výrobek po požití škodlivé účinky (JAY et al., 2005).

3.8.3 Mikroorganismy způsobující alimentární onemocnění u tepelně opracovaných masných výrobků

Při aplikaci správné výrobní a hygienické praxe a správném tepelném opracování obsahují tepelně opracované masné výrobky pouze několik set živých mikrobů na gram, které obvykle nejsou schopné rozmnožování při chladírenských teplotách (TOLDRÁ, 2010). Při nedostatečném tepelném opracování, nedodržení teploty chlazení či skladování nebo při rekontaminaci mohou být výrobky zdrojem patogenních bakterií. V následujících odstavcích jsou popsány nejvýznamnější patogenní bakterie, které by se mohly v tomto typu výrobků vyskytovat.

Inhibice *Clostridium botulinum* je stále důležitější, vzhledem k čím dál rozšířenějšímu vakuovému balení, snížení obsahu soli, lepší hygieně (méně konkurenční mikroflóry), pasterizaci v obalu (téměř žádná vegetativní mikroflóra) a snižování pasterační teploty, kdy může striktně anaerobní sporulující *C. botulinum* začít růst a produkovat toxiny, pokud není dodržena teplota a doba skladování (ACMSF, 1992; TOLDRÁ, 2010; SVOBODOVÁ, 2014). Poradní výbor pro mikrobiologickou bezpečnost potravin ACMSF (1992) doporučuje a vyzývá vakuově balené vařené masné výrobky s trvanlivostí delší než 10 dní skladované v chladu tepelně opracovat po dobu 10 minut při 90 °C (6 D redukce psychrotrofního *C. botulinum*), nebo ke snížení a_w do 0,97 (což odpovídá 3,5 % NaCl) nebo méně; nebo aby se snížilo pH na 5,0; nebo použít kombinaci vnějších a vnitřních faktorů schopných poskytnout odpovídající jistotu proti psychrotrofním kmenům *C. botulinum*.

Zahříváním masných výrobků s obsahem dusitanů vznikají sloučeniny, které jsou pro mikroby toxičtější než samotné dusitany, např. kyselina dusná, dusíkaté sloučeniny železa a síry a také oxid dusnatý. Právě ten narušuje fosforylační systém buněk *C. botulinum*, který slouží pro tvorbu intracelulárního ATP, jehož nedostatek vede k zastavení růstu a klíčení spor. Přídavek dusitanů tedy inhibuje *C. botulinum*, ale pouze proteolytické kmeny (SVOBODOVÁ, 2014).

Bacillus cereus byl potvrzen Národní referenční laboratoří v roce 2008 u 11 % vyšetřovaných vzorků paštik. Hodnoty vyšší než 10^3 KTJ/g byly prokázány u 3 % vzorků. Důležitým opatřením je výrobky po pasteraci rychle zchladit, aby nedocházelo k množení mikroorganismů (BRYCHTA et al., 2009). Doporučuje se dosáhnout 10 °C během dvou až tří hodin (FERNANDES, 2009). Stejně opatření platí i pro *Clostridium perfringens* (POUMEYROL et al., 2010).

Salmonella spp., *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* a *Yersinia enterocolitica* by měly být při dodržení správného tepelného opracování zničeny, ale mohou výrobek znovu kontaminovat (POUMEYROL et al., 2010), stejně jako např. *Campylobacter jejuni* (FERNANDES, 2009).

Nálezy salmonel u vařených masných výrobků v tržní síti v ČR nejsou příliš časté, ale dokládají význam kontaminace při krájení (KAMENÍK et al., 2014a). *Staphylococcus aureus* lze snadno najít v krájených tepelně opracovaných masných výrobcích, které jsou zabalené vakuově nebo v modifikované atmosféře. Jeho počty jsou však obvykle nízké vzhledem k působení konkurenční mikroflóry reprezentované zejména BMK (ICMSF, 2005; FEINER, 2006). Mnoho ohnisek stafylokokové otravy bylo způsobeno vařenými masnými výrobky solenými solící směsí, zejména šunkou, která byla kontaminována při krájení a potom uchovávána při pokojové teplotě na vzduchu po dobu několika hodin před konzumací (ICMSF, 2005).

Listerie dobře přežívají ve výrobním prostředí, je tedy třeba při manipulaci zabránit přenosu na výrobek. Vařené masné výrobky (paštiky, tlačěnka, šunka), zejména ty krájené, patří mezi nejčastěji kontaminované skupiny masných výrobků. Prevalence *L. monocytogenes* v tržní síti v ČR je často poměrně vysoká, ale naprostá většina vzorků nepřesáhla 100 KTJ/g (KAMENÍK et al., 2014a). *L. monocytogenes* byla ve Spojených státech nalezena u 1,6 % vzorků a přibližně 90 % těchto izolátů byl sérotyp 1/2a. V rozsáhlé studii luncheonmeatu v Marylandu a Kalifornii byla *L. monocytogenes* nalezena přibližně v 1 % vzorků (JAY et al., 2005). Žádné listerie nebyly izolovány z vídeňských párků po pasteraci ve studii, kterou provedl FRANZ (1996).

3.9 Polokonzervy

Polokonzerva je výrobek neprodyšně uzavřený v obalu, pasterovaný za podmínek stanovených zvláštním právním předpisem. Polokonzerva musí být tepelně ošetřena ve všech částech na teplotu, jejíž účinky odpovídají účinkům teploty 100 °C, působící po dobu nejméně 10 minut (VYHLÁŠKA 159/2014 Sb.). Mezi polokonzervy se řadí velká část párků v konzervě (pokud nepatří mezi konzervy), např. frankfurtské párky, kostelecké párky a dále šunky v plechových, popř. v plastových obalech, či moravské klobásy (KADLEC et al., 2009).

Používané teploty ničí vegetativní buňky patogenů, ale určité termorezistentní mikroorganismy a spory mohou stejně jako u tepelně opracovaných masných výrobků přežívat. Polokonzervy se proto musí skladovat v chladu. Mikroflóra polokonzerv je

tedy podobná mikroflóra tepelně opracovaných masných výrobků, ale kvůli vyšším používaným teplotám nebo dalším bariérám (pH) mají delší dobu trvanlivosti. Pokud bychom chtěli zničit vegetativní buňky spolu se sporami, museli bychom použít sterilaci (KLINTH JENSEN et al., 2004).

3.10 Trvanlivé tepelně opracované masné výrobky

Jsou to výrobky, u kterých bylo ve všech částech dosaženo minimálně tepelného účinku odpovídajícího působení teploty 70 °C po dobu 10 minut a navazujícím opracováním (zráním, uzením nebo sušením) došlo k jejich vysušení tak, aby byla prodloužena minimální trvanlivost na 21 dní při teplotě skladování 20 °C (VYHLÁŠKA MZE č. 159/2014 Sb.). Do této skupiny patří trvanlivé tepelně opracované salámy, např. salám vysočina, selský salám, nebo také turistický trvanlivý salám (KAMENÍK, 2012).

Mikroflóra trvanlivých tepelně opracovaných masných výrobků dominují BMK, které také často způsobují kažení. Ke kontaminaci může dojít sekundárně, při balení nebo krájení, protože většinou nepřežívají záhřev při tepelném opracování. Některé termorezistentní druhy, zejména *Weissella viridescens*, která byla označena za hlavního původce kažení těchto výrobků, však mohou přežít i tepelné opracování a následné sušení, a ve vhodných podmínkách se mohou dále množit (KAMENÍK et al., 2014).

Kombinace tepelného opracování a snížení a_w zajišťuje těmto výrobkům mikrobiální stabilitu. To potvrzuje studie trvanlivých tepelně opracovaných masných výrobků z tržní sítě v letech 2005 až 2011, kdy nebyl ani jeden vzorek pozitivní na přítomnost salmonel (HULÁNKOVÁ, 2013). Krájené a balené výrobky se však doporučuje skladovat při chladírenských teplotách (FEINER, 2006).

3.11 Trvanlivé fermentované masné výrobky

Jsou to tepelně neopracované výrobky určené k přímé spotřebě, u kterých v průběhu fermentace, zrání, sušení, popřípadě uzení došlo k jejich vysušení tak, aby byla prodloužena minimální trvanlivost na 21 dní při teplotě skladování 20 °C (VYHLÁŠKA MZE č. 159/2014 Sb.). Trvanlivé fermentované masné výrobky lze rozdělit na trvanlivé fermentované salámy, např. poličan, Herkules, dunajská klobása, lovecký salám, paprikáš; a na celosvalové výrobky, např. trvanlivé šunky nebo sušená masa (KAMENÍK, 2012).

Technologie výroby sestává z těchto úseků: mělnění masa, míchání díla, narážení, zrání, sušení a uzení. Takto vyrobené masné výrobky jsou podrobené činnosti

mikroorganismů, což jim propůjčuje specifické senzorycké vlastnosti ceněné spotřebiteli. Na druhé straně to představuje zvýšené nároky při výrobě z hlediska hygienického a technologického (STEINHAUSER et al., 1995).

3.11.1 Fermentované salámy

Překážky růstu nežádoucích mikroorganismů

Počáteční mikrobiální populace salámového díla je vysoce variabilní a závisí na mikrobiálním zatížení masa a na podmínkách jeho skladování. V aerobním chlazeném prostředí rostou zejména gramnegativní psychrotrofní bakterie, jako jsou *Pseudomonas* spp. (např. *P. fragi*, *P. fluorescens* a *P. lundensis*) a některé bakterie z čeledi *Enterobacteriaceae* (např. *Hafnia alvei*, *Serratia liquefaciens* a *Enterobacter agglomerans*) (FERNANDES, 2009).

Dle KAMENÍK (2012) je trvanlivost a hygienická nezávadnost výrobků zajištěna řadou vzájemně se doplňujících faktorů („překážek“), které se postupně vytvářejí během celého výrobního procesu. Tyto bariéry jsou blíže popsány v následujících bodech.

- Jako první překážka se v díle objevuje dusitanová solící směs. NaCl snižuje počáteční vodní aktivitu masa na hodnotu 0,96 až 0,97. Dusitan zablokuje růst rychle rostoucích gramnegativních mikrobů, zejména rodu *Pseudomonas*. Růst salmonel, *Listeria monocytogenes* a *Escherichia coli* inhibuje již v koncentraci 125 mg dusitanu/kg díla, této koncentrace je dosaženo přidáním 2,5 % dusitanové solící směsi do díla. Dusitan inhibuje také bakterii *Clostridium botulinum*.
- Jako další překážka se uplatňuje redoxní potenciál (Eh). Při mělnění a míchání díla se do vznikající směsi dostává vzdušný kyslík, který zvyšuje hodnotu Eh. Naopak přidavek kyseliny askorbové, askorbátu sodného a sacharidů redoxní potenciál snižuje. K dalšímu poklesu hodnoty Eh dochází při fermentaci. V této fázi dochází k inhibici především gramnegativních aerobních a fakultativně anaerobních tyčinek (čeleď *Pseudomonaceae* a *Enterobacteriaceae*).
- Další překážku představuje pomnožení BMK. Jde o kompetitivní působení konkurenční mikroflóry a spolu s tím i produkce antimikrobiálních látek.

Pokračujícím procesem zrání nastupuje jedna z nejvýznamnějších překážek, pro trvanlivost salámů vůbec rozhodující, a to pokles hodnot vodní aktivity z původní hodnoty v díle (0,96) na 0,9 až 0,8 i méně (STEINHAUSER et al., 1995).

Trvanlivé fermentované salámy analyzované v roce 2013 obsahovaly průměrně $2,6 \cdot 10^5$ KTJ/g CPM; $1,5 \cdot 10^4$ KTJ/g psychrotrofních bakterií; $2,6 \cdot 10^2$ KTJ/g termorezistentních bakterií; $2,2 \cdot 10^7$ KTJ/g BMK a $7,3 \cdot 10^3$ KTJ/g enterokoků. V žádném ze vzorků se nevyskytovaly kvasinky ani plísňe (BURDOVÁ, 2013). Přídavek jeleního masa ke stejné receptuře v množství 5 % nijak významně neovlivnil celkový počet mikroorganismů ani počet BMK. Psychrotrofních bakterií a enterokoků bylo zjištěno méně u salámů s přídavkem jeleního masa, termorezistentní bakterie se naopak u salámů s přídavkem jeleního masa vyskytovaly ve vyšším počtu (JÚZL et al., 2013).

Hlavní vady fermentovaných salámů a jejich příčiny z mikrobiálního hlediska

Mezi změny způsobené rozvojem nežádoucích mikroorganismů podle TOLDRÁ (2002) patří změna barvy, hniloba a rozvoj plísní. FERNANDES (2009) sem dále řadí povrchové osliznutí a nadměrnou kyselost. Dle KAMENÍK (2012) lze doplnit dírkovitost a výkvěty na povrchu fermentovaných salámů. Tyto změny jsou podrobněji popsány v následujících bodech.

- Díky bakteriálním kmenům schopným produkce peroxidu vodíku (některé druhy BMK) se může u fermentovaných salámů objevit určité zbarvení nebo může dojít ke změně barvy (TOLDRÁ, 2002).
- Hnilobný zápach se může rozvinout díky působení fakultativně anaerobních bakterií. Zápach je obvykle doprovázen šedým či zeleným zbarvením salámů. Mezi možné příčiny hniloby patří: nedostatečná hygiena, kontaminace jatečně upraveného těla na jatkách, použití masa s vysokým pH (DFD), nesprávné chlazení při mēlnění a míchání díla, fermentace s nedostatečným poklesem pH, nebo nerovnoměrné sušení (TOLDRÁ, 2002).
- Nežádoucí plísňe mohou znehodnotit výrobek, nebo může dokonce dojít k produkci mykotoxinů (TOLDRÁ, 2002). *Cladosporium* způsobuje černé skvrny na salámech. K detekci *Cladosporium oxysporum* v masných výrobcích lze využít real-time PCR (LOZANO-OJALVO et al., 2015).
- Příčinou osliznutí je tvorba biofilmu na obalu, který se tvoří kvůli vysoké teplotě při fermentaci, nízké teplotě během zrání anebo kvůli kondenzaci vody pod obalem (FERNANDES, 2009). Osliznutí způsobují bakterie mléčného kvašení a kvasinky (JAY et al., 2005).

- Nežádoucí metabolická aktivita laktobacilů, vyvolaná přidávkem nadměrného množství fermentovatelných cukrů ve spojení s nedostatečným sušením a zvýšením zrací anebo skladovací teploty, má za následek zvýšení obsahu kyseliny mléčné a kyseliny octové (FERNANDES, 2009).
- Dírkovitost vzniká, když se do díla přidá nadměrné množství cukrů a při zrání působí vysoká teplota a silně proudí vzduch. Laktobacily heterofermentativně kvasí cukry, přičemž mimo jiné produkují CO₂, který vytváří dírky v díle. Aroma může být po kyselině octové (KAMENÍK, 2010).
- Bělavé „výkvěty“ (eflorescence) na povrchu salámů se tvoří především kvůli změnám rosného bodu během skladování balených výrobků. Výkvěty jsou tvořeny racemickým mléčnanem hořečnatým, pocházejícím z mikrobiální činnosti, nebo kreatinem původem z masa (KRÖCKEL et al., 2003).

Mikroorganismy způsobující alimentární onemocnění ve fermentovaných masných výrobcích

Mezi patogeny, které mohou představovat u fermentovaných salámů potenciální riziko a jsou nejčastěji spojovány s alimentárním onemocněním spojeným s konzumací těchto výrobků, patří *Salmonella* spp., *S. aureus*, *L. monocytogenes* a *E. coli* (FERNANDES, 2009).

Vysoký obsah soli (kolem 2,5 %) inhibuje růst patogenů a v průběhu sušení odumírají *Salmonella* spp. a další bakterie z čeledi *Enterobacteriaceae* (FORSYTHE, 2000). V trvanlivých fermentovaných masných výrobcích z tržní sítě v letech 2005 až 2011 však bylo 1,8 % vzorků pozitivních na přítomnost salmonel (HULÁNKOVÁ, 2013). Nejčastěji se jedná o *S. typhimurium* DT 124 a *S. typhimurium* PT 193 (DIKEMAN, DEVINE, 2014).

Přestože je *Staphylococcus aureus* rezistentní vůči dusitanu a soli, nedokáže při anaerobních podmínkách v kyselém prostředí konkurovat ostatní mikroflóře (FORSYTHE, 2000).

Listeria monocytogenes je inhibována nízkým pH, konkurenční mikroflórou a pomocí antimikrobiálních sloučenin. Počet *L. monocytogenes* se snižuje s prodlužující se dobou zrání (TOLDRÁ, 2002).

Verotoxigenní kmeny *E. coli* byly u syrových hovězích masných výrobků přítomné u 3,8 % vzorků (KAMENÍK et al., 2014a). S ohledem na potencionální riziko onemocnění *E. coli* O157:H7, mají jednotlivé země stanoveny bezpečnostní opatření

k jeho eliminaci. V USA je vyžadován pokles o 5 log během fermentace, v Austrálii je vyžadován pokles o 3 log během zrání a sušení. Tradiční postupy však nejsou schopny způsobit takto významný pokles, proto se v těchto zemích používají další překážky, např. využití vysokého tlaku, používání antimikrobiálních látek nebo ozařování suroviny. V EU však některé tyto postupy nejsou povolené, zdravotní nezávadnost potravin je zajišťována pomocí systému HACCP a pomocí správné výrobní praxe (SVP) (STEINHAUSEROVÁ, 2014).

Přítomnost *C. botulinum*, *C. perfringens* a *Bacillus* spp. je vyloučena působením dusitanu v kombinaci s poklesem pH a a_w . *Y. enterocolytica* je inhibována stejným způsobem jako salmonely (FERNANDES, 2009).

Ve studii BOVOLENTA et al. (2008) týkající se fermentovaného masného výrobku, vyrobeného bez startovacích kultur a bez přídavku dusičnanu nebo dusitanu, nebyla v průběhu doby údržnosti izolována *Salmonella* spp. Koagulázopozitivní stafylokoky byly nalezeny ve dvou vzorcích odebraných z výchozího díla, v jednom výrobku na konci doby sušení a ve třech vzorcích během doby údržnosti. Úroveň kontaminace však byla vždy nižší než 10^4 KTJ/g, což je považováno za přijatelné (BOVOLENTA et al., 2008). Doporučená kritéria pro fermentované masné výrobky Německé společnosti pro hygienu a mikrobiologii jsou uvedena v tabulce 5.

Tabulka 5 - Doporučená kritéria pro fermentované masné výrobky v KTJ/g (DGHM, 2011)

Mikroorganismus	Výrobek	Doporučení	Limit
<i>Enterobacteriaceae</i>	roztíratelné	log 2/g	log 3/g
	krájitelné	log 3/g	log 4/g
koagulázopozitivní stafylokoky		log 3/g	log 4/g
<i>E. coli</i>		log 1/g	log 2/g
<i>Salmonella</i>			nepřítomna ve 25 g
<i>L. monocytogenes</i>			log 2/g

3.11.2 Trvanlivé tepelně neopracované masné výrobky: Sušené šunky

Sušené šunky patří mezi nejstarší masné výrobky. Vyrábí se ze syrového celistvého masa konzervovaného přídavkem soli a snižováním hodnoty a_w v průběhu sušení. Mezi hlavní fáze zpracování tedy patří příjem šunky a předsolení, solení, zrání a sušení. Sůl

snižuje a_w , inhibuje růst mikroorganismů způsobujících kažení, napomáhá částečnému rozpuštění myofibrilním bílkovinám a šunce dává charakteristickou slanou chuť. Finální sušené šunky se skladují mimo chladírenské teploty a konzumují se s nebo bez předchozí tepelné úpravy (TOLDRÁ, 2010; KAMENÍK, 2012).

Protože se nezpracovaná kýta nebourá, vnitřek je považován na počátku výrobního procesu za sterilní. Ke kontaminaci může dojít během výroby (TOLDRÁ, 2007). Vady způsobené nežádoucím rozvojem mikroorganismů se dle TOLDRÁ (2002) v poslední době díky lepšímu stavu poznatků a lepší technologii nevyskytují tolik jako před několika desítkami let, ale jsou stále aktuální:

- Kyselost a abnormální zbarvení jsou stejně jako u trvanlivých fermentovaných salámů způsobeny BMK (TOLDRÁ, 2002).
- „Hniloba od kosti“ nebo „hluboká hniloba“ může vést ke ztrátě celé šunky. Dle GARCÍA et al. (2000) jsou za to zodpovědné *Serratia* spp. a *Proteus* spp.
- Zápach po fenolu je způsoben plísněmi rodu *Penicillium*, většinou *P. commune*. Zápach podobný pachu brambor nebo pachu země ve zkažených šunkách způsobuje 2-methoxy-3-isopropylpyrazin, který je produkován *Pseudomonas* (nově *Burkholderia*) *cepacia*. Preventivní opatření proti zápachu by měla zahrnovat kontrolu povrchového znečištění sporami, přidavek soli až ke kosti k inaktivaci potenciálně přítomných spor a zábranu kontaminace mikroorganismy během zrání (TOLDRÁ, 2002).
- Nekontrolovaný růst plísně na povrchu šunky během výroby může představovat nebezpečí pro zdraví spotřebitelů z důvodu možnosti produkce mykotoxinů. Ve studii PIETRI et al. (2006) věnované sušeným šunkám byla zkoumána přítomnost karcinogenního, nefrotoxického, imunotoxického, teratogenního a pravděpodobně i neurotoxického a genotoxického ochratoxinu A produkovaného některými druhy rodů *Aspergillus* a *Penicillium* ve 30 vzorcích sušených šunek. U 5 vzorků byla nalezena koncentrace přesahující 1 ng/kg.

Bezpečnost sušených šunek je zajištěna především prostřednictvím správného množství soli a dusitanu. Skutečnost, že se tyto výrobky obvykle před konzumací tepelně zpracují, dělá ze *Staphylococcus aureus* a *Clostridium* spp. nejvýznamnější patogeny kvůli tvorbě termostabilních toxinů (FERNANDES, 2009).

3.11.3 Trvanlivé tepelně nepracované masné výrobky: Sušené maso

Výroba sušeného masa je následující: velké kusy hovězího stehna nebo plece se nakrájí na tenké proužky a smíchají se s marinádou, která obsahuje sůl, sacharidy a koření, ale může obsahovat také dusitan, kvůli antimikrobiálním a antioxidačním účinkům. Maso je do marinády ponořeno na několik hodin, nebo se jí potře. Poté se maso udí a suší (HUI, 2012).

Při dodržení správné teploty, rychlosti a doby sušení (čímž se dosáhne snížení a_w na nebo pod hodnotu 0,86), by se neměly vyskytnout žádné problémy s výskytem patogenů. Sušení po dobu 10 hodin při 60 °C dokáže snížit *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes* a *Salmonella typhimurium* o pět až šest řádů. Při pomalém sušení a nedostatečné teplotě (pod 60 °C) však může přežít *S. aureus* (JAY et al., 2005).

3.12 Konzervy

Konzerva je výrobek neprodyšně uzavřený v obalu, sterilovaný za podmínek stanovených zvláštním právním předpisem tak, aby byla zaručena obchodní sterilita. Konzerva musí být tepelně ošetřena ve všech částech na teplotu, jejíž účinky odpovídají účinkům teploty 121 °C, působící po dobu nejméně 10 minut (VYHLÁŠKA MZE č. 159/2014 Sb.).

Konzervy jsou pravděpodobně nejefektivněji konzervované masné výrobky. Používají se konzervy o různých velikostech (TOLDRÁ, 2010) a z různých materiálů (PEARSON, GILLET, 1996). Při výrobě konzerv se kalkuluje s očekávanou dobou použitelnosti: od polokonzerv, které vyžadují další způsoby konzervace, přes pravé konzervy až k tropickým konzervám, které mají trvanlivost 4 roky při 25 °C respektive 1 rok při 40 °C (TOLDRÁ, 2010; DIKEMAN, DEVINE, 2014).

