

Změny aminokyselinové skladby trvanlivých fermentovaných masných výrobků v průběhu zrání

Bc. Adéla Krmelová

Diplomová práce
2018



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav technologie potravin

akademický rok: 2017/2018

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Adéla Krmelová**

Osobní číslo: **T15286**

Studijní program: **N2901 Chemie a technologie potravin**

Studijní obor: **Technologie potravin**

Forma studia: **prezenční**

Téma práce: **Změny aminokyselinové skladby trvanlivých fermentovaných masných výrobků v průběhu zrání**

Zásady pro vypracování:

I. Teoretická část

1. Charakteristika trvanlivých fermentovaných masných výrobků.
2. Technologie výroby trvanlivých fermentovaných masných výrobků – fermentace, sušení, zrání.
3. Podmínky pro uvádění trvanlivých fermentovaných masných výrobků na trh.

II. Praktická část

1. Popis experimentu, výroba modelových vzorků.
2. Analýzy modelových vzorků a jejich vyhodnocení.
3. Výsledky a diskuze.
4. Formulace závěrů.

Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

[1] KALHOTKA, Libor; CWIKOVÁ, Olga; CÍRTKOVÁ, Veronika; MATOUŠOVÁ, Zuzana; PRICHYSTALOVÁ, Jitka. CHANGES in COUNTS of MICROORGANISMS and BIOGENIC AMINES PRODUCTION DURING the MANUFACTURE of FERMENTED SAUSAGES POLICAN. The Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences. 2012, vol. 2, no. 2 s. 667-683. ISSN:1338-5178.

[2] GARDINI, Fausto; MARTUSCELLI, Maria; CRUDELE, Maria Antonietta; PAPARELLA, Antonello; SUZZI, Giovanna. Use of Staphylococcus Xylosus as a Starter Culture in Dried Sausages: Effect on the Biogenic Amine Content. Meat Science. 2002, vol. 61, no. 3 s. 275-283. ISSN:0309-1740.

[3] HUI, Y. H. Handbook of Meat and Meat Processing (2nd Edition), 2012, . ISBN: 1439836833.

Vedoucí diplomové práce: **MVDr. Zdeněk Polášek**
Ústav technologie potravin

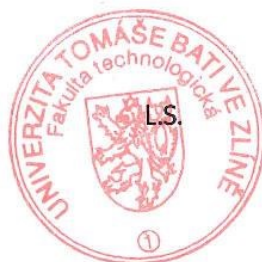
Datum zadání diplomové práce: **2. února 2018**

Termín odevzdání diplomové práce: **25. dubna 2018**

Ve Zlíně dne 2. února 2018



doc. Ing. František Buňka, Ph.D.
děkan



doc. Ing. František Buňka, Ph.D.
ředitel ústavu

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

- beru na vědomí, že odevzdáním diplomové/bakalářské práce souhlasím se zveřejněním své práce podle zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, bez ohledu na výsledek obhajoby ¹⁾;
- beru na vědomí, že diplomová/bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému dostupná k nahlédnutí, že jeden výtisk diplomové/bakalářské práce bude uložen na příslušném ústavu Fakulty technologické UTB ve Zlíně a jeden výtisk bude uložen u vedoucího práce;
- byl/a jsem seznámen/a s tím, že na moji diplomovou/bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3 ²⁾;
- beru na vědomí, že podle § 60 ³⁾ odst. 1 autorského zákona má UTB ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- beru na vědomí, že podle § 60 ³⁾ odst. 2 a 3 mohu užít své dílo – diplomovou/bakalářskou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- beru na vědomí, že pokud bylo k vypracování diplomové/bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tedy pouze k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové/bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- beru na vědomí, že pokud je výstupem diplomové/bakalářské práce jakýkoliv softwarový produkt, považují se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

Ve Zlíně 27.3.2018

.....
Adéla Krmelová

¹⁾ zákon č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, § 47 Zveřejňování závěrečných prací:

(1) Vysoká škola nevydělečně zveřejňuje disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce, u kterých proběhla obhajoba, včetně posudků oponentů a výsledku obhajoby prostřednictvím databáze kvalifikačních prací, kterou spravuje. Způsob zveřejnění stanoví vnitřní předpis vysoké školy.

(2) Disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce odevzdané uchazečem k obhajobě musí být též nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněny k nahlížení veřejnosti v místě určeném vnitřním předpisem vysoké školy nebo není-li tak určeno, v místě pracoviště vysoké školy, kde se má konat obhajoba práce. Každý si může ze zveřejněné práce pořizovat na své náklady výpisy, opisy nebo rozmnoženiny.

(3) Platí, že odevzdáním práce autor souhlasí se zveřejněním své práce podle tohoto zákona, bez ohledu na výsledek obhajoby.

²⁾ zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 35 odst. 3:

(3) Do práva autorského také nezasahuje škola nebo školské či vzdělávací zařízení, užije-li nikoli za účelem přímého nebo nepřímého hospodářského nebo obchodního prospěchu k výuce nebo k vlastní potřebě dílo vytvořené žákem nebo studentem ke splnění školních nebo studijních povinností vyplývajících z jeho právního vztahu ke škole nebo školskému či vzdělávacímu zařízení (školní dílo).

³⁾ zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 60 Školní dílo:

(1) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení mají za obvyklých podmínek právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla (§ 35 odst. 3). Odpirá-li autor takového díla udělit svolení bez vážného důvodu, mohou se tyto osoby domáhat nahrazení chybějícího projevu jeho vůle u soudu. Ustanovení § 35 odst. 3 zůstává nedotčeno.

(2) Není-li sjednáno jinak, může autor školního díla své dílo užít či poskytnout jinému licenci, není-li to v rozporu s oprávněnými zájmy školy nebo školského či vzdělávacího zařízení.

(3) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení jsou oprávněny požadovat, aby jim autor školního díla z výdělku jím dosaženého v souvislosti s užitím díla či poskytnutím licence podle odstavce 2 přiměřeně přispěl na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložily, a to podle okolností až do jejich skutečné výše; přitom se přihlédne k výši výdělku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.

ABSTRAKT

Cílem této práce bylo vyrobit fermentované masné výrobky s přidavkem šesti jednotlivých komerčních mikrobiálních kultur a srovnávacího vzorku bez mikrobiální kultury a stanovit obsah celkových, volných a vázaných aminokyselin. U všech vzorků byl pozorován nárůst obsahu volných aminokyselin po fermentaci a jejich pokles ke konci zrání. Největší koncentrace celkových i volných aminokyselin byla zaznamenána u vzorku s přidavkem *Lactobacillus curvatus*. Dále byla provedena chemická a mikrobiologická analýza. U všech vzorků došlo k výraznému poklesu pH v průběhu fermentace. V rámci mikrobiologické analýzy byly sledovány počty mikroorganismů a vyjádřeny jako KTJ/g.

Klíčová slova: Fermentované masné výrobky, aminokyseliny, proteolýza, mikrobiologie fermentovaných výrobků, startovací kultury

ABSTRACT

The aim of this work was to produce fermented meat products with the addition of six individual commercial starter cultures and a comparative sample without starter culture. The main objective was to determine the total, free and bound amino acid content. All samples showed an increase in the free amino acid content after fermentation and their decline to the end of maturation. The highest concentration of both total and free amino acids was observed in the *Lactobacillus curvatus* sample. Furthermore, chemical and microbiological analysis was observed. All samples had a significant pH decrease during fermentation. Within microbiological analysis the number of microorganisms were count and expressed as CFU/g.

Keywords: Fermented meat products, amino acids, proteolysis, microbiology of fermented meat products, starter cultures

Tímto bych ráda poděkovala vedoucímu mé diplomové práce, MVDr. Zdeňkovi Poláškoví za odborné vedení, konzultace, trpělivost a cenné rady. Dále bych ráda poděkovala doc. RNDr. Leoně Buňkové Ph.D. za poskytnuté informace a rady při vyhodnocování mikrobiologické části, Ing. Richardosovi Nikolaosovi Salekovi Ph.D. za užitečné poznatky a Ing. et. Ing. Ludmile Zálešákové za rady, pomoc a spolupráci v laboratoři.

*“Stomach of goat, crushed
sheep balls, soft full
pearls of pig eyes,
snout gristle, fresh earth,
worn iron of trotter, slate
of Zaragoza, dried cat heart,
cock claws. She grinds
them with one hand and
with other fists
mountain thyme, basil,
paprika, and knobs of garlic.
And if a tooth of stink thistle
pulls blood from the round
blue marbled hand
all the better for
this ruby of Pamplona,
this bright jewel of Vich,
this stained crown
of Solsona, this salami.”*

From “Salami” by Philip Levine, poet

Prohlašuji, že odevzdaná verze diplomové práce a verze elektronická, nahraná do IS/STAG, jsou totožné.

OBSAH

ÚVOD	10
I TEORETICKÁ ČÁST	11
1 FERMENTOVANÉ TRVANLIVÉ MASNÉ VÝROBKY	12
1.1 MASO, MASNÁ VÝROBA A MASNÉ VÝROBKY	12
1.1.1 Zařazení fermentovaných trvanlivých masných výrobků.....	12
1.2 CHARAKTERISTIKA FERMENTOVANÝCH TRVANLIVÝCH MASNÝCH VÝROBKŮ	14
1.2.1 Rozdělení fermentovaných masných výrobků	14
1.2.2 Fermentované trvanlivé salámy.....	15
1.2.3 Surovinová skladba fermentovaných trvanlivých salámů	16
2 TECHNOLOGIE VÝROBY FERMENTOVANÝCH TRVANLIVÝCH MASNÝCH VÝROBKŮ	23
2.1 HISTORIE FERMENTAČNÍCH TECHNOLOGIÍ	23
2.2 TECHNOLOGICKÉ OPERACE PŘI VÝROBĚ FERMENTOVANÝCH TRVANLIVÝCH MASNÝCH VÝROBKŮ	24
2.2.1 Příprava díla	25
2.2.2 Zrnění a míchání.....	25
2.2.3 Narážení	25
2.2.4 Zrání	26
3 FERMENTACE MASNÝCH VÝROBKŮ	28
3.1 CHEMICKÉ ZMĚNY PŘI FERMENTACI	28
3.1.1 Sacharidy	28
3.1.2 Proteiny	29
3.1.3 Lipidy	31
3.2 MIKROORGANISMY POUŽÍVANÉ PRO FERMENTACI	32
3.2.1 Bakterie mléčného kvašení (BMK).....	32
3.2.2 Koaguláza-negativní koky.....	34
4 PODMÍNKY UVÁDĚNÍ FERMENTOVANÝCH TRVANLIVÝCH MASNÝCH VÝROBKŮ NA TRH	36
II PRAKTICKÁ ČÁST	39
5 CÍL PRÁCE	40
6 METODIKA PRÁCE	41
6.1 POPIS EXPERIMENTU	41
6.2 ČASOVÝ PRŮBĚH EXPERIMENTU	42
6.3 VÝROBA MODELOVÝCH VZORKŮ	42
6.4 POUŽITÉ METODY ANALÝZ	43
6.4.1 Základní chemická analýza	43
6.4.2 Mikrobiologická analýza	44
6.4.3 Stanovení volných aminokyselin.....	47
6.4.4 Stanovení celkových aminokyselin	48

6.4.4.1	Kyselá hydrolýza.....	48
6.4.4.2	Oxidativní hydrolýza.....	48
7	VÝSLEDKY A DISKUZE	50
7.1	ZÁKLADNÍ CHEMICKÁ ANALÝZA.....	50
7.1.1	Sušina	50
7.1.2	pH.....	51
7.1.3	Úbytek hmotnosti	56
7.2	MIKROBIOLOGICKÁ ANALÝZA	57
7.3	ANALÝZA SLOŽENÍ A MNOŽSTVÍ AMINOKYSELIN	62
	ZÁVĚR	78
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	79
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	83
	SEZNAM OBRÁZKŮ	84
	SEZNAM TABULEK.....	87
	SEZNAM PŘÍLOH.....	88

ÚVOD

Fermentované masné výrobky jsou oblíbenou delikatesou rozšířenou po celém světě. K obrovskému rozmachu ve výrobě těchto produktů přispěl počátkem 20. století rozvoj a zdokonalení technologií a strojů pro masnou výrobu. K udržení stabilního hygienického kvalitativního a senzorického profilu potraviny přispěl v téže době objev izolace a uchování startovacích kultur prostřednictvím lyofilizace a mrazení. S použitím startovacích kultur lze vyrobit produkt se stálými a stabilními organoleptickými i hygienickými vlastnostmi. Startovací kultury jsou využívány pro kontrolovaný průběh fermentace a zahrnují bakterie mléčného kvašení a koagulóza negativní koky. Každá jednotlivá startovací kultura má jinou proteolytickou aktivitu, proto je tato práce zaměřena na změny aminokyselinové skladby působením jednotlivých kultur přidaných každé zvlášť do jednotlivých výrobků. Při výrobě byly u těchto výrobků zachovány stejné podmínky a stejné technologické operace včetně surovinové skladby, teplot, doby zrání.

V teoretické části práce je obsažena charakteristika fermentovaných masných výrobků od surovinové skladby po technologii výroby a uvádění na trh. Vzhledem k důležitosti procesu fermentace a jejím vlivu na obsah aminokyselin ve finálním výrobku je fermentaci masných výrobků věnována samostatná kapitola. Poslední kapitola teoretické části je zaměřena na uvádění fermentovaných masných výrobků na trh.

Praktická část diplomové práce spočívala ve výrobě modelových vzorků fermentovaných masných výrobků za použití vybraných šesti jednotlivých startovacích kultur a jejich podrobení daným analýzám. Kromě základní chemické a mikrobiologické analýzy bylo provedeno stanovení obsahu aminokyselin. V průběhu zrání byl ve čtyřech odběrech sledován obsah celkových a volných aminokyselin u každého výrobku se startovací kulturou a u kontrolního vzorku bez přídavku mikrobiální kultury.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 FERMENTOVANÉ TRVANLIVÉ MASNÉ VÝROBKY

1.1 Maso, masná výroba a masné výrobky

Maso je definováno jako všechny požitelné části těl živočichů, ryb a bezobratlých v čerstvém nebo upraveném stavu, vhodné k lidské výživě. V této definici jsou zahrnuty i živočišné tuky, kosti (pokud jsou konzumovatelné), krev, kůže a droby. Pro potřeby masné výroby se tímto pojmem označuje užší skupina živočišných produktů. Masem při výrobě masných výrobků rozumíme zejména kosterní svalovinu a to jak samotnou svalovou tkáň, tak i svalovou tkáň včetně vmezeřeného tuku, cév, nervů, vazivových a jiných částí, které jsou ve svalovině obsaženy (Steinhauser 1995; Pipek 1998).

Masná výroba je pojem, kterým rozumíme produkci nejrůznějších druhů salámů, párků, klobás, uzených mas a všech masných výrobků obecně. Prostřednictvím různých operací a jejich vzájemných kombinací se dosahuje potřebné údržnosti, charakteristické barvy, struktury a dalších žádoucích sensorických vlastností. Masné výrobky se dělí do dvou hlavních kategorií a to na výrobky tzv. celosvalové neboli kusové (šunka a uzená masa) a výrobky mělněné (párky, salámy, klobásy), (Kadlec, 2002).

Masný výrobek se získává zpracováním masa popřípadě již hotových masných výrobků. Maso pro výrobu masných výrobků se dělí do několika tříd podle obsahu tuku (Katina, 2016).

1.1.1 Zařazení fermentovaných trvanlivých masných výrobků

V roce 2016 nabyla účinnosti nově aktualizovaná vyhláška č. 69/2016 Sb. O požadavcích na maso, masné výrobky, produkty rybolovu a akvakultury a výrobky z nich, vejce a výrobky z nich, zákona 110/1997 O potravinách a tabákových výrobcích. Touto vyhláškou se ruší vyhlášky 264/2003; 169/2009; 159/2014 a vyhláška Ministerstva zemědělství 326/2001 zákona č. 110/1997 Sb. O potravinách a tabákových výrobcích a o změně a doplnění některých souvisejících zákonů, ve znění pozdějších předpisů, pro maso, masné výrobky, ryby, ostatní vodní živočichy a výrobky z nich, vejce a výrobky z nich. Dle této vyhlášky je rozdělení masných výrobků do kategorií a) až p), které jsou uvedeny níže. V uvedeném rozdělení je charakteristický výrobek, o kterém tato práce pojednává, tedy fermentovaný trvanlivý masný výrobek, označen písmenem „e)“ a je zvýrazněn tučně.

- a) tepelně opracovaným masným výrobkem zpracovaný masný výrobek, u kterého bylo ve všech částech dosaženo minimálně tepelného účinku odpovídajícího působení teploty plus 70 °C po dobu 10 minut,
- b) tepelně neopracovaným masným výrobkem zpracovaný masný výrobek určený k přímé spotřebě bez další úpravy, u něhož ve všech částech neproběhlo tepelné opracování surovin ani výrobku odpovídající působení teploty plus 70 °C po dobu 10 minut,
- c) tepelně neopracovaným masným výrobkem pro tepelnou úpravu zpracovaný masný výrobek⁴⁾ určený k tepelné kuchyňské úpravě, u něhož ve všech částech neproběhlo tepelné opracování surovin ani výrobku odpovídající působení teploty plus 70 °C po dobu 10 minut,
- d) trvanlivým tepelně opracovaným masným výrobkem zpracovaný masný výrobek, u kterého bylo ve všech částech dosaženo minimálně tepelného účinku odpovídajícího působení teploty plus 70 °C po dobu 10 minut a navazujícím technologickým opracováním, zráním, uzením nebo sušením za definovaných podmínek došlo k poklesu aktivity vody na hodnotu $a_w(\text{max.}) = 0,93$ a k prodloužení minimální doby trvanlivosti na 21 dní při teplotě skladování plus 20 °C a za případně dalších skladovacích podmínek,
- e) **fermentovaným trvanlivým masným výrobkem zpracovaný masný výrobek tepelně neopracovaný určený k přímé spotřebě, u kterého v průběhu fermentace, zrání, sušení, popřípadě uzení za definovaných podmínek došlo ke snížení aktivity vody na hodnotu $a_w(\text{max.}) = 0,93$, s minimální dobou trvanlivosti 21 dní při teplotě plus 20 °C a za případně dalších skladovacích podmínek,**
- f) technologickým obalem obal, ve kterém probíhá technologické opracování výrobku a který obvykle zůstává jeho součástí,
- g) vložkou krájená nebo zrněná část díla,
- h) technologickým opracováním jakákoliv úprava masa mimo použití chladu,
- i) konzervou výrobek neprodyšně uzavřený v obalu, sterilovaný,
- j) polokonzervou výrobek neprodyšně uzavřený v obalu, pasterovaný,

- k) čistou svalovou bílkovinou bílkovina pocházející ze svalové tkáně zvířat bez bílkoviny pojivové tkáně a bílkovin rostlinného původu,
- l) obsahem tuku celkový obsah tuku stanovený metodami založenými na principu hydrolyzy,
- m) průměrným množstvím potraviny hmotnost potraviny bez obalu se zohledněním záporné hmotnostní odchylky podle příloh č. 4 a 5 k této vyhlášce,
- n) paštikou tepelně opracovaný masný výrobek z mělněného masa, převážně roztíratelný, který nemusí být naražený v technologickém obalu,
- o) terinou tepelně opracovaný masný výrobek z mělněného masa, převážně hrubozrný, který nemusí být naražený v technologickém obalu,
- p) masným polotovarem v technologickém obalu masný polotovar z homogenizovaného masa, který je uváděn na trh v technologickém obalu (Česko - vyhláška 69/2016).

