

ČESKOSLOVENSKÁ
SOCIALISTICKÁ
REPUBLIKA
(19)



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K PATENTU

246076
(11) (32)

{51} Int. Cl.⁴
A 23 B 4/02

{22} Přihlášeno 10 04 84

{21} {PV 2735-84}

{32} {31} {33} Právo přednosti od 11 04 83
{483801} Spojené státy americké

{40} Zveřejněno 13 02 86

{45} Vydáno 15 12 87

{72}

Autor vynálezu

DAHLSTROM ROBERT VICTOR, NOVATO, KALIFORNIE {Sp. st. a.}

{73}

Majitel patentu

STAUFFER CHEMICAL COMPANY, WESTPORT, CONNECTICUT
{Sp. st. a.}

{54} **Způsob inhibování růstu bakterií Clostridium butulinum v masných
produktech**

1

2

Způsob inhibování růstu bakterií Clostridium botulinum v masných produktech působením dusitanu alkalického kovu, spočívá v tom, že se do masného produktu přidává od 40 do méně než 120 ppm dusitanu alkalického kovu, například dusitanu sodného, společně s 25 až 50 ppm 3-(4-tolylsulfonyl)-akrylonitrilu.

Vynález se týká způsobu inhibování růstu bakterií *Clostridium botulinum* v masných produktech, zejména v rozmělněných masných produktech, a zvláště inhibování růstu těchto bakterií u vepřových výrobků tohoto typu, a prostředku k provádění tohoto způsobu.

Pokud se týče dosavadního stavu techniky, je běžnou praxí po mnoho let konzervovat masné produkty přidavkem dusitanu sodného, který inhibuje růst bakterií *Clostridium botulinum* a produkci botulinového toxinu v masných produktech během skladování těchto materiálů.

Tato přítomnost dusitanu sodného nebo jiných dusičnanů alkalických kovů, kterých se používá jako přídatných látek do potravin, zejména do uzených masných výrobků, které se připravují při vysokých teplotách, se stala v poslední době předmětem zvýšeného zájmu, neboť se zjistilo, že přítomný dusitan sodný se může přivést do reakce se sekundárními a terciárními aminy v případě přípravy tepelně zpracovávaných masných výrobků, za vzniku nitrosaminů. V této souvislosti je nutno uvést, že četné nitrosaminy byly zjištěny jako karcinogenní pro zvířata.

Z výše uvedeného je patrné, že by bylo velice vhodné snížit množství dusitanů přítomných ve skladovaných masných produktech. Ovšem při tomto snižování obsahu dusitanu je třeba mít rovněž na mysli, že je nutno rovněž zabránit produkci smrtelného botulinového toxinu, který se může vyskytnout při skladování masných produktů. Od 15. června 1978 vyžaduje oddělení pro zemědělství Spojených států amerických (U.S. Department of Agriculture), aby veškerá slanina produkovaná za použití dusitanu jako konzervační přísady obsahovala 120 ppm dusitanu sodného k zabránění tvorby botulinového toxinu, a 550 ppm askorbátu sodného nebo erythorbátu sodného za účelem inhibování tvorby nitrosaminů.

V literatuře náležící k dosavadnímu stavu techniky je popsáno několik látek, u kterých bylo zjištěno, že inhibují růst *Clostridium botulinum* a/nebo inhibují vznik botulinového toxinu, v případě, že jsou použity jako náhrada části použitého dusitanu.

Například je možno v tomto směru citovat francouzskou patentovou přihlášku číslo 7 709 108, ve které je uváděna možnost snížení nutného množství dusitanu sodného náhradou části této látky velkým množstvím kyseliny sorbové nebo solemi této sloučeniny.

V patentech Spojených států amerických č. 4 282 260 a č. 4 348 419 se uvádí možnost náhrady použitého dusitanu sodného kyselinou fosforovou nebo sodnou solí, draselnou solí, vápenatou solí nebo hořečnatou solí této sloučeniny.

Podle těchto patentů Spojených států amerických je možno při použití těchto látek, to znamená uvedené kyseliny nebo solí

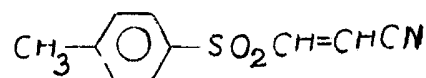
této kyseliny, snížit množství nutného použitého dusitanu sodného v masných produktech ze 120 ppm na přibližně 40 ppm.

Uvedený vynález se týká způsobu inhibování růstu bakterií *Clostridium botulinum* a potlačování tvorby botulinového toxinu během skladování masných produktů.

Způsob inhibování růstu bakterií *Clostridium botulinum* v masných produktech působením dusitanu alkalického kovu podle vynálezu spočívá v tom, že se do masného produktu přidává od 40 do méně než 120 ppm dusitanu alkalického kovu, například dusitanu sodného, společně s 25 až 50 ppm 3-(4-tolylsulfonyl)akrylonitrilu.