Při termosterilaci nejde o to dosáhnout absolutní sterility, jedná se o sterilitu obchodní. Trvanlivost sterilovaných potravin je značně delší i bez použití dalších konzervačních metod. Sterilační režim závisí na termorezistenci indikátorových mikroorganismů; pro masné výrobky se obvykle bere v úvahu *Clostridium botulinum* a *C. sporogenes* (HUI, 2012).

Při hodnocení účinnosti tepelných procesů se používá koncept času a teploty potřebný k usmrcení mikroorganismů. F-hodnota vyjadřuje čas, který je při teplotě 121 °C potřebný k dosažení určitého letálního efektu, hodnota F_0 představuje čas v minutách, potřebná pro dosažení sterility při teplotě 121 °C. D-hodnota je čas v minutách potřebný při dané teplotě k decimální redukci. Z-hodnota definuje,

o kolik °C se musí zvýšit teplota, aby se desetinásobně zvýšila úmrtnost mikroorganismů (LAWRIE, LEDWARD, 2006).

Nežádoucí změny díky růstu mikroorganismů mohou nastat, pokud není konzerva po naplnění dostatečně rychle uzavřena. Tepelné zpracování konzerv nesmí být provedeno později než do 20 minut po uzavření plechovky. Pokud není tepelné opracování dostatečné, mikroorganismy mohou způsobit vydutí, okyselení, nebo změny v chuti a vůni masových konzerv. Když ochlazování není prováděno dostatečně rychle, dochází k růstu termofilních druhů (DIKEMAN, DEVINE, 2014).

Kažení komerčně sterilovaných masných výrobků nesolených solící směsí je výsledkem buď přežití termorezistentních spor nebo kontaminací přes netěsnosti plechovek (FERNANDES, 2009). U komerčně sterilních výrobků solených solící směsí se uplatňuje jako další překážka proti mikroorganismům (*C. botulinum*) kromě teploty také dusitan (TOLDRÁ, 2010).

Rekontaminace masových konzerv po tepelném opracování je jeden z nejrozšířenějších problémů a může způsobit bombáž konzerv (DIKEMAN, DEVINE, 2014). Konzervy mohou být kontaminovány mikroorganismy vstupujícími dovnitř přes dírkou (buď z defektu konzervy nebo díky vnější korozi), vadné švy (z nesprávné výroby nebo uzavření konzervy), nebo pomocí tmelu, který utěsňuje konce k tělu konzervy (FERNANDES, 2009).

Největší nebezpečí pro konzervy představuje bakterie *Clostridium botulinum*, která je izolována z půdy a vody prakticky z celého světa a při růstu tvoří smrtelný toxin. Je to patogen s velkou tepelnou rezistencí (vzhledem k produkci termorezistentních spor) a v konzervách je anaerobní prostředí, které mu vyhovuje. Ve výrobcích s nízkým pH (pod 4,6), jako jsou dostatečně okyselené masné výrobky, spory *C. botulinum* nemohou vyklíčit (HUI, 2012). Většina masových konzerv má však pH nad 6,5, je tedy třeba důsledně dodržovat teplotní proces (TOLDRÁ, 2010), založený na konceptu 12 D – zahřátí na 121 °C/3 minuty, což zredukuje *C. botulinum* o 10^{-12} (SVOBODOVÁ, 2012). Složení masných výrobků také ovlivňuje účinnost tepelného ošetření – bílkoviny a tuk jsou špatné vodiče tepla (DIKEMAN, DEVINE, 2014; SVOBODOVÁ, 2014). Tepelná rezistence spor se zvyšuje s rostoucí a_w a klesá s extrémním pH (SVOBODOVÁ, 2014).

Pokud jsou konzervy tepelně opracované na 12D redukci pro *C. botulinum* a ne pro *C. sporogenes*, které přežívá vyšší teploty, mohou termorezistentní spory *C. sporogenes* přežít. Při skladování za vysokých teplot mohou vyklíčit a tato proteolytická a plynotvorná bakterie může způsobit deformaci plechovky či dokonce bombáž (FERNANDES, 2009).

Mezi mikroorganismy způsobujícími kažení masových konzerv patří také *C. thermosacharolyticum*, jehož spory mohou přežít i při velmi vysokých teplotách; z psychrofilních *Pseudomonas* spp. a *Achromobacter* spp., z mezofilních *E. coli* a *Bacillus subtilis*; dále fakultativní termofil *Streptococcus thermophilus* a *C. perfringens* a striktně termofilní *Bacillus stearothermophilus* (TOLDRÁ, 2010; DIKEMAN, DEVINE, 2014).

Za kažení konzerv mohou být odpovědné také plísně. Z 13 druhů masových konzerv prodávaných v Saudské Arábii, byly *Aspergillus* spp. a *Penicillium* spp. izolovány u více než 70 % vzorků. U většiny vzorků nebyly detekovány žádné bakterie, s výjimkou rodu *Bacillus* (u 5 vzorků, do $2 \cdot 10^1$ KTJ/g). V jednom vzorku byly přítomny kvasinky $4,2 \cdot 10^4$ KTJ/g (NASSER, 2014).

3.13 Mikroorganismy používané ve výrobě

Kromě saprofytických a patogenních mikroorganismů existují mikroorganismy žádoucí, jejichž činnosti se využívá při výrobě fermentovaných masných výrobků. Startovací kultury jsou vyšlechtěné kultury mikroorganismů přirozeně se vyskytující v surovinách a potravinách, které štěpí cukry na organické kyseliny a produkují nízkomolekulární látky, čímž se podílejí na vůni a chuti fermentovaných výrobků (LUKÁŠOVÁ, 2004).

Ačkoliv lze vyrábět fermentované masné výrobky i bez přídavku startovacích kultur, pouze s pomocí mikroflóry přítomné v díle, většinou se startovací kultury používají, protože umožňují výrobu standardních a bezpečných výrobků (TOLDRÁ, 2007).

3.13.1 Vlastnosti startovacích kultur

Startovací kultury musí být kontrolovány a musí být zaručena jejich identita, a to nejen na úrovni druhu, ale i kmene. V posledních letech se používají efektivní molekulární metody, které umožňují rychlé a citlivé určení kmene, např. pulzní gelová elektroforéza, profilování plazmidů, polymorfismus v délce amplifikovaných fragmentů a náhodně amplifikovaná polymorfní DNA – PCR (TOLDRÁ, 2007).

Vhodnost potenciálních startovacích kultur určují zejména tyto faktory: tvorba bakteriocinů, absence aminokyselinové dekarboxylační aktivity, netoxigenita, citlivost k antibiotikům a absence přenosné antimikrobiální rezistence (TOLDRÁ, 2007). Dle GÖRNER, VALÍK (2004) musí být startovací kultury také halotolerantní a nitritotolerantní ($> 6\% \text{ NaCl}$, $> 100 \text{ mg NO}_2/\text{kg}$) a musí růst v rozmezí teploty 27 až 43 °C s optimem při 32 °C, ale i při nižších teplotách.

Bakteriociny

Bakteriociny jsou extracelulární sloučeniny bílkovinné povahy, které vykazují určité antibakteriální vlastnosti vůči některým mikroorganismům (VESKOVIČ-MORAČANIN, 2010). Antimikrobiální účinek bakteriocinů je způsoben narušením buněčné stěny nebo buněčné membrány cílových organismů, což má za následek jejich smrt (O'SULLIVAN et al., 2003). Mohou být přidány do díla, nastříkány na povrch, nebo jsou přidávány prostřednictvím aktivního obalu (NOLETT, TOLDRÁ, 2006).

V současné době jsou široce používány pouze nisin a pediocin PA-1/AcH (TOLDRÁ, 2007). Většina grampozitivních bakterií je citlivých na nisin, včetně mnoha druhů *Staphylococcus*, *Clostridium*, *Listeria* a *Bacillus*. Gramnegativní bakterie jsou chráněny jejich vnější membránou, ale citlivost na nisin se může zvýšit v kombinaci s chelatační EDTA (TURGIS et al., 2012). Kombinace nisinu s jinou antimikrobiální látkou může zvýšit antimikrobiální účinek (nisin a ϵ -polylysin proti *E. coli*, *B. subtilis* a *S. aureus*; nisin a esenciální olej z *Origanum vulgare* proti *Salmonella*) (TURGIS et al., 2012; LIU et al., 2015). Pediocin PA-1 je účinný proti *L. monocytogenes* (KERRY, KERRY, 2011; TURGIS et al., 2012), *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Serratia liquefaciens* a *Pseudomonas fluorescens* (TURGIS et al., 2012).

Mezi další bakteriociny, které byly úspěšně aplikované do masných výrobků za účelem biokonzervace, patří např. sarcin, enterocin, lactocin, lacticin, reuterin, planataricin (NOLLET, TOLDRÁ, 2006) a bakteriociny MT 104b a MT 162b produkované *Enterococcus faecium* (TURGIS et al., 2012). Bylo však identifikováno mnoho dalších bakteriocinů nebo lantibiotik (KERRY, KERRY, 2011).

Biogenní aminy

Fermentované salámy představují jednu z potravin, která může obsahovat vyšší obsah biogenních aminů (BA). Jsou to dusíkaté nízkomolekulární látky s biologickými funkcemi, vznikající převážně bakteriální dekarboxylací aminokyselin (LATORRE-MORATALLA et al., 2012).

BA při vyšším množství přijatém v potravinách mohou působit toxicky. Histamin vyvolává hypotenzi, zčervenání, bolest hlavy, arytmii, bušení srdce, návaly pocení, kopřivku, křeče v břiše, nevolnost a zvracení. Zvýšený příjem tyraminu může způsobit hypertenzi, bolest hlavy a migrény, krvácení do mozku a selhání srdce.

Podle EEROLA et al. (1998) je tyramin obvykle nejvýznamnější BA ve fermentovaných masných výrobcích. Dle RAVISHANKAR, JAMUNA (2015) se taky mohou vyskytnout histamin, fenyletylamin, tryptamin, putrescin a kadaverin. Podle KALHOTKA et al. (2012) bylo v čerstvě vyrobených fermentovaných salámech Poličan množství BA nízké, přičemž spermidin, spermin a tyramin byly kvantitativně nejpočetnější. Během zrání se množství BA zvyšovalo. Významný rozdíl byl zjištěn u tyraminu, jehož obsah na konci zrání přesahoval 100 mg/kg, což může představovat riziko pro citlivé jedince.

Dávky BA v potravinách, které působí toxicky, je obtížné určit, neboť významnou roli hrají individuální odlišnosti mezi lidmi a přítomnost jiných aminů. Toxická dávka v potravinách je pro tyramin 100 až 800 mg/kg, pro histamin 100 mg/kg a pro fenyletylamin 30 mg/kg. Pro ostatní BA nebyly limitní hodnoty stanoveny (CWIKOVÁ, 2009).

Tvorba BA je obranným mechanismem mikroorganismů vůči kyselému prostředí. Ve fermentovaných masných výrobcích je za rostoucí množství BA zodpovědná spíše kontaminující mikroflóra (např. *Pseudomonas*, *Enterococcus* a enterobakterie), než startovací kultury (TARTÉ, 2009; RAVISHANKAR, JAMUNA, 2015). Bylo zjištěno, že 10 až 20 % izolátů fermentační mikroflóry včetně BMK a grampozitivních katalázopozitivních koků má aminogenní potenciál (RAVISHANKAR, JAMUNA, 2015).

3.13.2 Aplikace a složení startovacích kultur

Startovací kultury se mohou aplikovat v mraženém, lyofilizovaném nebo tekutém stavu (FEINER, 2006; KAMENÍK, 2010). Startovací kultury přidávané do díla musí být v počtu alespoň 10^7 /g díla. Kromě mikrobiální biomasy a nosného materiálu startovací kultury obvykle obsahují kryoprotektanty (např. glutamát sodný, sacharóza a laktóza) a mangan (růstový faktor pro laktobacily). Počet nežádoucích bakterií ve startovacích kulturách by neměl překročit 10^3 /g kultury. Některé bakterie, jako je *Clostridium* spp. a *Salmonella* spp. nesmí být přítomny vůbec (FEINER, 2006). Kultury se do díla přidávají na začátku míchání v kutru (KAMENÍK, 2010).

Plísňové startovací kultury se obvykle aplikují ve formě lyofilizovaných spor nebo kapalných koncentrátů spor rozprášením na povrch výrobku, nebo se výrobek před zráním ponoří do suspenze konidií. Kvasinky mohou být také použity jako povrchové kultury, nebo mohou být přímo přimíchány do díla. To vede k vývoji barvy a chuti a zvýšení hodnoty pH (TARTÉ, 2009).

3.13.3 Používané startovacích kultury

Komerční startovací kultury v Evropě jsou obecně tvořeny vyváženou směsí BMK, koagulázonegativních koků a některými dalšími členy čeledi *Mirococcaceae*. Ve středomořských zemích je povrch výrobku inokulován kvasinkami a plísněmi, na rozdíl od severních technologií, ve kterých se používá udící kouř. Ve spontánně fermentovaných evropských masných výrobcích převažují homofermentativní laktobacily, *Lactobacillus sakei* a *Lactobacillus curvatus* (TOLDRÁ, 2007).

Bakterie mléčného kvašení

Bakterie mléčného kvašení (BMK) zahrnují 13 rodů grampozitivních bakterií: *Carnobacterium*, *Oenococcus*, *Enterococcus*, *Pediococcus*, *Lactococcus*, *Paralactobacillus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Lactosphaera*, *Tetragenococcus*, *Leuconostoc*, *Vagococcus* a *Weissella* (JAY et al., 2005).

Rod *Lactobacillus* zahrnuje více než 100 různých druhů, ale jen málo z nich slouží jako startovací kultury. Obvykle se používají fakultativní heterofermentativní laktobacily *L. sakei*, *L. curvatus* a *L. plantarum*. Ve většině studií *L. sakei* tvořil více než 55 % z celkové populace BMK (TOLDRÁ, 2007).

Pediokoky jsou grampozitivní koky, tvořící tetrády. Rod se skládá v současné době z devíti druhů, ale jen *P. pentosaceus* se obvykle používá jako startovací kultura (TOLDRÁ, 2007). Dle FEINER (2006) se používá také *P. acidilactici*.

BMK jsou schopné růst v uzeninách při takových podmínkách, které potlačují růst nežádoucích gramnegativních aerobních bakterií (dusitan, udící kouř, CO₂, vysoké koncentrace soli, nízká a_w a nižší pH). BMK produkují kyselinu mléčnou, která působí mikrobicidně na růst patogenních bakterií, zejména na enterotoxinogenní salmonely a na *Staphylococcus aureus* (GÖRNER, VALÍK, 2004).

BMK mají dlouhou historii bezpečného používání. Rody *Lactococcus* a *Lactobacillus* jsou obecně považovány jako bezpečné (GRAS), avšak někteří členové rodu *Enterococcus* jsou oportunními patogeny (RAVISHANKAR, JAMUNA, 2015).

Čeledi *Micrococcaceae* a *Staphylococcaceae*

Zástupci čeledi *Micrococcaceae*, jako *Micrococcus varians* (nyní známý jako *Kocuria varians*), *M. candidus*, *M. aquatilis*, a zástupci čeledi *Staphylococcaceae*, jako *Staphylococcus carnosus* (FEINER, 2006), *S. xylosus*, *S. equorum* a *S. saprophyticus*, jsou také přidáváni do startovacích kultur (TOLDRÁ, 2007). Mikrokoky jsou striktně aerobní bakterie a jsou pouze slabě aktivní během kvašení na okraji výrobku. Stafylokoky jsou fakultativně anaerobní a působí i v jádře. Z tohoto důvodu se tyto bakterie nejčastěji přidávají v kombinaci (FEINER, 2006).

Mikrokoky a stafylokoky mají slabší schopnost fermentovat sacharidy na kyselinu mléčnou, ale produkují enzym kataláza, který štěpí nežádoucí peroxidy, které způsobují změnu barvy. Redukují dusičnan na dusitan (GÖRNER, VALÍK, 2004; FEINER, 2006). Navíc se má za to, že růst vybraných kmenů *Kocuria* a *Staphylococcus carnosus*, nezbytných pro senzorické vlastnosti, není ovlivněn bakteriociny (NOLLET, TOLDRÁ, 2006).

Plísně a kvasinky

Plísně přispívají k charakteristické chuti a vzhledu výrobků. Inokulace žádoucích plísní navíc pomáhá zabránit růstu nežádoucích plísní, které produkují mykotoxiny, nebo které vedou k nepřijatelné kvalitě produktů. Často se používají netoxinogenní a technologicky vhodné kmeny *Penicillium chrysogenum* a *P. nalgiovense* (TARTÉ, 2009).

Přítomnost protektivní kultury *P. nalgiovense* v hodnotách vyšších než 10^6 KTJ/g inhibuje růst toxigenních plísní, které produkují aflatoxiny, OTA, patulin, sterigmatocystin a verrucosidin a další mykotoxiny (BERNÁLDEZ et al., 2013). I přesto, že je *P. nalgiovense* označen jako bezpečný, pokud jde o produkci nejčastějších mykotoxinů, může být jeho bezpečnost kmenově specifická. Kmeny S1-2 a S14-4 byly za testovaných podmínek netoxigenní (LUDEMANN et al., 2009).

Různé kmeny *P. gladioli* jsou také považovány za přijatelné, protože jsou netoxinogenní a poskytují optimální chuť a mají šedou barvu mycelia. I *P. camemberti* patří mezi vhodné startovací kultury pro masný průmysl (TOLDRÁ, 2007).

Chuť a barva může být zlepšena také použitím kvasinek, např. *Debaryomyces hansenii*, *Yarrowia lipolytica* a dalších (TARTÉ, 2009), avšak *D. hansenii* a její imperfektní forma *Candida famata* jsou nejpoužívanější. Druh je charakterizován vysokou tolerancí k soli, odolností vůči nízkému pH a a_w , aerobním nebo slabě fermentačním metabolismem a může růst při teplotách blízkých těm, které se používají při zrání fermentovaných salámů (TOLDRÁ, 2007).

NÚÑEZ et al. (2015) zjistil, že autochtonní izoláty *Debaryomyces hansenii* mohou být potenciálně vhodné k inhibici toxinogenních *Penicillium* (konkrétně ochratoxigenní *P. verrucosum*) ve fermentovaných salámech. *Debaryomyces hansenii*, *D. maramus*, *Candida famata*, *C. zeylanoides* a *Hyphopichia burtonii* byly VIRGILI et al. (2012) testovány na antagonistickou aktivitu proti toxinogennímu kmenu *P. nordicum* a na inhibici biosyntézy OTA. *H. burtonii* a *C. zeylanoides* byly nejúčinnější, nejpoužívanější *D. hansenii* se ale ukázal jako druh s nejnižší inhibiční aktivitou.

3.13.4 Funkční startovací kultury

I přes všechny výhody startovacích kultur lze najít několik omezení, např.: univerzálnost průmyslově vyráběných fermentovaných výrobků, potenciální nesoulad mezi použitou obchodní startovací kulturou a technologií výroby, přetrvávající mikrobiální nebezpečí a negativní pohled spotřebitelů na nutriční kvalitu fermentovaných masných výrobků. K překonání těchto omezení je předmětem zkoumání využívání nových funkčních startovacích kultur (TARTÉ, 2009).

V dnešní době je technicky možná produkce probiotických masných výrobků, nejčastěji probiotických salámů, avšak tyto zatím nejsou široce vyráběny (KHAN et al., 2011; WÓJCIAK et al., 2012; RUBIO et al., 2013; RAVISHANKAR, JAMUNA, 2015). Pro stimulaci růstu probiotik je možné přidat prebiotika, u masných výrobků se používají nejčastěji vláknina a oligosacharidy (NOLLET, TOLDRÁ, 2006).

Výběr probiotik by měl být proveden opatrně, protože metabolické funkce se liší mezi kmeny a závisí na použité technologii a přísadách (TARTÉ, 2009). Je však důležité, aby bakteriální kmeny použité jako probiotická kultura byly schopné přežít a dobře se adaptovat v reálných podmínkách (nativní mikroflóra masa, nízké pH a a_w , dusitan) a aby dominovaly ve finálním výrobku (RAVISHANKAR, JAMUNA, 2015).

V roce 2002 bylo pracovní skupinou FAO/WHO vypracováno Doporučení pro hodnocení probiotik v potravinách (Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food).

To navrhuje, aby probiotické kmeny byly charakterizovány následujícími testy:

- určení rezistence k antibiotikům,
- hodnocení některých metabolických aktivit,
- hodnocení vedlejších účinků během klinických zkoušek,
- pokud kmen patří k druhu, u něhož se vyskytuje produkce toxinů (vůči savcům), test na produkci toxinů,
- pokud kmen patří k druhu, u něhož se vyskytuje hemolytická aktivita, test na tuto aktivitu,
- hodnocení absence infektivitu u imunokompromitovaných zvířat.

Mezi probiotické bakterie používané ve výrobě fermentovaných a funkčních masných výrobků patří např. *Lactobacillus rhamnosus* GG, LC-705 a E-97800, *L. plantarum*, *L. curvatus* a *L. casei* LOCK 0908 a LOCK 0900. Netradiční masné startovací kultury zahrnují *L. acidophilus* LAFT1kL10, *L. paracasei* LAFT1kL26 a 5119, *Lactobacillus sp.* L24 a *Bifidobacterium lactis* LAFT1kB94. Mezi potenciální probiotické kmeny patří např. *L. acidophilus* Bauer, *L. casei* Bif3'/IV, *L. fermentum* HL57, *L. reuteri* PL519 a *Pediococcus acidilactici* SP979 (RAVISHANKAR, JAMUNA, 2015).

Ve studii provedené HOLKO et al. (2013), kde se startovací kultury nahradily probiotickými kmeny *Lactobacillus acidophilus* CCDM 476 a *Bifidobacterium animalis* 241a byly zjištěny srovnatelné technologické vlastnosti (při počtu laktobacilů $10^7/g$ a počtu bifido bakterií při počtu $10^3/g$ v konečném výrobku), avšak laktobacily jsou výhodnější než bifidobakterie, které ve výrobku po 60 dnech skladování už nebyly detekovatelné. Potenciální probiotické vlastnosti byly zjišťovány hodnocením počtu laktobacilů a bifidobakterií ve stolici konzumentů před a po 14 dnech konzumace. Počty laktobacilů se po konzumaci probiotického salámu výrazně zvýšily (HOLKO et al., 2013).

Masná matrice výrobku pomáhá chránit přežití probiotických laktobacilů v celém zažívacím traktu (KERRY, KERRY, 2011). Pro zajištění, že bude požadovaný počet probiotických mikroorganismů přítomný i ve finálním výrobku, či pro zabezpečení ochrany při průchodu zažívacím traktem, lze použít enkapsulaci. Ta však může negativně ovlivnit antimikrobiální vlastnosti probiotik (RAVISHANKAR, JAMUNA, 2015).

Minimální denní množství probiotických bakterií potřebné k průkaznému účinku na zdraví se pohybuje kolem 10^6 až 10^{10} živých mikrobů (NOLLET, TOLDRÁ, 2006). Denní konzumace 50 g probiotického salámu může účinně regulovat imunitní systém (KERRY, KERRY, 2011). Konzumace probiotik zlepšuje také poruchy zažívacího traktu a potravinové alergie (NOLLET, TOLDRÁ, 2006).