1.2 Charakteristika fermentovaných trvanlivých masných výrobků

Fermentované trvanlivé výrobky jsou tepelně neopracované masné výrobky, které představují celosvětově oblíbenou a různorodou skupinu masných výrobků. Tyto výrobky nejsou tepelně opracovány a vyrábí se přímo zpracováním syrového masa, tím získávají svou specifickou chuť a aroma, zároveň to ale znamená zvýšené technologické a hygienické nároky při jejich výrobě (Steinhauser, 1995). Do této skupiny patří salámy (hercules, lovecký salám, poličan, paprikáš), klobásy (dunajská klobása) a také šunky a pršuty (Katina, 2016).

1.2.1 Rozdělení fermentovaných masných výrobků

Na základě rozdílné údržnosti, struktury a technologie výroby lze fermentované výrobky roztrždit do několika následujících skupin:

- a) Syrové šunky - jsou konzervovány snížením aktivity vody, fermentací při nízkých teplotách a následně dlouhým zráním a sušením. Patří sem například parmská šunka nebo pršut.

- b) Trvanlivé fermentované salámy - jsou konzervovány především sušením, jejich pH se pohybuje kolem hodnot 5,3 - 6. Zrají obvykle déle než 3 týdny. U nás je to například poličan, paprikáš nebo maďarský uherský salám.
- c) Krájitelné fermentované salámy - rychle zrající salámy (méně než 3 týdny), údržnosti je dosaženo snížením hodnoty pH na 4,6 až 5,2. Mnohé výrobky z této a z předchozí skupiny jsou si natolik podobné, že se nachází spíše na pomezí těchto dvou skupin. U nás je to například herkules a lovecký salám
- d) Roztíratelné fermentované salámy - jsou měkké na omak i na skus, pastovitěho charakteru. Zrají kratší dobu než 14 dní a jsou tudíž i méně údržné. Řadí se sem například čajový salám a métský salám (Pipek, 1998).

Vzhledem k charakteru výrobků použitých jako modelové vzorky v praktické části této práce, bude popis technologie výroby zaměřen na skupinu výrobků "b)" (velkou podobností mezi oběma skupinami částečně i "c)", tedy fermentované trvanlivé salámy.

1.2.2 Fermentované trvanlivé salámy

Fermentované trvanlivé salámy, které tvoří podstatnou skupinu fermentovaných masných výrobků, jsou připravovány z jemně zrněného syrového masa a tukové tkáně. Dílo je promícháno se solí, kořením, startovacími kulturami, popřípadě dalšími přísadami a naráženo do obalového střeva, ve kterém je za definovaných podmínek, jako jsou teplota vzduchu a relativní vlhkost vzduchu vystaveno zrání. Hotový výrobek není nutno uchovávat při chladírenských teplotách a zpravidla bývá konzumován bez ohřevu (Steinhauser, 1995). Fermentované výrobky, ať už salámy nebo klobásy se dělí podle několika kritérií například podle pH hotového výrobku, typu fermentace, stupně mělnění díla nebo dle přítomnosti či nepřítomnosti plísní na povrchu. V současnosti se fermentované trvanlivé výrobky obvykle dělí na dvě velké skupiny, podle pH finálního výrobku na fermentované výrobky s nízkou konečnou hodnotou pH a vysokou konečnou hodnotou pH.

1) Fermentované výrobky s nízkou finální hodnotou pH

Tyto výrobky jsou charakteristické přidávkem sacharidů do díla (v množství 0,3 - 0,7 %) a mikrobiálních, neboli tzv. startovacích kultur k zajištění dostatečné fermentace, tedy produkce kyseliny mléčné za využití přidaných sacharidů. Rychlé snížení hodnoty pH pod hodnotu 5,3 hraje rozhodující roli z hlediska technologického, sensorického a hygienického-

ho. Pro tento druh výrobků jsou typické vyšší počáteční teploty zrání, 22 - 25°C v evropských zemích a 37°C i více v USA.

2) Fermentované výrobky s vysokou finální hodnotou pH

Pro tuto skupinu výrobků je charakteristická dlouhá doba zrání a sušení až do hodnot aktivity vody a_w 0,88 - 0,89. Při jejich výrobě se nepřidávají sacharidy a zrání probíhá při nižších teplotách, nedochází tak k žádné významné tvorbě organických kyselin a pH se tedy pohybuje nad hodnotou 5,5 respektive v rozmezí hodnot pH 5,8 - 6,2. Díky minimální přítomnosti organických kyselin je zde hlavním inhibičním faktorem nežádoucího mikrobiálního růstu dokud neklesne a_w pod hodnotu 0,96 nízká teplota (10 - 12°C), (Steinhauser, 1995).

1.2.3 Surovinová skladba fermentovaných trvanlivých salámů

Fermentované masné výrobky, specifitěji salámy, se skládají ze dvou majoritních složek a to masa a tuku. Typicky se pro jejich výrobu používá vepřové maso a hovězí maso, často i jejich kombinace, méně pak maso ovčí, kozí nebo krůtí. Minoritními, leč neméně důležitými složkami jsou sůl, sacharid a startovací kultura (Toldrá, 2015).

- **Maso**

Maso jatečných zvířat, v našich podmínkách zejména vepřové a hovězí, je výchozí surovinou pro výrobu fermentovaných trvanlivých salámů (dále FTS). Tradiční receptura je složena z jednoho dílu vepřového masa, jednoho dílu hovězího masa a jednoho dílu vepřového sádla. Maso pro výrobu FTS má být dobře vyzrálé a mělo by pocházet ze zdravých a starších zvířat (prasnice, krávy), (Steinhauser 1995; Kameník, 2011). Takové maso je tmavší a obsahuje méně vody a více extraktivních látek. Při opracování masa je potřeba odstranit co nejvíce viditelné pojivové tkáně, jejíž přítomnost je patrná na řezu výrobků, působí rušivě na při skusu a tím negativně ovlivňuje produkt a snižuje jeho celkovou hodnotu. Pro výrobu FTS je ideální libové maso s vysokým obsahem čistých svalových bílkovin a minimálním obsahem pojivové tkáně a tuku (Kameník, 2011). Dle vyhlášky 69/2016 O požadavcích na maso, masné výrobky, produkty rybolovu a akvakultury a výrobky z nich, vejce a výrobky z nich zákona č. 110/1997 o potravinách a tabákových výrobcích jsou při výrobě FTS o kterých tato práce pojednává základními surovinami pro výrobu maso hovězí a vepřové, nepřipouští se použití vlákniny, masa zvířat jiných živočišných druhů,

strojně odděleného masa, bílkovin jiných živočišných druhů nebo rostlinných bílkovin (Česko - vyhláška 69/2016).

Technologie výroby FTS klade vysoké nároky na mikrobiální stav suroviny, zejména masa. Vzhledem k absenci tepelné úpravy je počáteční kontaminace rozhodujícím faktorem kvality finálního výrobku, z tohoto důvodu je například naprosto nevhodné použití masa s vadou DFD (dark, firm, dry neboli v překladu: tmavé, tuhé, suché). DFD je vada vyskytující se především u hovězího masa, zejména u mladých býků, je pro ni charakteristické nedostatečné okyselení masa, pH je 24 hodin po porážce nad hodnotou 6,2. U masa s normálním průběhem zrání by hodnota pH 24 hodin po porážce neměla být vyšší než 5,8 u hovězího a 6 u vepřového masa. K této vadě dochází, jsou-li před porážkou spotřebovány zásoby glykogenu ve svazech (dlouhé lačnění, extrémní stresová situace), po porážce se potom netvoří žádné nebo jen nedostatečné množství kyseliny mléčné a hodnota pH tak klesá jen velmi nepatrně. DFD maso je tmavé, mdlého aroma, lepkavé a snadno podléhá nežádoucím mikrobiálním pochodům, má však lepší schopnost vázat vodu, proto se dá použít při výrobě mělněných tepelně opracovaných výrobků, pro FTS je však zcela nevhodné. Maso s vadou PSE (pale, soft, exudative neboli v překladu: bledé měkké, vodnaté) se pro výrobu FTS použít dá, ovšem v množství nepřesahujícím 20 % z celkového podílu masa. K vadě PSE dochází u zvířat citlivých na stres. Uvolněním vápenatých iontů a nadměrnou produkcí tepla dojde k rychlému poklesu pH z počáteční hodnoty 7 před porážkou, pod 5,8 během 45 minut po porážce. Běžně klesá teplota prasat 45 minut po porážce k hodnotám mezi 36 - 38°C. U zvířat se sklonem k výskytu vady PSE teplota v důsledku zvýšené látkové výměny stoupá až na 40 - 42,5°C. Setká-li se brzy po porážce nízká hodnota pH a poměrně vysoká tělesná teplota, dojde k částečné denaturaci svalových bílkovin a membrány svalových buněk se stanou propustnými, buněčný obsah tak může volně vytékat, což vede ke zhoršení schopnosti masa vázat vodu. Vadám PSE lze předejít šetrným zacházením se zvířetem před porážkou, správným a rychlým omráčením a vykrvením a zchlazením během 90 minut pod 35°C (Steinhauser, 1995; Kameník, 2011). Pro zajištění kvalitní suroviny by mělo mít vepřové maso 24 hodin po porážce hodnotu pH pod 5,8, mělo by být uchováno při 0°C a spotřebováno do 3-5 dnů od porážky, případně zamrazeno a při teplotách -30 až -18°C uchováno maximálně po dobu 90 dní. Hovězí maso by také mělo být do 24 hodin od porážky pod hodnotou pH 5,8, uchováno při 0°C po dobu maximálně 8-14 dní před zpracováním, případně zamrazeno při -30 až -18°C po dobu maximálně 180 dní (Toldrá, 2015).

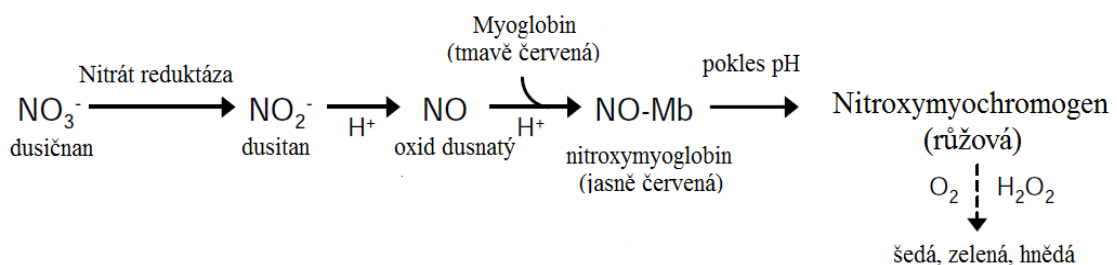
- **Vepřové sádlo**

Pro výrobu FTS, kde je požadována jasná kontrastní mozaika je nejvhodnější použít jadrné, tuhé sádlo a proto se používá téměř výhradně hřbetní sádlo, ideální je z krční části, tzv. hřivky. Použité sádlo má rozhodující vliv na utváření struktury výrobku ve fázi mělnění a míchání. Měkké sádlo obsahuje řídký až olejnatý tuk, který díky vyššímu podílu nenasycených mastných kyselin snadno oxiduje. Měkký tuk se při mělnění uvolňuje z tukových buněk, obklopuje částičky masa tenkým tukovým filmem a zabraňuje tak vzniku viskózního bílkovinného roztoku vznikajícího reakcí vody, myofibrilárních bílkovin a soli, salám tak zůstává měkký. Mazlavý tuk rovněž negativně ovlivňuje proces sušení a tím i konzistenci finálních výrobků. Při mělnění, míchání, kutrování i plnění dochází v důsledku tření k zahřívání díla, aby se předešlo a zabránilo uvolňování tuku při těchto operacích, mrazí se na teplotu -10 až -15°C (Steinhauser, 1995; Kameník, 2011).

- **Sůl a solící směs**

Kuchyňská sůl je esenciální ingrediencí pro výrobu všech typů masných výrobků. Ve výrobku zastává několik zásadních funkcí od ovlivnění chuti a struktury až po zvýšení údržnosti (Hutkins, 2006). Sůl ochucuje maso a masný výrobek, ten by bez soli, ač s přidavkem koření, neměl požadované sensorické a organoleptické vlastnosti. Sůl také (zejména v kombinaci s fosforečnany) pozitivně ovlivňuje texturu a strukturu výrobku tím, že rozpouští myofibrilární bílkoviny. Spojením vody obsažené v mase s těmito bílkovinami vzniká viskózní bílkovinný roztok, který dílo spojí a je nezbytný pro správnou strukturu výrobku. Sůl dále přispívá k rychlosti snižování aktivity vody a_w a působí tak pozitivně v průběhu sušení výrobku. Zároveň sůl ztěžuje růst mikroorganismů, váže totiž volnou vodu, která potom není k dispozici pro růst a množení nežádoucích bakterií. Přídavek soli zvýhodňuje růst grampozitivních bakterií oproti gramnegativním (Kameník 2011; Ockerman 2015). Obsah soli se v FTS pohybuje mezi 2,4 - 4 %, přičemž přídavek 2 % je minimální pro žádoucí funkce soli v masném výrobku, přídavek soli nad 3 % už ovšem může zpomalit průběh fermentace. Některé druhy bakterií jako například *Staphylococcus aureus*, jsou halotolerantní i vůči koncentraci soli nad 3 %. *S. aureus* je ale často inhibován laktobacily (Ockerman, 2015). V našich podmínkách je dusitanová solící směs, DSS, někdy též označována jako "rychlosůl" nebo "praganda" směsí chloridu sodného s dusitanem, jehož obsah nesmí překročit limit 0,6 %. Tato směs je používána k solení masných výrobků a to v množství 2,4 - 3,0 % (Pipek, 1998; Kameník, 2011) DSS se přidává do masných výrobků

z několika důvodů, ovlivňuje chuť výrobku, údržnost, barvu a má antioxidační účinek. Pro chuť a aroma výsledného výrobku mají největší význam N-nitrososloučeniny, zejména nitrosothioly. Aroma dále dusitan ovlivňuje tím, že brání oxidaci tuků a účastní se reakcí s aldehydy, alkoholy a inosinem (Pipek, 1998). Dusitan brání rozvoji gramnegativních bakterií, zejména salmonel, částečně také ovlivňuje a snižuje množství klostridií, stafylokoků a listerií. Zajišťuje tak jednu z prvních překážek (bariér) tzv. bariérového efektu při výrobě FTS (Kameník, 2011). Antioxidační účinek dusitanů je významný zejména v zabránění oxidaci tuků, tento efekt je vysvětlován schopností dusitanu vázat některé kovy (např. železo) do neaktivních chelátových komplexů, které pak nemohou působit jako katalyzátory oxidace. Stabilizuje hemová barviva proti oxidaci a rozkladu a chrání fosfolipidy v buněčných membránách před oxidací (Pipek, 1998; Kameník, 2011). Vliv dusičnanu na vybarvení masných výrobků byl objeven už v 19. století. V 90. letech 19. století však bylo prokázáno, že účinnou látkou je dusitan vznikající redukcí dusičnanu. Na počátku 20. století byly definovány chemické reakce popisující sloučeniny, které jsou nositeli barvy masných výrobků (Kameník, 2011). V USA je při výrobě fermentovaných masných výrobků použito vyšších fermentačních teplot a samotná fermentace trvá krátce, zatímco v Evropě jsou teploty fermentace nízké a fermentace probíhá delší dobu. I z tohoto důvodu se v USA používají téměř výhradně dusitanové solící směsi, kdežto v Evropě se lze v některých případech setkat s malým přídavkem dusičnanu do DSS bezprostředně před aplikací DSS do díla. Protože je to dusitan, který v masě reaguje za tvorby růžového nebo červeného vybarvení, musí být dusičnan, pokud je přidán, nejdříve redukován prostřednictvím enzymu nitrát reduktáza.



Obrázek 1: Redukce dusičnanu na dusitan působením nitrát reduktázy za vzniku oxidu dusnatého, který reakcí s myoglobinem tvoří nitroxymyoglobin, ten při vyšších teplotách (nízkém pH) tvoří stabilní nitroxymyochromogen (upraveno dle: Hutkins, 2006).