Při výhodném provedení tohoto vynálezu se do masného produktu přidává 40 ppm dusitanu alkalického kovu.

3-(4-Tolylsulfonyl)akrylonitril je možno znázornit obecným vzorcem:



Tato sloučenina je například popsána v patentu Spojených států amerických číslo 3 159 532.

Za účelem zjištění účinku uvedené sloučeniny, to znamená 3-(4-tolylsulfonyl)akrylonitrilu, na inhibování růstu *Clostridium botulinum* a na produkci botulinového toxinu v masných produktech, zvláště v produktech z vepřového masa, byla provedena řada pokusů. Kromě toho byly provedeny pokusy za účelem zjištění možného snížení hladiny obsahu dusitanu sodného, přičemž se nahradí dusitan sodný sloučeninou podle uvedeného vynálezu v takovém množství, aby byla zachována konzervační účinnost, tzn. kontrola růstu bakterií *Clostridium botulinum*, za současného snížení tvorby nitrosaminů vzhledem k nízké koncentraci dusitanu.

Z výsledků pokusů, které budou popsány v dalším textu, je zřejmé, že podle uvedeného vynálezu bylo zjištěno, že je možno snížit množství použitého dusitanu z koncentrace 120 ppm na koncentraci asi 40 ppm přidáním uvedené sloučeniny podle vynálezu, zejména v množství v rozmezí od 25 do 50 ppm, přičemž výsledkem je stejný nebo lepší účinek, pokud se týče inhibice růstu bakterií *C. botulinum*.

Pokusy, které budou v dalším popsány, byly prováděny v podstatě následujícím způsobem.

Nejdříve byly připraveny vzorky uzených substrátů z břich vepřů, které měly následující složení:

substrát z břicha vepře	450,00 g
voda	35,00 g

sůl 6,75 g
dextróza 4,50 g
erythorbát sodný 50 ppm

Směsná suspenze sporů *Clostridium botulinum* byla připravena následujícím způsobem:

Nejdříve byly připraveny čtyři zmrazené vzorky bakterií typu A a šest vzorků bakterií typu B, přičemž tyto vzorky byly potom zředěny na koncentraci přibližně 100 sporů na mililitr. Potom bylo připraveno směsné inokulum těchto suspenzí přidáním 3 mililitrů každé kultury do sterilní láhve. Množství sporů ve směsném inokulu bylo stanoveno jako 93 sporů na mililitr.

Vzorky uzených substrátů z břich vepřů byly inokulovány 10 mililitry suspenzí směsných sporů, přičemž byla suspenze kontaktována se vzorkem uzeného masa ve stavu v jakém byla namíchána. Po tomto zpracování byl každý vzorek neprodyšně zabalen do určené nádoby a zahřát na teplotu 53 °C, což je nejobvyklejší konečná používaná teplota v průmyslu přípravy slaninových produktů.

Každý vzorek byl potom umístěn do plastického pytle, přičemž bylo vytvořeno vakuové balení. Tyto vzorky ve formě vakuového balení byly potom umístěny do inkubátoru udržovaném na teplotě 26,5 °C. Tato

balení byla inkubována tak dlouho, dokud nenastal zjevný vývoj plynu, přičemž potom byly vzorky analyzovány na *Clostridium botulinum*.

V případě, že jako testované sloučeniny bylo použito akrylonitrilu, byla tato sloučenina smíchána se vzorkem masa, přičemž bylo nejdříve odváženo potřebné množství této sloučeniny na danou hmotnost masného vzorku, toto množství bylo rozpuštěno v minimálním množství vody a tato směs vody a uvedených sloučenin byla vetřena do vzorku masa za účelem zajištění stejnoměrného rozložení uvedených sloučenin.

Příklad 1

Růst bakterií *Clostridium botulinum* u vzorků uzených substrátů z břich vepřů

Podle tohoto pokusu byly připraveny tři vzorky uzených substrátů z břich vepřů stejným způsobem jako bylo uvedeno shora, přičemž tyto vzorky byly označeny jako vzorky A, B a C. Tyto vzorky obsahovaly 0, 20 a 40 ppm dusitanu sodného.

Výsledky uvedených pokusů jsou uvedeny v následující tabulce č. 1. Pro tyto vzorky mas se předpokládá, že jsou vhodným prostředím pro rozmnožování bakterií *Clostridium*.