Cílem studie provedené WÓJCIAK et al. (2012) bylo zhodnotit vliv různého obsahu probiotického kmene *Lactobacillus casei* LOCK 0900 na kvalitu fermentovaných masných výrobků po zrání a při dlouhodobém skladování ve vakuu. Vzorek s 1.10^6 KTJ *L. casei/g* měl kvalitnější začlenění barev a lepší stabilitu lipidů proti oxidaci, než vzorek s 2.10^6 KTJ *L. casei/g*, který měl ale vyšší přežití BMK a nejvyšší celkovou kvalitu. Použití probiotických bakterií je zdraví prospěšné, ale na druhé straně může urychlit oxidaci lipidů v důsledku tvorby hydroperoxidu, takže snižuje trvanlivost.

Z výsledků studie TRZAŃSKOWSKA et al. (2014) lze dodat, že přídavek tohoto probiotického kmene (*Lactobacillus casei* LOCK 0900) ve vyšším množství (2.10^7 KTJ/g) je z hlediska mikrobiologické bezpečnosti výrobku výhodnější, neboť u vzorku s nižším přídatkem (1.10^6 log KTJ/g) se vyskytl nízký počet *S. aureus*, *E. coli* a *Enterobacteriaceae* (oproti nulovému výskytu těchto bakterií při vyšším přídatku). RUBIO et al. (2013) zjistil, že oba kmeny *Lactobacillus plantarum* 299V a *Lactobacillus rhamnosus* GG brání růstu bakterií z čeledi *Enterobacteriaceae* v průběhu celého procesu zrání.

Další přístup k výrobě zdravějších masných výrobků zahrnuje využití startovacích kultur, které jsou schopny produkovat mikronutrienty a nutraceutika, např. vitamíny a konjugovanou kyselinu linolovou (TARTÉ, 2009).

3.14 Boj proti mikroorganismům

K výrobě bezpečných potravin je třeba zajistit, že se mikroby nemohou množit na infekční dávky (v ideálním případě odumřou) a toxiny nejsou přítomny (FORSYTHE, 2000) V boji proti nežádoucí činnosti mikroorganismů se v potravinářském průmyslu používají biologické prostředky, fyzikální prostředky, chemické prostředky a jejich kombinace (ŠILHÁNKOVÁ, 2002).

Použití pouze jedné silné překážky může mít často negativní dopad na kvalitu výrobku. Použití více slabších překážek, které působí synergicky, vyústí v bezpečný produkt bez negativního vlivu na kvalitu (FEINER, 2006).

Bylo identifikováno a popsáno více než 50 potenciálních bariér, které ovlivňují konzervaci a kvalitu potravin (PEARSON, DUTSON, 1997). Dle FEINER (2006) patří mezi nejpoužívanější bariéry v masné výrobě tyto:

- nízké počáteční množství mikroorganismů v mase,
- skladování masa a masných výrobků při nebo pod 4 °C,
- vakuové balení a balení masných výrobků do modifikované atmosféry,
- hodnota a_w ,
- snížení redoxního potenciálu (výjimkou z tohoto pravidla jsou obligátně anaerobní bakterie *Clostridium* spp.),
- konzervační látky,
- přídavek konkurenční mikroflóry,
- správné tepelné opracování pasterovaných i sterilovaných masných výrobků,
- hygiena může být také považována za bariéru, i když je nemožné ji kvantifikovat (FEINER, 2006).

S hygienou souvisí tvorba biofilmů, které mohou negativně ovlivnit kvalitu i zdravotní nezávadnost výrobků (FRATAMICO et al, 2009). Dle KLINTH JENSEN et al. (2004) k tvorbě biofilmu dochází postupnými kroky, které jsou popsány v následujících bodech.

- Sorpce živin z potravy na povrch materiálu za vzniku kondicionálního filmu (FORSYTHE, 2000).
- Vratné uchycení buněk. Uplatňují se síly, které nejsou tak silné (např. van der Waalsovy síly, elektrostatické síly a hydrofobní interakce) a uchycení bakterií tedy jde zvrátit, např. opláchnutím. Do nevratného uchycení buněk jsou zapojeny i silnější síly (např. kovalentní a vodíkové vazby a silné hydrofobní interakce) a poté, co dojde k nevratnému uchycení je třeba k odstranění použít škrábání, drhnutí, čisticí prostředky a dezinfekci (GOULTER et al., 2009). K uchycení některých bakterií na povrch může dojít již po 20 minutách od kontaktu (SOFOS, 2009).
- Tvorba mikrokolonií a biofilmů s výrobou exopolymerních materiálů a modifikací mikroprostředí (KLINTH JENSEN et al., 2004).
- Periodické disperze, rekolonizace nebo odlučování buněk biofilmu (KLINTH JENSEN et al., 2004).

Mezi bakterie, které tvoří biofilm, patří např. druhy *Pseudomonas*, *Listeria*, *Salmonella*, *Campylobacter*, *Escherichia coli* a BMK. Mohou se vyskytovat jako smíšené kultury, ale většinou jeden druh dominuje. Tvorba biofilmu trvá do 24 hodin a přírůstek je během několika dní i několik milimetrů. Vazba biofilmu je silnější s časem, ale bakteriální buňky se mohou z vazby uvolnit a následně slouží jako další zdroje kontaminace na jiných površích nebo potravinách (SOFOS, 2009).

Nejlepší prevencí vzniku biofilmu je správné čištění a sanitace. V případě, že prevence selže, je nutné jeho odstranění. Odstranění a inaktivace biofilmu se dosáhne kombinací správného čištění a sanitačních prostředků, odpovídajícího expozičního času, vhodnou teplotou a velice důležitým řádným mechanickým odstraněním. Tato kombinace rozpouští biofilm a organický materiál, na kterém je uchycen, což umožňuje sanitačním prostředkům inaktivovat uvolněné citlivější buňky (SOFOS, 2009).

S tvorbou biofilmů souvisí také pojem *Quorum sensing*. Je to jev, při kterém mikroorganismy produkují určité malé molekuly (induktory), které se uvolní z buněk a hromadí se v životním prostředí. Při dosažení určité kritické úrovně (quorum), induktory vstoupí do dalších blízkých buněk a vyvolají určité měřitelné změny, jako je tvorba pigmentu či slizu. Induktory produkované většinou gramnegativních bakterií jsou např. acylhomoserinlaktony (JAY et al., 2003).

Mezi další bariéry rozvoje nežádoucích mikroorganismů patří např. působení vysokého tlaku na masné výrobky, nebo jejich ozařování. Ozáření masa přichází v úvahu pouze v zemích, ve kterých je ozařování potravin povoleno (KAMENÍK et al., 2014a). Vysoký tlak inaktivuje mnoho mikroorganismů, např. *C. jejuni*, *E. coli*, *L. monocytogenes* a *L. sakei*. Účinnost devitalizace závisí na velikosti tlaku a době jeho působení. Používá se tlak v rozmezí 400 až 1000 MPa po dobu 10 minut v závislosti na výrobku. CPM salámů se působením tlaku 400 MPa snížil přibližně o dva řády (ŠKORPILOVÁ et al., 2014).

4 MATERIÁL A METODY ZPRACOVÁNÍ

4.1 Charakteristika výrobků

Předmětem experimentální části této diplomové práce byla mikrobiologická analýza tepelně opracovaných masných výrobků, konkrétně paštik. Jedná se o jemné paštiky (ve skle a v plastovém obalu) a o hrubé paštiky (ve skle a v plastovém obalu), viz. obrázek 1. Zemí původu je Česká republika. První šarže byla vyrobena 14.11.2014, druhá šarže byla vyrobena 13.2.2015. Datum použitelnosti bylo u paštik ve skle 3 měsíce a u paštik balených v plastu 21 dní. Obě paštiky (hrubá i jemná) se mají dle etikety skladovat při teplotě do 5 °C a po rozbalení spotřebovat do 72 hodin.



Obrázek 1 - Vzorky paštik z první šarže

4.1.1 Jemná paštika

Složení uvedené na etiketě: vepřová játra, maso z vepřových hlav, vepřové sádlo, vývar, bramborový škrob, jedlá sůl, cibule, směs přírodního koření, stabilizátor E250, E450, zahušťovadlo E412, E407, E410, glukózový sirup, dextróza, aroma, látka zvýrazňující chuť a vůni E621, třtinový cukr.

Receptura:

Suroviny: 20 kg vepřová játra, 30 kg hřbetní sádlo nebo tučný bok (vařené), 20 kg vařené vepřové hlavy (vařené) a 30 kg vývar (celkem 100 kg).

Přísady na 1 kg díla:

- 15 g dusitanová solící směs (dusitanová vakuovaná nakládací sůl s jodem): chlorid sodný, draslík, vápník, hořčík, dusitan sodný E250, jodičnan draselný, protispékavá látka E535;
- 6 g Compound L1 emulgátor: zahušťovadla E412, E407, E410, glukózový sirup, stabilizátor E450, jedlá sůl;
- 4 g Diamant směs koření na paštiku: koření, dextróza, látka zvýrazňující vůni a chuť E621, kořenící aroma (muškátový ořech, pepř, kardamom, chili, vanilin), třtinový cukr;
- 2 g smažená cibule tekutá.

Dusitanová solící směs neobsahuje alergeny ani GMO, výrobce má zavedeny ISO 9001/1400, ISO 22000 a International Food Standart certification. Compound L1 a Diamant také neobsahují alergeny ani GMO a nejsou ošetřeny ionizujícím zářením. Splňují mikrobiologická kritéria Nařízení Komise (ES) č. 2073/2005. Střívka se používají umělá, nepropouštějící vzduch, o kalibru 65.

Výroba:

Vepřová játra zbavená žlučových spolu s podílem dusitanové solící směsi se na jemno rozmělní v kutru, ze kterého se potom vyjmou. Maso z uvařených hlav a ztužené sádlo s odřezky se vloží do předehřátého kutru, kde se spolu s vývarem a emulgátorem rozmělní na jemno. Po poklesu teploty v kutru na 42 °C se přidají předkastrovaná játra a pokračuje se do vzniku emulze. Poté se přidá zbytek dusitanové solící směsi a směs koření Diamant a kutruje se dále do řádného vmíchání směsi a po dosažení teploty 30 až 35 °C. Následně se dílo okamžitě plní do připravených střívek či sklenic a vaří se v kotli při teplotě 80 °C po dosažení teploty 72 °C uvnitř výrobku. Teplota pasterace je stejná pro paštiky v plastu i pro paštiky ve skle. Jemná paštika je zobrazena na obrázcích 2 a 3.



Obrázek 2 - Jemná paštika ve skle



Obrázek 3 - Jemná paštika v plastovém obalu

4.1.2 Hrubá paštika

Složení uvedené na etiketě: vepřová játra, maso z vepřových hlav, vepřové sádlo, vývar, bramborový škrob, jedlá sůl, cibule, směs přírodního koření, stabilizátor E250, E450, zahušťovadlo E412, E407, E410, glukózový sirup, dextróza, aroma, látka zvýrazňující chuť a vůni E621, třtinový cukr, ztužený palmový tuk, koření extract.

Receptura:

Suroviny: 35 kg jemné paštikové dílo, 20 kg vepřová játra 4 mm (jemný podíl), 45 kg vařený vepřový lalok 4 mm (hrubý podíl) (celkem 100 kg).

Přísady na 1 kg hrubého podílu:

- 16 g dusitanová solící směs: chlorid sodný, draslík, vápník, hořčík, dusitan sodný E250, jodičnan draselný, protispékavá látka E535;
- 6 g Compound L1 emulgátor: zahušťovadla E412, E407, E410, glukózový sirup, stabilizátor E450, jedlá sůl.

Koření na 1 kg celkové hmoty (jemné dílo + hrubý podíl):

- 7 g Selské zlato směs koření na paštiku: bylinky, koření, dextróza, kořenící látky, jedlá sůl, ztužený palmový tuk, kořenící extract.

Dusitanová solící směs stejně jako u jemné paštiky neobsahuje alergeny ani GMO a výrobce má zavedeny stejné certifikační systémy. Compound L1 a Selské zlato také neobsahují alergeny ani GMO, nejsou ošetřeny ionizujícím zářením a splňují mikrobiologická kritéria. Střívka se používají stejná jako u jemné paštiky.

Výroba:

Vepřová játra zbavená žlučovodů spolu s podílem dusitanové solící směsi se přeřezou přes desku s otvory 4 mm. Maso z uvařených laloků se přemele přes desku s otvory 4 mm a smíchá se s játry, jemným paštikovým dílem a ostatními přísadami. Následně se dílo okamžitě plní do připravených střívek nebo sklenic a vaří se v kotli při teplotě 80 °C po dosažení teploty 72 °C uvnitř výrobku. Teplota pasterace je i u hrubých paštik stejná pro paštiky v plastu a ve skle. Hrubá paštika je zobrazena na obrázcích 4 a 5.



Obrázek 4 - Hrubá paštika ve skle



Obrázek 5 - Hrubá paštika v plastovém obalu

4.2 Příprava laboratorních pomůcek

Před mikrobiologickou analýzou bylo laboratorní sklo sterilizováno v horkovzdušném sterilizátoru při teplotě 165 °C po dobu 60 minut. Erlenmayerovy baňky s živnými půdami a zkumavky s fyziologickým roztokem byly sterilizovány v parním sterilizátoru při teplotě 121 °C po dobu 20 minut. Byly použity sterilní

jednorázové špičky na automatické pipety. Petriho misky byly použity sterilní jednorázové. Všechny použité sterilní pomůcky a nástroje byly do doby použití uchovávány sterilně.

4.3 Postup mikrobiologické analýzy

Při analýzách byla využita plotnová metoda se zalitím inokula živnou půdou.



Obrázek 6 - Petriho misky připravené k naočkování inokula

Navážka 10 g vzorku paštiny byla smíchána s 90 ml sterilního fyziologického roztoku. Následovala homogenizace v homogenizátoru typu STOMACHER po dobu 60 sekund. Následně byla připravena řada desetinného ředění. Inokulum bylo pipetou naočkováno do sterilních Petriho misek a zalito příslušnou živnou půdou zchlazenou na teplotu přibližně 45 °C. Inokulum bylo v Petriho misce s půdou promícháno krouživým pohybem po desce stolu a směs se nechala zatuhnout. Poté se misky obrátily dnem vzhůru a nechaly inkubovat v termostatu po předem stanovený čas při určité teplotě. Po uplynutí inkubační doby se spočítaly typické kolonie, které na miskách narostly.

U stanovení sporulujících anaerobních mikroorganismů bylo nutno před inokulací zničit vegetativní formy mikroorganismů ve zkumavce s inokulem záhřevem na teplotu 85 °C po dobu 10 minut. Následně bylo inokulum ochlazen a naočkováno na Petriho misky. Misky byly vloženy do anaerostatu spolu s vyvíječem atmosféry k zajištění anaerobního prostředí. Další postup byl shodný s předchozím odstavcem.

4.4 Stanovované skupiny mikroorganismů

CELKOVÝ POČET MIKROORGANISMŮ (CPM): inokulum bylo zalito živnou půdou Plate Count Agar (PCA). Misky byly inkubovány v termostatu při teplotě 30 °C po dobu 72 hodin.

KOLIFORMNÍ BAKTERIE: inokulum bylo zalito Violet Red Bile Lactose Agar (agar s krystalovou violetí, neutrální červení, žlučí a laktózou). Misky byly inkubovány v termostatu při teplotě 37 °C po dobu 24 hodin.

KVASINKY A PLÍSNĚ: byly stanoveny na Chloramfenicol Glucose Yeast Agar (agar s chloramfenikolem, kvasničným extraktem a glukózou) při teplotě 25 °C po dobu 120 hodin.

SPORULUJÍCÍ ANAEROBNÍ BAKTERIE: inokulum bylo po předchozím záhřevu na 85 °C po dobu 10 minut zalito živnou půdou Plate Count Agar (PCA). Misky byly anaerobně inkubovány v termostatu při teplotě 30 °C po dobu 48 hodin.

ENTEROKOKY: inokulum bylo zalito živnou půdou COMPASS *Enterococcus* Agar. Inkubace probíhala 24 hod při teplotě 44 °C.

4.5 Složení a příprava živných půd

AGAR S TRYPTONEM, KVASNIČNÝM EXTRAKTEM A GLUKÓZOU (PCA) o složení: trypton 5,0 g; kvasničný extrakt 2,5 g; glukóza 1,0 g; agar 12,0 g. Navážka 20,5 g půdy se rozpustí v 1 000 ml destilované vody, pH půdy se upraví na $7 \pm 0,2$ při 25 °C a sterilizuje se v autoklávu při 121 °C po dobu 15 minut (složení půdy dle ČSN ISO 4833). Výrobce: Biokar Diagnostics, Francie

AGAR S KRYSTALOVOU VIOLETÍ, NEUTRÁLNÍ ČERVENÍ, ŽLUČÍ A LAKTÓZOU (VRBL) o složení: pepton 7 g; kvasničný extrakt 3 g; laktóza 10 g; chlorid sodný 5 g; žlučové soli 1,5 g; neutrální červeně 0,03 g; krystalová violet 0,002 g; agar 12 g; destilovaná voda 1000 ml. Dehydratovaná půda se smísí s předepsaným objemem destilované vody, provede se úprava pH na $7,4 \pm 0,2$ při 25 °C. Půda se nesterilizuje v autoklávu, pouze se vaří po dobu 2 minut (složení půdy dle ČSN ISO 4832). Výrobce: Biokar Diagnostics, Francie

AGAROVÁ PŮDA S KVASNIČNÝM EXTRAKTEM, GLUKÓZOU A CHLORAMFENIKOLEM o složení: kvasničný extrakt 5 g; glukóza 20 g; chloramfenikol 0,1 g; agar 15 g. Navážka 40,1g se rozpustí v 1 000 ml destilované vody, pH půdy se upraví na $6,6 \pm 0,2$ při 25 °C a sterilizuje se v autoklávu při 121 °C

($\pm 1^\circ\text{C}$) po dobu 15 minut (složení půdy dle ČSN ISO 7954). Výrobce: Biokar Diagnostics, Francie

COMPASS *ENTEROCOCCUS* AGAR o složení: pepton 27,5 g; kvasničný extrakt 5 g; chlorid sodný 5 g; tween 80 1 g; selektivní agens 0,3 g, X-glucoside 0,1 g; agar 14,0 g. Navážka 59,2 g se rozpustí v 1l destilované vody. Poté se zahřívá do rozpuštění. Steriluje se při 121°C po dobu 15 minut. Výrobce: Biokar Diagnostics, Francie

4.6 Způsob vyjádření výsledků

Po ukončení kultivace byly spočítány na jednotlivých Petriho miskách narostlé typické kolonie mikroorganismů.



Obrázek 7 - Počítání narostlých kolonií na Petriho miskách

Výsledky byly poté vyjádřeny jako KTJ na gram, dle rovnice:

$$N = \frac{\sum a + b + c + d}{V \cdot (n_1 + 0,1 \cdot n_2) \cdot d}$$

Kde:

$\Sigma a+b+c+d$ je součet kolonií napočítaných na Petriho miskách,

n_1 je počet Petriho misek použitých pro výpočet z prvního ředění,

n_2 je počet Petriho misek použitých pro výpočet z druhého ředění,

d je faktor prvního ředění použitého pro výpočet,

V je objem napipetovaného inokula.

Výpočet základních statistických charakteristik a grafické zpracování výsledků bylo provedeno v programu Microsoft Office Excel.

Ke zjištění, zda dochází ke zvýšení nebo snížení počtu jednotlivých skupin mikroorganismů v závislosti na čase s pravděpodobností 95 % ($p < 0,05$) bylo provedeno srovnání intervalů spolehlivosti KTJ/g.

Statistické testování a tvorba krabicových grafů byla prováděna v softwaru Statistica 12. U všech statistických testů byla použita hladina významnosti $p < 0,05$. Pro testování normality dat byl proveden Shapiro-Wilkův test normality vhodný pro soubory o malém rozsahu. Data neměla normální rozložení, proto byla dále zvolena neparametrická statistika.

Statistické testování rozdílu v počtu jednotlivých skupin mikroorganismů mezi paštikami balenými ve skle a v plastu, statistické testování rozdílu v počtu jednotlivých skupin mikroorganismů mezi hrubými a jemnými paštikami a statistické testování rozdílu v počtu jednotlivých skupin mikroorganismů mezi šarží 1 a šarží 2 bylo provedeno pomocí dvouvýběrového Mann-Whitneyova testu. Statistické testování rozdílu v počtu jednotlivých skupin mikroorganismů mezi 1. analýzou, 2. analýzou a 3. analýzou (dle doby použitelnosti paštik v plastu) bylo provedeno pomocí Kruskal-Wallisova testu, případně s Kruskal-Wallisovým post-hoc testem.

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

Předmětem mikrobiologické analýzy byly dvě šarže paštik, každá po čtyřech vzorcích. V každé šarži byly dvě paštiky jemné, přičemž jedna z nich byla ve skle a druhá byla v plastovém obalu, druhé dvě paštiky byly hrubé a jedna z nich byla ve skle a druhá v plastovém obalu. Analyzované vzorky byly z místa výroby převezeny do školy, kde byly skladovány v chladničce. K analýze byly vždy použity vzorky z nového spotřebitelského balení dané šarže.

U těchto vzorků byly v průběhu skladování (5 až 33 dní po výrobě) sledovány následující skupiny mikroorganismů: celkový počet mikroorganismů, koliformní bakterie, kvasinky a plísně, sporulující anaerobní mikroorganismy a enterokoky. Analýza první šarže byla prováděna v listopadu a prosinci, analýza druhé šarže následovala v únoru a březnu. U každé šarže byly provedeny tři mikrobiologické analýzy. Analýzy první šarže byly provedeny po 10, 24 a 33 dnech od výroby. Analýzy druhé šarže byly provedeny po 5, 18 a 25 dnech od výroby. Paštiky ve skle mají trvanlivost 3 měsíce, datum použitelnosti u nich tedy ještě nevypršelo. Paštiky v plastovém obalu mají ale dobu použitelnosti pouze 21 dní, druhá a třetí analýza u první šarže a třetí analýza u druhé šarže byla tedy provedena krátce po vypršení doby použitelnosti za účelem zjištění, zda může výrobce případně dobu použitelnosti prodloužit.

Výsledky analýz jsou uvedeny v následujících tabulkách a grafech v KTJ/g. Pro lepší přehlednost grafického znázornění byly KTJ/g převedeny na log KTJ/g. Vzorek č. 1 (hrubá paštika ve skle) je kódován jako HS, vzorek č. 2 (hrubá paštika v plastovém obalu) jako HP, vzorek č. 3 (jemná paštika ve skle) jako JS a vzorek č. 4 (jemná paštika v plastovém obalu) jako JP.

Celkové výsledky mikrobiologické analýzy jsou uvedeny v tabulkách 6, 7 a 8.

Tabulka 6 – První mikrobiologická analýza paštik u šarže 1 (10 dní po výrobě)
a u šarže 2 (5 dní po výrobě) v KTJ/g

šarže	vzorek	dny	CPM	ENT	KOLI	SPAN	KVaPL
1	HS	10 dní	3,1.10 ²	ND	ND	41	ND
	HP	10 dní	8,5.10 ²	ND	ND	5	ND
	JS	10 dní	6,0.10 ²	ND	ND	ND	ND
	JP	10 dní	7,4.10 ²	ND	ND	ND	ND
	průměr		6,2.10 ²	0	0	11	0
	medián		6,7.10 ²	0	0	2	0
	směrodatná odchylka		2,0.10 ²	0	0	17	0
šarže	vzorek	dny	CPM	ENT	KOLI	SPAN	KVaPL
2	HS	5 dní	2,5.10 ²	ND	ND	5	ND
	HP	5 dní	4,2.10 ²	ND	ND	ND	ND
	JS	5 dní	32	ND	ND	ND	ND
	JP	5 dní	1,2.10 ²	ND	ND	ND	ND
	průměr		2,1.10 ²	0	0	1	0
	medián		1,8.10 ²	0	0	0	0
	směrodatná odchylka		1,5.10 ²	0	0	2	0

Legenda:

CPM...celkový počet mikroorganismů,

SPAN...sporující anaerobní mikroorganismy,

ENT...enterokoky,

KOLI...koliformní bakterie,

KVaPL...kvasinky a plísňe,

ND...nedetekováno.