Působí-li na nitroxyhemochrom dále kyslík nebo peroxid vodíku, respektive dojde-li k oxidaci těmito látkami, mohou vznikat šedá a zelená barviva (Pipek, 1998). Důvodem, proč se v některých případech používá pro ošetření FTS i malé množství dusičnanu a ne výhradně dusitan, (přestože u nich musí dojít k redukci na dusitan) je rozložení působení na delší dobu. Dochází-li k této redukci postupně, mohou se v průběhu těchto reakcí uvolňovat lipázy a další enzymy, které produkují prekurzory chuti ve finálním výrobku. Kmeny produkující nitrát reduktázu jsou zároveň kmeny, které produkují lipázy a jiné enzymy důležité pro vývoj chuti a aroma výrobku. Jsou to rody *Staphylococcus*, *Micrococcus* a *Kocuria*. Při použití vyšších fermentačních teplot (38 - 40 °C) dochází k rychlé produkci kyseliny mléčné. Nízké pH inhibuje růst těchto bakterií a ve výrobku je tím značně zredukována tvorba nitrát reduktázy, proto je do těchto výrobků nezbytné přidávat dusitan, neboť případný zbytkový dusičnan by bez přítomnosti nitrát reduktázy nebyl redukován. Příčinou je poměrně nízká aktivita nitrát reduktázy při nízkých teplotách a nízkém pH. Fermentace při nižších teplotách oproti tomu umožňuje růst zmiňovaných bakterií, tím je zajištěna dostatečná produkce nitrát reduktázy a zároveň lipáz, proteináz a dalších enzymů podílejících se na aroma výrobku. Delším zráním výrobku při nižších teplotách tak dochází k postupné redukci veškerého dusičnanu na dusitan, v důsledku čehož je dosaženo žádoucích senzoryckých vlastností (Beck, 2005). Vedle nesporných pozitivních aspektů dusitanů a dusičnanů v technologii masné výroby jsou s nimi spojena i určitá rizika pro zdraví konzumenta. Na lidský organismus mohou působit přímo toxickým působením (při masivním předávkování) nebo ve formě N-nitrosolátek - nitrosaminů (při nesprávné úpravě). Pro dospělého jedince mohou představovat hrozbu nitrosaminy, což jsou kancerogenní N-nitrososloučeniny nacházející se v masných výrobcích v poměrně malém množství. Jejich množství se však mnohonásobně zvyšuje nesprávnou přípravou, zejména působením teplot nad 170°C na výrobky obsahující dusitany (slanina, špekáčky, FTS). Z těchto důvodů je přídavek dusitanů a dusičnanů do masných výrobků legislativně omezen a to na 150 mg/kg u tepelně opracovaných masných výrobků a na 180 mg/kg u fermentovaných masných výrobků (Pipek, 1998; Evropská Unie - nařízení komise 1129/2011).

- **Kořenící směsi**

K přípravě FTS lze použít různé druhy koření, mezi nejčastěji používané patří pepř, paprika, česnek, kmín, hřebíček, kardamom, muškátový květ, muškátový oříšek, tymián, jalovec nebo zázvor. Celkový přídavek směsí koření se pohybuje kolem 5 - 10 g/kg díla, případně

vyšší, je-li požadována výraznější chuť. Některé druhy koření vykazují částečně antioxidační účinek (rozmarýn, tymián, šalvěj, nebo muškátový květ). Jiné druhy jsou zase známé svými antimikrobiálními účinky, které vychází z přítomnosti fytoncidů (česnek, zázvor, pepř, rozmarýn, paprika, kmín, koriandr, nové koření a skořice) a mnohé podporují sekreci trávicích šťáv (Kameník, 2011). Vzhledem k tomu, že koření může být nežádoucím nositelem kontaminace (zejména plísní), nezřídka se používají extrakty koření u kterých je mikrobiální kontaminace téměř vyloučena. Často se koření připravují pro výrobu tradičních výrobků dodávají připravené v kombi směsích se sacharidem a antioxidantem (Pipek, 1998; Kameník, 2011).

- **Sacharidická složka**

Monosacharidy nebo disacharidy jsou přidávány, aby sloužily jako výchozí substrát pro startovací kultury (např. BMK). Jsou fermentovány převážně na kyselinu mléčnou. Přídavek sacharidů činí obvykle 0,4 - 0,8 % maximálně až 3,0 % a jejich přítomnost v díle určuje rychlost a intenzitu fermentace. Mezi nejčastěji používané patří monosacharidy glukóza a fruktóza, disacharidy sacharóza a laktóza a méně často oligosacharidy např. škrobový sirup. Zbytkové množství cukrů se pohybuje okolo 0,1 - 1,0 % hmotnosti výrobku (Steinhauser, 1995; Pipek, 1998).

- **Glukono- δ -lakton (GdL)**

V některých recepturách se přidává místo sacharidů pro rychlé okyselení díla a to v koncentracích 0,3 - 0,5 %. Do několika hodin po namíchání díla nastává hydrolyzou GdL na kyselinu glukonovou okyselení výrobku až na pH 4,8. Zároveň však umocňuje negativní změny tukové složky FTS (žluknutí). Současné použití GdL se startovací kulturou laktobacilů může vést k tomu, že tyto začnou odbourávat GdL na kyselinu octovou. Použití GdL je dostupný způsob jak urychlit, popřípadě nahradit fermentaci (Pipek, 1998; Kameník, 2011).

- **Kyselina askorbová, askorbát sodný, erythorbát (isoaskorbát sodný)**

Přídavek askorbátu, erythorbátu nebo kyseliny askorbové urychluje proces vybarvení výrobků a stabilizuje již vytvořenou barvu. Kyselina askorbová je silné redukční činidlo (ze zbytkového dusitanu vytváří oxid dusnatý a zvyšuje hladinu nitroxymyoglobinu) a antioxidant (stabilizuje hydroperoxydy) a do masných výrobků se přidává v koncentraci 0,4 - 0,6 g/kg díla. Stejný účinek jako má 100 gramů askorbátu nebo erythorbátu má 87 gramů kyseliny askorbové.

liny askorbové, proto se solí přidává do díla více než by se přidávalo samotné kyseliny. Při aplikaci ať už kyseliny askorbové nebo jejich solí je důležité, aby nebyla přidávána současně s dusitanovou solící směsí (Steinhauser 1995; Kameník, 2011).

- **Startovací kultury**

Startovací kultury jsou mikroorganismy s žádoucími fyziologickými vlastnostmi (také označovány jako kulturní mikroflóra), které se přidávají do díla FTS, aby zde zajistily správný průběh zrání a fermentace (Pipek, 1998). Odbourávají sacharidy na organické kyseliny a tím přispívají k okyselení díla, redukují dusičnany (produkcí enzymu nitrát reduk-tázy, např. rod *Staphylococcus*) a ovlivňují štěpení lipidů a další procesy. Jsou antagonisty hnilobné mikroflóry (Pipek, 1998; Beck, 2005). Při tradiční fermentaci je fermentace podmíněna širokým spektrem mikroorganismů, z nichž některé mohou produkovat senzorycké významné metabolity odlišné od kyseliny mléčné – organické kyseliny, aromatické látky, alkohol atp. Z toho důvodu může z přirozené fermentace vzejít produkt s vynikajícími senzoryckými vlastnostmi, které mohou v mnohém předčit použití homofermentativních startovacích kultur. Zároveň je nutné uvědomit si, že právě tato rozmanitost a variace mikroorganismů v díle může naopak vést k negativním nekontrolovatelným výkyvům a k výrobě produktů s nekonzistentní kvalitou. Pro dosažení vyváženého senzoryckého profilu výrobku se využívá kombinace startovacích kultur, z nichž jeden mikroorganismus produkuje kyselinu mléčnou, čímž okyseluje dílo (BMK - laktobacily, pediokoky) a další, který pozitivně ovlivňuje organoleptické vlastnosti (mikrokoky, stafylokoky), (Ockerman, 2015). Startovací kultury nesmí být patogenní a musí mít příslušnou biochemickou aktivitu. Při výběru vhodné startovací kultury se přihlíží i ke zvyklostem v příslušné zemi. Používají se laktobacily (*L. plantarum*, *L. brevis*, *L. fermenti*, *L. alimentarius*, *L. sakei*, *L. curvatus*), stafylokoky (*S. carnosus*, *S. xylosus*, *S. simulans*), pediokoky (*P. acidilactici*, *P. pentosaceus*, *P. cerevisiae*), mikrokoky (*M. varians*, *M. aurantiacus*, *M. specialis*, *M. caseolyticus*, *M. candidus*), kvasinky (*Debaromyces hansenii*) a další mikroorganismy (Pipek, 1998, Cocconcelli a Fontana, 2010).

2 TECHNOLOGIE VÝROBY FERMENTOVANÝCH TRVANLIVÝCH MASNÝCH VÝROBKŮ

Fermentované masné výrobky jsou známy už několik tisíciletí. Technologie jejich výroby se neustále vyvíjí a největší rozmach této technologie nastal ve 20. Století s výrobou průmyslových lyofilizovaných nebo mražených startovacích kultur. Tyto komerčně dostupné kultury společně s novými postupy v oblasti výroby fermentovaných výrobků vedly k rozsáhlému rozvoji této skupiny masných výrobků (Hutners, 2006).

2.1 Historie fermentačních technologií

K objevu této konzervační metody mohlo dojít již mnohem dříve, než uvádí doložené historické prameny. Tisíce let předtím, než byla zvířata domestikována a chována pro účely konzumace, bylo obtížné uchovávat a skladovat maso po delší dobu nebyla-li například příhodná nízká teplota. Již tehdy konzumenti zaznamenali nepříjemné následky po konzumaci zkaženého masa. Sušení bylo nepochybně jednou z prvních technologií konzervace masa vůbec. Následováno solením a uzením, které se také ukázalo jako efektivní. Pokud by k takto připravenému masu bylo přidáno malé množství cukru a množství soli by bylo dostatečně nízké, za příznivých podmínek, mohl už tenkrát vzniknout naprosto odlišný poměrně dlouhou dobu skladovatelný produkt se specifickou chutí. První zmínky o fermentovaných masných výrobcích pochází už z římské éry v oblasti jižní Evropy a středozemního moře. Ze stejného období pochází i zmínky o těchto výrobcích z Asie. Je však v podstatě nemožné určit, zda se opravdu jednalo o fermentované výrobky, i když je těžké si představit, že by, vzhledem k podmínkám, k přirozené formě fermentace nedošlo. Produkce fermentovaných výrobků byla s největší pravděpodobností založena na náhodném objevu těchto chutných specialit a poté v napodobování procesu výroby, opakovatelnost se stejnými a konstantními výsledky byla ovšem velmi obtížná, ne-li nemožná. Pravděpodobnost úspěchu byla zvýšena objevem techniky tzv. „backslopping“, tedy výrobou nového produktu přidáním části předchozího, správně vyrobeného hotového produktu k počátečnímu syrovému materiálu. Tato metoda se v různých částech světa praktikuje dodnes, i když v současnosti existují mnohem spolehlivější metody produkce fermentovaných výrobků. Konzervace těchto výrobků byla zajištěna fermentací, sušením a, zejména v teplejších oblastech na středním východě a v oblasti středozemního moře, podpořena přísadami koření. V chladnějších, severnějších oblastech potom uzením nebo tepelným opracováním. Později

se ke zvýšení konzervačního účinku začaly používat dusitany a dusičnany (Hutners, 2006). V Evropě je výroba fermentovaných salámů dokumentována před více než 260 lety v Itálii, odtud se rozšířila do okolních zemí. V Německu byl znám göttingský métský salám již v roce 1734 a ještě v témže století se rozšířil do dalších zemí Evropy, do Ruska a dokonce do Indie. V Maďarsku se datuje počátek výroby tamních tradičních uherských salámů od roku 1835 (Steinhauser, 1995). K největšímu rozmachu ve výrobě fermentovaných masných výrobků došlo později, než tomu bylo u fermentovaných potravin jiného než masného původu. Ve 20. století byly aplikovány nové postupy a produkční technologie. S dostupností moderního vybavení jako jsou kutry, míchačky a narážečky a zejména s objevem technologie izolace a uchování čistých startovacích kultur v 60. letech 20. století došlo k největšímu rozmachu v tomto odvětví. V současnosti existuje obrovská škála fermentovaných výrobků, liší se druhem masa (hovězí, vepřové, ovčí, kozí atd.), ale také způsobem sušení, uzení, použité technologie a samozřejmě složením, kořením atd. (Hutners, 2006). Mezi největší a nejznámější evropské i světové výrobce patří v dnešní době Německo, Španělsko a Itálie (Steinhauser, 1995). Ve Španělsku existuje více než 50 druhů těchto výrobků a v Německu dokonce více než 350 (Hutners, 2006).

2.2 Technologické operace při výrobě fermentovaných trvanlivých masných výrobků

Vzhledem k tomu, že při výrobě fermentovaných masných výrobků nedochází k tepelnému ošetření, uplatňují se zde jiné způsoby, jak zajistit nezávadnost výsledného produktu. Tyto způsoby jsou jakýmsi souborem překážek (bariér), které buď samy o sobě, ale spíše vzájemnou kombinací zabraňují rozvoji nežádoucích mikroorganismů v průběhu zrání výrobku. Pro tento soubor překážek se používá označení bariérový efekt (též překážkový efekt). Princip spočívá v zabránění nárůstu nežádoucích mikroorganismů v celém průběhu přípravy FTS (Pipek, 1998; Kameník, 2011). První a poměrně razantní překážkou je dusitanová solící směs, kdy obsažený chlorid sodný snižuje počáteční vodní aktivitu masa na hodnotu 0,96 - 0,97 a dusitan inhibuje už při koncentraci 125 mg / kg díla (2,5 %) růst salmonel, klostridií, listerií a *Escherichia coli*. Další překážkou je snížený redoxní potenciál, čehož je dosaženo přidáním kyseliny askorbové, askorbátu nebo erythorbátu sodného a sacharidů. V průběhu fermentace pak redoxní potenciál snižují zejména BMK, v této fázi dochází k potlačení gramnegativní aerobní nebo fakultativně anaerobní mikroflóry - čeledi *Pseudo-*

monocerae a *Enterobacteriaceae*. Následná produkce kyseliny mléčné bakteriemi mléčného kvašení a s tím související pokles pH je další účinnou bariérou, následovanou poslední, pravděpodobně nejvýznamnější a tou je snížení aktivity vody k hodnotám 0,93 (Kameník, 2011).

2.2.1 Příprava díla

Před samotným začátkem přípravy FTS je nutné mít k dispozici veškeré suroviny při správných teplotách. Kvalitu výsledného výrobku ovlivňuje mnoho faktorů od samého počátku výroby. Patří mezi ně složení salámu a vzájemný poměr libové a tučné suroviny, jejich kvalita a teplota. Přísady včetně solící směsi a v neposlední řadě i ostrost nožů kutru a jeho konstrukce (Kameník, 2011).

2.2.2 Zrnění a míchání

Jelikož v průběhu zpracování dochází k zahřátí díla, je vhodné použít maso vychlazené či namrazené, případně část namrazeného a část vychlazeného masa. Tuk by měl být vždy namrazený. Zrnění a míchání bylo dříve prováděno pomocí řezaček a míchaček, dnešní technologie umožňují spojení těchto dvou kroků a přípravu všech složek díla v jednom stroji - kutru (Pipek, 1998). FTS se v našich podmínkách připravují o velikosti zrna do 3 mm. Teplota díla by se ideálně měla pohybovat mezi hodnotami -4 až -1°C k tomu napomůže i přidavek soli, který může snížit teplotu díla až o 2°C. Nižší teploty by mohly vést k nedostatečné aktivaci bílkovin, vyšší naopak k rozmazávání tukových částic a tím i k vadám díla (Kameník, 2011).

2.2.3 Narážení

Obalové střevo, do kterého jsou výrobky typicky naráženy, dává výslednému produktu velikost a tvar. Důležitými faktory jsou při této operaci teplota díla, rychlost narážení, kvalita a správná příprava střev před narážením a průměr plnicí trubky. Teplota díla by se při narážení měla pohybovat kolem - 2 až - 1°C. Tuto teplotu je žádoucí udržet v celém procesu plnění, toho lze docílit správnou rychlostí (příliš vysoká rychlost vede k nadměrnému tření a tím i ke zvýšení teploty díla a mazání tuku) a co největším průměrem plnicí trubky (takéž omezení nadměrného tření). V dnešní době jsou používána pro výrobu FTS zejména celulósová a umělá klihovková (kolagenní) střevo, jejich výhodou je dostupnost a propust-

nost pro vodní páru a složky udícího kouře a přilnavost k povrchu salámu (Kameník, 2011).

2.2.4 Zrání

Zrání je rozhodující fází výroby fermentovaných masných výrobků. Pojmeme zrání rozumíme komplex procesů odehrávajících se v díle po naražení. Proces výroby FTS lze zjednodušeně popsat jako proces přeměny suroviny sensoricky poměrně chudé a snadno podléhající zkáze - syrové maso a sádlo - na trvanlivý produkt s výraznými organoleptickými vlastnostmi. V této fázi dochází k fermentaci uzení a sušení FTS. Správný průběh zrání je ovlivněn mnoha faktory, vnějšími i vnitřními (Steinhauser, 1995).

Vnější faktory ovlivňující průběh zrání

Mezi vnější faktory ovlivňující průběh zrání patří zejména relativní vlhkost vzduch (RVV), teplota vzduchu (TV) a rychlost proudění vzduchu (RPV). Zrání probíhá v klimatizovaných zracích komorách, kde jsou výrobky zavěšeny na udírenských vozech. Ihned po zaplnění komory nastává vyrovnávací fáze, při níž je teplota komory nastavena na 16 - 22°C, RVV 60 - 70 % a RPV kolem 0,8 m/s. Vyrovnávací fáze trvá 1-6 hodin, její účel spočívá v pozvolném vyrovnání velkého rozdílu teplot mezi výrobkem (kolem 0°C) a teplotou ve zrací komoře, a v zabránění přirozené kondenzaci vody na povrchu výrobků. Po vyrovnání teploty výrobků s teplotou okolního vzduchu je nutné zvýšit RVV v komoře na 92 - 93 %, teplotu na 22 - 26°C a RPV na 0,5 - 0,8 m/s. Vnější podmínky se v komoře v průběhu zrání mění dle právě probíhající fáze, ke konci zrání, ve fázi sušení se snižuje teplota, RPV i RVV (Steinhauser 1995; Kameník, 2011).

Vnitřní faktory ovlivňující průběh zrání

Mezi vnitřní faktory ovlivňující průběh zrání patří přídavek DSS, obsah tuku v díle a velikost zrn tuku a masa v díle a průměr obalového střeva (Kameník, 2011).

Uzení

Uzení je technologická operace odehrávající se v průběhu zrání výrobků, která se často používá u FTS pro získání požadované barvy, aroma a pro mírné konzervační a antioxidační účinky. K uzení dochází při teplotách 20 - 25 °C, jedná se tedy o uzení studeným kouřem (Kameník, 2011). Látky obsažené v udícím kouři působí preventivně proti růstu plísní na povrchu obalového střeva a mají mírný antioxidační účinek. Antioxidačním půso-

bením se vyznačují například fenoly přítomné v udírenském kouři, které deaktivují radikály volných masných kyselin (Feiner, 2008). Udírenský kouř se běžně aplikuje několikrát v intervalech 1 - 3 hodiny během zracího procesu a může trvat až několik dní. Zakuřování se provádí většinou ve zracích komorách (Steinhauser, 1995, Hui, 2012).

