

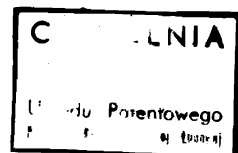
POLSKA
RZECZPOSPOLITA
LUDOWA



URZĄD
PATENTOWY
PRL

OPIS PATENTOWY PATENTU TYMCZASOWEGO

122 115



Patent tymczasowy dodatkowy
do patentu _____

Zgłoszono: 09.01.80 (P. 221293)

Pierwszeństwo: _____

Zgłoszenie ogłoszono: 15.12.80

Opis patentowy opublikowano: 30.11.1984

Int. Cl.³

G01N 33/02

Twórcy wynalazku: Jerzy Mierzejewski, Andrzej Skoczek

Uprawniony z patentu tymczasowego: Wojskowy Ośrodek Naukowo-Badawczy Służby Weterynaryjnej,
Puławy (Polska)

SPOSÓB OZNACZANIA PRZYDATNOŚCI KONSERW W SZCZEGÓLNOŚCI RYBNYCH DO MAGAZYNOWANIA POZACHŁODNICZEGO

Przedmiotem wynalazku jest sposób oznaczania przydatności konserw, w szczególności rybnych do magazynowania pozachłodniczego na drodze bakteriologicznej.

Dotychczas sposób taki nie jest znany. Wprawdzie o przydatności produktów żywnościowych do przechowywania pozachłodniczego można domniemać na podstawie analiz określających stan bakteriologiczny produktu, uwzględniając stan zakażenia bakteryjnego w chwili badania i ogólnie przyjęte w mikrobiologii kryteria wzrostu i odżywiania bakterii, ale postępowanie takie jest jednostronne i nie pozwala na ocenę podatności treści konserw na wzrost flory bakteryjnej w warunkach magazynowania pozachłodniczego.

Znany z polskiej normy (PN-59, A-82053) sposób oznaczania przydatności spożywczej konserw i przydatności konserw w puszkach do składowania polega na inkubacji w termostacie reprezentatywnych próbek pobranych z partii wyprodukowanych konserw i obserwacji puszek po termostatowaniu i ochłodzeniu.

Według tego sposobu konserwy przeznaczone do termostatowania oznacza się datą rozpoczęcia badania i umieszcza w termostacie, podkładając pod nie czysty arkusz bibuły. Temperatura termostatu powinna wynosić 37°C. Kontrolę temperatury należy przeprowadzać przynajmniej 2 razy w ciągu dnia. Rozpoczęcie badań termostatowych liczy się od chwili uzyskania w termostacie temperatury 36°C. Czas badania konserw pasteryzowanych wynosi 3 doby (72 godziny bez względu na wagę brutto puszki). Czas badania konserw sterylizowanych o wadze brutto do 1 kg wynosi 7 dób (168 godzin), powyżej 1 kg – 10 dób (240 godzin). Po upływie czasu termostatowania konserwy schładza się w temperaturze do 8°C. Czas chłodzenia powinien wynosić 24 godziny. W czasie termostatowania i chłodzenia nie należy wstrząsać puszkami.

Konserwy, które wykazały chociażby jedną z następujących wad: bombaż, niezestalenie się, gdy norma przedmiotowa przewiduje zestalenie się po 24 godzinach chłodzenia, wyciek, określa się wynikiem dodatnim badań termostatowych. Jeśli badania termostatowe wypadną dodatnio wówczas całą partię puszek (konserw) uznaje się za niezgodną z normą i odrzuca się nie przeprowadzając dalszych badań bakteriologicznych.

Wiadomym jest, że do najbardziej niebezpiecznych zagrożeń sanitarnych w żywności konserwowanej należy obecność kiełkujących endospor łaseczek botulinowych. Jednym z produktów metabolizmu tych łaseczek jest najbardziej aktywna biologicznie trucizna – toksyna botulinowa, powodująca ciężkie i śmiertelne zatrucia.

Przydatność konserw w szczególności rybnych do magazynowania pozachłodniczego można właściwie i szybko ocenić jeżeli zastosuje się sposób według wynalazku.