Tabulka 7 – Druhá mikrobiologická analýza paštik u šarže 1 (24 dní po výrobě) a u šarže 2 (18 dní po výrobě) v KTJ/g

šarže	vzorek	dny	CPM	ENT	KOLI	SPAN	KVaPL
1	HS	24 dní	2,1.10 ²	36	ND	ND	ND
	HP	24 dní *	2,1.10 ³	32	7,2.10 ²	9	ND
	JS	24 dní	5,2.10 ²	4,6.10 ²	ND	18	5
	JP	24 dní *	7,6.10 ²	2,3.10 ²	ND	18	ND
	průměr		9,0.10 ²	1,9.10 ²	1,8.10 ²	11	1
	medián		6,4.10 ²	1,3.10 ²	0	14	0
	směrodatná odchylka		7,4.10 ²	1,8.10 ²	3,1.10 ²	8	2
šarže	vzorek	dny	CPM	ENT	KOLI	SPAN	KVaPL
2	HS	18 dní	1,3.10 ²	ND	5	ND	ND
	HP	18 dní	9,8.10 ²	ND	ND	18	ND
	JS	18 dní	96	ND	ND	ND	5
	JP	18 dní	7,1.10 ²	ND	ND	ND	ND
	průměr		4,8.10 ²	0	1	5	1
	medián		4,2.10 ²	0	0	0	0
	směrodatná odchylka		3,8.10 ²	0	2	8	2

Legenda:

CPM...celkový počet mikroorganismů,

SPAN...sporující anaerobní mikroorganismy,

ENT...enterokoky,

KOLI...koliformní bakterie,

KVaPL...kvasinky a plísňe,

*...stanovení po uplynutí doby použitelnosti,

ND...nedetekováno.

Tabulka 8 – Třetí mikrobiologická analýza paštik u šarže 1 (33 dní po výrobě) a u šarže 2 (24 dní po výrobě) v KTJ/g

šarže	vzorek	dny	CPM	ENT	KOLI	SPAN	KVaPL
1	HS	33 dní	2,5.10 ²	64	3,1.10 ²	ND	ND
	HP	33 dní *	9,0.10 ²	32	9,3.10 ²	9	6,1.10 ²
	JS	33 dní	6,0.10 ²	5,1.10 ²	1,1.10 ³	59	1,0.10 ²
	JP	33 dní *	8,0.10 ²	3,0.10 ²	4,2.10 ³	86	5
	průměr		6,3.10 ²	2,3.10 ²	1,6.10 ³	39	1,8.10 ²
	medián		7,0.10 ²	1,8.10 ²	1,0.10 ³	34	52
	směrodatná odchylka		2,5.10 ²	2,0.10 ²	1,5.10 ³	36	2,5.10 ²
šarže	vzorek	dny	CPM	ENT	KOLI	SPAN	KVaPL
2	HS	25 dní	77	ND	9	ND	ND
	HP	25 dní*	8,5.10 ²	ND	ND	ND	ND
	JS	25 dní	ND	ND	9	ND	ND
	JP	25 dní*	1,3.10 ²	ND	41	ND	ND
	průměr		2,6.10 ²	0	15	0	0
	medián		1,0.10 ²	0	9	0	0
	směrodatná odchylka		2,4.10 ²	0	16	0	0

Legenda:

CPM...celkový počet mikroorganismů,

SPAN...sporulující anaerobní mikroorganismy,

ENT...enterokoky,

KOLI...koliformní bakterie,

KVaPL...kvasinky a plísň,

*...stanovení po uplynutí doby použitelnosti,

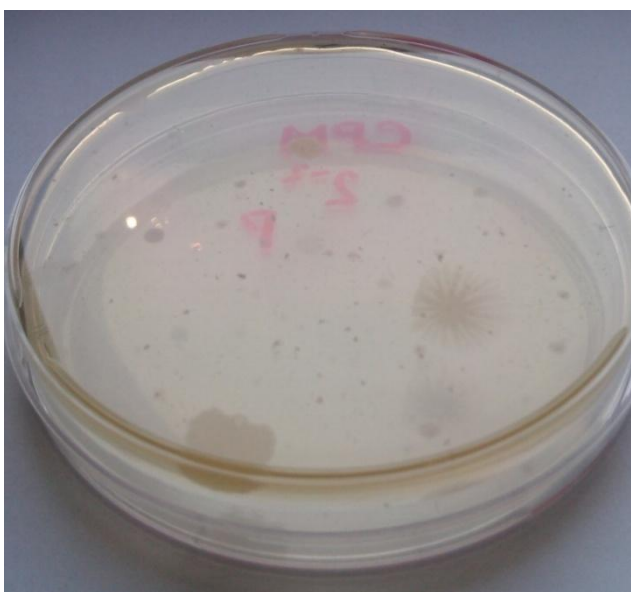
ND...nedetekováno.

Výsledky jsou v následujícím textu podrobněji analyzovány z těchto úhlů pohledu:

- vývoj jednotlivých skupin mikroorganismů v čase,
- zjišťování rozdílů jednotlivých skupin mikroorganismů mezi paštikami z první šarže (24 dní po výrobě) a paštikami z druhé šarže (25 dní po výrobě),
- zjišťování rozdílů počtu jednotlivých skupin MO u paštik ve skle a v plastu,
- zjišťování rozdílů počtu jednotlivých skupin MO u hrubých a jemných paštik,
- zjišťování, zda ve společnosti není problém při dodržování hygienických směrnic při výrobě, přepravě a skladování paštik.

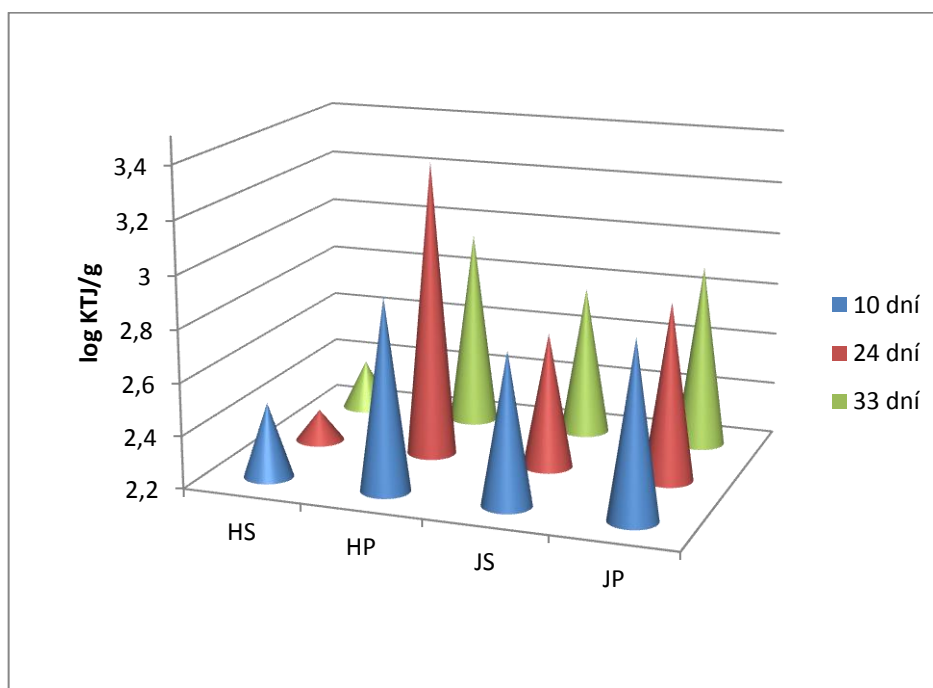
5.1 Celkový počet mikroorganismů

CPM poskytuje základní informace o stupni mikrobiální kontaminace. Z jeho hodnot lze usuzovat na dodržování hygienických směrnic při výrobě, přepravě a skladování výrobků (BURDYCHOVÁ, SLÁDKOVÁ, 2007). CPM může pomoci zhodnotit sanitační poměry a časově-teplotní historii výrobků, pokud jsou tyto faktory neznámé (KLINTH JENSEN et al., 2004).



Obrázek 8 - CPM: kolonie mikroorganismů narostlé při 30 °C/3 dny na půdě PCA

Vývoj CPM v závislosti na čase



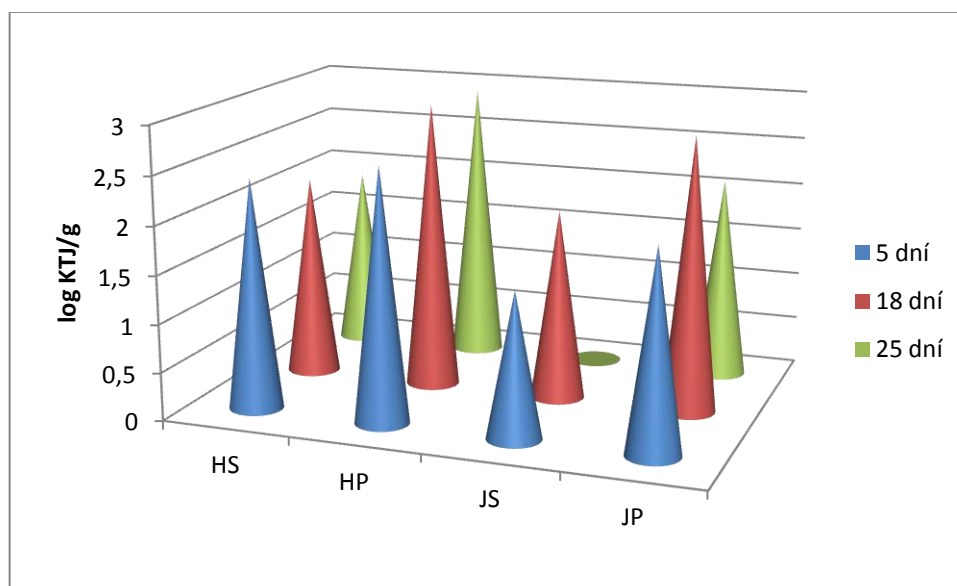
Obrázek 9 - Vývoj CPM v čase u šarže 1

Nejmenší CPM **první šarže** (viz. obrázek 9) měl ve všech třech analýzách vzorek č. 1 (hrubá paštika ve skle), a to $2,1 \cdot 10^2$ až $3,1 \cdot 10^2$ KTJ/g ; největší CPM měl naopak vzorek č. 2 (hrubá paštika v plastu), $8,5 \cdot 10^2$ až $2,1 \cdot 10^3$ KTJ/g .

Tabulka 9 - Statistické prokázání snížení či zvýšení CPM u šarže 1 ve vzorcích paštik pomocí intervalu spolehlivosti

IS (0,05)	HS	HP	JS	JP
10 dní	$(3,05 \pm 0,01) \cdot 10^2$	$(8,45 \pm 0,00) \cdot 10^2$	$(5,95 \pm 0,00) \cdot 10^2$	$(7,36 \pm 0,07) \cdot 10^2$
33 dní	$(2,45 \pm 0,02) \cdot 10^2$	$(8,95 \pm 0,01) \cdot 10^2$	$(5,95 \pm 0,03) \cdot 10^2$	$(7,95 \pm 0,01) \cdot 10^2$
překrytí	NE	NE	ANO	NE
změna počtu	SNÍŽENÍ	ZVÝŠENÍ	-	ZVÝŠENÍ

Z obrázku 9 a tabulky 9 je vidět, že CPM **šarže 1** se v čase u vzorku č. 1 (hrubá paštika ve skle) mírně snížil, u vzorků č. 2 a č. 4 (hrubá a jemná paštika v plastu) se naopak mírně zvýšil. U vzorku č. 3 (jemná paštika ve skle) nedošlo ke změně.



Obrázek 10 – Vývoj CPM v čase u šarže 2

Nejmenší CPM **druhé šarže** (viz. obrázek 10) měl u všech tří analýz vzorek č. 3 (jemná paštika ve skle), a to 0 až 96 KTJ/g; největší CPM měl naopak vzorek č. 2 (hrubá paštika v plastu), $4,2 \cdot 10^2$ až $9,8 \cdot 10^2$ KTJ/g. Vzorek č. 2 (hrubá paštika v plastu) měl tedy u obou zkoumaných šarží nejvyšší CPM ze všech vzorků. Celkově jsou však CPM u obou šarží relativně nízké.

Tabulka 10 - Statistické prokázání snížení či zvýšení CPM u šarže 2 ve vzorcích paštik pomocí intervalu spolehlivosti

IS (0,05)	HS	HP	JS	JP
5 dní	$(2,50 \pm 0,10) \cdot 10^2$	$(4,23 \pm 0,14) \cdot 10^2$	$(3,18 \pm 0,14) \cdot 10^1$	$(1,18 \pm 0,03) \cdot 10^2$
25 dní	$(7,73 \pm 0,22) \cdot 10^1$	$(8,46 \pm 0,08) \cdot 10^2$	ND	$(1,32 \pm 0,05) \cdot 10^2$
překrytí	NE	NE	NE	NE
změna počtu	SNÍŽENÍ	ZVÝŠENÍ	SNÍŽENÍ	ZVÝŠENÍ

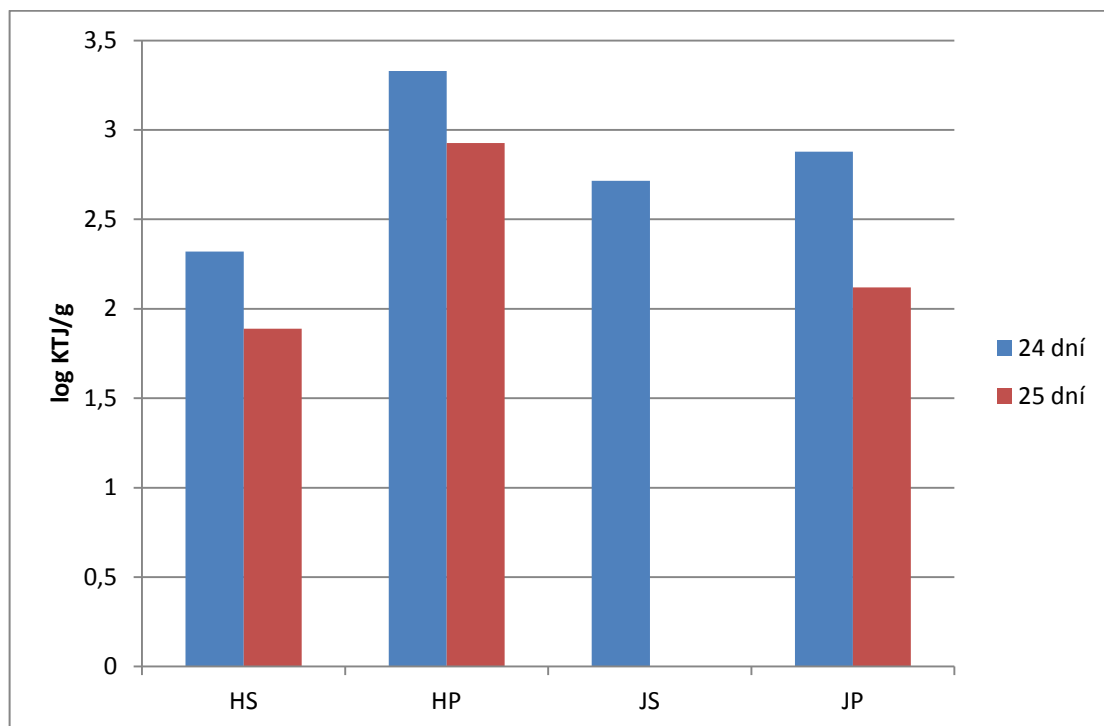
Z obrázku 10 a tabulky 10 vyplývá zjištění, že CPM šarže 2 se v čase u vzorků č. 1 (hrubá paštika ve skle) a č. 3 (jemná paštika ve skle), tedy u obou paštik ve skle, snížil; u vzorků č. 2 (hrubá paštika v plastu) a č. 4 (jemná paštika v plastu), tedy u obou vzorků v plastu, má CPM naopak tendenci se zvyšovat. Obě paštiky (v plastu i ve skle) mají stejné složení a vyrábí se stejným postupem. Po naplnění do obalu (do plastu nebo do skla) se tepelně opracovávají při shodné teplotě. Paštice ve skle ale pravděpodobně déle trvá, než při teplotě tepelného opracování (80 °C) dosáhne teploty 72 °C uvnitř výrobku. Rozdíl v CPM může být také způsoben tím, že plastový obal nepředstavuje tak účinnou bariéru pro mikroorganismy jako hermeticky uzavřená sklenice. Proto mají paštiky v plastovém obalu kratší dobu použitelnosti než paštiky ve skle.

Získané výsledky 1. analýz po výrobě paštik (1,5 až 2,9 log KTJ/g) jsou konzistentní s výsledky studie PARK et al. (2014) provedené u párků, kde byl zjištěn po výrobě celkový počet mikroorganismů od 1,6 do 2,4 log KTJ/g. Neshodují se však se studií METAXOPOULOS et al. (2003), kde byl CPM tepelně opracovaných masných výrobků po výrobě vyšší, až 4,7 log KTJ/g. To může být ovlivněno tím, že v této studii byly zkoumány různé tepelně opracované masné výrobky. Např. párky byly po tepelném opracování ještě loupány, příp. krájeny. To se mohlo projevit na přítomné mikroflóře, protože výrobky, které se přebalují nebo krájí nebo je s nimi jinak manipulováno, jsou náchylnější ke kontaminaci než výrobky pasterované v obalu (plastové střívko, sklo). Ty obsahují mikroflóru, která přežila tepelné opracování, např. některé termorezistentnější streptokoky a laktobacily (*L. viridescens*) mohou přežít a snížit tak dobu použitelnosti (ICMSF, 2005).

Ve studii SAGOO et al. (2007) mělo na konci doby použitelnosti 66 % vzorků vařených masných výrobků balených v modifikované atmosféře nebo ve vakuu (dle britského mikrobiologického doporučení) dobrou mikrobiologickou kvalitu (třída A)

nebo akceptovatelnou mikrobiologickou kvalitou (třída B), 33 % vzorků bylo neuspokojující jakosti a 1% vzorků bylo nepřijatelných, nebo představovalo potenciální riziko pro veřejné zdraví (limity jsou uvedeny níže, viz. mikrobiologické doporučení pro masné výrobky vydané britským FOOD AND ENVIRONMENTAL HYGIENE DEPARTMENT). Nevyhovující mikrobiologické výsledky byly dány zejména kvůli vysokému počtu aerobních mikroorganismů inkubovaných při 30 °C/48 hodin (tj. CPM), tvořených zejména BMK (nad 10^8 KTJ/g) a bakteriemi z čeledi *Enterobacteriaceae* (nad 10^4 KTJ/g). Vysoké počty aerobů a bakterií z čeledi *Enterobacteriaceae* mohou být zapříčiněny nedostatečným tepelným opracováním, rekontaminací, nevhodným skladováním, nevhodně zvolenou dobou použitelnosti, nebo kombinací těchto faktorů.

Porovnání CPM mezi jednotlivými šaržemi



Obrázek 11 – Porovnání CPM v paštikách u první šarže (24 dní po výrobě) a u druhé šarže (25 dní po výrobě) u různých vzorků

Z obrázku 11 je vidět vyšší CPM u šarže 1 oproti šarži 2. Pro zjištění, zda je v CPM mezi šarží 1 (24 dní po výrobě) a šarží 2 (25 dní po výrobě) statisticky průkazný rozdíl, byl po otestování normality dat zvolen neparametrický dvouvýběrový Mann-Whitneyův test, který je vhodný pro veličiny, z nichž alespoň 1 není normální. Byla stanovena nulová (H_0) a alternativní (H_A) hypotéza.

H_0 : Mezi CPM paštik šarže 1 a šarže 2 není rozdíl.

H_A : Mezi CPM paštik šarže 1 a šarže 2 je rozdíl.

P-hodnota vyšla 0,0087; je tedy nižší než hladina významnosti α (0,05). Nulová hypotéza tedy byla zamítnuta a byla potvrzena hypotéza alternativní. Rozdíl CPM mezi šarží 1 (24 dní po výrobě) a šarží 2 (25 dní po výrobě) byl tedy statisticky průkazný.

KLINTH JENSEN et al. (2004) udává, že pokud se CPM mezi různými šaržemi hodně liší, může být příčina v neadekvátní mikrobiologické kontrole při výrobě, přepravě či skladování. To ale v našem případě může být ovlivněno tím, že analýzy paštik 1. šarže a 2. šarže byly z technických důvodů prováděny v různých dnech (viz. metodika).

Legislativní limity

Legislativní limit pro celkový obsah mikroorganismů v paštikách či jiných tepelně opracovaných výrobcích NAŘÍZENÍ EP A RADY (ES) č. 2073/2005 nestanovuje. Toto nařízení pouze udává, že potraviny nesmí obsahovat mikroorganismy, jejich toxiny nebo metabolity v množství představujícím riziko pro lidské zdraví. Konkrétní kritéria jsou stanovena pouze pro vybrané mikroorganismy a rizikové výrobky. Ani jiná současná legislativa neudává kritéria pro CPM v tepelně opracovaných masných výrobcích.

Právně nezávazná ČSN 56 9609 stanovuje v potravinách určených k přímé spotřebě (s výjimkou potravin, kde jsou takové mikroorganismy součástí kulturní mikroflóry), kam lze paštiky zařadit, jako nejvyšší mezní hodnotu 10^8 aerobních mezofilních mikroorganismů (tj. CPM) na gram potraviny. FEINER (2006) tvrdí, že při počtu bakterií kolem 10^7 na cm^2 nebo gram masa či masného výrobku lze pozorovat typické nežádoucí změny, které jsou výsledkem kažení masa. Mírné negativní změny lze pozorovat už mnohem dříve, mezi 10^5 a 10^6 .

Právně nezávazná ČSN 56 9609 dále stanovuje u hermeticky balených tepelně opracovaných masných výrobků – polokonzerv jako přípustnou hodnotu CPM u tří vzorků z pěti $5 \cdot 10^3/\text{g}$. Zbývající dva vzorky mohou mít $5 \cdot 10^4/\text{g}$.

Dnes už neplatná VYHLÁŠKA č. 132/2004 o mikrobiologických kritériích pro potraviny uvádí u tepelně opracovaných nekrájených masných výrobků přípustnou hodnotu CPM 10^5 KTJ/g .

Mikrobiologické doporučení pro masné výrobky vydané britským FOOD AND ENVIRONMENTAL HYGIENE DEPARTMENT (2001) udává u kategorie 3, kam patří např. paštiky a krájené tepelně opracované masné výrobky, jako dobrou mikrobiologickou kvalitu (třída A) počet aerobních kolonií inkubovaných při 30 °C/48 hodin (tj. CPM) do 10^5 KTJ/g. Akceptovatelná mikrobiologická kvalita (třída B), jež vyjadřuje hraniční limit mikrobiologické kvality, je 10^5 až 10^6 KTJ/g. Nad 10^6 KTJ/g je již mikrobiologická kvalita neuspokojující (třída C). U kategorie 1 (hovězí hamburgery, skotská vejce, kebaby) jsou limity o dva řády přísnější, u kategorie 2 (nekrájená drůbež, párky) jsou limity přísnější o jeden řád proti kategorii 3. Kategorie 4 (krájená šunka a vařený jazyk) a 5 (salámy a fermentované masné výrobky) mají naopak limity o jeden a o dva řády volnější.