Sušení FTS

Sušení výrobku na požadovanou hodnotu a_w 0,93 tvoří finální a nejstabilnější bariéru proti růstu nežádoucích bakterií. Rychlost procesu sušení je určena vnější a vnitřní difúzí vody v produktu. Difúze je závislá na rozdílu - gradientu - obsahu vody mezi produktem a jeho okolím (R_{VV} , a_w), na druhu použitého sřeva, kvalitě povrchu produktů, RPV a teplotě. Vnitřní difúzi navíc ovlivňuje složení produktu, pH výrobků, stupeň zrnění díla a rovnoměrnost distribuce zrn v díle (Kameník, 2011). Sušení nastává ve chvíli, kdy jsou salámy navěšeny na udící vozy a převezeny do zrací komory. Chceme-li odlišit fázi sušení díla od fermentace, můžeme říci, že fáze sušení začíná poklesem pH na hodnotu 5,2. Proces sušení musí být šetrný k výrobku a rychlost vypařování vody z povrchu salámů musí být přizpůsobena rychlosti difúze vody ze středu výrobku k povrchu (Feiner, 2008).

Klíčovou roli při této fázi hrají fermentační procesy, na nichž se podílejí mikroorganismy přítomné v díle. Vzhledem k důležitosti procesu fermentace při výrobě fermentovaných masných výrobků bude fermentaci věnována samostatná následující kapitola.

3 FERMENTACE MASNÝCH VÝROBKŮ

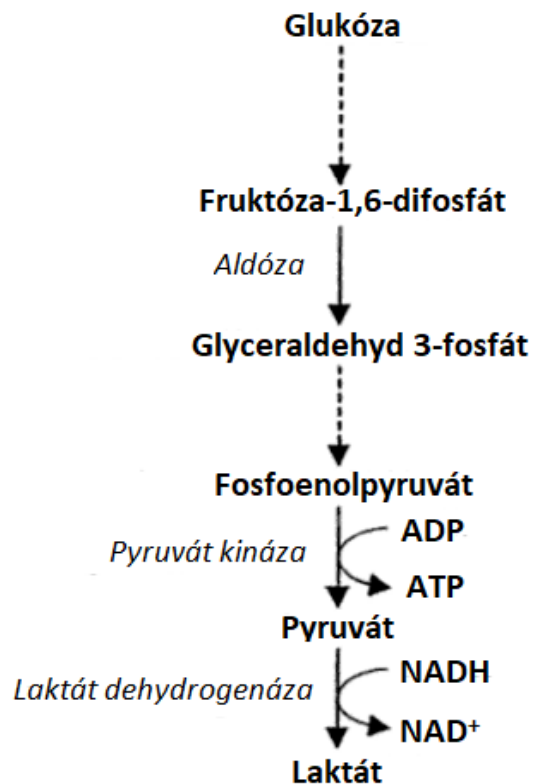
Existuje několik způsobů jak nastartovat fermentaci v masných výrobcích. Jedním z vůbec prvních způsobů fermentace masa bylo pouze s přispěním mikroflóry přirozeně se vyskytující v mase (kultury laktobacilů, koaguláza-negativních koků, mikrokoků a kvasinek). Přítomnost a množství těchto bakterií se ovšem různí, což činí proces obtížně kontrolovatelným a vyrobit produkt s jednotnými organoleptickými vlastnostmi je nemožné. Sofistikovanější způsob výroby byl tzv. vsádkovým způsobem, kdy se k nastartování fermentačních procesů používalo malé množství správně vyrobeného hotového výrobku. V současnosti je nejspolehlivější metodou přidavek mrazených, nebo lyofilizovaných mrazených koncentrátů kultur, které zajišťují rychlý a stabilní průběh fermentace (Mehta, 2012).

3.1 Chemické změny při fermentaci

Charakteristický fermentovaný masný výrobek je výsledkem mnoha biochemických, fyzikálních, mikrobiologických a sensorických reakcí. Tyto reakce jsou ovlivňovány vnějšími i vnitřními faktory, které jsou uvedeny v kapitole 2.2.5. Zrání. Většina z těchto reakcí zahrnuje proteiny, sacharidy a lipidy a významnou roli zde hrají endogenní a mikrobiální enzymy. Obecně lze říci, že na celkovém aroma se podílí komplex reakcí, který mimo vnější a vnitřní faktory zahrnuje enzymatické a neenzymatické reakce a chemické reakce jako je například oxidace lipidů, Maillardova reakce nebo Streckerova degradace aminokyselin (Lachowicz, Żochowska-Kujawska a Sobczak, 2013).

3.1.1 Sacharidy

Metabolismus sacharidů začíná transportem sacharidu do buňky, kde se účastní rozdílných interakcí podle druhu fermentace. Hlavním produktem fermentace sacharidů je kyselina mléčná. Kyselina mléčná se v přírodě vyskytuje jako pravotočivá L(+), levotočivá D(-) nebo jako směs obou izomerů v různých poměrech. Při homofermentaci je hlavní metabolická dráha pro hexózy Embden-Mayerhof-Parnasova dráha, při které se mění 1 mol hexózy na 2 moly kyseliny mléčné. Při heterofermentaci je metabolickou dráhou 6-fosfoglukonátová dráha, kterou vzniká z 1 molu glukózy 1 mol CO₂, 1 mol kyseliny octové a 1 mol kyseliny mléčné. Při výrobě fermentovaných masných výrobků je žádoucím produktem kyselina mléčná (Hui, 2001).

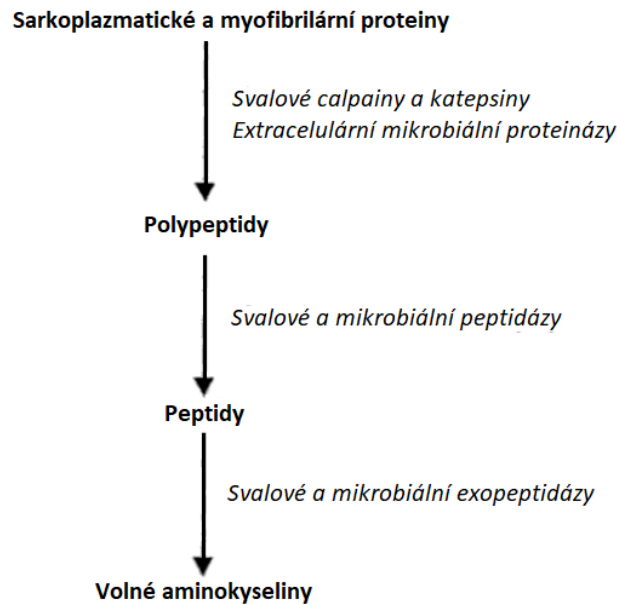


Obrázek 2: Zjednodušené schéma fermentace glukózy na kyselinu mléčnou (Upraveno dle: Hui, 2001).

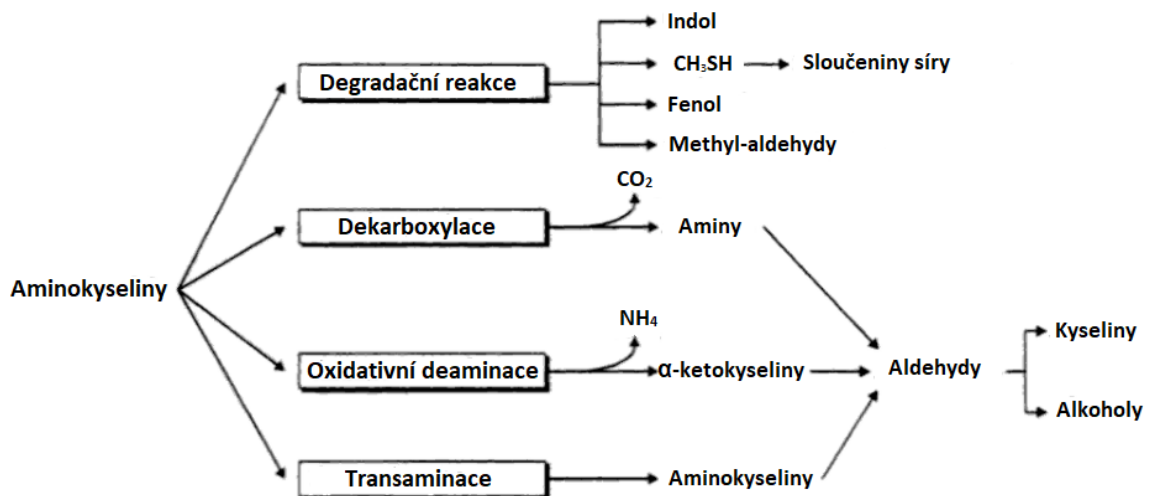
3.1.2 Proteiny

Proteolýza je jednou ze zásadních biochemických reakcí majících vliv na aroma chutí a texturu výrobku. Na proteolýze se podílejí jak enzymy mikrobiálního původu, tak enzymy přirozeně se vyskytující v masě. Polypeptidy v masě podléhají hydrolýze na oligopeptidy působením endogenních enzymů, jako jsou svalové proteinázy calpains a katepsiny. (Hui, 2001; Lachowicz, Żochowska-Kujawska a Sobczak, 2013). K nejvýznamnějším změnám sarkoplasmatických bílkovin dochází právě během fermentace, během zrání klesá jejich obsah už jen nepatrně (Dalmis a Soyer, 2008). Oligopeptidy jsou pak dále hydrolyzovány na menší peptidy působením peptidáz. Posledním krokem proteolýzy je tvorba volných aminokyselin z peptidů působením aminopeptidáz (např. alanyl-, arginyl-, leucilaminopeptidázy) a je podmíněna přítomností proteázových enzymů mikroorganismů. Peptidy s malou molekulovou hmotností a aminokyseliny vedou přímo i nepřímo k tvorbě těkavých i netěkavých aromatických sloučenin. Tvorba volných aminokyselin přímo přispívá

k typické chuti fermentovaných výrobků a nepřímě přispívá k rozvoji aroma, neboť AMK jsou prekurzory mnoha aromatických sloučenin. K tvorbě aromatických sloučenin vede i degradace určitých AMK, například degradace valinu, leucinu a isoleucinu na methyl- aldehydy, kyseliny a alkoholy je úzce spojena s tvorbou typického aroma a vůně fermentovaného výrobku (Hui, 2001; Lachowicz, Źochowska-Kujawska a Sobczak, 2013, Stadnik a Dolatowski, 2015).



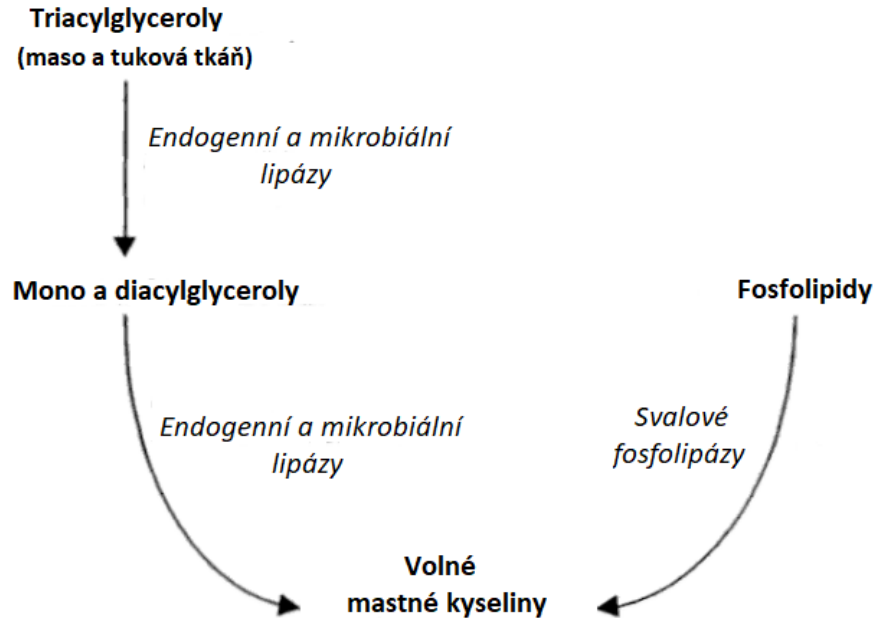
Obrázek 3: Zjednodušené schéma metabolismu proteinů v průběhu fermentace FTS (upraveno dle: Hui, 2001).



Obrázek 4: Zjednodušené schéma metabolismu aminokyselin v průběhu zrání FTS (upraveno dle: Hui, 2001).

3.1.3 Lipidy

Lipolýza má významný vliv na vývoj aroma, chuti i jiných organoleptických vlastností výrobku. Lipidy jsou hydrolyzovány enzymy za vzniku volných mastných kyselin, které jsou následně oxidovány za vzniku sloučenin s typickým aroma. Prvním krokem lipolýzy je hydrolýza triacylglycerolu mikrobiálními enzymy a enzymy masa a tukové tkáně. Koncentrace volných mastných kyselin závisí na aktivitě lipolytických enzymů, mikrobiálních metabolických procesech a oxidačních reakcích. Lipolýza pokračuje uvolňováním mastných kyselin, které následně podléhají enzymatickým i neenzymatickým oxidacím a vznikají tak jako finální produkty karbonyly, a jiné sloučeniny s nízkou molekulovou hmotností (alkoholy, karboxylové kyseliny atd.). Enzymatická hydrolýza během fermentace urychluje peroxidaci lipidů. Díky vysokému obsahu tuku a nízké aktivitě vody je oxidace lipidů hlavním faktorem vedoucím k nežádoucím změnám kvality, žluklé chuti a ztrátě pigmentace a vitaminů. Z těchto důvodů je do díla přidáván antioxidant, v našich podmínkách nejčastěji v podobě kyseliny askorbové (Kameník 2011; Lachowicz, Źochowska-Kujawska a Sobczak, 2013).



Obrázek 5: Zjednodušené schéma metabolismu lipidů v průběhu zrání FTS (upraveno dle: Hui, 2001).

3.2 Mikroorganismy používané pro fermentaci

3.2.1 Bakterie mléčného kvašení (BMK)

Bakterie mléčného kvašení jsou grampozitivní nesporogenní mikroaerofilní bakterie, které se řadí do skupiny homofermentativních (resp. fakultativně heterofermentativních) mikroorganismů a při fermentaci sacharidů je hlavním produktem kyselina mléčná (Kameník, 2011). Počty BMK v díle zůstávají v průběhu zrání poměrně stabilní. Počet bakterií mléčného kvašení přirozeně se vyskytujících v masě na počátku výroby udává rychlost nárůstu BMK v díle. BMK jsou do výrobku přidávány v množství 10^6 až 10^7 KTJ/g (Kalhotka et. al., 2012). Ve výrobku nastává v prvních dnech zrání nárůst až k hodnotám 10^9 KTJ/g, které se v průběhu celého zracího procesu příliš nemění (Gardini et. al., 2002; Kalhotka et. al., 2012).

Antimikrobiální působení BMK

Bakterie mléčného kvašení tvoří významnou překážku proti růstu nežádoucích mikroorganismů zejména v prvních dnech procesu výroby. Tento antagonistický efekt je založen na několika mechanismech. V prvé řadě jde o kompetici o životní prostor a živiny. V díle FTS je od počátku vytvořeno optimální prostředí pro rozvoj BMK, ty se tak mohou lépe prosadit na úkor svých konkurentů. Rychleji rostou a využívají dostupné živiny, které pak nejsou dostupné pro pomaleji se vyvíjející mikroby. BMK vylučují do okolního prostředí metabolity a látky, z nichž mnohé mají antibakteriální účinek. Tyto látky napomáhají další inhibici nežádoucích mikrobů, je to například peroxid vodíku, organické kyseliny, nebo bakteriociny. Bakteriociny jsou sloučeniny bílkovinné povahy, které vykazují baktericidní aktivitu vůči omezenému okruhu mikroorganismů (většinou úzce příbuzných s produkujícím kmenem). Dělí se do dvou skupin podle obsahu lanthioninu. První skupina (obsahující lanthionin), také nazývána lantibiotika, zahrnuje například nisin, lacticin. Do druhé skupiny (neobsahující lanthionin) patří pediocin, sakacin a enterocin (Kameník, 2011, Hui, 2012).

Rod *Lactobacillus*

Laktobacily jsou grampozitivní, nesporogenní, anaerobní či mikroaerofilní bakterie. Výhody jejich použití spočívají v urychlení fermentace produkcí kyseliny mléčné, omezení růstu mikrobů a jejich inhibici prostřednictvím produkce peroxidu vodíku, organických kyselin a bakteriocinů. K jejich vadám může být připočtena právě zmíněná produkce peroxidu vodí-

ku a organických kyselin, které ve vyšších koncentracích mohou negativně ovlivňovat organoleptické vlastnosti díla. Nejčastěji používanými jsou v masném průmyslu *Lactobacillus curvatus*, *L. sakei*, *L. plantarum* (Rai, Zhang a Xia, 2010; Kameník, 2011).