Sposób oznaczania przydatności konserw, w szczególności rybnych do magazynowania pozachłodniczego na drodze bakteriologicznej, według wynalazku, charakteryzuje się tym, że wyciąg wodny danego gatunku konserwy sztucznie zakaża się dawką 10^8 zawiesiny endospor laseczek beztlenowych z rodzaju *Clostridium botulinum* E 1163 przygotowanej w znany sposób, zakażone wyciągi poddaje się inkubacji w temperaturze 30°C w czasie 240 godzin i okresowo sprawdza pod mikroskopem ilość endospor wykiełkowanych i wyrosłych form wegetatywnych z liczby 100 losowo napotkanych w obrazie mikroskopowym, oblicza sumę form wegetatywnych ze wszystkich obserwacji do momentu szczytu wegetacji i dzieli przez liczbę tych obserwacji obliczając wskaźnik wegetacji, a następnie wylicza się współczynnik kiełkowania i wegetacji, w porównaniu do wzorca, jakim jest standardowe podłoże DRCM, którego wartość liczbowa jest miarą podatności konserw na zakażenie bakteryjne.

Do oznaczania należy użyć wyciąg wodny sporządzony przez rozdrobnienie treści konserwy w homogenizatorze z dwukrotną ilością wody destylowanej, ogrzanie otrzymanej zawiesiny w temperaturze 100°C w czasie 30 minut, ochłodzenie jej do 4°C , przetrzymanie w tej temperaturze przez okres 12 godzin, odsączenie i zagęszczenie przesycając np. w wężyku dializacyjnym do objętości składników wyjściowych i wyjałowienie.

Według wynalazku zaleca się aby do oznaczenia użyć co najmniej 9 próbek wyciągów z trzech puszek tego samego gatunku konserwy i do oceny konserwy przyjąć wartość średnią współczynnika kiełkowania i wegetacji w porównaniu do zakażonego sztucznie w tych samych warunkach standardowego podłoża DRCM.

Według wynalazku należy do obserwacji mikroskopowych pobrać nie mniej niż 12 próbek w okresie 240 godzin inkubacji, najkorzystniej po 3, 6, 9, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 192 i 240 godzinach.

Według wynalazku, próbki do badań mikroskopowych nanosi się na szkiełka podstawowe i barwi w znany sposób według metody Grama.

Oznaczony współczynnik kiełkowania i wegetacji oblicza się ze wzoru:

$$W = \frac{W_k}{W_w}$$

gdzie: W_k — oznacza wartość liczbową wskaźnika wegetacji w konserwie,

W_w — oznacza wartość liczbową wskaźnika wegetacji we wzorcu.

Wskaźnik wegetacji wyznacza się następująco: pobraną próbkę nanosi się na szkiełko podstawowe, barwi według metody Grama, następnie odnotowuje odsetek endospor wykiełkowanych i wyrosłych form wegetatywnych z liczby 100 losowo napotkanych w obrazie mikroskopowym, oblicza sumę form wegetatywnych ze wszystkich obserwacji do momentu szczytu wegetacji (najwyższa liczba form wegetatywnych ze wszystkich obserwacji) i dzieli przez liczbę tych obserwacji.

Współczynnik wegetacji jest miarą przydatności konserw, w szczególności rybnych do magazynowania pozachłodniczego. W porównaniu do sposobu znanego z polskiej normy PN-59 A-82053 — „Badanie trwałości metodą termostatową”, można przyjąć, że konserwy o współczynniku wegetacji powyżej 0,46 nie nadają się do długotrwałego przechowywania w warunkach pozachłodniczych bez ryzyka zatrucia i strat ekonomicznych wynikających z namnażania się w nich form wegetatywnych beztlenowców.

Sposób według wynalazku jest szybki, pozwala na uszeregowanie konserw pod względem podatności na kiełkowanie i wegetację bakterii, jest niezawodny dla danego asortymentu konserw produkowanych przez różnych wytwórców w oparciu o tę samą technologię.

Określone według wynalazku, wartości współczynnika dla każdego gatunku konserw stwarzają pełniejszą charakterystykę bakteriologiczną trwałości konserw, co pozwala z większym prawdopodobieństwem wnioskować o możliwości magazynowania i prawdopodobieństwie psucia się testowanych asortymentów konserw, w warunkach pozachłodniczych.

Sposób według wynalazku wyjaśnia się bliżej w oparciu o przykłady.

P r z y k ł a d I. Do oznaczenia użyto konserwy „Śledź w sosie pomidorowym”.