Doporučená kritéria pro počet aerobních mezofilů vydaná Německou společností pro hygienu a mikrobiologii (týkající se vařených masných výrobků) jsou do 10^4 KTJ/g pro kusové zboží a do 10^6 KTJ/g u krájených výrobků (DGHM, 2011).

Všechny vzorky analyzovaných paštik tedy, co se týká CPM, splňují požadavky právně nezávazné ČSN 56 9609, neplatné vyhlášky č. 132/2004 Sb. a britských a německých kritérií. Nejvyšší zjištěná hodnota byla $2,1 \cdot 10^3$ KTJ/g a tato hodnota byla naměřena u paštik v plastovém obalu 3 dny po vypršení doby použitelnosti. Lze tedy předpokládat, že ve firmě není problém při dodržování hygienických směrnic při výrobě, přepravě a skladování.

Protože ve výsledcích analýz paštik v plastovém obalu provedených před a po vypršení doby použitelnosti nebyl statisticky významný rozdíl a nejvyšší naměřené hodnoty nepřekračují doporučené limity českých, britských a ani nej přísnějších německých doporučení, lze konstatovat, že by bylo možné dobu použitelnosti z hlediska celkového počtu mikroorganismů prodloužit na dobu delší než 21 dní. Pro toto tvrzení by však bylo vhodné provést také analýzy na přítomnost mikroorganismů způsobujících alimentární onemocnění.

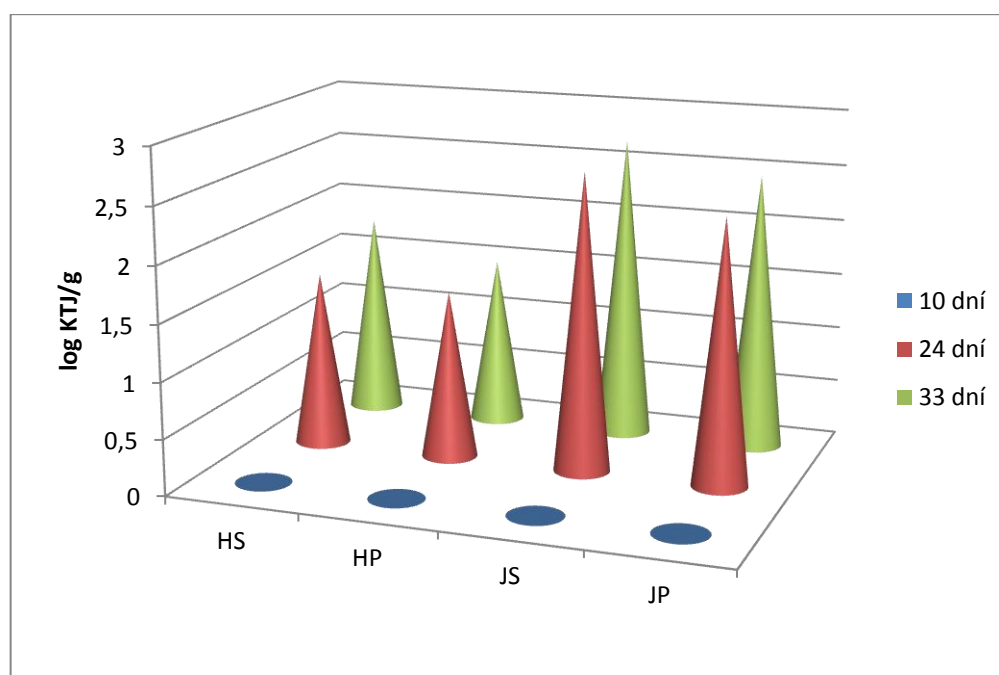
5.2 Enterokoky

V nefermentovaných potravinách signalizuje zvýšená přítomnost enterokoků nedostatečné tepelné opracování nebo nedostatečnou hygienu pracovních ploch a zařízení (BURDYCHOVÁ, SLÁDKOVÁ, 2007).



Obrázek 12 - Petriho miska s půdou COMPASS Enterococcus Agar inkubovaná při 44 °C/1 den: enterokoky nejsou přítomny

Vývoj počtu enterokoků v závislosti na čase



Obrázek 13 - Vývoj počtu enterokoků v čase u šarže 1

Nejmenší počet enterokoků **první šarže** (viz. obrázek 13) měl ve druhé a třetí analýze vzorek č. 2 (hrubá paštika v plastu) a to 32 KTJ/g; největší počet enterokoků měl naopak vzorek č. 3 (jemná paštika ve skle) a to $4,6 \cdot 10^2$ KTJ/g ve druhé analýze a $5,1 \cdot 10^2$ KTJ/g ve třetí analýze. V **druhé šarži** nebyly enterokoky při ředění od 10^{-1} do 10^{-2} detekovány.

Tabulka 11 - Statistické prokázání snížení či zvýšení počtu enterokoků u šarže 1 ve vzorcích paštik pomocí intervalu spolehlivosti

IS (0,05)	HS	HP	JS	JP
10 dní	ND	ND	ND	ND
33 dní	$(6,36 \pm 0,16) \cdot 10^1$	$(3,18 \pm 0,06) \cdot 10^1$	$(5,14 \pm 0,00) \cdot 10^2$	$(3,00 \pm 0,06) \cdot 10^2$
překrytí	NE	NE	NE	NE
změna počtu	ZVÝŠENÍ	ZVÝŠENÍ	ZVÝŠENÍ	ZVÝŠENÍ

Jak je zřejmé z obrázku 13 a tabulky 11, enterokoky nebyly při první analýze první šarže detekovány. U druhé analýzy byl u všech vzorků pozorován největší nárůst. U třetí analýzy se počty zvyšovaly pouze mírně.

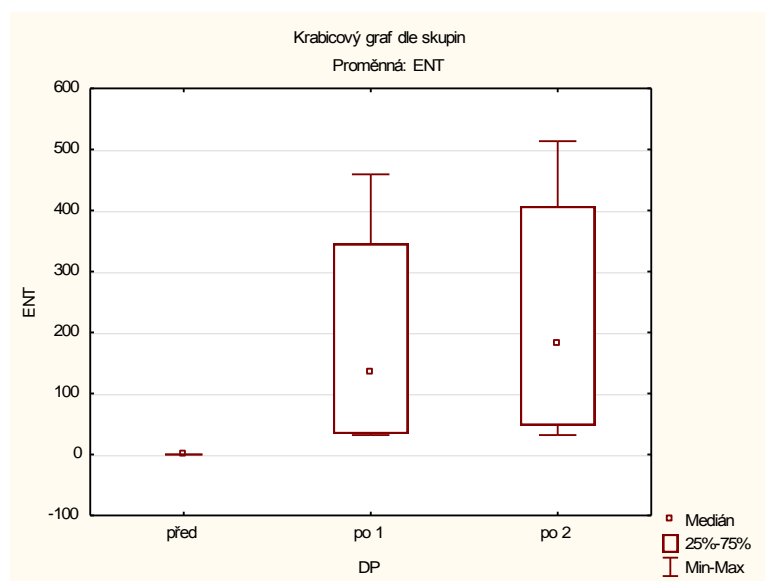
Enterokoky patří mezi nejvíce termotolerantní nesporeující bakterie. *E. faecalis* a *E. faecium* byly zapojeny do kažení masných výrobků poté, co přežily tepelné zpracování. To platí zejména, pokud je zabráněno rekontaminaci konkurenčními bakteriemi, tedy pokud jsou výrobky tepelně opracovávány až po balení do nepropustných obalů. Tepelná odolnost enterokoků v masných výrobcích je ovlivněna zejména přítomností soli, dusitanů a svalové tkáně (FRANZ et al., 2003).

Lze tedy předpokládat, že některé enterokoky v první šarži přežily tepelné opracování a následně došlo k jejich pomnožení, nebo že tepelné opracování nebylo dostatečné. U druhé šarže nebyly enterokoky detekovány v žádném z analyzovaných vzorků. Lze tedy předpokládat, že byly všechny devitalizovány dostatečným tepelným opracováním, nebo se v původních surovinách této šarže termotolerantní enterokoky nevyskytovaly.

Počty enterokoků se u první šarže zvyšovaly u paštik ve skle (vzorky č. 1 a č. 3) i u paštik v plastu (vzorky č. 2 a č. 4). Paštiky ve skle mají trvanlivost 3 měsíce, paštiky v plastu pouze 21 dní. V nárůstu počtu enterokoků u této šarže tedy na typu obalu nezáleželo. To potvrzuje teorii o přežití některých více termorezistentních druhů enterokoků, protože kdyby enterokoky pocházely z rekontaminace po tepelném opracování, tak by paštiky v plastu nejspíše představovaly více náchylný výrobek.

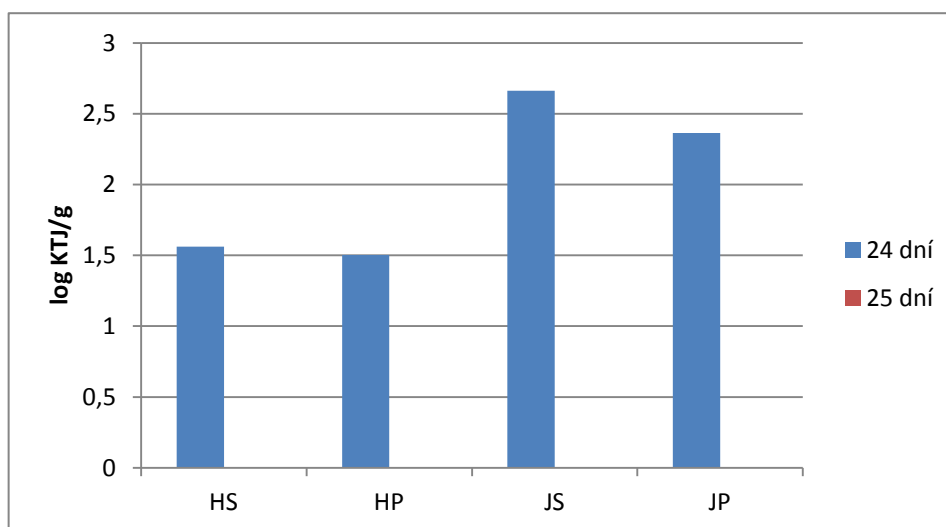
Z obrázku 13 je také u druhé a třetí analýzy patrný vyšší počet enterokoků u vzorků č. 3 a č. 4 (jemné paštiky) oproti paštikám hrubým. Rozdíl v počtu enterokoků z obou šarží mezi hrubými a jemnými paštikami však nebyl statisticky průkazný ($p: 0,64 < 0,05$).

Pomocí Kruskal-Wallisova testu byl u první šarže zjištěn statisticky významný rozdíl ($p: 0,02 < 0,05$) v počtu enterokoků u paštik v plastovém obalu 11 dní před uplynutím doby použitelnosti, 3 dny po uplynutí doby použitelnosti a 12 dní po uplynutí doby použitelnosti. Počty enterokoků 11 dní před vypršením doby použitelnosti a 3 dny po vypršení doby použitelnosti jsou shodné (významně se od sebe staticky neliší). Počet enterokoků 12 dní po uplynutí doby použitelnosti je odlišný od počtu enterokoků před vypršením DP, ale shodný s počtem enterokoků 3 dny po vypršení DP (viz obrázek 14). Po vypršení doby použitelnosti se počty enterokoků zvýšily o jeden až dva řády.



Obrázek 14 – Krabicový graf: srovnání počtu enterokoků v závislosti na době použitelnosti

Porovnání počtu enterokoků mezi jednotlivými šaržemi



Obrázek 15 – Porovnání počtu enterokoků v paštikách u první šarže (24 dní po výrobě) a u druhé šarže (25 dní po výrobě) u různých vzorků

Z obrázku 15 je vidět vyšší počet enterokoků u šarže 1 oproti šarži 2, kde enterokoky nebyly při ředění od 10^{-1} do 10^{-2} detekovány. Tento rozdíl byl statisticky průkazný ($p: 0,003 < 0,05$).

Legislativní limity

V současné době neexistuje žádný legislativní limit týkající se tepelně opracovaných masných výrobků ohledně počtu enterokoků. Ani neplatná vyhláška č. 132/2004, ani právně nezávazná ČSN 56 9609 neudávají přípustnou hodnotu enterokoků v těchto výrobcích. Nejvyšší zjištěná hodnota počtu enterokoků u paštik byla $5,1 \cdot 10^2$ KTJ/g u jemné paštiky ve skle.

K zabránění kažení tepelně opracovaných masných výrobků způsobenému enterokoky je nutné, aby počáteční kontaminace těmito mikroorganismy byla omezena na minimum a tepelné zpracování by mělo být založeno na D-hodnotách nejvíc tepelně rezistentních enterokoků izolovaných ze surovin (FRANZ et al., 2003).

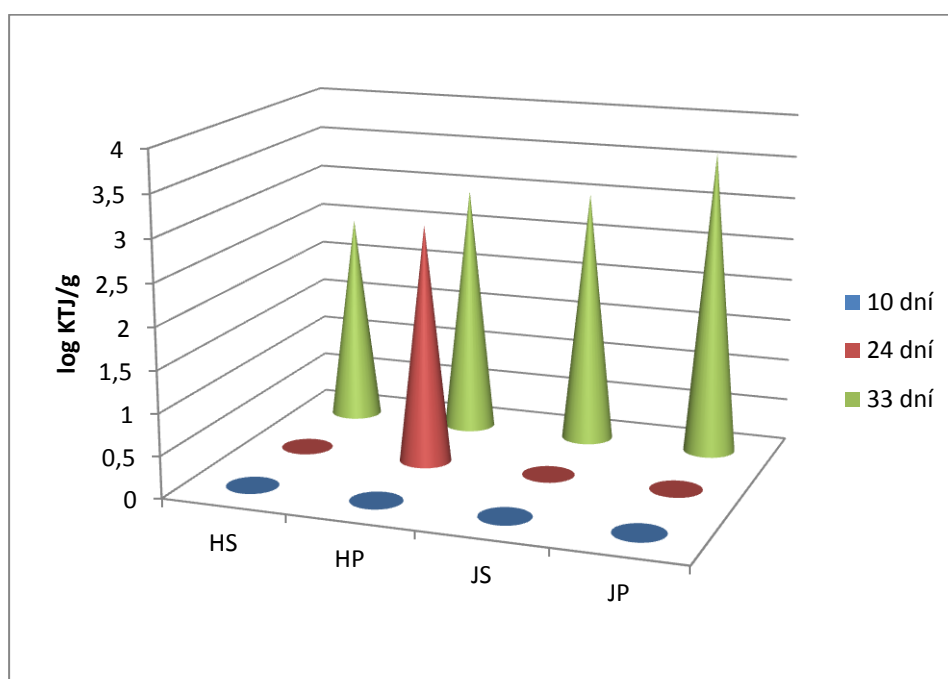
5.3 Koliformní bakterie

Koliformní bakterie jsou důležité mikrobiologické a hygienické indikátory zpracování výrobků a hygieny pracovníků (FILIMON et al., 2010). Jde o gramnegativní nesporulující tyčinky, které zkvašují laktózu a další sacharidy. Řadí se mezi ně tyto rody: *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia* a *Klebsiella*. Dobře rostou v mnoha potravinách při velkém rozmezí teplot a pH (JAY et al., 2005).



Obrázek 16 - Petriho miska s půdou VRBL inkubovaná při 37 °C/1 den: koliformní bakterie a malé kousičky paštiky

Vývoj počtu koliformních bakterií v závislosti na čase



Obrázek 17 - Vývoj počtu koliformních bakterií ve vzorcích paštik v čase u šarže 1

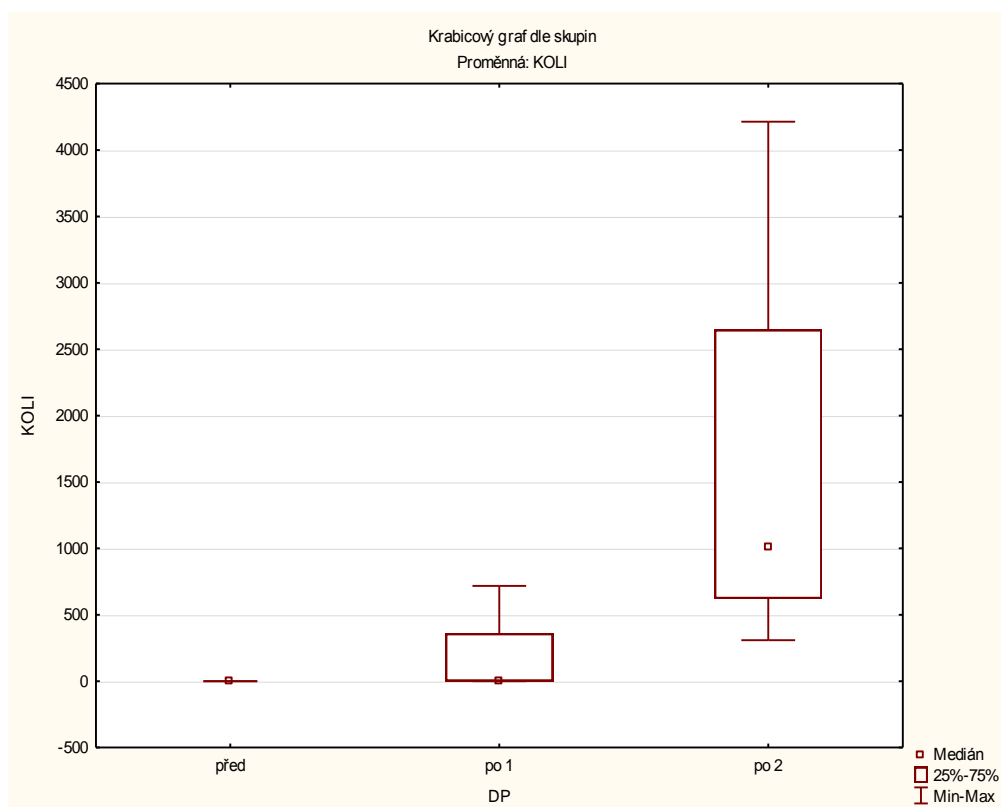
Nejmenší počet koliformních bakterií **první šarže** (viz. obrázek 17) měl u třetí analýzy (u první analýzy tyto bakterie nebyly detekovány u žádného ze vzorků) vzorek č. 1 (hrubá paštika ve skle), a to $3,1 \cdot 10^2$ KTJ/g; největší počet koliformních bakterií měl u druhé analýzy vzorek č. 2 (hrubá paštika v plastu), a to $7,2 \cdot 10^2$ KTJ/g, a u třetí analýzy vzorek č. 4 (jemná paštika v plastu), a to $4,2 \cdot 10^3$ KTJ/g.

Tabulka 12 - Statistické prokázání snížení či zvýšení počtu koliformních bakterií ve vzorcích paštik u šarže 1

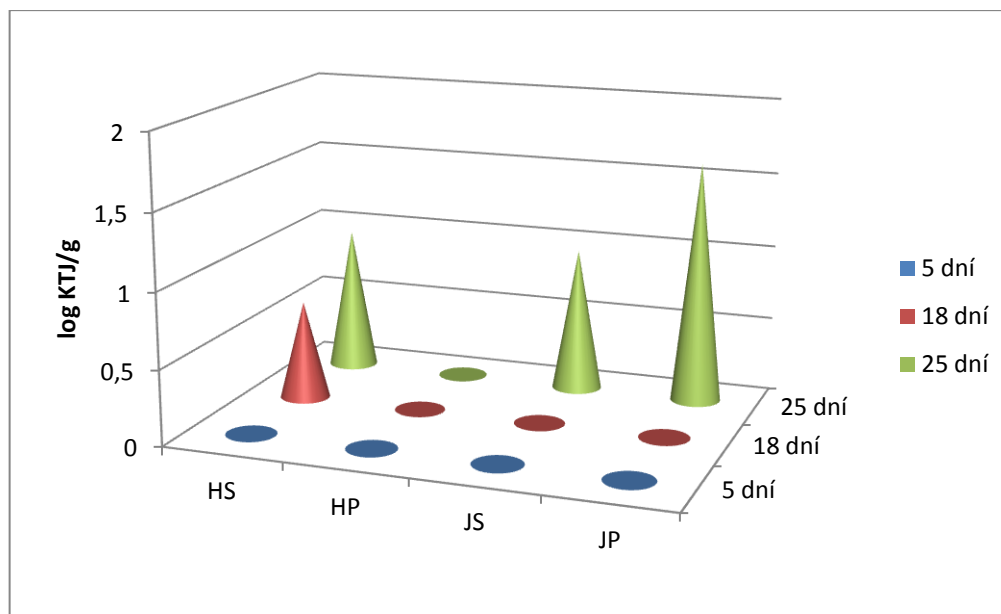
IS (0,05)	HS	HP	JS	JP
10 dní	ND	ND	ND	ND
33 dní	$(3,09 \pm 0,09) \cdot 10^2$	$(9,32 \pm 0,07) \cdot 10^2$	$(1,08 \pm 0,01) \cdot 10^3$	$(4,21 \pm 0,03) \cdot 10^3$
překrytí	NE	NE	NE	NE
změna počtu	ZVÝŠENÍ	ZVÝŠENÍ	ZVÝŠENÍ	ZVÝŠENÍ

Koliformní bakterie u **šarže 1** (viz. obrázek 17 a tabulka 12) nebyly při první analýze u žádného ze vzorků detekovány. Při druhé analýze byly koliformní bakterie detekovány u vzorku č. 2, kde se počty zvýšily. Ve třetí analýze se počty koliformů zvýšily u všech vzorků.

Pomocí Kruskal-Wallisova neparametrického testování byl u první šarže mezi počtem koliformních bakterií pařtik v plastovém obalu 11 dní před uplynutím doby použitelnosti, 3 dny po uplynutí doby použitelnosti a 12 dní po uplynutí doby použitelnosti zjištěn statisticky významný rozdíl ($p:0,02 < 0,05$). Počty koliformních bakterií 11 dní před vypršením doby použitelnosti a 3 dny po vypršení doby použitelnosti jsou shodné (významně se od sebe staticky neliší). Počet koliformních bakterií 12 dní po uplynutí doby použitelnosti je odlišný od počtu koliformních bakterií před vypršením DP, ale shodný s počtem koliformních bakterií 3 dny po vypršení DP (viz. obrázek 18). Po vypršení doby použitelnosti se počty koliformních bakterií zvýšily o dva až tři řády.



Obrázek 18 – Krabicový graf: Srovnání počtu koliformních bakterií u pařtik v plastovém obalu v závislosti na době použitelnosti



Obrázek 19 – Vývoj počtu koliformních bakterií v čase u šarže 2

Nejmenší počet koliformních bakterií **druhé šarže** (viz. obrázek 19) měl u všech tří analýz vzorek č. 2 (hrubá paštika v plastu), kde tyto bakterie nebyly při daném ředění detekovány; největší počet měl u druhé analýzy vzorek č. 1 (hrubá paštika ve skle) (5 KTJ/g) a u třetí analýzy (stejně jako u šarže 1) vzorek č. 4 (jemná paštika v plastu) (41 KTJ/g).