Rod *Pediococcus*

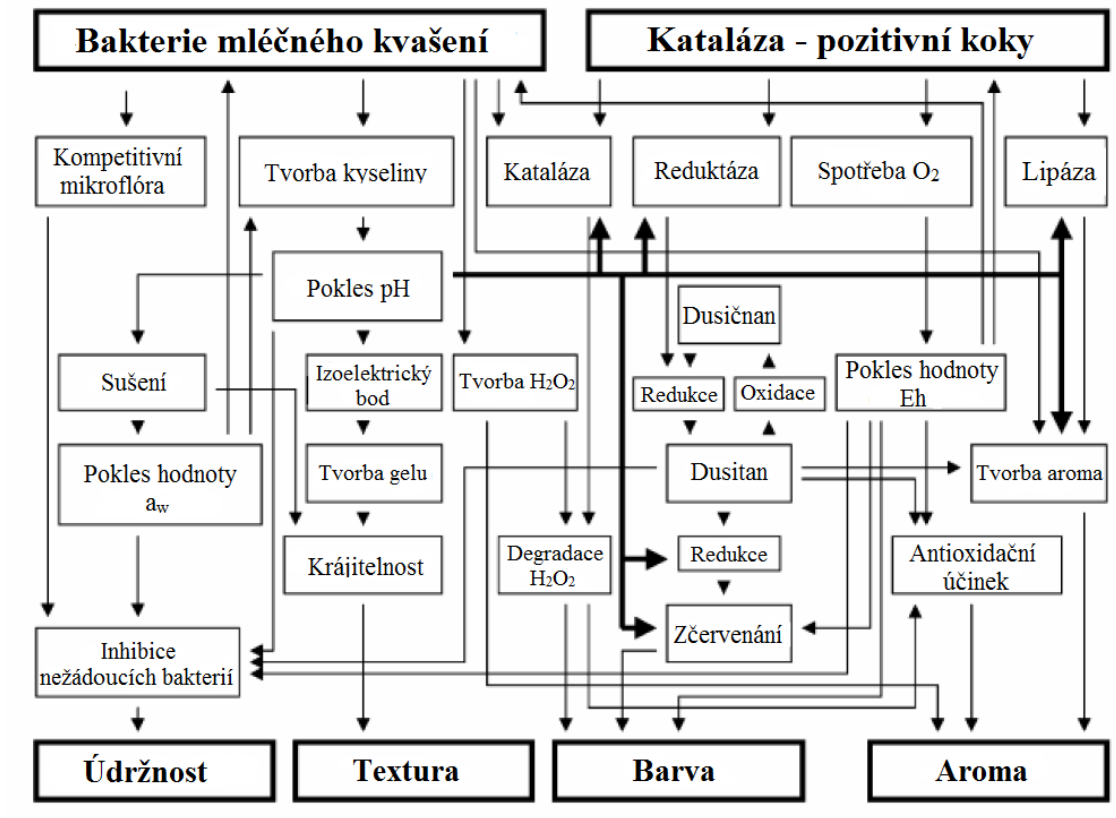
Pediokoky jsou grampozitivní, nesporogenní, anaerobní či mikroaerofilní bakterie. Jejich účinky jsou podobné laktobacilům. Před použitím pediokoků jako poměrně dominantní kultury při výrobě fermentovaných masných výrobků byla snaha o využití především laktobacilů. Vzhledem k neúspěšným pokusům o lyofilizaci laktobacilů se do popředí dostaly pediokoky s jejichž lyofilizací nebyl problém (Toldrá, 2007). Přestože rod *Pediococcus* nebyl dříve běžně spojován s masem, při výrobě FTS se osvědčil a účinky se podobá laktobacilům. Je mírně halotolerantní a přežívá i v prostředí s 6% koncentrací soli, množí se i při vyšších teplotách a nemá výraznou (nežádoucí) proteolytickou či lipolytickou aktivitu (Matthews, Kniel a Monthville, 2017). S objevem mrazených koncentrátů kultur, se laktobacily vrátily do popředí, pediokoky se ale používat nepřestaly a dodnes jsou součástí startovacích kultur. Pediokoky jsou podobně jako laktobacily homofermentativní a zkvašují glukózu na kyselinu mléčnou, tímto okyselením díla inhibují nežádoucí mikroorganismy jako je *Staphylococcus aureus*, *Clostridium botulinum*, *Salmonellae* a některé gramnegativní bakterie a kvasinky (Toldrá, 2007). Nejčastěji používanými jsou *Pediococcus acidilactici* a *P. pentosaceus* (Kameník, 2011).

Rod *Lactococcus*

Laktokoky jsou grampozitivní, nesporogenní, homofermentativní koky. V potravinářském průmyslu se používají zejména v mlékárenství. Poměrně nedávno se objevily tendence pro využití tohoto mikroorganismu i v masném průmyslu při výrobě fermentovaných masných výrobků. Jejich vlastnosti se podobají laktobacilům a pediokokům, zkvašují sacharidy na kyselinu mléčnou, okyselují tak dílo a jsou označovány jako projektivní kultura pro svou schopnost produkce bakteriocinu nisinu (Kameník, 2011; Kröckel, 2013). Ve studii prováděné chorvatskými vědci (Frece et. al., 2014) byly prokázány funkční a technologické vlastnosti vhodné pro použití kultury v masném průmyslu. *Lactococcus lactis* ssp *lactis* vykazoval dostatečné okyselení díla a antibakteriální účinnost proti patogenním mikroorganismům. Je možné, že v budoucnu bude tato kultura využívána jako startovací kultura (Frece et. al., 2014).

3.2.2 Koaguláza-negativní koky

Jsou grampozitivní nesporulující bakterie, které mají vliv na aroma fermentovaného masného výrobku. Jejich význam při výrobě FTS spočívá v redukci dusičnanu, případně dusitanu, v tvorbě enzymu katalázy a v tvorbě chuťově (aromaticky) aktivních látek. Redukce dusičnanu a dusitanu je nezbytná pro správné vybarvení výrobku, princip této reakce je popsán v kapitole 1.2.3. Surovinová skladba fermentovaných trvanlivých salámů – sůl a solící směs. Enzym kataláza rozrušuje peroxid vodíku, který produkují některé kmeny laktobacilů. Chuť a aroma výrobku ovlivňují koaguláza-negativní koky zejména produkcí enzymů. Během zrání se uplatňují zejména mikrobiální peptidázy, jejichž role spočívá v sekundární proteolýze, při níž se uvolňují AMK. Hydrolýzou myofibrilárních bílkovin jsou uvolňovány hlavně AMK valin, leucin, fenylalanin a lysin. V praxi jsou nejběžněji používanými mikroorganismy této skupiny *Staphylococcus carnosus*, *S. xylosus*, některé mikrokoky a kocurie (Kameník, 2011). Při spontánní fermentaci může dojít i k pomnožení dalších stafylokoků jako *Staphylococcus equorum* a *S. saprophyticus* (Dikeman a Devine, 2014). V průběhu zrání FTS má populace koaguláza-negativních koků tendence klesat a to až o jeden logaritmický řád na úkor laktobacilů. Důvodem poklesu může být i přílišné okyselení díla (Dalmis a Soyer, 2008). Počty stafylokoků v díle se běžně pohybují kolem 10^5 KTJ/g v celé průběhu zrání. Zvýší-li se přídavek stafylokoků do díla na začátku 10^8 KTJ/g v průběhu zrání jejich počty opět klesají k 10^5 KTJ/g (Gardini et. al., 2002).



Obrázek 6: Interakce BMK a kataláza - pozitivních koků v průběhu fermentace masných výrobků (Staruch et al., 2006).

4 PODMÍNKY UVÁDĚNÍ FERMENTOVANÝCH TRVANLIVÝCH MASNÝCH VÝROBKŮ NA TRH

Výňatky z vyhlášky 69/2016 o požadavcích na maso, masné výrobky, produkty rybolovu a akvakultury a výrobky z nich, vejce a výrobky z nich týkající se začlenění fermentovaných masných výrobků a jejich označování, jakosti a uvádění na trh.

Tabulka 1: Členění masných výrobků a masných polotovarů na druhy a skupiny (Česko - vyhláška 69/2016).

Druh	Skupina
Masný výrobek	tepelně opracovaný
	tepelně neopracovaný
	tepelně neopracovaný pro tep. Úpravu
	trvanlivý tepelně opracovaný
	trvanlivý fermentovaný
	konzerva
	polokonzerva

Označování

- Na masné výrobky a masné polotovary v technologických obalech se pohlíží jako na potraviny nebalené.
- Označení masa podle živočišného druhu zvířat lze v názvu masného výrobku nebo masného polotovaru použít, obsahuje-li masný výrobek nebo masný polotovar nejméně 50 % hmotnostních uvedeného masa z celkového obsahu masa použitého při jeho výrobě.
- Masné výrobky se označí názvem druhu a skupiny jako výrobek tepelně opracovaný, tepelně neopracovaný, tepelně neopracovaný pro tepelnou úpravu, trvanlivý tepelně opracovaný, trvanlivý fermentovaný, konzerva a polokonzerva. Názvy masných výrobků, u kterých jsou specifikovány požadavky na složení, smyslové požadavky a chemické a fyzikální znaky, nelze používat pro jiné masné výrobky, které těmto požadavkům neodpovídají.

Požadavky na jakost

- Při nakrojení masných výrobků nesmí u nich docházet k uvolňování vody nebo tuku. Vložka masného výrobku nesmí vypadávat z nákroje. V nákroji nesmí být cizí části, které netvoří součást složení masného výrobku, a otisky razítek. V nákroji ne-

smí být nezpracované části, tuhé kůže a kolagenní části, shluky koření nebo jiných složek, pokud nejsou charakteristickým znakem výrobku.

- Povrch masných výrobků nesmí být oslizlý, lepkavý, netypicky svraštělý nebo porostlý plísní, pokud se nejedná o ušlechtilé druhy plísní charakteristické pro daný výrobek, ani jinak narušený. Chuť masného výrobku musí být typická pro daný výrobek, nesmí vykazovat cizí příchutě nebo příchut' po narušené surovině.
- Požadavky na složení vybraných trvanlivých fermentovaných masných výrobků jsou u výrobků poličan, herkules, dunajská klobása, lovecký salám a paprikáš stejné. Musí obsahovat hovězí a vepřové maso a nepřipouští se u nich použití vlákniny, masa zvířat jiných živočišných druhů, strojně odděleného masa, a bílkovin jiných živočišných druhů a bílkovin rostlinných.

Chemické a fyzikální požadavky na složení vybraných masných výrobků

Tabulka 2: Požadavky na obsah čisté svalové bílkoviny a tuku ve vybraných fermentovaných výrobcích (Česko - vyhláška 69/2016).

Výrobek	čistá svalová bílkovina (% hmot. Nejméně)	obsah tuku (% hmot. Nejvýše)
Poličan	16	50
Lovecký salám	15	50
Dunajská klobása	14	55
Paprikáš	14	50
Herkules	14	50

Uvádění na trh

- Nebalené nakrájené masné výrobky musí být prodány nejpozději v den následující po dni jejich nakrájení v místě prodeje. Masné výrobky, které byly nakrájeny a baleny před dodáním do místa prodeje za účelem jejich prodeje jako nebalené potraviny, musí být prodány nejpozději v den následující po dni jejich rozbalení v místě prodeje.
- Zabalené nakrájené masné výrobky musí být zabaleny bez zbytečného prodlení po nakrájení v místě prodeje.

- Masné výrobky, které byly nakrájeny a baleny před dodáním do místa prodeje za účelem prodeje jako zabalené potraviny, musí být v místě prodeje zabaleny bez zbytečného prodlení po rozbalení.
- Zabalené nakrájené masné výrobky musí být bezprostředně po zabalení označeny datem zabalení a datem použitelnosti
- U krájených masných výrobků provozovatel potravinářského podniku zaznamená a eviduje datum jejich nakrájení v místě prodeje nebo datum rozbalení, pokud byly nakrájeny před dodáním do místa prodeje.
- Masné výrobky s povrchem koření nebo s jinou nestabilní povrchovou úpravou se uvádějí na trh balené nebo zabalené s výjimkou prodeje a nabízení k prodeji spotřebiteli (Česko - vyhláška 69/2016).

II. PRAKTICKÁ ČÁST

5 CÍL PRÁCE

Cílem práce bylo zjistit, jakým způsobem ovlivňují jednotlivé vybrané kultury mikroorganismů finální produkt z pohledu aminokyselinového složení.

Pro dosažení cíle bylo třeba:

- Zpracovat literární rešerši, která zahrnuje charakteristiku a technologii výroby trvanlivých fermentovaných masných výrobků.
- Při popisu zrání se zaměřit na fermentaci, během které nastávají největší změny v aminokyselinovém složení výrobku.

Pro zpracování praktické části bylo nezbytné naplnit tyto cíle:

- Vyrobít modelové vzorky trvanlivých fermentovaných salámů za použití šesti různých mikrobiálních kultur.
- Při výrobě použít lyofilizované mikrobiální kultury vyrobené firmou Christian Hansen CZ s.r.o. a to *Staphylococcus carnosus*, *Lactobacillus sakei*, *Lactobacillus curvatus*, *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*, *Pediococcus pentosaceus* a *Pediococcus acidilactici*, a připravit srovnávací vzorek bez přídavku kultury.
- Provést odběry vzorků ve fázích těsně po naražení, po fermentaci a po ukončení 1., 2. a 3. týdne zrání a u těchto odběrů vzorků stanovit obsah celkových, volných a vázaných aminokyselin.
- Modelové vzorky dále podrobit, ve stejných odběrech chemické a mikrobiologické analýze.

vyhodnotit výsledky a vyvodit závěry.

6 METODIKA PRÁCE

6.1 Popis experimentu

Experiment spočíval ve výrobě modelových vzorků trvanlivých fermentovaných salámů s přidavkem šesti různých mikrobiálních kultur, dále v odběrech vzorků ve specifických časech (popsáno v následující podkapitole 6.2 Časový průběh experimentu) a v provedení naplánovaných analýz. Pro účely experimentu byly použity lyofilizované mikrobiální kultury vyrobené firmou Christian Hansen, CZ, s.r.o.. Jednalo se o následující kultury:

- *Staphylococcus carnosus*, CS 300, jedno-kmenová kultura
- *Lactobacillus sakei* B2, bioprotektivní kultura
- *Lactobacillus curvatus*, B-LC-48, bioprotektivní kultura
- *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* RUBIS, bioprotektivní kultura
- *Pediococcus pentosaceus* LHP, rychle fermentující kultura
- *Pediococcus acidilactici* B-LC-20, bioprotektivní kultura

Při výrobě fermentovaného výrobku typu byl odebrán vzorek díla (2 salámy, jeden pro mikrobiologii a druhý pro chemické analýzy) bezprostředně po naražení. Tento vzorek byl převezen z výroby ve sterilním obalu a v chladičím boxu do Zlína. Nejdříve byl vzorek zvážen, pro pozdější výpočet úbytku hmotnosti v průběhu zrání. Jeden ze salámů byl umístěn do fermentační komory, kde probíhalo měření pH v průběhu fermentace. Vzorek byl zbaven obalu, rozmělněn v přístroji Stephan a uchován v lednici pro pozdější analýzy. Prioritou ovšem bylo co nejdříve provést mikrobiologické analýzy. Poté co byl vzorek zvážen, a rozmělněn, byl celý jeden salám odnesen do mikrobiologické laboratoře na budově U1. Po sterilním odebrání vzorku a přípravě desítkového ředění následovalo očkování roztěrem na předem připravené Petriho misky. Po uložení Petriho misek do termostatu bylo možno navrátit se na budovu U3 a pokračovat v navažování vzorků na stanovení sušiny a měření pH vzorku. Zbytek vzorku byl zamražen pro pozdější využití při stanovování tuků a bílkovin vzorku a volných a vázaných aminokyselin. Takto byly zpracovány všechny vzorky ve všech fázích odběru i referenční vzorek bez přidavku jakékoliv mikrobiální kultury.

6.2 Časový průběh experimentu

Experiment byl zahájen na podzim roku 2016, kdy nám po domluvě s místním výrobcem masných výrobků bylo umožněno připravit v malém množství tyto výrobky při jejich běžném výrobním procesu. Experiment bylo potřeba pečlivě naplánovat a skloubit časové možnosti všech zúčastněných s možnostmi využívání laboratoří pro dané analýzy. Odběry byly prováděny ve specifických cyklech a časech tak, aby byly vždy prováděny ve stejnou dobu. Získávání vzorků a první analýzy byly provedeny v rámci asi dvou měsíců. Vzorek odebraný před naražením díla, následoval odběr vzorku po dalších 72 hodinách, respektive po fermentaci, následoval odběr po prvním, druhém a třetím, posledním týdnu zrání.

1. den – Odběr ihned po naražení

3. den – odběr po fermentaci 72 hodin

10. den – odběr po prvním týdnu zrání

17. den – odběr po druhém týdnu zrání

24. den – odběr po třetím týdnu zrání – respektive po ukončení zracího procesu.

Přesná data odběrů a konkrétní odběry jsou uvedeny v příloze I ČASOVÝ PRŮBĚH EXPERIMENTU

6.3 Výroba modelových vzorků

Jak už bylo zmíněno výše, výroba vzorků probíhala ve spolupráci s místní firmou. Aplikace vybraných mikrobiálních kultur se prováděla do malé části díla, které bylo zpracováváno běžným technologickým postupem. Provozní receptura výrobku byla zachována, jediný rozdíl tedy spočíval v použití jiných kultur. Při výrobě byla použita surovinová skladba pro salám poličan se směsí koření Lovecký II Bio (pepř, třtinový cukr, česnek, glukóza, kyselina askorbová (E300), kmín, hřebíček).

Složení výrobku (na 100 kg díla)

25 kg vepřová plec (V2)

25 kg vepřová plec (V3)

25 kg hovězí maso (H2)

25 kg vepřové sádlo (V8, V9)

1 kg směs koření - Lovecký II Bio

+ množství startovací kultury doporučené výrobcem

- *Staphylococcus carnosus* 25 g / 100 kg
- *Lactobacillus sakei* 25 g / 200 kg
- *Lactobacillus curvatus* 25 g / 200 kg
- *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* 25 g / 100 kg
- *Pediococcus pentosaceus* 42 g / 225 kg
- *Pediococcus acidilactici* 25 g / 100 kg

Namrazené maso a mrazené sádlo byly společně kutrovány spolu s dalšími přísadami do dosažení požadované velikosti zrna. Dílo bylo plněno do fibrózních střev Visko o průměru 61 mm (50 % regenerovaná celulóza, 25 % dlouhovláknitý papír, 20 % změkčovadla, 5 % voda) a tloušťce 80 mikronů \pm 25 %. Před samotným použitím byla střeva namočena v čisté vodě o teplotě mezi 30 - 50°C po dobu 30 minut. Po naražení byly salámy pověšeny na udicí vozík a převezeny do zrací komory. Ve zrací komoře proběhla nejdříve vyrovnávací fáze následována fermentací za daných podmínek a výrobky byly dále ve stejné komoře uzeny studeným kouřem a sušeny. Podrobný rozpis teplot, časů a RVV v průběhu zrání je uveden v

6.4 Použité metody analýz

6.4.1 Základní chemická analýza

Stanovení obsahu sušiny – do aluminiové misky s pískem bylo naváženo 5 g zhomogenizovaného vzorku s přesností na 4 desetinná místa, přidáno 5 ml etanolu a skleněnou tyčinkou rozmícháno. Takto připravené vzorky byly sušeny v sušárně při teplotě 105 °C do konstantní hmotnosti (4,5 hodiny). Po vychladnutí byl vzorek zvážen s přesností na 4 desetinná místa.

Hodnota pH byla měřena vpichovým pH metrem v průběhu zrání a záznamovým pH metrem v průběhu fermentace.

Stanovení úbytku hmotnosti bylo vyjádřeno procentuálně z průběžných hodnot vážení vzorku při každém odběru.