Tabulka 1

Růst bakterií *C. botulinum* u testovaných vzorků

Vzorek	NaNO ₂ (ppm)	Doba (dny)	<i>C. botulinum</i> (g)
A	0	0	—
		3	11 000 000
B	20	0	—
		4	8 500 000
C	40	0	—
		5	12 000 000

Příklad 2

Účinek testované sloučeniny

V tomto příkladu byly provedeny pokusy stejným způsobem jako v příkladu 1 se vzor-

ky uzeného substrátu z břich vepřů, které obsahovaly proměnlivou koncentraci dusitanu sodného a akrylonitrilu podle vynálezu.

Výsledky těchto pokusů jsou uvedeny v následující tabulce č. 2.

Tabulka 2

Koncentrace akrylonitrilu (ppm)	Koncentrace erythorbátu sodného (ppm)	Koncentrace dusitanu (ppm)	Doba potřebná k vývinu plynu (dny)	C. botulinum (počet/g)
0	550	120	27	9 100 000
0	550	120	30	6 200 000
0	550	120	28	6 300 000
0	0	40	4	26 000 000
0	0	40	6	19 000 000
0	0	40	6	31 000 000
50	550	40	+NG	140 000
50	550	40	33	2 100 000
50	550	40	+NG	620 000
50	1 000	40	+NG	90 000
50	1 000	40	+NG	110 000
50	1 000	40	+NG	40 000
25	550	40	28	4 300 000
25	550	40	30	7 200 000
25	550	40	30	6 200 000
25	1 000	40	30	5 500 000
25	1 000	40	32	6 300 000
25	1 000	40	30	8 100 000
10	550	40	12	14 000 000
10	550	40	10	9 200 000
10	550	40	11	9 500 000
10	1 000	40	12	12 000 000
10	1 000	40	13	8 100 000
10	1 000	40	12	13 000 000

+NG znamená, že po 35 dnech nebyl zaznamenán vývin plynu.

Tvorba plynu je indikačním znamením, že nastal růst bakterií *Clostridium* za použitých podmínek. Z výsledků uvedených ve shora uvedených tabulkách je zřejmé, že při použití 25 ppm testované akrylonitrilové sloučeniny společně se 40 ppm dusitanu byly dosaženy přibližně stejné výsledky, pokud se týká růstu bakterií *Clostridium*, jako v případě, kdy byla použita koncentrace dusitanu 120 ppm, přičemž současně tyto výsledky byly mnohem lepší, než při použití koncentrace dusitanu pouze 40 ppm při současné nepřítomnosti akrylonitrilové sloučeniny.

V případě, kdy byl použit akrylonitril v koncentraci 50 ppm, bylo dosaženo mnohem lepších výsledků, než ve všech dalších uvedených pokusech, přičemž po 35 dnech nebyl ve většině případů zaznamenán žádný vývin plynu.

Příklad 3

Stanovení tvorby toxinu v masných vzorcích po skladování

V tomto příkladu provedení byly připraveny různé vzorky substrátů uzených mas z břich vepřů, což bylo provedeno stejným způsobem jako je popsáno výše, přičemž tyto vzorky obsahovaly 0, 40 nebo 120 ppm dusitanu a v jedné skupině vzorků bylo použito kombinace 40 ppm dusitanu plus 50 ppm testované akrylonitrilové sloučeniny.

Tyto vzorky byly inokulovány směsnou suspenzí sporů a inkubovány stejným způsobem jako bylo popsáno výše. Extrakty vzorků mas byly odebrány po 10, 20 a 40 dnech, přičemž současně v těchto časových periodách byly tyto extrakty každého ze vzorků vstřikovány dvěma myším.

V následující tabulce č. 3 jsou souhrnně uvedeny výsledky těchto testů. Tvorba toxinů v těchto masných vzorcích během skladování je dána úmrtností myší.

Tabulka 3

Test č.	Dusitan (ppm)	Testovaná sloučenina (ppm)	Počet myší (ze dvou), které zemřely po vstříknutí extraktu		
			10 dní	20 dní	40 dní
1	0	0	2	2	2
2	0	0	2	2	2
3	0	0	2	2	2
4	40	0	0	2	2
5	40	0	0	2	2
6	40	0	0	2	2
7	40	50	0	0	0
8	40	50	0	0	1
9	40	50	0	0	0
10	120	0	0	0	0
11	120	0	0	0	0
12	120	0	0	0	0

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

1. Způsob inhibování růstu bakterií *Clostridium botulinum* v masných produktech působením dusitanu alkalického kovu, vyznačující se tím, že se do masného produktu přidává od 40 do méně než 120 ppm dusitanu alkalického kovu, například dusitanu

sodného, společně s 25 až 50 ppm 3-(4-tolylsulfonyl)akrylonitrilu.

2. Způsob podle bodu 1, vyznačující se tím, že se do masného produktu přidává 40 ppm dusitanu alkalického kovu.