Najpierw przygotowano standardową liofilizowaną zawiesinę endospor toksynogennych laseczek beztlenowych z rodzaju *Clostridium botulinum* E 1163 (nr kol. PZH) metodą podaną przez Schneidera i wsp. (J. Bact. 85, 126, 1963) w wężyku dializacyjnym na pożywkę Elnera (skład pożywki według Burbianki i wsp., Mikrobiologia żywności, PZWL, W-wa, wyd. III, 1971). Uzyskaną w woreczkach gęstą zawiesinę ciał bakteryjnych poddano trawieniu lizozymem 25 000 j/mg i trypsyną 1:250 według metody Walkera i wsp. (J. appl. Bact. 27, 137, 1964).

W celu pełnej inaktywacji laseczek, które nie uległy strawieniu enzymatycznemu, hodowlę poddano dodatkowo działaniu alkoholu etylowego w stosunku 1:1 w czasie 60 minut w temperaturze 37°C . Następnie zawiesinę 3-krotnie odwirowano przy 4000 obr./min. w czasie 60 minut i przepłukano płynem fizjologicznym. Ilość endospor w zawieszynie obliczono w komorze Thoma, używając mieszalników do białych krwinek i rozcieńczano

płynem fizjologicznym do gęstości 10^9 w 1 ml. Tak przygotowaną zawiesinę rozlano po 1 ml do ampulek i poddano liofilizacji.

Następnie przygotowano wyciągi wodne z konserw. Zawartość trzech puszek przeniesiono do homogenizatora i rozdrobniono z dwukrotną ilością wody destylowanej, przy szybkości obrotów 2000 obr./min. Rozdrobnioną zawiesinę ogrzewano w temperaturze 100°C w czasie 30 minut i pozostawiono na noc w temperaturze 4°C . W następnym dniu przesączono ją przez filtr płócienny i przesącz zagęszczono przez odparowanie w wężu dializacyjnym do 1/3, tj. objętości wyjściowej całej konserwy, z której sporządzono wyciąg. Zagęszczony wyciąg rozlano po 10 ml do probówek pod parafinę i wyjałowiono w temperaturze 117°C w czasie 30 minut.

Do oznaczenia użyto 9 próbek wyciągów. Wyciągi zakażano dawką 10^8 endospor (0,1 ml zawiesiny liofilizatu w płynie fizjologicznym).

Zakażone wyciągi wodne poddano inkubacji w temperaturze 30°C . W określonych odstępach czasu, w okresie 240 godzin, pobrano 12 próbek, które naniesiono na szkiełka podstawowe i zabarwiono według metoda Grama. Preparaty barwne poddano badaniu mikroskopowemu i odnotowano odsetek endospor wykiełkowanych i wyrosłych form wegetatywnych z liczby 100 losowo napotkanych w obrazie mikroskopowym. Sumę form wegetatywnych ze wszystkich obserwacji do momentu szczytu wegetacji (najwyższa liczba form wegetatywnych) dzielono przez liczbę tych obserwacji. Wartość średnia z 9 próbek stanowi wskaźnik kiełkowania i wzrostu bakteryjnego tzw. wskaźnik wegetacji w konserwie (W_k).

Wyniki zebrano w tabeli 1.

Tabela 1

Wyciąg wodny konserwy „Śledź w sosie pomidorowym”	Godziny obserwacji:											
	3	6	9	12	24	48	72	96	120	144	192	240
	Liczba form wegetatywnych (średnia z 9 obserw.):											
	1	6	9	25	93	93	89	98	93	84	82	79

Najwyższą liczbę form wegetatywnych (szczyt wegetacji) stwierdzono po 96 godzinach, tj. po 8 obserwacjach.

$$W_k = \frac{1 + 6 + 9 + 25 + 93 + 93 + 89 + 98}{8} = 51,75$$

W podany wyżej sposób obliczono wskaźnik wegetacji w standardowym podłożu DRCM (skład podłoża: pepton – 10,0 g, Lab.-Lemco (Oxoid) – 10,0 g, octan sodowy uwodn. – 5,0 g, wyciąg drożdżowy (Difco) – 1,5 g, skrobia – 1,0 g, L-cysteina – 0,5 g, glukoza – 1,0 g, woda destylowana ad – 1000 ml.