6.4.2 Mikrobiologická analýza

Mikrobiologická analýza byla prováděna jako jedna z prvních analýz hned po příjmu vzorku v den odběru. Ze vzorku celého salámu v technologickém obalu bylo sterilně odebráno 5 g vzorku a rozmícháno v 45 ml sterilního fyziologického roztoku. Takto připravený vzorek se 3 minuty homogenizoval na přístroji Stomacher. Z připraveného homogenizovaného roztoku vzorku byla připravena sada desítkového ředění (10^{-1} až 10^{-6} , dle použité půdy, stanovovaného mikroorganismu a očekávaného nárůstu kolonií). Na připravené sterilní Petriho misky s půdami bylo metodou rozřeru sterilní hokejkou rozetřeno vždy 0,1 ml vzorku o daném ředění. Takto připravené misky byly kultivovány při různých časech a teplotách a poté byly spočítány narostlé kolonie a spočítány kolonie tvořící jednotky (dále jen KTJ) na gram výrobku. U vzorků byla vždy naočkována půda PCA pro stanovení celkového počtu mikroorganismů a půda pro stanovení daného mikroorganismu. V případě stafylokoků byla kultivována půda PCA a MSA, u laktobacilů to byla půda PCA a MRS a u pedikoků půda PCA a M17+glukoza. U všech vzorků byly zároveň kultivovány půdy ENDO a CHYGA pro kontrolu (klesajícího) množství enterobakterií a plísní a kvasinek.

Použité roztoky a agary

- Fyziologický roztok (0,9 % roztok NaCl)

Chlorid sodný 9,0 g

Voda 1000 ml

Příprava: 9 g směsi bylo rozpuštěno v 1000 ml destilované vody. Po rozpuštění byla směs sterilizována v autoklávu (121 °C, 15 minut).

- PCA – Plate Count Agar (HiMedia)

Půda pro stanovení počtu mikroorganismů ve vodě a potravinách.

Glukóza 15,0 g/l

Enzymatický hydrolyzát kaseinu 5,0 g/l

Kvasničný extrakt 2,5 g/l

Agar 15,0 g/l

Příprava: 23,5 g směsi bylo rozmícháno v 1000 ml destilované vody. Po rozpuštění sterilizace v autoklávu (121 °C, 15 minut) a poté za aseptických podmínek rozlita na Petriho misky. Kultivace probíhala při 30 °C po dobu 48h.

- MRS – De Man Rogosa Sharpe Agar (HiMedia)

Agarová půda určená pro detekci mléčných tyčinek rodu *Lactobacillus*.

Dextróza	20,0 g
Masový pepton	10,0 g
Hovězí extrakt	10,0 g
Citran sodný	5,0 g
Octan sodný	5,0 g
Kvasničný extrakt	4,0 g
Hydrogenfosforečnan (di)draselný	2,0 g
Polysorbát 80	1,0 g
Heptahydrát síranu hořečnatého	0,1 g
Tetrahydrát síranu manganatého	0,05 g
Agar	15,0 g

Příprava: Bylo naváženo 67,15 g směsi do 1000 ml destilované vody. Po rozpuštění byla směs sterilizována v autoklávu při teplotě 121 °C po dobu 15 minut a poté za aseptických podmínek rozlita na Petriho misky. Kultivace probíhala při 30 °C po dobu 48h.

- MSA – Mannitol Salt Agar (HiMedia)

Selektivní médium k izolaci stafylokoků.

Masový extrakt	1,0 g/l
Pepton	10,0 g/l
Chlorid sodný	75,0 g/l
D-mannitol	10,0 g/l
Fenol červený	0,025 g/l
Agar	15,0 g/l

Příprava: navážka 111,02 g směsi byla rozmíchána v 1000 ml destilované vody. Po rozpuštění byla směs sterilizována v autoklávu (121 °C po dobu 15 minut) a poté za aseptických podmínek rozlita na Petriho misky. Kultivace probíhala při 30 °C po dobu 48h.

- M17 + glukosa 5 %

Živný agar pro kultivaci a zjišťování počtu mléčných streptokoků a pediokoků.

Trypton.....	2,5 g/l
Maso-peptonový agar.....	2,5 g/l
Sojo-peptonová moučka.....	5 g/l
Masový extrakt.....	5,0 g/l
Kvasničný extrakt.....	0,025 g/l
Laktóza.....	5,0 g/l
Glycerolfosfát sodný.....	19,0 g/l
Síran hořečnatý.....	0,25 g/l
Kyselina askorbová.....	0,5 g/l
Agar	15,0 g/l
+ 5% přídavek glukózy (50 g na 1000 ml)	

Příprava: navážka 111,02 g směsi byla rozmíchána v 1000 ml destilované vody. Po rozpuštění byla směs sterilizována v autoklávu (121 °C po dobu 15 minut) a poté za aseptických podmínek rozlita na Petriho misky. Kultivace probíhala při 30 °C po dobu 48h.

- ENDO Agar (HiMedia)

Používá se pro detekci laktóza-pozitivních a laktóza-negativních enterobakterií.

Masový pepton	10,0 g/l
Laktóza	10,0 g/l
Siřičitan sodný	2,5 g/l
Hydrogenfosforečnan (di)draselný	3,5 g/l
Bazický fuschin	0,5 g/l
Agar	15,0 g/l

Příprava: Bylo naváženo 41,5 g směsi do 1000 ml destilované vody. Po rozpuštění byla směs sterilizována v autoklávu při teplotě 121 °C po dobu 15 minut a poté za aseptických podmínek rozlita na Petriho misky. Kultivace probíhala při 30 °C po dobu 48h.

- CHYGA - Chloramfenicol Yeast Glucose Agar (HiMedia)

Používá se k detekci a stanovení počtu kvasinek a plísní v potravinách. Kvasničný extrakt

a glukóza podporují růst kvasinek a plísní, zatímco chloramfenikol potlačuje růst kontaminujících bakterií.

Kvasničný extrakt	5,0 g/l
Glukóza	20,0 g/l
Chloramfenikol	0,1 g/l
Agar	15,0 g/l

Příprava: 41,1 g směsi byla rozmícháno v 1000 ml destilované vody. Po rozpuštění byla směs sterilizována v autoklávu (121 °C, 15 minut) a poté za aseptických podmínek rozlita na Petriho misky. Kultivace probíhala při 23 °C po dobu 120h.

Použité pomůcky a vybavení

Automatické pipety, špičky, Petriho misky, laboratorní váhy, odměrný válec, zkumavky, skleněné hokejky, stomacher, vortex, kahan, Autokláv Systec 2540 EL, termostat, ethanol, destilovaná voda.

6.4.3 Stanovení volných aminokyselin

Příprava vzorků pro stanovení FAA (Free Amino Acids = volné aminokyseliny)

Navážka 1 g rozmělněného vzorku na analytických vahách byla dobře promíchána s 10 ml 0,6 M kyseliny chloristé. Následně byla tato směs 30 minut třepána na třepáče, poté odstředěna při 6000 otáčkách po dobu 5 minut. Supernatan byl přelit do 25 ml odměrné baňky. Tento postup byl opakován ještě dvakrát, ovšem s nižším přídatkem 0,6 M kyseliny chloristé a to 7 ml. Poté byla 25 ml odměrná baňka doplněna po rysku 0,6 M kyselinou chloristou a přefiltrována přes papírový filtr KA3 do kádinky. Roztok byl dále přefiltrován do kalibrovaných mikrozkuvek eppendorf 1,5 ml přes stříkačkový membránový filtr s porozitou 0,45 μm a dávkován do chromatografického systému. Stanovení proběhlo pomocí přístroje HPLC Agiland technology. HPLC s předkolonovou derivatizací pomocí AQC (6-aminoquinolyl-N-hydrosysuccinimidyl carbamate) s DAD detekcí (UV/VIS detektor s diodovým polem).

6.4.4 Stanovení celkových aminokyselin

6.4.4.1 Kyselá hydrolýza

K navážce 75 mg vzorku masného výrobku s přesností 0,0001 g bylo přidáno 15 ml 6 M HCl, takto připravený vzorek se nechal 30 s probublat argonem a zavřené vialky byly umístěny do termobloku, kde po dobu 23 hodin probíhala při 117°C kyselá hydrolýza. Po ukončení hydrolýzy a vychlazení vialek byl jejich obsah kvantitativně převeden 0,1 M HCl přes filtrační papír do odpařovací baňky a odpařen na vakuové rotační odparce s teplotou lázně 52°C do sirupovité konzistence. Odparek byl poté rozpuštěn v několika ml redestilované vody a znovu odpařen, tento postup byl opakován celkem třikrát. Odparek byl poté kvantitativně převeden sodno-citrátovým pufrem o pH 2,2 do 25 ml odměrné baňky. Následně byl takto připravený vzorek přefiltrován přes stříkačkový membránový filtr s porozitou 0,45 µm do mikrozkušavek eppendorf 1,5 ml a umístěn do automatického analyzátoru aminokyselin AAA 400, Ingos s.r.o. Praha.

Chromatografie s průběhem na koloně ionexu prostřednictvím nárůstu pH, iontové síly a teploty.

Kolona: skleněná ID 3,7 mm, sloupec 350 mm

Detektor: fotometr dvoukanálový 440 a 570 nm, objem kyvety 5 µl

6.4.4.2 Oxidativní hydrolýza

Při stanovení AMK kyselou hydrolýzou dochází částečnému zničení AMK obsahujících síru – metionin a cystein, proto jsou tyto dvě aminokyseliny stanoveny po předchozí oxidaci. Nejdříve byla připravena oxidační směs peroxidu vodíku (30%) a kyseliny mravenčí (85%) v poměru 1:9. Tato směs byla ponechána 2 hodiny v digestoři a následně vychlazená 15 minut v chladničce. Poté byla přidána v množství 15 ml k navážce 1 g vzorku (navážka s přesností 0,0001 g) v 50 ml zkumavce a ponechána cca 20 hodin v chladničce. K takto oxidovanému vzorku bylo přidáno 50 ml 6 M HCl a baňka byla umístěna do olejové lázně, kde probíhala oxidativní hydrolýza po 23 hodin při teplotě 118°C. Po ukončení hydrolýzy a vychladnutí baňky byl její obsah kvantitativně převeden 0,1 M HCl přes filtrační papír do 250 ml odměrné baňky a doplněn 0,1 M HCl po rysku. Z filtrátu byla odebrána alikvotní část 25 ml a převedena do odpařovací baňky, ve které byla odpařena na vakuové rotační

odparce při teplotě lázně 50°C. Odparek byl následně rozpuštěn v několika ml redestilované vody a znovu odpařen, tento krok se opakoval celkem třikrát. Následně byl odparek kvantitativně převeden sodno-citrátovým pufrům o pH 2,2 do 25 ml odměrné baňky, následně přefiltrován přes stříkačkový membránový filtr s porozitou 0,45 μm do mikrozku-
mavek eppendorf 1,5 ml a umístěn do automatického analyzátoru aminokyselin AAA 400, Ingos s.r.o. Praha.

Chromatografie s průběhem na koloně ionexu prostřednictvím nárůstu pH, iontové síly a teploty.

Kolona: skleněná ID 3,7 mm, sloupec 350 mm

Detektor: fotometr dvoukanálový 440 a 570 nm, objem kyvety 5 μl

7 VÝSLEDKY A DISKUZE

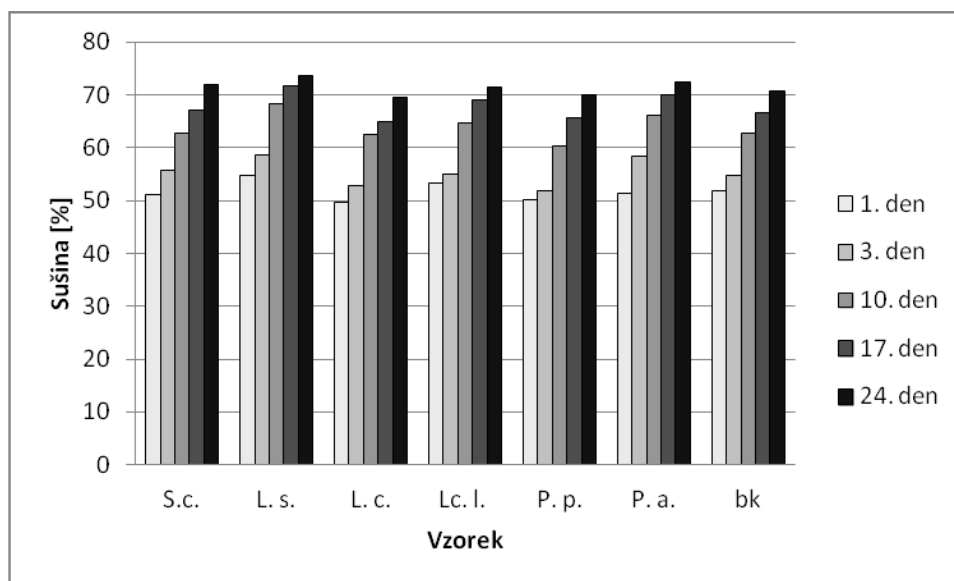
7.1 Základní chemická analýza

7.1.1 Sušina

Sušina byla stanovena u všech odběrů a průměrné procentuální hodnoty obsahu sušiny jsou uvedeny v tabulce níže.

Tabulka 3: Sušina výrobků v průběhu zrání.

Den odběru	Sušina výrobku [%]
1.	51,88 ± 1,58
3.	55,55 ± 2,36
10.	64,38 ± 2,43
17.	67,81 ± 1,99
24.	71,26 ± 1,27



Obrázek 7: Sušina vzorků v jednotlivých odběrech v průběhu zrání

Sušina vzorků byla v jednotlivých odběrech podobná. V prvním odběru ihned po naražení byla stanovena na $51,88 \pm 1,58$, po třídní fermentaci (odběr 3. den) byl zaznamenán nárůst sušiny na hodnotu $55,55 \pm 2,36$. K největšímu nárůstu podílu sušiny došlo mezi 3. a 10. odběrem, tedy po prvním týdnu zrání, kde se množství sušiny zvýšilo až na $64,38 \pm 2,43$. Ve zbývajících dvou odběrech nedošlo k tak výraznému navýšení, přesto je patrné, že

proces sušení dále pokračoval, což potvrzuje hodnota sušiny stanovená v 17. dni a to $67,81 \pm 1,99$. Poslední hodnotou naměřenou 24. den od výroby, odpovídající hotovému výrobku byla hodnota $71,26 \pm 1,27$.

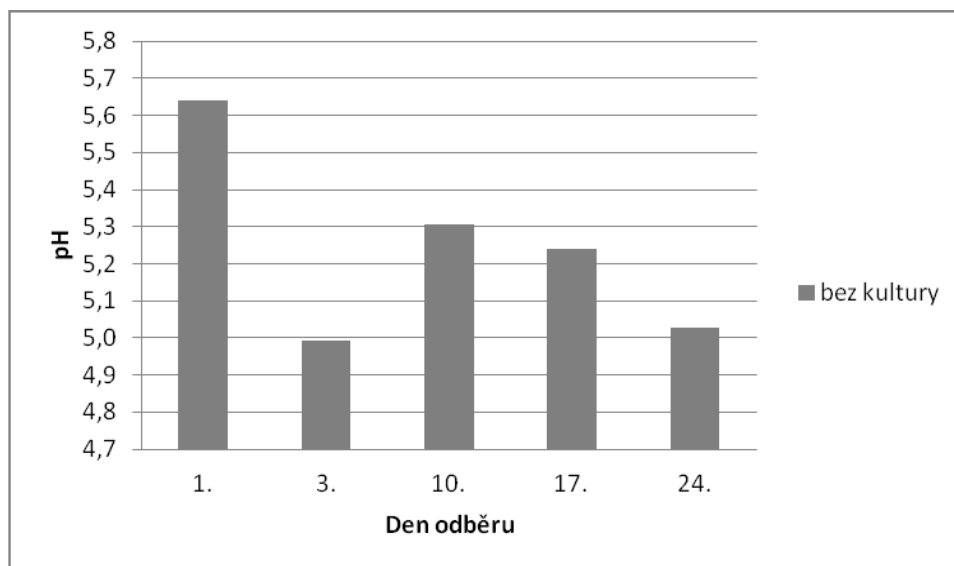
7.1.2 pH

Hodnota pH byla měřena v průběhu zrání vpichovým pH metrem u jednotlivých vzorků kultur. Ve všech případech včetně referenčního vzorku došlo k výraznému poklesu pH po fermentaci.

Tabulka 4: pH vzorků v průběhu zrání

Den odběru	Vzorek						
	bk	S. c.	L. s.	L. c.	Lc. l. ssp l.	P. p.	P. a.
1.	5,64	5,67	5,69	5,51	5,56	5,63	5,52
3.	4,99	5,05	5,01	4,98	5,13	4,96	5,21
10.	5,31	5,10	4,76	5,01	5,34	5,16	5,15
17.	5,24	5,27	5,32	5,15	5,20	5,18	4,87
24.	5,03	5,02	5,17	5,23	5,28	4,91	4,73

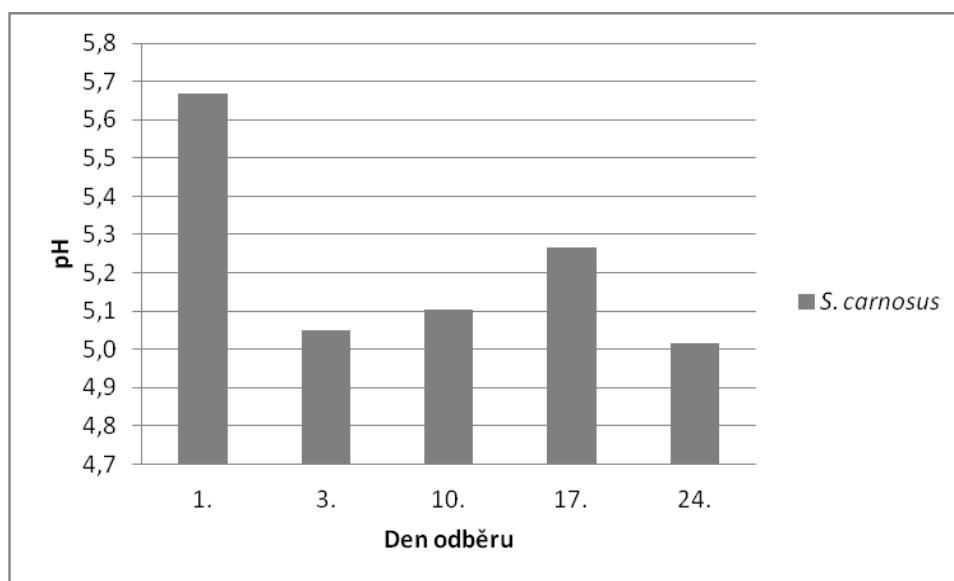
Směrodatná odchylka se u všech hodnot pohybovala v rozmezí od 0 do 0,015.