Tabulka 13 - Statistické prokázání snížení či zvýšení počtu koliformních bakterií ve vzorcích paštik u šarže 2

IS (0,05)	HS	HP	JS	JP
5 dní	ND	ND	ND	ND
25 dní	9,09±0,00	ND	9,09±0,40	(4,10±0,06).10 ¹
překrytí	NE	-	NE	NE
změna počtu	ZVÝŠENÍ	-	ZVÝŠENÍ	ZVÝŠENÍ

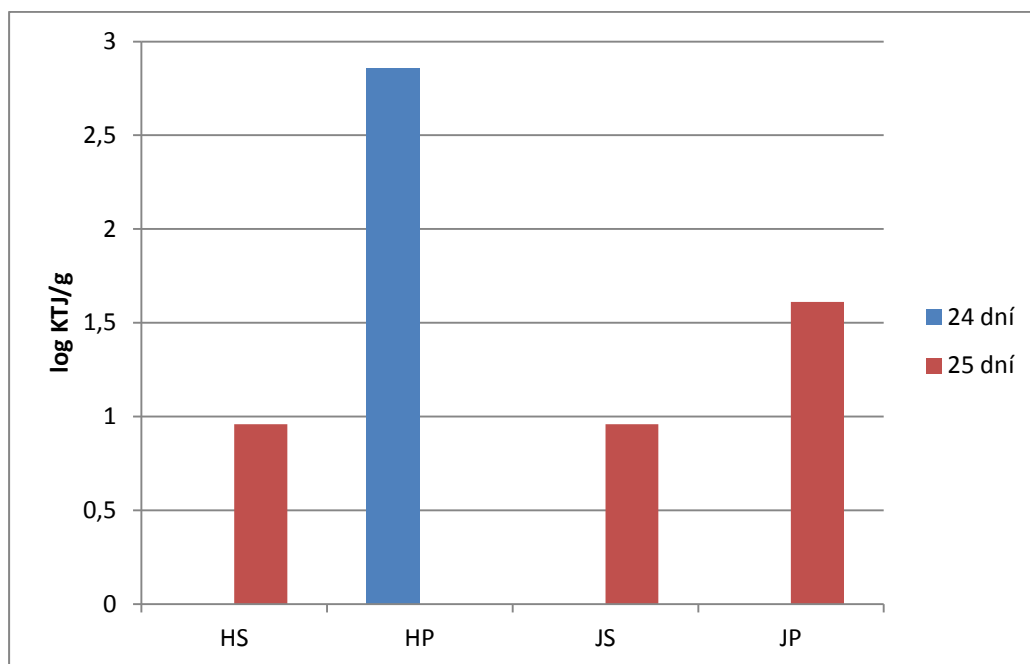
Počty koliformních bakterií **šarže 2** se v čase (viz. obrázek 19 a tabulka 13) u vzorků měnily různorodě, ale pouze o 1 řád. U vzorku č. 2 nebyly koliformní bakterie detekovány. U vzorků č. 3 a č. 4 koliformy nebyly detekovány ve dvou analýzách, ve třetí analýze se počet zvýšil. U vzorku č. 1 se počet koliformů po první analýze, kde nebyly detekovány, zvyšoval.

U druhé šarže nebyl pomocí Kruskal-Wallisovy neparametrické statistiky mezi počtem koliformních bakterií paštik v plastovém obalu 16 dní před uplynutím doby

použitelnosti, 3 dny před uplynutím doby použitelnosti a 4 dny po uplynutí doby použitelnosti zjištěn statisticky významný rozdíl ($p < 0,05$).

Výsledky 1. analýz po výrobě paštik u obou šarží (koliformní bakterie nedetekovány) jsou konzistentní s výsledky studie PARK et al. (2014), týkající se párků, kde také nebyly po výrobě koliformní bakterie detekovány.

Porovnání počtu koliformních bakterií mezi jednotlivými šaržemi



Obrázek 20 - Porovnání počtu koliformních bakterií v paštikách u první šarže (24 dní po výrobě) a u druhé šarže (25 dní po výrobě)

Rozdíl v počtu koliformních bakterií mezi šarží 1 (24 dní po výrobě) a šarží 2 (25 dní po výrobě) nebyl statisticky průkazný ($p: 0,418 < 0,05$) (viz obrázek 20).

Počet koliformních bakterií indikuje správnost technologických postupů a správnost sanitace náradí i zařízení (GÖRNER, VALÍK, 2004). Nejvyšší naměřená hodnota počtu koliformních bakterií u paštik byla $4,2 \cdot 10^3$ KTJ/g u vzorku č. 4 (jemná paštika v plastovém obalu), tato hodnota však byla naměřená 12 dní po vypršení data použitelnosti. Před vypršením data použitelnosti u paštik balených v plastovém obalu (21 dní) nebyly koliformy detekovány u žádného ze vzorků, lze tedy usuzovat na správné postupy i správnou sanitaci technologického zařízení a náradí. Paštiky ve skle mají trvanlivost delší (3 měsíce) a nárůst koliformních bakterií byly zjištěn u jednoho vzorku (hrubá paštika) 18 dní po výrobě (5 KTJ/g), u obou vzorků 25 dní po výrobě a u obou vzorků 33 dní po výrobě, počty však byly relativně nízké.

Legislativní limity

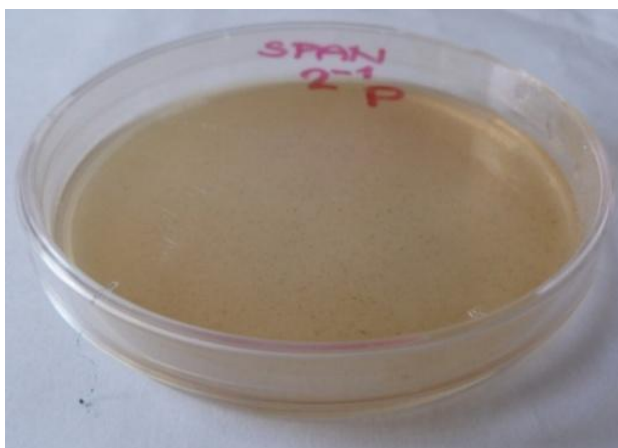
Počet koliformních bakterií týkající se tepelně opracovaných masných výrobků neudává žádný legislativní limit. Ani neplatná vyhláška č. 132/2004 neudává přípustnou hodnotu koliformních bakterií v těchto výrobcích. Udává však přípustnou hodnotu 10^3 *Enterobacteriaceae*/g u nekrájených tepelně opracovaných masných výrobků. *Salmonella* spp., která nepatří mezi koliformní bakterie, ale patří do čeledi *Enterobacteriaceae* nesmí být přítomna v 25 g nekrájeného tepelně opracovaného masného výrobku. Tato vyhláška také udává nejvyšší mezní hodnotu *E. coli* O157 a dalších verotoxin produkujících *E. coli*, a to negativní/25 g ve všech druzích potravin.

Právně nezávazná ČSN 56 9609 také neudává limit pro koliformní bakterie v tepelně opracovaných masných výrobcích. Tolerovaná hodnota *E. coli* pro masné výrobky je touto normou stanovena na $5 \cdot 10^2$ /g u třech vzorků z pěti, přičemž zbývající dva mohou obsahovat $5 \cdot 10^3$ /g. *Salmonella* spp. nesmí být přítomna ve 25 g vzorku.

Mikrobiologické doporučení pro masné výrobky vydané britským FOOD AND ENVIRONMENTAL HYGIENE DEPARTMENT (2001) udává u všech kategorií (1 až 5), jako dobrou mikrobiologickou kvalitu (třída A) počet veškerých *E. coli* jako indikátorových mikroorganismů do 20 KTJ/g. Akceptovatelná mikrobiologická kvalita (třída B), jež vyjadřuje hraniční limit mikrobiologické kvality je 20 až 100 KTJ/g. Nad 100 KTJ/g je již mikrobiologická kvalita neuspokojující (třída C). *E. coli* O157 nesmí být přítomna v 25 g vzorku.

5.4 Sporulující anaerobní bakterie

Mezi mezofilní anaerobní sporulující mikroorganismy lze zařadit např. *Clostridium sporogenes*, *C. putrificum*, *C. putrefaciens* (BLACKBURN, 2006), *C. botulinum* a *C. perfringens* (JAY et al., 2005).



Obrázek 21 - Petriho miska s pěstou PCA inkubovaná při 30 °C/2 dny

Vývoj počtu sporulujících anaerobních bakterií v závislosti na čase

Nejmenší počet sporulujících anaerobních bakterií **první šarže** měly u první analýzy vzorky č. 3 a č. 4 (jemné paštiky), kde nebyly tyto bakterie detekovány a u druhé a třetí analýzy vzorek č. 1 (hrubá paštika ve skle), kde tyto bakterie také nebyly detekovány. Největší počet sporulujících anaerobních bakterií měl naopak u první analýzy vzorek č. 1 (hrubá paštika ve skle), a to 41 KTJ/g, a u druhé a třetí analýzy vzorek č. 4 (jemná paštika ve skle), a to 18 až 86 KTJ/g.

Tabulka 14 - Statistické prokázání snížení či zvýšení počtu sporulujících anaerobních bakterií ve vzorcích paštik u šarže 1

IS (0,05)	HS	HP	JS	JP
10 dní	$(4,09 \pm 0,02) \cdot 10^1$	$4,55 \pm 0,20$	ND	ND
33 dní	ND	$9,09 \pm 0,00$	$(5,91 \pm 0,02) \cdot 10^1$	$(8,64 \pm 0,06) \cdot 10^1$
překrytí	NE	NE	NE	NE
změna počtu	SNÍŽENÍ	ZVÝŠENÍ	ZVÝŠENÍ	ZVÝŠENÍ

Počet sporulujících anaerobních bakterií šarže 1 se pohyboval u všech tří analýz v rámci jednoho řádu. U vzorků č. 2, č. 3 a č. 4 se počty rovnoměrně zvyšovaly (viz. tabulka 14). Vzorek č. 1 (hrubá paštika ve skle) při první analýze obsahoval 41 KTJ/g sporulujících bakterií a ve druhé a třetí analýze nebyly tyto mikroorganismy detekovány.

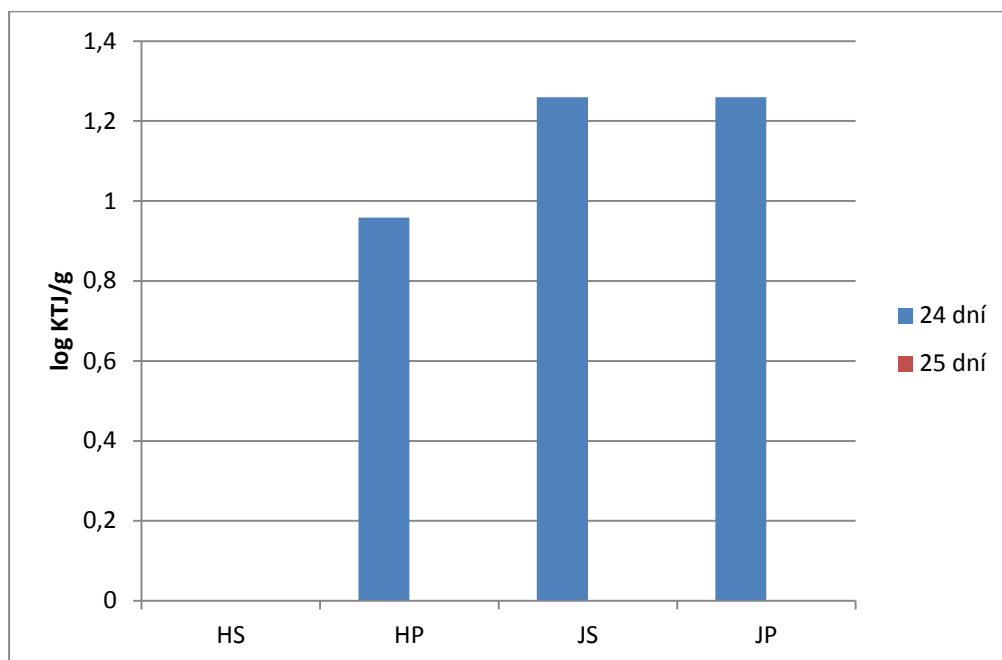
Tabulka 15 - Statistické prokázání snížení či zvýšení počtu sporulujících anaerobních bakterií ve vzorcích paštik u šarže 2

IS (0,05)	HS	HP	JS	JP
5 dní	$4,55 \pm 0,20$	ND	ND	ND
25 dní	ND	ND	ND	ND
překrytí	NE	-	-	-
změna počtu	SNÍŽENÍ	-	-	-

Počet sporulujících anaerobních bakterií se i u **šarže 2** pohyboval u všech tří analýz v rámci jednoho řádu. U vzorků č. 3 a č. 4 (jemné paštiky) nebyly tyto bakterie detekovány. Vzorek č. 1 (hrubá paštika ve skle) se (podobně jako u šarže 1) z hodnoty 5 KTJ/g naměřené při první analýze snížil v obou dalších analýzách pod hranici detekovatelnosti. Počet sporulujících anaerobních bakterií u vzorku č. 2 (hrubá paštika

v plastu) se z první analýzy, kde tyto bakterie nebyly detekovány, ve druhé analýze zvýšil (na 18 KTJ/g), aby ve třetí zase poklesl.

Porovnání počtu sporulujících anaerobních mikroorganismů mezi jednotlivými šaržemi



Obrázek 22 - Porovnání počtu sporulujících anaerobních bakterií v paštikách u první šarže (24 dní po výrobě) a u druhé šarže (25 dní po výrobě) u různých vzorků

Z obrázku 22 je vidět vyšší počet sporulujících anaerobních bakterií u šarže 1 oproti šarži 2. Tento rozdíl mezi šaržemi byl statisticky průkazný ($p:0,01 < 0,05$).

Většina surovin použitých k výrobě paštik (vepřové masa z hlavy, laloky, tuk, játra a kůže) snadno podléhá zkáze, pokud nejsou správně skladovány. V těchto surovinách jsou často přítomny bakteriální spory *Clostridium* spp. (FEINER, 2006). Koření je také významným zdrojem tohoto rodu mikroorganismů (METAXOPOULOS et al., 2003). Počátečním článkem přenosu klostridií je trávicí ústrojí. Fekáliemi kontaminovanou půdou a vodou se může následně dostat do potravin. Ke kontaminaci masa může dojít při porážce, uzeniny se mohou znečistit kontaminovanou vodou nebo nedostatečně ošetřenými střevy (GÖRNER, VALÍK, 2004). Spory jsou tepelným opracováním pouze mírně ovlivněny (ICMSF, 2005). Sporulující anaerobní patogeny (*C. botulinum* a *C. perfringens*), které přežijí vaření, se mohou množit, pokud jsou vařené masné výrobky drženy nad 10 °C (*C. botulinum*) nebo nad 15 °C (*C. perfringens*) (JAY et al., 2005). Paštiky by se měly skladovat při teplotě od 0 °C do 4 °C, ale vzhledem k vysoké náchylnosti paštik ke kažení se doporučuje teplota do 2 °C (FEINER, 2006).

Legislativní limity

Počet sporulujících anaerobních bakterií týkající se tepelně opracovaných masných výrobků neudává žádný současný legislativní limit. Neplatná vyhláška č. 132/2004 však udává přípustnou hodnotu *C. perfringens* 10^2 /g u nekrájeného tepelně opracovaného masného výrobku. Právně nezávazná ČSN 56 9609 uvádí jako nejvyšší mezní hodnotu 10^4 *C. perfringens* na gram potraviny určené k přímé spotřebě. V hermeticky balených tepelně opracovaných masných výrobcích – polokonzervách je podle této normy přípustná hodnota 10^2 sulfitredukujících klostridií u dvou vzorků z pěti, zbylé tři vzorky nesmí tyto bakterie obsahovat.

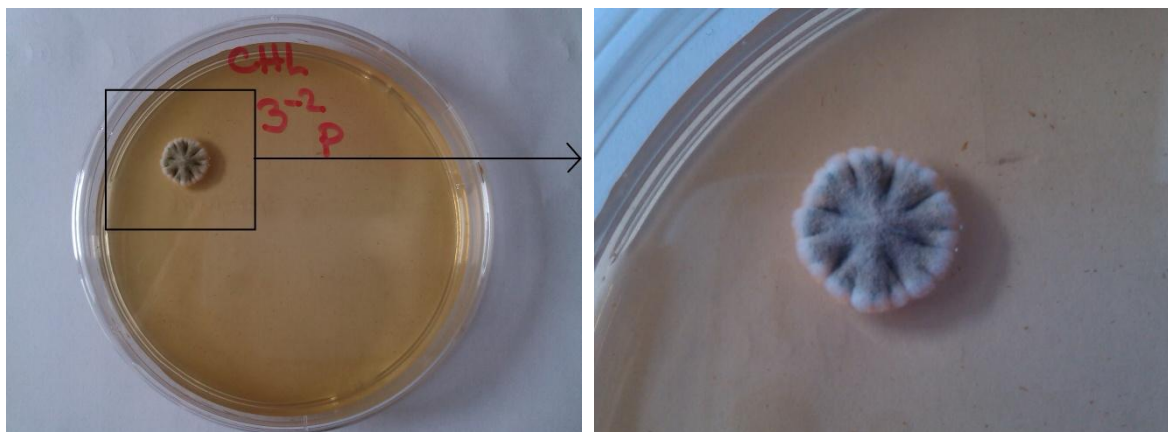
Mikrobiologické doporučení pro masné výrobky vydané britským FOOD AND ENVIRONMENTAL HYGIENE DEPARTMENT (2001) udává u všech kategorií (1 až 5), jako dobrou mikrobiologickou kvalitu (třída A) počet *C. perfringens* do 20 KTJ/g. Akceptovatelná mikrobiologická kvalita (třída B), jež vyjadřuje hraniční limit mikrobiologické kvality, je 20 až 100 KTJ/g. Nad 100 KTJ/g je již mikrobiologická kvalita neuspokojující (třída C).

Nejvyšší naměřená hodnota sporulujících anaerobních bakterií byla 86 KTJ/g u vzorku č. 4, tato hodnota však byla naměřená u paštiky v plastovém obalu 12 dní po vypršení data použitelnosti. Před vypršením data použitelnosti paštik v plastovém obalu byla největší naměřená hodnota 18 KTJ/g u vzorku č. 2 (hrubá paštika v plastu). U paštik ve skle, které mají trvanlivost 3 měsíce, byla nejvyšší naměřená hodnota 59 KTJ/g (33 dní po výrobě) u vzorku č. 3 (jemná paštika). Jedná se tedy o nízké počty sporulujících anaerobních mikroorganismů, svědčící o nízké počáteční mikrobiální kontaminaci surovin.

5.5 Kvasinky a plísň

Negativní význam kvasinek a plísní spočívá především ve schopnosti způsobovat kažení potravin proteolytickou, lipolytickou a sycharolytickou činností. Plísň jsou rizikové také tvorbou mykotoxinů. Počty kvasinek a plísní tedy informují o kažení potraviny. Kvasinky a plísň rostou i za nižších skladovacích teplot a při nižší a_w . Do masných výrobků se mohou dostat především z rostlinných materiálů, nejčastěji z koření. Některé druhy jsou termorezistentní (GÖRNER, VALÍK, 2004).

Ve všech pozitivních vzorcích se vyskytovaly kvasinky, plíseň na Petriho miskách narostla pouze jedna, a to u vzorku č. 3 (viz. obrázek 23).



Obrázek 23 - Jediná kolonie plísně, která v celé mikrobiologické analýze narostla

Vývoj počtu kvasinek a plísni v závislosti na čase

U vzorku č. 1 (hrubá paštika ve skle) z **první šarže** nebyly plísně a kvasinky detekovány v žádné z analýz, šlo tedy o vzorek s nejmenším počtem kvasinek a plísni; největší počet těchto mikroorganismů měl ve druhé analýze vzorek č. 3 (jemná paštika ve skle) a ve třetí analýze vzorek č. 2 (hrubá paštika v plastu).

Tabulka 16 - Statistické prokázání snížení či zvýšení počtu kvasinek a plísni ve vzorcích paštik u šarže 1

IS (0,05)	HS	HP	JS	JP
10 dní	ND	ND	ND	ND
33 dní	ND	$(6,14 \pm 0,01) \cdot 10^2$	$(1,00 \pm 0,01) \cdot 10^2$	$4,55 \pm 0,20$
překrytí	-	NE	NE	NE
změna počtu	-	ZVÝŠENÍ	ZVÝŠENÍ	ZVÝŠENÍ

Kvasinky a plísně u šarže 1 (tabulka 16) nebyly při první analýze detekovány u žádného ze vzorků. U druhé analýzy byly kvasinky a plísně detekovány pouze u vzorku č. 3 (jemná paštika ve skle), kde se jejich počet mírně zvýšil. Ve třetí analýze došlo u vzorků č. 2 a č. 3 ke zvýšení až o dva řády. U vzorku č. 1 (hrubá paštika ve skle) nebyly kvasinky plísně detekovány v žádné analýze.

Tyto výsledky jsou shodné s výsledky studie NIELSEN et al. (2009), s výrobním místem A, kde po výrobě paštik také nebyly detekovány žádné kvasinky, ale po vypršení doby použitelnosti došlo ke zvýšení počtu u některých vzorků. Izoláty byly identifikovány jako *Candida zeylanoides*. Dle FERNANDES (2009) jsou výrobky

v obalovém střívků náchylné na vnějším povrchu zejména k rodům *Candida*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Galactomyces*, *Pichia*, *Rhodotorula* a *Torulaspora*.

Kvasinky a plísně u **druhé šarže** nebyly u žádné z analýz vzorků č. 1, č. 2 a č. 4 detekovány. U vzorku č. 3 (jemná paštika ve skle) ale v druhé analýze narostla jedna kolonie plísně. Jinak ale u tohoto vzorku plísně a kvasinky také nebyly detekovány. Pravděpodobně se jednalo o termorezistentní druh plísně, který přežil tepelné opracování. Do paštikového díla se plísně mohly dostat např. z kořenící směsi.

Nepřítomnost kvasinek je shodná s výsledky studie NIELSEN et al. (2009), s výrobním místem B, kde po výrobě paštik také nebyly detekovány žádné kvasinky. Další analýzy už ve studii nebyly provedeny.

Mezi počtem kvasinek a plísní šarže 1 (24. den po výrobě) a šarže 2 (25. den po výrobě) nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl.

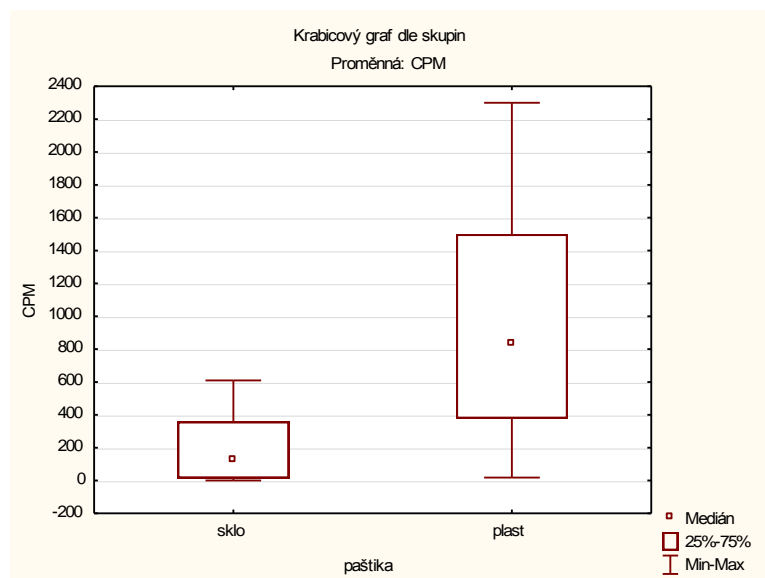
Legislativní limity

Počty kvasinek a plísní nejsou platnou legislativou omezené, ale jejich výskyt může způsobit vady výrobků. Právně nezávazná ČSN 56 9609 udává $10^7/g$ jako nejvyšší mezní hodnotu u potravin určených k přímé spotřebě. Nejvyšší počet kvasinek a plísní byl pozorován u hrubé paštiky v plastu ($6,1 \cdot 10^2$), tato hodnota však byla naměřena po uplynutí doby použitelnosti.