Wykonanie podłoża: składniki rozpuszcza się w wodzie destylowanej, ustala się pH podłoża na 7,1 – 7,2 i wyjaławia w temperaturze 121°C w czasie 15 minut. Przed użyciem dodaje się jałowego roztworu siarczanu sodowego bezw. – 0,04% i cytrynianu żelazowego – 0,07%. Gotowe podłoże rozlewa się po 10 ml do probówek pod parafinę.

Wyniki zebrano w tabeli 2.

Tabela 2.

Pożywka DRCM	Godziny obserwacji:											
	3	6	9	12	24	48	72	96	120	144	192	240
	Liczba form wegetatywnych:											
	0	14	23	48	99	94	95	88	82	85	73	69

Wskaźnik kiełkowania i wzrostu *Clostridium botulinum* E w pożywce standardowej DRCM (W_w) wynosi:

$$W_w = \frac{0 + 14 + 23 + 48 + 99}{5} = 36,80$$

Współczynnik kiełkowania i wegetacji dla konserw „Śledź w sosie pomidorowym” wynosi:

$$W = \frac{W_k}{W_w} = \frac{51,75}{36,80} = 1,40$$

Konserwa ta nie nadaje się do magazynowania pozachłodniczego.

Przykład II. W analogiczny sposób, jak w przykładzie I wykonano oznaczenie dla konserwy „Sałatka pikantna z makreli”.

Uzyskane wyniki zestawiono w tabeli 3.

Tabela 3

Wyciąg wodny konserwy „Sałatka pikantna z makreli”	Godziny obserwacji:											
	3	6	9	12	24	48	72	96	120	144	192	240
	Liczba form wegetatywnych:											
	0	2	3	7	9	10	10	14	16	15	13	14

$$W_k = \frac{0 + 2 + 3 + 7 + 9 + 10 + 10 + 14 + 16}{9} = 7,89$$

$$W = \frac{W_k}{W_w} = \frac{7,89}{36,80} = 0,21$$

Konserwa ta jest zalecana do magazynowania pozachłodniczego.

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób oznaczania przydatności konserw, w szczególności rybnych do magazynowania pozachłodniczego na drodze bakteriologicznej, z n a m i e n n y t y m, że wyciąg wodny badanego gatunku konserwy sztucznie zakaża się dawką 10^8 zawiesiny endospor laseczek beztlenowych z rodzaju *Clostridium botulinum* E 1163 przygotowanej w znany sposób, zakażone wyciągi poddaje się inkubacji w temperaturze 30°C w czasie 240 godzin i okresowo sprawdza pod mikroskopem ilość endospor wykiełkowanych i wyrosłych form wegetatywnych z liczby 100 losowo napotkanych w obrazie mikroskopowym, oblicza sumę form wegetatywnych ze wszystkich obserwacji do momentu szczytu wegetacji i dzieli przez liczbę tych obserwacji obliczając wskaźnik wegetacji, a następnie wylicza się współczynnik kiełkowania i wegetacji, w porównaniu do wzorca, jakim jest standardowe podłoże DRCM, którego wartość liczbową jest miarą podatności konserw na zakażenie bakteryjne.

2. Sposób według zastrz. 1, z n a m i e n n y t y m, że wyciąg wodny sporządza się przez rozdrobnienie treści konserwy w homogenizatorze z dwukrotną ilością wody destylowanej, ogrzanie otrzymanej zawiesiny w temperaturze 100°C w czasie 30 minut, ochłodzenie jej do 4°C , przetrzymanie w tej temperaturze przez okres 12 godzin, odsączenie i zagęszczenie przesączu np. w węży dializacyjnym do objętości składników wyjściowych i wyjałowienie.

3. Sposób według zastrz. 1, z n a m i e n n y t y m, że do oznaczania używa się co najmniej 9 próbek wyciągów wodnych z 3 puszek tego samego gatunku konserwy i do oceny konserwy przyjmuje się wartość średnią współczynnika kiełkowania i wegetacji w porównaniu do zakażonego sztucznie w tych samych warunkach standardowego podłoża DRCM.

4. Sposób według zastrz. 1, z n a m i e n n y t y m, że do obserwacji mikroskopowych pobiera się nie mniej, niż 12 próbek w okresie 240 godzin inkubacji najkorzystniej po 3, 6, 9, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 192 i 240 godzinach.

5. Sposób według zastrz. 1, z n a m i e n n y t y m, że próbki do badań mikroskopowych nanosi się na szkiełka podstawowe i barwi w znany sposób według metody Grama.