Obrázek 8: pH referenčního vzorku bez přidané mikrobiální kultury v průběhu zrání

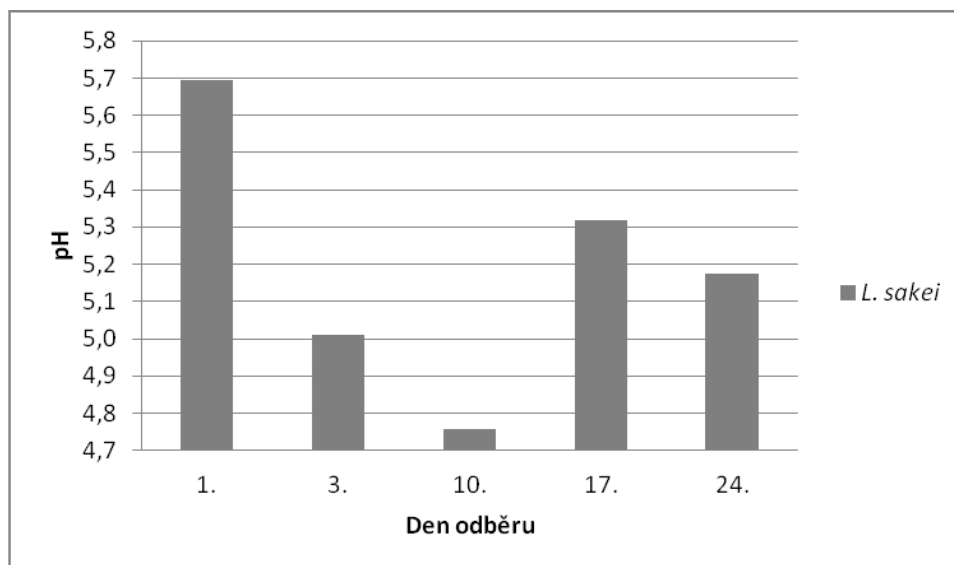
U referenčního vzorku došlo k významnému poklesu pH po fermentaci a to z počáteční hodnoty 5,64 na hodnotu 4,99. Tento pokles je pravděpodobně způsoben nežádoucí kontaminací díla, neboť veškeré vzorky byly vyráběny v běžných provozních podmínkách. v

následujícím odběru po prvním týdnu zrání (10. den) byl zaznamenán nárůst pH na hodnotu 5,31 a poté opětovný pokles po druhém týdnu zrání na 5,24, po třetím na 5,03.



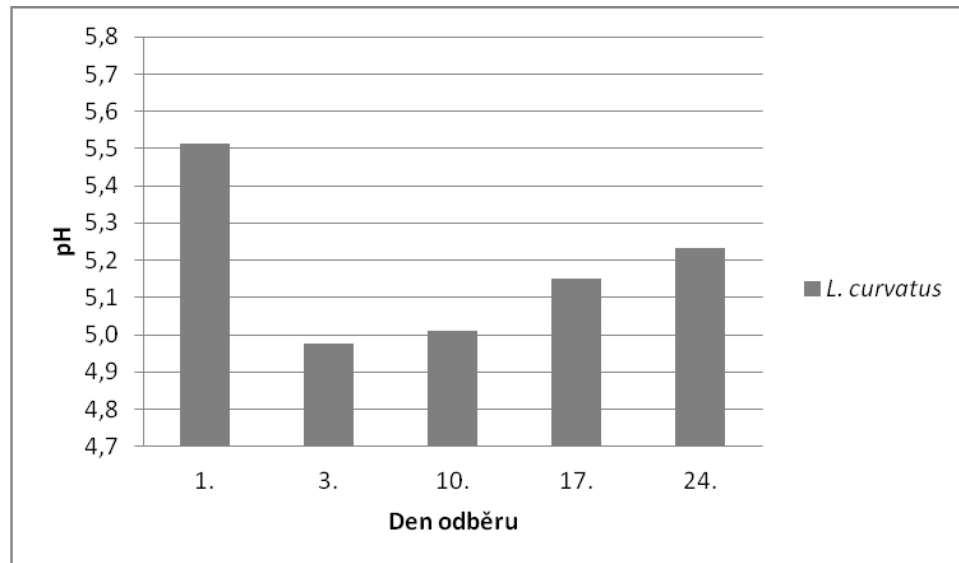
Obrázek 9: pH vzorku s přídavkem kultury *Staphylococcus carnosus* v průběhu zrání.

U vzorku s přídavkem mikrobiální kultury *S. carnosus* byl zaznamenán prudký pokles pH po fermentaci. Z počáteční hodnoty pH 5,67 došlo k poklesu na hodnotu 5,05. Tato hodnota nezůstala konstantní a zvyšovala se v průběhu zrání až na hodnotu 5,27 v odběru po 2. týdnu zrání (17. den). Poté byl opět zaznamenán pokles hodnoty a to na 5,02.



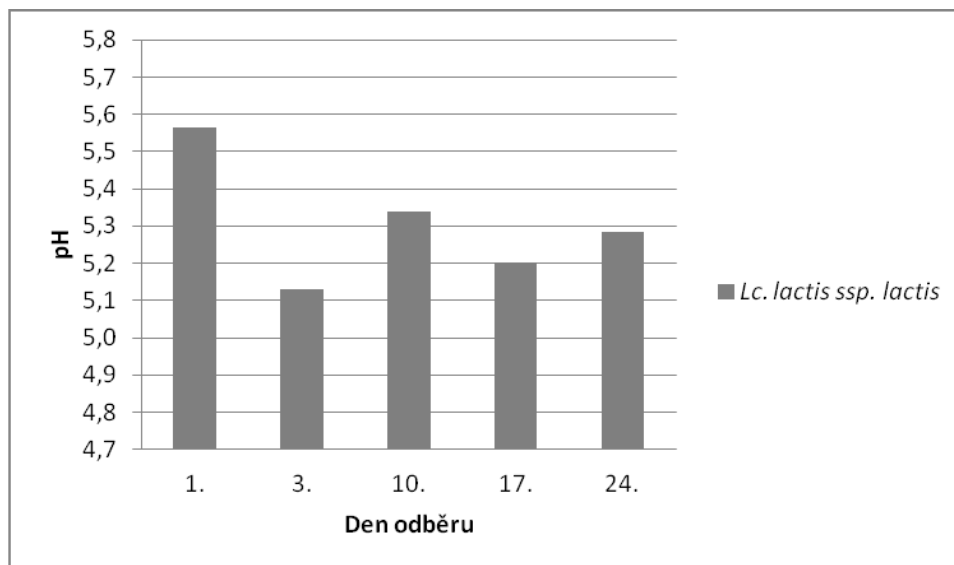
Obrázek 10: pH vzorku s přídavkem kultury *Lactobacillus sakei* v průběhu zrání.

Vzorek s přidavkem mikrobiální kultury *L. sakei* se také vyznačoval razantním poklesem pH po ukončení fermentace. Pokles byl pozvolný a pokračoval i v prvním týdnu zrání. Z počáteční hodnoty 5,69 klesl po fermentaci na hodnotu 5,01 a po prvním týdnu zrání až na hodnotu 4,76. Poté následoval nárůst na hodnotu 5,32 po druhém týdnu zrání a mírný pokles na hodnotu 5,17 po ukončení zrání.



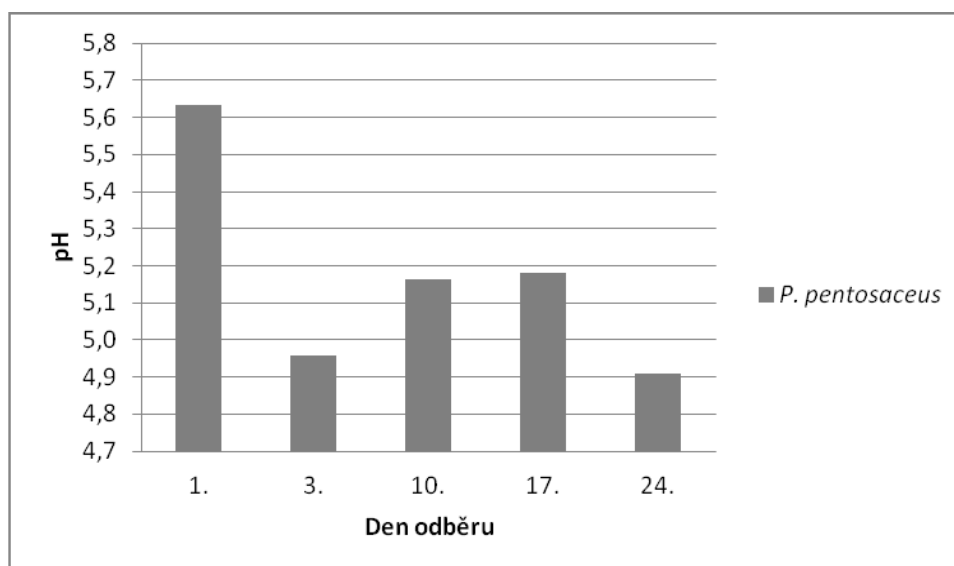
Obrázek 11: pH vzorku s přidavkem kultury *Lactobacillus curvatus* v průběhu zrání.

Fermentovaný výrobek s přidavkem kultury *L. curvatus* vykazoval podobný trend jako předchozí vzorky. Z počáteční hodnoty 5,51 na 4,98 po fermentaci. 10. den od výroby došlo pouze k velmi nepatrnému nárůstu na hodnotu 5,01. Po druhém týdnu zrání se tato hodnota dále zvyšovala přes 5,15 (17. den) až 5,23 po ukončení zrání.



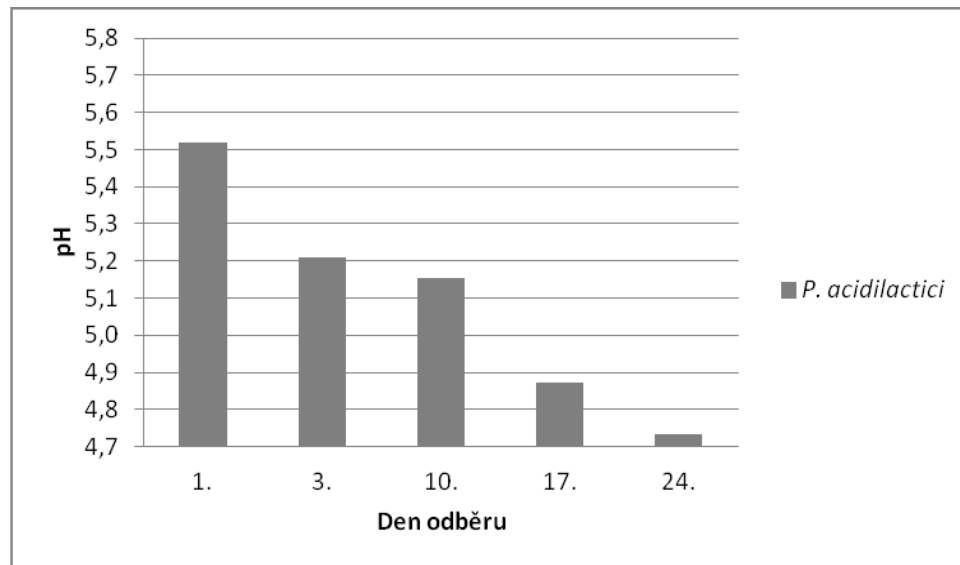
Obrázek 12: pH vzorku s přidavkem kultury *Lactococcus lactis ssp. lactis* v průběhu zrání.

Mikrobiální kultura *Lc. lactis ssp lactis* prokázala podobnou schopnost okyselení díla jako předchozí kultury. K nejvýraznějšímu poklesu došlo po fermentaci z hodnoty 5,56 na 5,13. V 10. dnu následoval nárůst na 5,34 a poté mírný pokles v dalším odběru na 5,20. Po ukončení zrání byla stanovená hodnota pH 5,28.



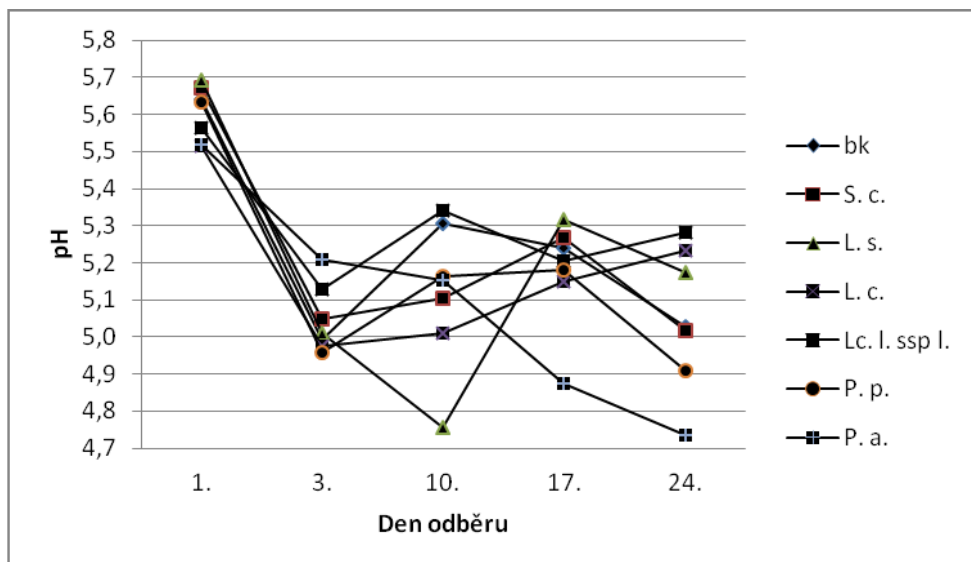
Obrázek 13: pH vzorku s přidavkem kultury *Pediococcus pentosaceus* v průběhu zrání.

Trend zůstal zachován i s použitím kultury *P. pentosaceus*, kdy byl pokles pH po fermentaci z 5,63 na 4,96 následován nárůstem pH v 10. dni odběru na 5,16. V dalším odběru takřka nedošlo ke změně pH neboť naměřená hodnota byla 5,18. Konečná hodnota pak 4,91.



Obrázek 14: pH vzorku s přidavkem kultury *Pediococcus acidilactici* v průběhu zrání.

Pediococcus acidilactici použitý v tomto případě způsobil okyselování díla po celou měřenou dobu zrání. Výrazný pokles byl zaznamenán po fermentaci z hodnoty 5,52 na 5,21. Následoval mírnější pokles mezi fermentací a ukončeným prvním týdnem zrání na hodnotu 5,15. Dalším poměrně výrazným poklesem byl následující, kdy hodnota klesla na 4,87. Na konci zrání byla hodnota pH 5,73.



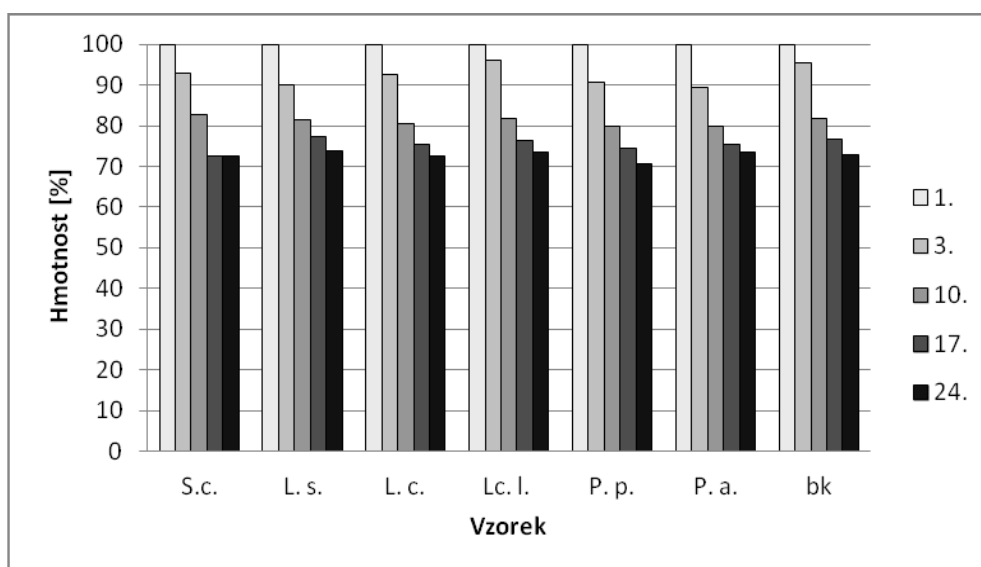
Obrázek 15: Srovnání pH vzorků v průběhu zrání

7.1.3 Úbytek hmotnosti

Úbytky hmotnosti byly počítány jako procentuální vyjádření úbytku hmotnosti k výrobku na začátku zrání. Procentuální vyjádření úbytků hmotnosti v jednotlivých dnech je uvedeno v tabulce níže.

Tabulka 5: Hmotnostní úbytky výrobků v průběhu zrání.

Den odběru	Úbytky hmotnosti v průběhu zrání [%]
1.	0
3.	$7,69 \pm 2,29$
10.	$18,57 \pm 1,08$
17.	$24,12 \pm 1,60$
24.	$27,11 \pm 1,24$

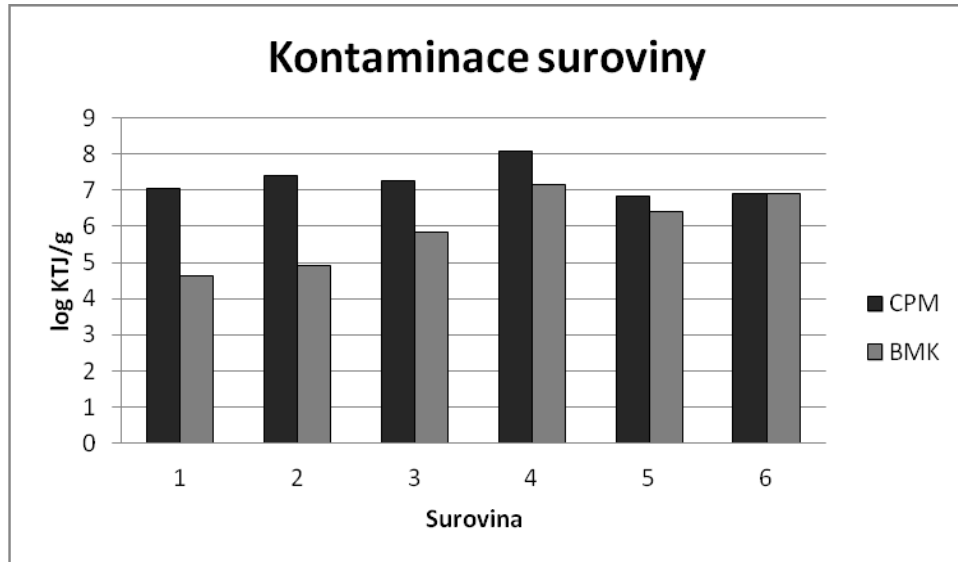


Obrázek 16: Srovnání hmotnostních úbytků vzorků v průběhu zrání.