Kvasinky a plísně se mohou stát dominující mikroflórou a způsobit kažení, zejména pokud jsou bakterie inhibovány. Z výsledků vyplývá, že se kvasinky v paštikách po výrobě nevyskytují vůbec, nebo pouze v malých množstvích. Analyzované vzorky tedy byly vyrobeny za dobrých hygienických podmínek a nemělo by docházet k problémům s kažením způsobeným kvasinkami či plísněmi.

5.6 Zjišťování rozdílu počtu jednotlivých skupin mikroorganismů u paštik ve skle a v plastovém obalu

Při porovnání CPM u paštik ve skle a v plastovém obalu byl zjištěn statisticky významný rozdíl ($p: 0,03 < 0,05$). Jak vyplývá z obrázku 24, paštiky v plastu mají vyšší CPM než paštiky ve skle. Obě paštiky jsou pasterizovány při stejné teplotě. Hermetické uzavření skleněného obalu představuje významnou překážku pro mikroorganismy. Mezi počtem enterokoků, koliformních bakterií, sporulujících bakterií a kvasinek a plísní mezi paštikami ve skle a v plastu není statisticky významný rozdíl.



Obrázek 24 – Krabicový graf: Srovnání CPM mezi paštikami ve skle a v plastu

5.7 Zjišťování rozdílu počtu jednotlivých skupin mikroorganismů u hrubých a jemných paštik

Hrubé a jemné paštiky mají odlišné složení. Hrubé paštiky mají oproti jemným jinou kořenící směs, navíc obsahují palmový tuk a kořenící extrakt a mají o 1 g dusitanu sodného navíc. Výrobní proces se u hrubých a jemných paštik liší v tom, že u hrubých paštik se masné suroviny nemělní v kutru, ale přeřezou se přes desku s otvory a následně se suroviny zamíchají a ihned plní. Mezi kontaminací CPM u hrubých paštik a jemných paštik však není statisticky významný rozdíl ($p < 0,05$), stejně jako u kontaminace enterokoky, koliformními bakteriemi, sporulujícími bakteriemi a kvasinkami a plísněmi, které se u hrubých a jemných paštik taktéž neliší. Rozdílné složení a odlišný výrobní postup paštik tedy mikrobiologii nijak významně neovlivnil.

6 ZÁVĚR

Mikroorganismy jsou součástí všech skupin masných výrobků. Je třeba rozlišovat mikroorganismy žádoucí, nežádoucí a mikroorganismy způsobující alimentární onemocnění. Posledním dvěma skupinám mikroorganismů je nutné zamezit v růstu, nebo je usmrtit. Toho se u masných výrobků dosahuje řadou konzervačních zákroků: zejména solením, uzením, sušením a tepelným opracováním, skladováním při chladírenských teplotách, nebo použitím startovacích kultur jako konkurenční mikroflóry. Nejčastěji se k zajištění zdravotní nezávadnosti výrobků z mikrobiologického hlediska používají kombinace více překážek. Nelze také opomenout dodržování zásad správné výrobní a hygienické praxe.

Praktickou částí diplomové práce byla mikrobiologická analýza tepelně opracovaných masných výrobků (paštik). Analyzovány byly čtyři druhy paštik: hrubá paštika ve skle, hrubá paštika v plastovém obalu, jemná paštika ve skle a jemná paštika v plastovém obalu. V rámci každé šarže byly provedeny tři analýzy. Analýzy první šarže byly provedeny po 10, 24 a 33 dnech. Analýzy druhé šarže byly provedeny po 5, 18 a 25 dnech. Paštiky ve skle mají trvanlivost 3 měsíce, datum použitelnosti u nich tedy ještě nevypršelo. Paštiky v plastovém obalu však mají trvanlivost 21 dní, druhá a třetí analýza u první šarže a třetí analýza u druhé šarže byly tedy provedeny krátce po vypršení doby použitelnosti.

Z výsledků lze vyvodit tyto závěry:

- dle zjištěného CPM, počtu enterokoků, koliformních bakterií, sporulujících bakterií a kvasinek a plísní lze předpokládat, že ve společnosti není problém při dodržování hygienických směrnic při výrobě, přepravě a skladování;
- paštiky z první šarže měly 24 dní po výrobě vyšší CPM, počet enterokoků i počet sporulujících anaerobních bakterií než paštiky z druhé šarže 25 dní po výrobě;
- paštiky v plastovém obalu měly vyšší CPM než paštiky ve skle, u ostatních stanovovaných skupin mikroorganismů nebyl zjištěn statisticky průkazný rozdíl;
- mezi kontaminací hrubých a jemných paštik nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl, rozdílné složení a odlišný výrobní postup paštik tedy mikrobiologii nijak významně neovlivnilo.

7 PŘEHLED POUŽITÉ LITERATURY

ADVISORY COMMITTEE ON THE MICROBIOLOGICAL SAFETY OF FOOD (ACMSF). *Report on Vacuum Packaging and Associated Processes*. Londýn: HMSO, 1992, 72 s. ISBN: 0 11 32 1558 4.

BALÁŠ J. Posílení bezpečnosti masných polotovarů s využitím ochranných kultur. *Maso, odborný časopis pro obor zpracování masa*. 2014, 7, s. 37 až 39.

BERNÁLDEZ V., CÓRDOBA J. J., RODRÍGUEZ M., CORDERO M., POLO L. a RODRÍGUEZ A. Effect of *Penicillium nalgiovense* as protective culture in processing of dry-fermented sausage “salchichón”. *Food Control* [online]. 2013, 32 (1), s. 69 až 76 [cit. 2015-02-13]. DOI: 10.1016/j.foodcont.2012.11.018. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0956713512006202>

BLACKBURN C. V. *Food spoilage microorganisms*. 1. vyd. Cambridge: Woodhead Publishing Limited, 2006, 712 s. ISBN-13: 978-1-84569-141-7.

BOVOLENTA S., BOSCOLO D., DOVIER S., MORGANTE M., PALLOTTI A. a PIASENTIER A. Effect of pork lard content on the chemical, microbiological and sensory properties of a typical fermented meat product (Pitina) obtained from Alpagota sheep. *Meat Science* [online]. 2008, 80 (3), s. 771 až 779 [cit. 2015-02-13]. DOI: 10.1016/j.meatsci.2008.03.021. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0309174008000909>

BRIZIO A. P. D. R., PRENTICE C. “Bare” or “Gloved” Hands: A Study on the Production of Safe Food. *International Journal of Food Engineering* [online]. 2014, 10 (4), s. 721 až 726 [cit. 2015-02-11]. DOI: 10.1515/ijfe-2014-0196. Dostupné z: <http://www.degruyter.com/view/j/ijfe.2014.10.issue-4/ijfe-2014-0196/ijfe-2014-0196.xml>

BRYCHTA J., BULAWOVÁ H., KLÍMOVÁ E., BRYCHTA T. a STEINHAUSER L. Jaké riziko představuje přítomnost *Bacillus cereus* a *Bacillus pumillus* v potravinách? *Maso, odborný časopis pro obor zpracování masa*, 2009, 4, s. 36 až 38.

BURDOVÁ E. *Mikroflóra masných výrobků*. Bakalářská práce. Mendelova univerzita v Brně, 2013, 57 s.

BURDYCHOVÁ R., SLÁDKOVÁ P. *Mikrobiologická analýza potravin*. 1. vyd. Brno: MZLU v Brně, 2007, 208 s. ISBN 978-80-7375-116-6.

CABRERA-DIAZ E., BARBOSA-CARDENAS C. M., PEREZ-MONTAÑO J. A., GONZALEZ-AGUILAR D., PACHECO-GALLARDO C. a BARBA J. Occurrence, Serotype Diversity, and Antimicrobial Resistance of *Salmonella* in Ground Beef at Retail Stores in Jalisco State, Mexico. *Journal of Food Protection* [online]. 2013, 76 (12), s. 2004 až 2010 [cit. 2015-02-12]. DOI: 10.4315/0362-028X.JFP-13-109. Dostupné z: <http://openurl.ingenta.com/content/xref?genre=article&issn=0362-028X&volume=76&issue=12&spage=2004>

CEMPÍRKOVÁ R., LUKÁŠOVÁ J. a HEJLOVÁ Š. *Mikrobiologie potravin*. 1. vyd. České Budějovice: Jihočeská univerzita, 1997, 165 s. ISBN 80-7040-254-7.

CWIKOVÁ O. *Bakterie podílející se na produkci biogenních aminů ve vybraných fermentovaných potravinách*. Disertační práce, MZLU v Brně, 2009, 114 s.

ČSN 56 9609 Pravidla správné hygienické a výrobní praxe. *Mikrobiologická kritéria pro potraviny: principy stanovení a aplikace*.

ČSN ISO 4832 Mikrobiologie. *Všeobecné pokyny pro stanovení počtu koliformních bakterií*.

ČSN ISO 4833 Mikrobiologie. *Všeobecné pokyny pro stanovení celkového počtu mikroorganismů*.

ČSN ISO 7954 Mikrobiologie. *Všeobecné pokyny pro stanovení počtu kvasinek a plísní.*

DEUTSCHEN GESELLSCHAFT FÜR HYGIENE UND MIKROBIOLOGIE (DGHM).

Veröffentlichte mikrobiologische Richt- und Warnwerte zur Beurteilung von Lebensmitteln [online]. 2011, 42 s. Dostupné na:

http://www.google.cz/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&ved=0CCEQFjAA&url=http%3A%2F%2Fwww.dghm.org%2Fm_275&ei=V18NVfSTE5bnapWggZgJ&usg=AFQjCNEseoBFNXJz6wVEWRDKILpavIqHYA&bvm=bv.88528373,d.d2s

DIKEMAN M., DEVINE C. *Encyclopedia of meat sciences*. 2. vyd. Londýn: Academic press, 2014, 1696 s. ISBN 9780123847348.

DOYLE M. P., BUCHANAN R. L. *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers*. 4. vyd. Washington: ASM Press, 2013, 1118 s. ISBN 978-1-55581-846-3.

EEROLA H. S., ROIG SAGUÉS A. X., HIRVI T. K. Biogenic amines in Finnish dry sausages [online]. *Journal of Food Safety*, 1998 [cit. 2013-03-07]. Dostupné na: <http://agris.fao.org>

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA). The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2007. *EFSA Journal* [online]. 2009, 312 s. [cit. 2015-02-12]. doi:10.2903/j.efsa.2009.223r. Dostupné z: <http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/223r.htm>

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA). The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2012. *EFSA Journal* [online]. 2014, 12 (2), 312 s. [cit. 2015-02-12]. doi:10.2903/j.efsa.2014.3547. Dostupné z: <http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/3547.htm>

FAO/WHO Working Group (FAO, WHO Společná pracovní skupina). *Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food: Report of a Joint FAO/WHO Working Group on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food*. Ontario: FAO, WHO. 2002, 11 s.

FAUCITANO, L., IELO M. C., STER C., LO FIEGO D. P., METHOT S. a SAUCIER L. Shelf life of pork from five different quality classes. *Meat Science* [online]. 2010, 84 (3), s. 466 až 469 [cit. 2015-02-12]. DOI: 10.1016/j.meatsci.2009.09.017. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0309174009003118>

FEINER G. *Meat products handbook*. Cambridge: Woodhead Publishing Limited, 2006, 648 s. ISBN-10: 1-84569-172-5.

FERNANDES R. *Microbiology handbook: meat products*. Leatherhead: Leatherhead Publishing, 2009, 297 s. ISBN 978-1-905224-66-1.

FILIMON M. N., BOROZAN A., BOREDEAN D., RADU F. a POPESCU R.

Microorganisms, Qualitative Indicators for Meat Products. *Animal Science and biotechnologies* [online]. 2010, 43 (2), s. 346 až 349 [cit. 2015-02-12]. Dostupné z:

<http://connection.ebscohost.com/c/articles/60948134/microorganisms-qualitative-indicators-meat-products>

FOOD AND ENVIRONMENTAL HYGIENE DEPARTMENT. *Microbiological Guidelines for Ready-to-eat Food* [online]. 2001, 10 s. [cit. 2015-02-12]. Dostupné z:

http://www.google.cz/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=5&ved=0CD4QFjAE&url=http%3A%2F%2Fwww.cfs.gov.hk%2Fenglish%2Ffood_leg%2Ffiles%2Fready-to-eat-food.pdf&ei=7EwNVZfAG8rrape7gtAH&usg=AFQjCNGvt2BIEpiCl-Jk3U0QKQZvAHvuMQ&bvm=bv.88528373,d.d2s

FORSYTHE S. J. *The Microbiology of Safe Food*. 1. vyd. Londýn: Blackwell Science, 2000, 412 s. ISBN 0-632-05487-5.

FORSYTHE S., HAYES P. *Food Hygiene, Microbiology and HACCP*. 3. vyd. Gaithersburg: Aspen Publishers, 1998, 449 s. ISBN 0-7514-0450-0.

FRANZ C. Thermotolerance of meat spoilage lactic acid bacteria and their inactivation in vacuum-packaged vienna sausages. *International Journal of Food Microbiology* [online]. 1996, 29 (1), s. 59 až 73 [cit. 2015-02-13]. DOI: 10.1016/0168-1605(95)00022-4. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0168160595000224>

FRANZ CH. M. A. P., STILES M. E., SCHLEIFER K. H. a HOLZAPFEL H. W. Enterococci in fous - a conundrum for food safety. *International Journal of Food Microbiology* [online]. 2003, 88 (2 až 3), s. 105 až 122 [cit. 2015-02-13]. Doi:10.1016/S0168-1605(03)00174-0. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160503001740>

FRATAMICO P. M., ANNOUS B. A. a GUNTHER N. W. IV. *Biofilms in the food and beverage industries*. Cambridge: Woodhead Publishing Limited, 2009, 580 s. ISBN 978-1-84569-716-7.

GARCÍA C., MARTÍN A., TIMÓN M. L. a CÓRDOBA J. J. Microbial populations and volatile compounds in the bone taint spoilage of dry cured ham. *Letters in Applied Microbiology* [online]. 2000, 30, s. 61 až 66 [cit. 2015-02-13]. Dostupné z: <http://www.readcube.com/articles/10.1046%2Fj.1472-765x.2000.00663.x>

GOULTER R. M., GENTLE I. R. a DYKES G. A. Issues in determining factors influencing bacterial attachment: a review using the attachment of *Escherichia coli* to abiotic surfaces as an example. *Letters in Applied Microbiology* [online]. 2009, 49, s. 1 až 7 [cit. 2015-02-13]. Dostupné z: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1472-765X.2009.02591.x/pdf>

GÖRNER F., VALÍK L. *Aplikovaná mikrobiológia požívatin*. 1. vyd. Bratislava: Malé Centrum, 2004, 528 s. ISBN 80-967064-9-7.

HECER C., ULUSOY SÖZEN B. H. Microbiological properties of mechanically deboned poultry meat that applied lactic acid, acetic acid and sodium lactate. *African Journal of Agricultural Research* [online]. 2011, 6 (16), s. 3847 až 3852 [cit. 2015-02-13]. Dostupné z: http://www.researchgate.net/publication/268416412_Microbiological_properties_of_mechanically_deboned_poultry_meat_that_applied_lactic_acid_acetic_acid_and_sodium_lactate

HOLKO I., HRABĚ J., ŠALAKOVÁ A. a RADA V. The substitution of a traditional starter culture in mutton fermented sausages by *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium animalis*. *Meat Science* [online]. 2013, 94 (3), s. 275. [cit. 2015-02-13] Doi: 10.1016/j.meatsci.2013.03.005. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23567124>

HONG Y., PAN Y., EBNER P. D. Meat science and muscle biology symposium: Development of Bacteriophage treatments to reduce *Escherichia coli* O157:H7 contamination of beef products and produce. *Journal of Animal Science*, 2014, 92 (4), s. 1366 až 1377. [cit. 2015-02-13] DOI: 10.2527/jas2013-7272. Dostupné z: <http://www.scopus.com/record/display.url?eid=2-s2.0-84896991101&origin=inward&txGid=B68CB7C10602D85677F8012EB3E9420F.euC1gMODexYlPkQec4u1Q%3a1>

HORÁČEK J. a kolektiv. *Základy lékařské mikrobiologie*. 1. vyd. Praha: Karolinum, 2000, 309 s. ISBN 80-246-0006-4.

HUI Y. *Handbook of meat and meat processing*. 2. vyd. Boca Raton: CRC Press, 2012, 982 s. ISBN 978-1-4398-3683-5.

HULÁNKOVÁ R. Vlastnosti salmonel a jejich výskyt v potravinovém řetězci člověka. *Maso, odborný časopis pro obor zpracování masa*. 2013, 5, s. 37 až 43.

CHEN Q., LI H., OUYANG Q. a ZHAO J. Identification of spoilage bacteria using a simple colorimetric sensor array. *Sensors and Actuators B: Chemical* [online]. 2014, 205, s. 1 až 8 [cit. 2015-02-12]. DOI: 10.1016/j.snb.2014.08.025. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0925400514009939>

INGR I. Zrání masa a jeho praktický význam [online]. *Český svaz zpracovatelů masa*, 2003 [cit. 2013-03-07]. Dostupné na <http://www.cszm.cz>

INGR I. *Produkce a zpracování masa*. 2. vyd. Brno: Mendelova univerzita, 2011, 202 s. ISBN 978-80-7375-510-2.

INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS (ICMSF). *Microorganisms in Foods 6: Microbial Ecology of Food Commodities*. 2. vyd. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2005, 763 s. ISBN: 0-306-48676-8.

JALOSINSKA M., WILCZAK J. Influence of plant extracts on the microbiological shelf life of meat products [online]. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 2009 [cit. 2013-03-07]. Dostupné na: <http://agris.fao.org>

JAY J. M., VILAI J. P. a HUGHES M. E. Profile and activity of the bacterial biota of ground beef held from freshness to spoilage at 5–7 °C. *International Journal of Food Microbiology* [online]. 2003, 81 (2), s. 105 až 111 [cit. 2015-02-11]. doi:10.1016/S0168-1605(02)00189-7. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160502001897>

JAY J. M., LOESSNER M. J. a GOLDEN D. A. *Modern Food Microbiology*. New York: Springer, 2005, 790 s.

JAYASENA D. D., JO C. Essential oils as potential antimicrobial agents in meat and meat products: A review. *Trends in Food Science & Technology* [online]. 2013, 34 (2), s. 96 až 108 [cit. 2015-02-11]. DOI: 10.1016/j.tifs.2013.09.002. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0924224413002033>

JELENA J., BRANKA, B., BRANKO V., BRANKICA L., TATJANA B., RADMILA M. a MILAN M. Mikrobiološki status pilećeg mehanički separisanog mesa. *Meat Technology/Tehnologija Mesa* [online]. 2013, 54 (2), s. 117 až 122 [cit. 2015-02-13]. doi:10.5937/tehmesa1302117J. Dostupné z: <http://scindeks.ceon.rs/Article.aspx?artid=0494-98461302117J>

JŮZL M., KALHOTKA L., SÝKORA V., BURDOVÁ E. a BÜRGEROVÁ L. Zhodnocení jakosti masného výrobku s přídavkem jeleního masa. *Hygiena a technologie potravin - XLIII. Lenfeldovy a Höklovy dny*. 1. vyd. Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, 2013, s. 153 až 156. ISBN 978-80-7305-664-3.

KADLEC P., MELZUCH K. a VOLDŘICH M. *Co byste měli vědět o výrobě potravin?* 1. vyd. Ostrava: Key Publishing, 2009, 536 s. ISBN 978-80-7418-051-4.

KALHOTKA L. CWIKOVÁ O., ČÍRTKOVÁ V., MATOUŠOVÁ Z. a PŘICHYSTALOVÁ J. Changes in counts of microorganisms and biogenic amines production during the manufacture of fermented sausages Poličan [online]. *The Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 2012 [cit. 2013-03-07]. Dostupné na: <http://www.jmbfs.org>

KALIN R. a ÖNGÖR H. Tüketime Sunulan Kıymalarda Escherichia coli O157: H7'nin ve Bazı Virülens Genlerinin Araştırılması. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* [online]. 2014 [cit. 2015-02-12]. DOI: 10.9775/kvfd.2014.11310. Dostupné z: http://vetdergi.kafkas.edu.tr/extdocs/2014_6/957-960.pdf

KAMENÍK J. *Trvanlivé masné výrobky*. 1. vyd. Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita, 2010, 262 s. ISBN 978-80-7305-106-8.

KAMENÍK J. *Hygiena a technologie masa: Trvanlivé masné výrobky*. Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, 2012, 117 s. ISBN 978-80-7305-608-7

KAMENÍK J., DUŠKOVÁ M., ŠEDO O., ZDRÁHAL Z., SALÁKOVÁ A. a LAČANIN I. *Weissella viridescens* jako původce sensorických změn salámu vysočina – případová studie. *Maso, odborný časopis pro obor zpracování masa*. 2014, 6, s. 39 až 42.

KAMENÍK J. a kolektiv. *Maso jako potravina: produkce, složení a vlastnosti masa*. 1. vyd. Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, 2014, 328 s. ISBN 978-80-7305-673-5 (v textu označeno jako 2014a).

KERRY J. P., KERRY J. F. *Processed meats: Improving safety, nutrition and quality*. Cambridge: Woodhead Publishing Limited. 2011, 724 s. ISBN 978-0-85709-294-6.

KHAN M. I., ARSHAD M. S., ANJUM F. M., SAMEEN A. a GILL W. T. Meat as a functional food with special reference to probiotic sausages. *Food Research International* [online]. 2011, 44 (10), s. 3125 až 3133 [cit. 2015-02-13]. DOI: 10.1016/j.foodres.2011.07.033. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0963996911004819>

KLINTH JENSEN W., DEVINE C. a DIKEMAN M. *Encyclopedia of meat sciences*. 1. vyd. Oxford: Elsevier, 2004, 1 až 499 s., 502 až 941 s, 944 až 1473 s. ISBN 0-12-464970-x.

KOZÁK A. Chladicí řetězec pro maso a masné výrobky. *Maso: odborný časopis pro výrobce, zpracovatele a prodejce masa a masných výrobků*. 2010, 5, s. 6.

KRÖCKEL L., JIRA W., KÜHNE D. a MÜLLER W. D. Creatinausblühungen auf der Oberfläche vorverpackter fermentierter Rohwürste. *Mitteilungen* [online]. 2003, 42 (159), s. 7 až 14. [cit. 2015-02-13]. Dostupné z: HTTP://WWW.FGBAFF.DE/UPLOAD/MEINE_BILDER/MTB-01-2003/MB159_07B14_4C_8_KRCKEL.PDF

LARIVIÈRE-GAUTHIER G., LETELLIER A., KÉROUANTON A., BEKAL S., QUÉSSY S., FOURNAISE S. a FRAVALO P. Analysis of *Listeria monocytogenes* Strain Distribution in a Pork Slaughter and Cutting Plant in the Province of Quebec. *Journal of Food Protection* [online]. 2014-12-01, 77 (12), s. 2121 až 2128 [cit. 2015-03-21]. DOI: 10.4315/0362-028X.JFP-14-192. Dostupné z: <http://openurl.ingenta.com/content/xref?genre=article&issn=0362-028X&volume=77&issue=12&spage=2121>

LATORRE-MORATALLA M. L. a kolektiv. Control of Biogenic Amines in Fermented Sausages: Role of Starter Cultures. *Frontiers in Microbiology* [online]. 2012, 3, 169 s. [cit. 2013-03-07]. Dostupné na: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

LAWRIE R. A., LEDWARD D. A. *Lawrie's meat science*. 7. vyd. Cambridge: Woodhead Publishing Limited, 2006, 442 s. ISBN-13:978-1-84569-159-2.

LINGBECK J. M., CORDERO P., O'BRYAN C. A., JOHNSON M. G., RICKE S. C. a CRANDALL P. G. Functionality of liquid smoke as an all-natural antimicrobial in food preservation. *Meat Science* [online]. 2014, 97 (2), s. 197 až 206 [cit. 2015-02-13]. DOI: 10.1016/j.meatsci.2014.02.003. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0309174014000394>

LIU H., PEI H., HAN Z., FENG G. a LI D. The antimicrobial effects and synergistic antibacterial mechanism of the combination of ϵ -Polylysine and nisin against *Bacillus subtilis*. *Food Control* [online]. 2015, 47, s. 444 až 450 [cit. 2015-02-13]. DOI: 10.1016/j.foodcont.2014.07.050. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0956713514004356>

LORENCOVA A., VASICKOVA P., MAKOVCOVA J. a SLANA I. Presence of *Mycobacterium avium* Subspecies and Hepatitis E Virus in Raw Meat Products. *Journal of Food Protection* [online]. 2014-02-01, 77 (2), s. 335 až 338 [cit. 2015-04-14]. DOI: 10.4315/0362-

028X.JFP-13-252. Dostupné z: <http://openurl.ingenta.com/content/xref?genre=article&issn=0362-028X&volume=77&issue=2&spage=335>

LOZANO-OJALVO D., RODRÍGUEZ A., CORDERO M., BERNÁLDEZ V., REYES-PRIETO M. a CÓRDOBA J. J. Characterisation and detection of spoilage mould responsible for black spot in dry-cured fermented sausages. *Meat Science* [online]. 2015, 100, s. 283 až 290 [cit. 2015-02-13]. DOI: 10.1016/j.meatsci.2014.10.003. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0309174014004379>

LU H., PAN Y., ZHAO Y. a SUN X. Antibacterial Activity of Eighteen Edible Spice Extracts on Five Food-borne Bacteria. *Natural Product Research* [online]. 2010, 22 (5), s. 883 až 889 [cit. 2015-02-13]. Dostupné z: <http://eds.a.ebscohost.com.ezproxy.muni.cz/eds/detail/detail?sid=c64e9d36-6745-4f6a-af33-983a6b7a47f1%40sessionmgr4002&vid=0&hid=4213&bdata=JkF1dGhUeXBIPWlwLGNvb2tpZSx1aWQmbGFuZz1jcyZzaXRIPWVkcylsaXZlJnNjb3BIPXNpdGU%3d#db=bth&AN=57280358>

LUDEMANN V., POSE G., MOAVRO A., MALIAVIABARRENA M. G., FANDIÑO R., RIPOLL G., BASÍLICO J. C. a PARDO A. G. Toxicological assessment of *Penicillium nalgiovense* strains for use as starter cultures in the manufacture of dry fermented sausages. *Journal Of Food Protection* [online]. 2009, 72 (8), s. 1666 až 1670 [cit. 2015-02-13]. Dostupné z: <http://eds.b.ebscohost.com.ezproxy.muni.cz/eds/detail/detail?sid=06be50c6-cb87-467d-a4b3-451e653b1f9c%40sessionmgr113&vid=0&hid=108&bdata=JkF1dGhUeXBIPWlwLGNvb2tpZSx1aWQmbGFuZz1jcyZzaXRIPWVkcylsaXZlJnNjb3BIPXNpdGU%3d#db=cmedm&AN=19722398>

LUKÁŠOVÁ J. Význam mikrobiologie pro zajištění zdravotní nezávadnosti a jakosti potravin [online]. *Veterinářství*, 2004, 54, [cit. 2013-03-07]. Dostupné na: <http://www.vetweb.cz>

MAČÁK J. *General pathology*. 1. vyd. Brno: Masaryk University, 2008, 190 s. ISBN 978-80-210-4549-1.

MARTÍN B., PERICH A., GÓMEZ D., YANGÜELA J., RODRÍGUEZ A., GARRIGA M. a AYMERICH T. Diversity and distribution of *Listeria monocytogenes* in meat processing plants. *Food Microbiology* [online]. 2014, 44, s. 119 až 127 [cit. 2015-02-11]. DOI: 10.1016/j.fm.2014.05.014. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0740002014001208>

METAXOPOULOS J., KRITIKOS D. a DROSINOS E. H. Examination of microbiological parameters relevant to the implementation of GHP and HACCP system in Greek meat industry in the production of cooked sausages and cooked cured meat products. *Food Control* [online]. 2003, 14 (5), s. 323 až 332 [cit. 2015-03-18]. DOI: 10.1016/S0956-7135(02)00097-X. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S095671350200097X>

MITH H., DURÉ R., DELCENSERIE V., ZHIRI A., DAUBE G. a CLINQUART A. Antimicrobial activities of commercial essential oils and their components against food-borne pathogens and food spoilage bacteria. *Food Science & Nutrition* [online]. 2014, 2 (4), s. 403 až 416 [cit. 2015-02-13]. DOI: 10.1002/fsn3.116. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/fsn3.116>

MOLDOVANU C., LASLO C. Research on raw material correlation and soy protein derivatives used for meat preparations in membrane. *Animal Biology* [online]. 2010, 2 (2), s. 53 až 58 [cit. 2015-02-13]. Dostupné z: <http://eds.b.ebscohost.com.ezproxy.muni.cz/eds/pdfviewer/pdfviewer?sid=8d23a8a6-a6e6-4d7d-9de4-5d7e7dd6faa8%40sessionmgr198&vid=1&hid=108>

MOTARJEMI Y., ADAMS M. *Emerging foodborne pathogens*. Cambridge: Woodhead Publishing Limited, 2006, 634 s. ISBN 13: 978-1-84569-139-4.

NAŘÍZENÍ EVROPSKÉHO PARLAMENTU A RADY (ES) č. 852/2004, o hygieně potravin.

NAŘÍZENÍ EVROPSKÉHO PARLAMENTU A RADY (ES) č. 853/2004, stanovující zvláštní hygienické předpisy pro potraviny živočišného původu.

NAŘÍZENÍ EVROPSKÉHO PARLAMENTU A RADY (ES) č. 2073/2005 o mikrobiologických kritériích pro potraviny.

NASTASIJEVIC, I., MITROVIC R. a BUNCIC S. Occurrence of *Escherichia coli* O157 on hides of slaughtered cattle. *Letters in Applied Microbiology* [online]. 2007, [cit. 2015-02-16]. DOI: 10.1111/j.1472-765X.2007.02270.x. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1472-765X.2007.02270.x>

NASSER L. A. Molecular identification of isolated fungi, microbial and heavy metal contamination of canned meat products sold in Riyadh, Saudi Arabia. *Saudi Journal of Biological Sciences* [online]. 2014, [cit. 2015-02-13]. DOI: 10.1016/j.sjbs.2014.08.003. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1319562X14000953>

NIELSEN S. D., JACOBSEN T., JESPERSEN L., KOCH G. A. a ANERBORG N. Occurrence and growth of yeasts in processed meat products-implication for potential spoilage. *Meat science*, 2009, 80 (3), s. 919 až 929

NOLLET L. M. L., TOLDRÁ F. *Advanced Technologies for Meat Processing*. Florida: CRC Press. 2006, 483 s., ISBN:10: 1-57444-587-1

NÚÑEZ F., LARA M. S., PEROMINGO B., DELGADO J., SÁNCHEZ-MONTERO L. a ANDRADE M. J. Selection and evaluation of *Debaryomyces hansenii* isolates as potential bioprotective agents against toxigenic penicillia in dry-fermented sausages. *Food Microbiology* [online]. 2015, 46, s. 114 až 120 [cit. 2015-02-13]. DOI: 10.1016/j.fm.2014.07.019. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0740002014001956>

OCHOA M. L., HARRINGTON P. B. Immunomagnetic Isolation of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 from Ground Beef and Identification by Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry and Database Searches. *Analytical Chemistry* [online]. 2005, 77 (16), 5258 až 5267 [cit. 2015-02-13]. DOI: 10.1021/ac0502596. Dostupné z: <http://pubs.acs.org.ezproxy.muni.cz/doi/abs/10.1021/ac0502596>

O'SULLIVAN L., ROSS R.P a HILL C. Potential of bacteriocin-producing lactic acid bacteria for improvement in food safety and quality [online]. *Biochimie*, 2003 [cit. 2013-03-07]. Dostupné na: <http://agris.fao.org>

PARK M., WANG J., PARK J., FORGHANI F., MOON J. a OH D. Analysis of Microbiological Contamination in Mixed Pressed Ham and Cooked Sausage in Korea. *Journal of Food Protection* [online]. 2014, 77 (3), s. 412 až 418 [cit. 2015-03-18]. DOI: 10.4315/0362-028X.JFP-13-322. Dostupné z: <http://openurl.ingenta.com/content/xref?genre=article&issn=0362-028X&volume=77&issue=3&page=412>

PEARSON A. M., DUTSON T. R. *Quality Attributes and their Measurement in Meat, Poultry and Fish Products*. Wilts: Springer, 1994, 505 s. ISBN 978-1-4615-2167-9.

PEARSON A. M., DUTSON T. R. *Production and Processing of Healthy Meat, Poultry and Fish Products*. Londýn: Blackie Academic and Professional, 1997, 367 s. ISBN-13: 978-1-4613-1125-6.

PEARSON A. M., GILLET T. A. *Processed meats*. 3. vyd. Springer, 1996, 448 s. ISBN 978-1-4615-7685-3.

PIETRI A., BERTUZZI T., GUALLA A. a PIVA G. Occurrence of ochratoxin A in raw ham muscles and in pork products from northern Italy. *Italian Journal of Food Science* [online]. 2006, 1 (18), s. 99 až 106 [cit. 2015-02-13]. Dostupné z: <http://www.ismea.it/flex/AppData/Redational/Normative/D.e604f64a9c00809f4bfb/200760032.pdf>

PIPEK P. *Technologie masa II*. 1. vyd. Kostelní Vydří: Karmelitánské nakl., 1998, 348 s. ISBN 80-7192-283-8.

PIPEK P. Fermentované salámy a probiotika. *Potravinářská revue* [online]. 2008, 3, s. 13 [cit. 2015-03-17]. Dostupné z: <http://agral.cz/Portals/15/pdf/RE3-2008.pdf>

POUMEYROL G., ROSSET P., NOEL V. a MORELLI E. HACCP methodology implementation of meat pâté hazard analysis in pork butchery. *Food Control* [online]. 2010, 21 (11), s. 1500 až 1506 [cit. 2015-03-17]. DOI: 10.1016/j.foodcont.2010.03.017. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S095671351000143X>

RAVISHANKAR R. V., JAMUNA A. B. *Beneficial Microbes in Fermented and Functional Foods*. Florida: CRC Press, 2015, 252 s. ISBN 13:978-1-4822-0663-0

ROBINSON R. K., BATT C. A. a PATEL P. D. *Encyclopedia of food microbiology*. Londýn: Academic Press, 2000, 2364 s. ISBN 0-12-227070-3.

RUBIO R., AYMERICH T., BOVER-CID S., GUÀRDIA M. D., ARNAU J. a GARRIGA M. Probiotic strains *Lactobacillus plantarum* 299V and *Lactobacillus rhamnosus* GG as starter cultures for fermented sausages. *LWT - Food Science and Technology* [online]. 2013, 54 (1), s. 51 až 56 [cit. 2015-02-13]. DOI: 10.1016/j.lwt.2013.05.014. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0023643813001758>

SAGOO S. K., LITTLE C. L., ALLEN G., WILLIAMSON K. a GRANT K. A. Microbiological Safety of Retail Vacuum-Packed and Modified-Atmosphere-Packed Cooked Meats at End of Shelf Life. *Journal of Food Protection*, 2007, 70 (4), s. 943 až 951.

SEDLÁČEK I. *Taxonomie prokaryot*. 1. vyd. Brno: Masarykova univerzita, 2007, 270 s. ISBN 978-80-210-4207-0.

SIMEONOVÁ J., INGR I. a GAJDŮŠEK S. *Zpracování a zbožiznalství živočišných produktů*. 1. vyd. Brno: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, 2003, 122 s. ISBN 80-7157-708-1.

SOFOS J. N. Biofilms: Our Constant Enemies. *Food Safety magazine* [online]. 2009, February/March. [cit. 2015-02-13]. Dostupné z: <http://www.foodsafetymagazine.com/magazine-archive1/februarymarch-2009/biofilms-our-constant-enemies/>

SPERBER W. H., DOYLE M. P. *Compendium of the microbiological spoilage of foods and beverages*. New York: Springer, 2009, 367 s. ISBN 978-1-4419-0825-4.

STEINHAUSER L. a kolektiv. *Hygiena a technologie masa*. 1. vyd. Brno: LAST, 1995, 643 s. ISBN 80-900260-4-4.

STEINHAUSER L. a kolektiv. *Produkce masa*. Tišnov: Last, 2000, 464 s. ISBN 80-900260-7-9.

STEINHAUSEROVÁ I. *Escherichia coli*: Skupiny *E. coli* a jejich význam z pohledu bezpečnosti masa. *Maso, odborný časopis pro obor zpracování masa*. 2014, 6, s. 45 až 51.

SVOBODOVÁ I. *Clostridium botulinum*: vlastnosti a význam v oboru zpracování masa. *Maso, odborný časopis pro obor zpracování masa*. 2014, 1, s. 50 až 56.

ŠILHÁNKOVÁ L. *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology*. 3. vyd. Praha: Academia, 2002, 363 s. ISBN 80-200-1024-6.

ŠKORPILOVÁ T., ŠESTÁKOVÁ B., ŠIMONIOVÁ A. a PIPEK P. Ošetření tepelně opracovaných masných výrobků vysokým tlakem. *Maso, odborný časopis pro obor zpracování masa*. 2014, 4, s. 33 až 36.

TARTÉ R. *Ingredients in Meat Products: Properties, Functionality and Applications*. New York: Springer. 2009, 419 s. ISBN: 978-0-387-71327-4.

TOLDRÁ F. *Dry-cured meat products*. Connecticut: Food and Nutrition Press, Inc. 2002, 244 s. ISBN: 0-91 7678-54-0

TOLDRÁ F. *Handbook of Fermented Meat and Poultry*. Iowa: Blackwell Publishing. 2007, 555 s. ISBN 13: 978-0-8138-1477-3

TOLDRÁ F. *Safety of meat and processed meat*. New York: Springer, 2009, 699 s. ISBN 978-0-387-89026-5.

TOLDRÁ F. *Handbook of meat processing*. Ames, Iowa: Wiley-Blackwell, 2010, 566 s. ISBN 978-0-8138-2182-5.

TRZAŠKOWSKA M., KOŁOŻYN-KRAJEWSKA D., WÓJCIAK K. a DOLATOWSKI Z. Microbiological quality of raw-fermented sausages with *Lactobacillus casei* LOCK 0900 probiotic strain. *Food Control* [online]. 2014, 35 (3), s. 184 až 191 [cit. 2015-02-13]. DOI: 10.1016/j.foodcont.2013.07.002. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0956713513003411>

TURGIS M., VU K. D., DUPONT C. a LACROIX M. Combined antimicrobial effect of essential oils and bacteriocins against foodborne pathogens and food spoilage bacteria. *Food Research International* [online]. 2012, 48 (2), s. 696 až 702 [cit. 2015-02-13]. DOI: 10.1016/j.foodres.2012.06.016. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0963996912002086>

VESKOVIĆ-MORAČANIN S. Lactic acid bacteria bacteriocins as natural food protectors – possibilities of application in meat industry [online]. *Technologija mesa*, 2010 [cit. 2013-03-07]. Dostupné na: <http://agris.fao.org>

VIRGILI R., SIMONCINI N., TOSCANI T., CAMARDO LEGGIERI M., FORMENTI S. a BATTILANI P. Biocontrol of *Penicillium nordicum* Growth and Ochratoxin A Production by Native Yeasts of Dry Cured Ham. *Toxins* [online]. 2012, 4 (12), s. 68 až 82 [cit. 2015-02-13]. DOI: 10.3390/toxins4020068. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/2072-6651/4/2/68/>

VYHLÁŠKA 202/2003 Sb. o veterinárních požadavcích na čerstvé maso, mleté maso, masné polotovary a masné výrobky

VYHLÁŠKA č. 132/2004 o mikrobiologických požadavcích na potraviny, způsobu jejich kontroly a hodnocení.

VYHLÁŠKA č. 122/2011 Sb., kterou se stanoví druhy a podmínky použití přídatných látek a extrakčních rozpouštědel při výrobě potravin.

VYHLÁŠKA č. 159/2014 Sb. pro maso, masné výrobky, ryby, ostatní vodní živočichy a výrobky z nich, vejce a výrobky z nich.

WÓJCIAK K. M., DOLATOWSKI Z. J., KOŁOŻYN-KRAJEWSKA D. a TRZAŠKOWSKA M. The Effect of the *Lactobacillus casei* Lock 0900 Probiotic Strain on the Quality of Dry-Fermented Sausage During Chilling Storage. *Journal of Food Quality* [online]. 2012, 35 (5), s. 353 až 365 [cit. 2015-02-13]. DOI: 10.1111/j.1745-4557.2012.00458.x. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1745-4557.2012.00458.x>

WWW.SZU.CZ/publikace/data/vybrane-infekcni-nemoci-v-cr-v-letech-2003-2012-absolutne [cit. 2015-02-13]

ZHENG-YOU Y., WON-BO S., KYEONG-YEOL K. a DUCK-HWA C. Rapid Detection of Enterotoxigenic *Clostridium perfringens* in Meat Samples Using Immunomagnetic Separation Polymerase Chain Reaction (IMS-PCR). *J. Agric. Food Chem.* [online]. 2010, 58 (12), s. 7135 až 7140. [cit. 2015-02-13]. DOI: 10.1021/jf1009654. Dostupné z: <http://pubs.acs.org.ezproxy.muni.cz/doi/abs/10.1021/jf1009654>

8 SEZNAM POUŽITÝCH TABULEK A OBRÁZKŮ

Tabulka 1 - Specifická saprofytická mikroflóra čerstvého masa skladovaného při teplotě 0 °C až 4 °C za různých balicích podmínek (BLACKBURN, 2006, upraveno)

Tabulka 2 - Členění masných výrobků (VYHLÁŠKA MZE č. 159/2014 Sb.)

Tabulka 3 – Kritéria hygieny výrobního procesu (NAŘÍZENÍ EP A RADY (ES) č. 2073/2005)

Tabulka 4 – Kritéria pro Salmonella spp. v mletém mase a polotovarech (NAŘÍZENÍ EP A RADY (ES) č. 2073/2005)

Tabulka 5 - Doporučená kritéria pro fermentované masné výrobky v KTJ/g (DGHM, 2011)

Tabulka 6 – První mikrobiologická analýza paštik u šarže 1 (10 dní po výrobě) a u šarže 2 (5 dní po výrobě) v KTJ/g

Tabulka 7 – Druhá mikrobiologická analýza paštik u šarže 1 (24 dní po výrobě) a u šarže 2 (18 dní po výrobě) v KTJ/g

Tabulka 8 – Třetí mikrobiologická analýza paštik u šarže 1 (33 dní po výrobě) a u šarže 2 (24 dní po výrobě) v KTJ/g

Tabulka 9 - Statistické prokázání snížení či zvýšení CPM šarže 1 ve vzorcích paštik pomocí intervalu spolehlivosti

Tabulka 10 - Statistické prokázání snížení či zvýšení CPM šarže 2 ve vzorcích paštik pomocí intervalu spolehlivosti

Tabulka 11 - Statistické prokázání snížení či zvýšení počtu enterokoků u šarže 1 ve vzorcích paštik pomocí intervalu spolehlivosti

Tabulka 12 - Statistické prokázání snížení či zvýšení počtu koliformních bakterií ve vzorcích paštik u šarže 1

Tabulka 13 - Statistické prokázání snížení či zvýšení počtu koliformních bakterií ve vzorcích paštik u šarže 2

Tabulka 14 - Statistické prokázání snížení či zvýšení počtu sporulujících anaerobních bakterií ve vzorcích paštik u šarže 1

Tabulka 15 - Statistické prokázání snížení či zvýšení počtu sporulujících anaerobních bakterií ve vzorcích paštik u šarže 2

Tabulka 16 - Statistické prokázání snížení či zvýšení počtu kvasinek a plísní ve vzorcích paštik u šarže 1

Obrázek 1 - Vzorky paštik z první šarže

Obrázek 2 - Jemná paštika ve skle

Obrázek 3 - Jemná paštika v plastovém obalu

Obrázek 4 - Hrubá paštika ve skle

Obrázek 5 - Hrubá paštika v plastovém obalu

Obrázek 6 - Petriho misky připravené k naočkování inokula

Obrázek 7 - Počítání narostlých kolonií na Petriho miskách

Obrázek 8 - CPM: kolonie mikroorganismů narostlé při 30 °C/3 dny na půdě PCA

Obrázek 9 - Vývoj CPM v čase u šarže 1

Obrázek 10 – Vývoj CPM v čase u šarže 2

Obrázek 11 – Porovnání CPM v paštikách u první šarže (24 dní po výrobě) a u druhé šarže (25 dní po výrobě) u různých vzorků

Obrázek 12 - Petriho miska s půdou COMPASS Enterococcus Agar inkubovaná při 44 °C/1 den: enterokoky nejsou přítomny

Obrázek 13 - Vývoj počtu enterokoků v čase u šarže 1

Obrázek 14 – Krabicový graf: srovnání počtu enterokoků v závislosti na době použitelnosti

Obrázek 15 – Porovnání počtu enterokoků v paštikách u první šarže (24 dní po výrobě) a u druhé šarže (25 dní po výrobě) u různých vzorků

Obrázek 16 - Petriho miska s půdou VRBL inkubovaná při 37 °C/1 den: koliformní bakterie a malé kousíčky paštiky

Obrázek 17 - Vývoj počtu koliformních bakterií ve vzorcích paštik v čase u šarže 1

Obrázek 18 – Krabicový graf: Srovnání počtu koliformních bakterií u paštik v plastovém obalu v závislosti na době použitelnosti

Obrázek 19 - Vývoj počtu koliformních bakterií v čase u šarže 2

Obrázek 20 - Porovnání počtu koliformních bakterií v paštikách u první šarže (24 dní po výrobě) a u druhé šarže (25 dní po výrobě) u různých vzorků

Obrázek 21 - Petriho miska s půdou PCA inkubovaná při 30 °C/2 dny: sporulující anaerobní bakterie na ní nejsou, jedná se pouze o malé kousíčky paštiky

Obrázek 22 - Porovnání počtu sporulujících anaerobních bakterií v paštikách u první šarže (24 dní po výrobě) a u druhé šarže (25 dní po výrobě) u různých vzorků

Obrázek 23 - Jediná kolonie plísně, která v celé mikrobiologické analýze narostla

Obrázek 24 – Krabicový graf: Srovnání CPM mezi paštikami ve skle a v plastru

9 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

a_w – vodní aktivita

BA – biogenní amin

BMK – bakterie mléčného kvašení

CO₂ – oxid uhličitý

CPM – celkový počet mikroorganismů

ČR – Česká republika

DFD – suché, tuhé, tmavé maso (odchylka)

EDTA – kyselina etylendiamintetraoctová

Eh – oxidoredukční potenciál

GRAS – generally regarded as safe (všeobecně považováno za bezpečné)

H₀ – nulová hypotéza

H_A – alternativní hypotéza

HACCP – systém analýzy nebezpečí pomocí kritických kontrolních bodů

KTJ – kolonie tvořící jednotku

MALDI TOF – desorpce/ionizace laserem za účasti matrice, hmotnostní analyzátor doby průletu

MSM – mechanicky separované maso

NaCl – chlorid sodný

PCA – Plate Count Agar

PSE – bledé, měkké, vodnaté maso (odchylka)

rRNA – ribozomální RNA

SOM – strojně oddělené maso