Úbytek hmotnosti byl zaznamenán při každém odběru vzorku, aby sloužil jako kontrolní analýza k sušení. Z výsledků je patrné, že úbytky hmotnosti v jednotlivých odběrech jsou velmi podobné. Největší úbytek byl zaznamenán v prvním týdnu zrání v období od ukončení fermentace tedy v období mezi odběry 3. a 10. den. Tento úbytek je logický neboť na začátku zrání má výrobek vyšší obsah vody, jejíž odpar se zmenšuje úměrně s nárůstem sušiny. Rozdíly v úbytcích hmotnosti nejsou velké a mohou být způsobeny podmínkami v provozu.

7.2 Mikrobiologická analýza

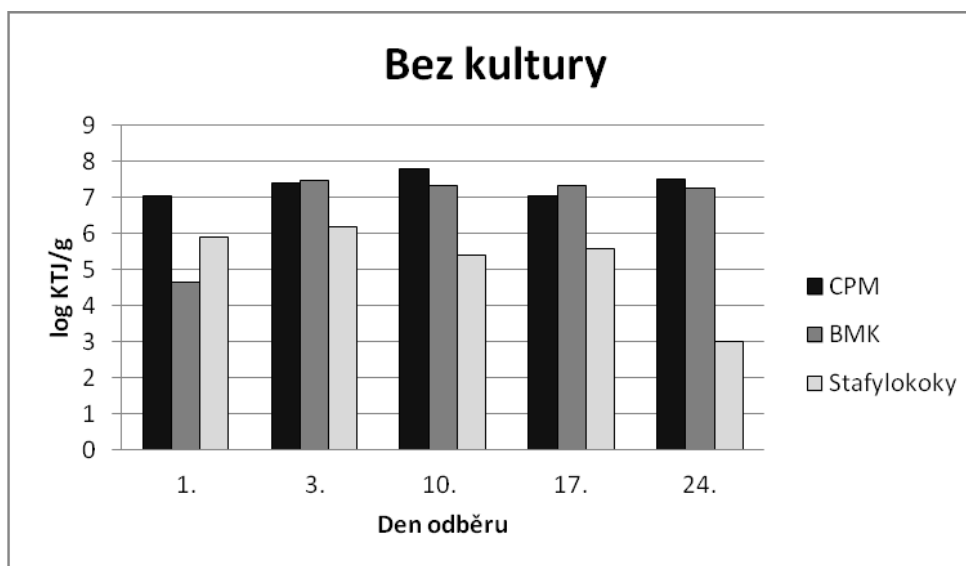
Kontrolní vzorky suroviny:



Obrázek 17: Počáteční mikrobiální kontaminace suroviny před přidavkem startovací kultury – CPM a BMK v 1g suroviny.

Celkový počet mikroorganismů v surovině pro výrobu (maso a tuk) se pohyboval mezi 7 až 8 log KTJ/g. Z grafu je patrné, že v surovině byly přítomny přirozeně se vyskytující bakterie mléčného kvašení a to v různých koncentracích řádově od 5 po 7 log KTJ/g.

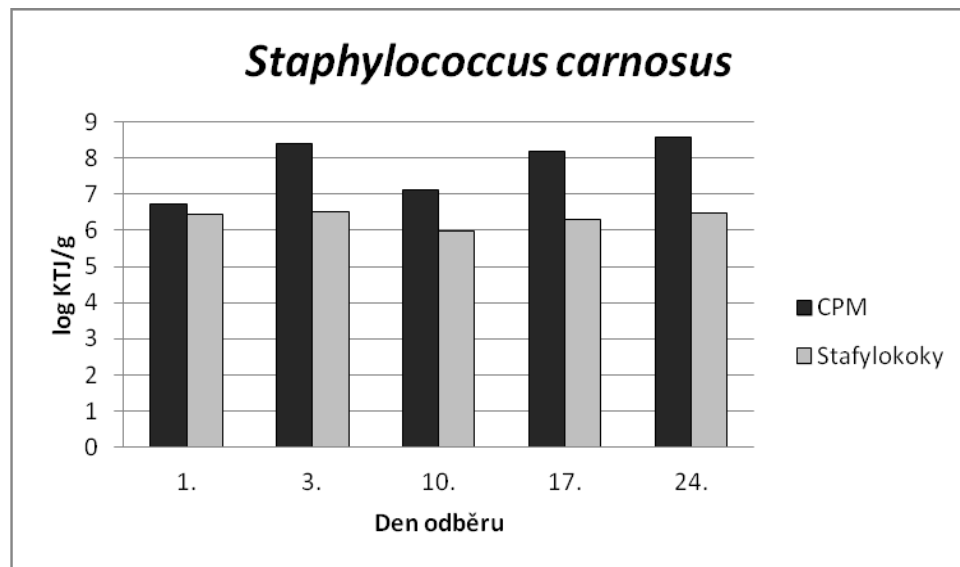
Kontrolní vzorek bez přídavku startovací kultury



Obrázek 18: Kontrolní vzorek bez přídavku startovací kultury – CPM, BMK a stafylokoky v 1 g vzorku.

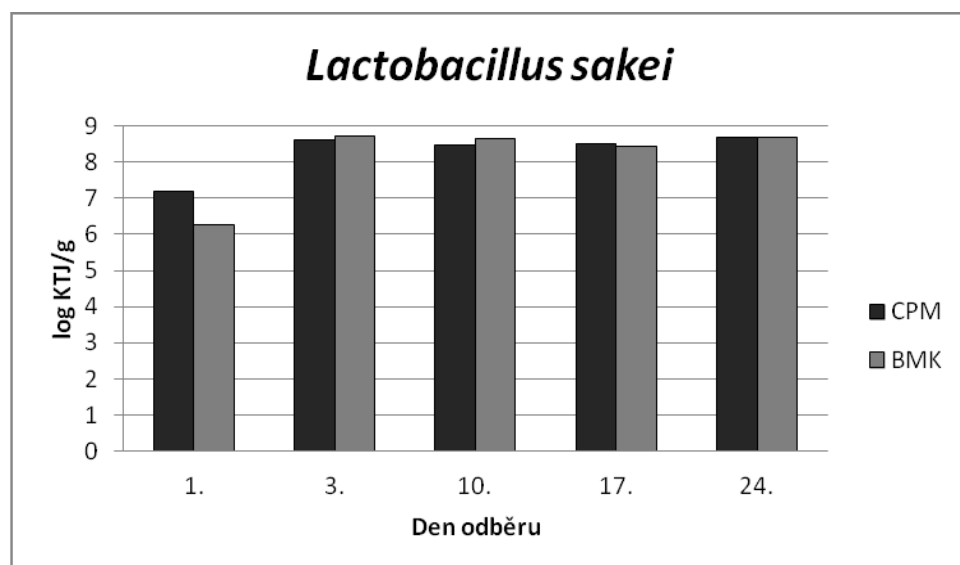
U celkového počtu mikroorganismů došlo k mírnému nárůstu z původní hodnoty 7,04 log KTJ/g na hodnotu 7,8 log KTJ/g v 10. odběru následoval mírný pokles na hodnotu 7,04 a posléze nárůst v posledním odběru na 7,5 log KTJ/g. Přestože do vzorku nebyla přidána startovací kultura, je patrné, že již v prvním odběru byly přítomny jak bakterie mléčného kvašení, tak stafylokoky. Během fermentace došlo k nárůstu počtu BMK z 4,6 na hodnotu vyšší než 7 log KTJ/g a tato hodnota zůstala takřka neměnná po zbytek zračního procesu. U stafylokoků byl naopak pozorován klesající trend kdy z počáteční hodnoty 5,9 log KTJ/g klesl jejich počet na konci zrání na méně než 3 log KTJ/g.

Vzorky s přidavkem startovací kultury:



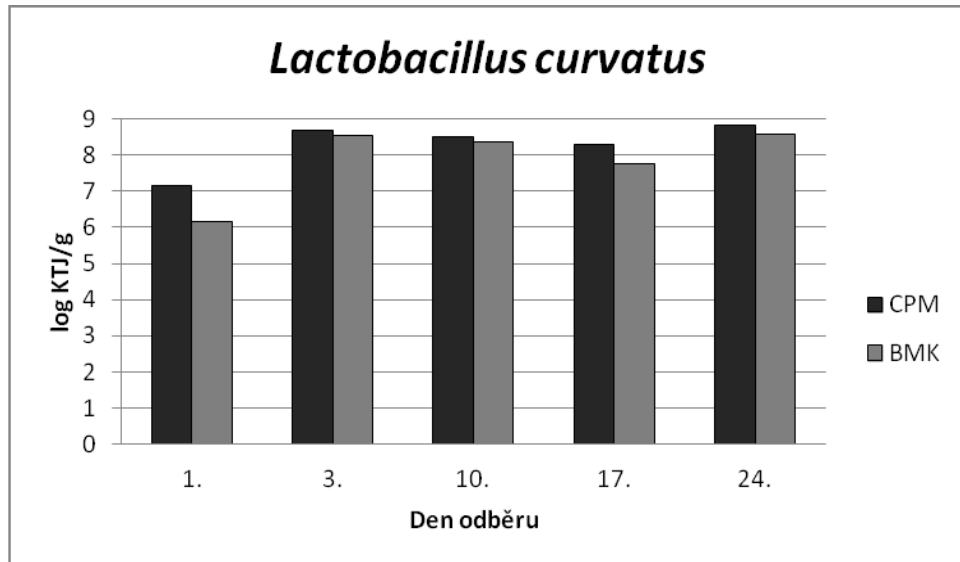
Obrázek 19: CPM a počty stafylokoků (půda MSA) v 1 g vzorku s přidavkem mikrobiální kultury *Staphylococcus carnosus*.

U vzorku s přidavkem *S. carnosus* je možné pozorovat nárůst CPM až o 1,5 logaritmičeského řádu v průběhu fermentace, ačkoliv po prvním týdnu zrání došlo k poklesu, v následujících odběrech bylo množství log KTJ/g opět nad hodnotou 8. Množství stafylokoků zůstávalo téměř neměnné a stabilní v průběhu celého zrání a pohybovalo se kolem hodnoty 6 log KTJ/g.



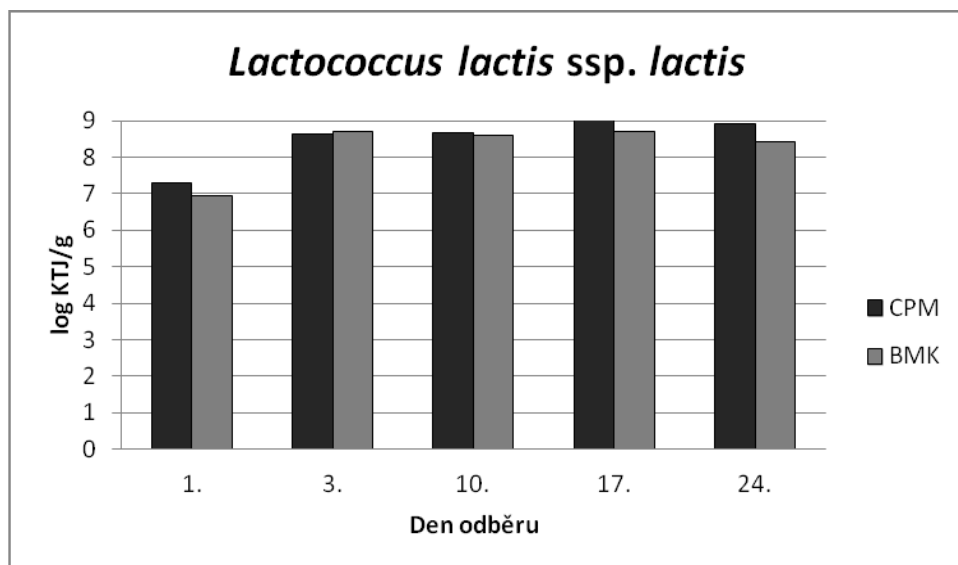
Obrázek 20: CPM a BMK (půda MRS) v 1 g vzorku s přidavkem mikrobiální kultury *Lactobacillus sakei*.

Vzorek D reprezentuje typický nárůst CPM i BMK v průběhu zrání, kdy u CPM došlo po fermentaci k nárůstu o 1,5 řádu a u BMK přibližně o 2 řády na hodnoty přesahující 8 log KTJ/g.



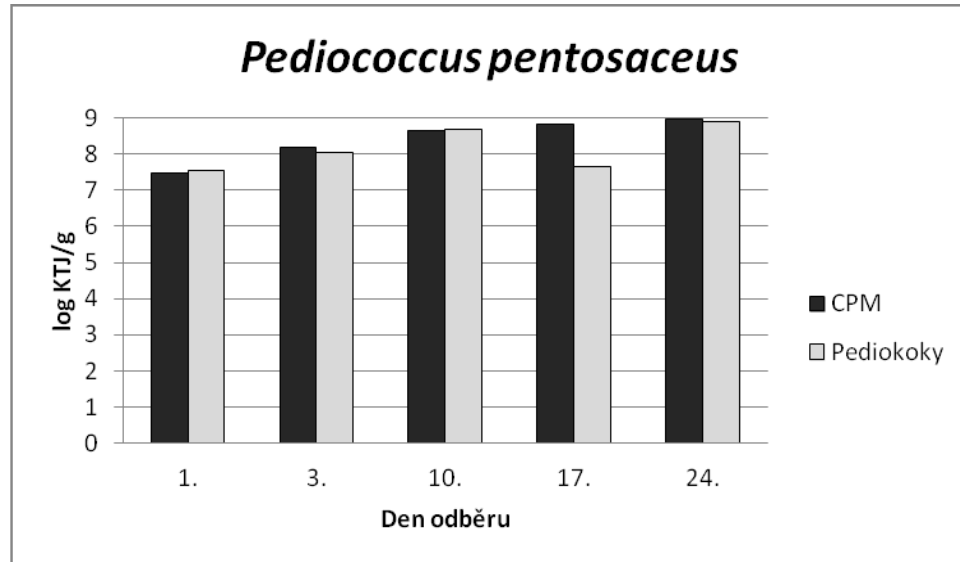
Obrázek 21: CPM a BMK (půda MRS) v 1 g vzorku s přidavkem mikrobiální kultury *Lactobacillus curvatus*.

U vzorku E je také patrný nárůst CPM i BMK po fermentaci, opět se jednalo o nárůst o přibližně 1,5 řádu u CPM a přibližně o 2 řády u BMK. Během zrání zůstávaly počty celkových bakterií i bakterií mléčného kvašení pohybující se v řádech 9 až 9,5 log KTJ/g.



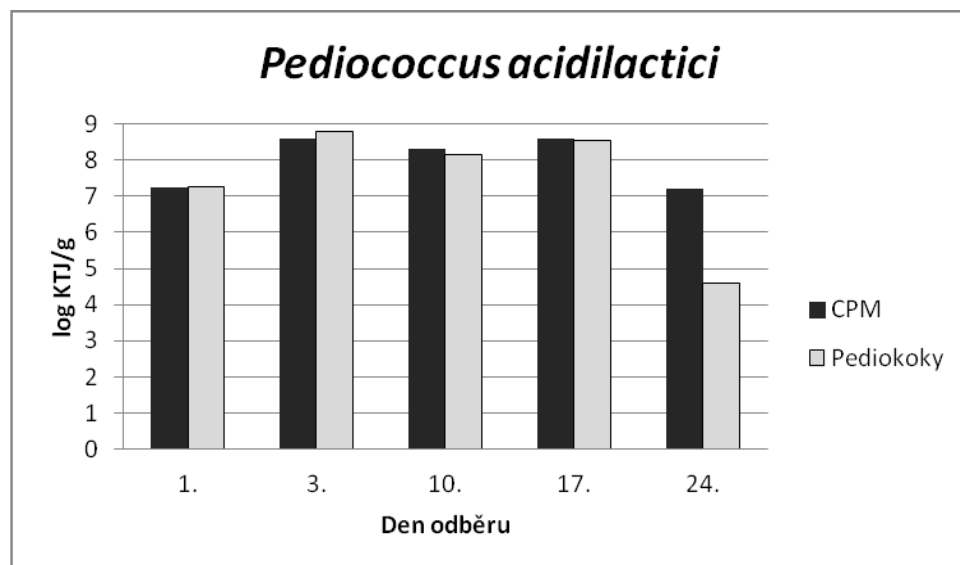
Obrázek 22: CPM a BMK (půda MRS) v 1 g vzorku s přidavkem mikrobiální kultury *Lactococcus lactis ssp. lactis*.

Lactococcus lactis ssp. *lactis* vykazoval velmi podobný nárůst dvěma předchozím bakteriím. U CPM došlo k nárůstu ihned po fermentaci o téměř 2 logaritmické řády a u BMK přibližně o 1,5 řádu.



Obrázek 23: CPM a počty pediokoků (půda M17) v 1 g vzorku s přidavkem mikrobiální kultury *Pediococcus pentosaceus*.

Vzorek se startovací kulturou *Pediococcus pentosaceus* vykazoval pozvolný nárůst CPM v průběhu zrání asi o 1,5 řádu k hodnotě 9 log KTJ/g. Počet pediokoků v podstatě kopíroval nárůst CPM, i když nepřekročil hodnotu 9 log KTJ/g.



Obrázek 24: CPM a počty pediokoků (půda M17) v 1 g vzorku s přidavkem mikrobiální kultury *Pediococcus acidilactici*.

Vzorek s přídatkem startovací kultury *Pediococcus acidilactici* vykazoval nižší nárůst jak CPM tak i na půdě M17 pro kultivaci pediokoků. Z počáteční hodnoty CPM 7,2 log KTJ se po fermentaci počet zvýšil o více než jeden logaritmičtý řád, posléze ale v dalších odběrech docházelo k pozvolnému poklesu k počáteční hodnotě. Pediokok oproti tomu po fermentaci zvýšil svůj počet o 1,5 logaritmičtého řádu, v průběhu zrání se jejich počet udržoval nad hodnotou 8 log KTJ/g. Po ukončení zrání však došlo k poklesu na hodnotu pod 5 log KTJ/g.

7.3 Analýza složení a množství aminokyselin

Množství aminokyselin je uvedeno v následujících tabulkách a znázorněno v grafech. Ve všech tabulkách byly používány stejné zkratky.

S. c. - *Staphylococcus carnosus*

L. s. - *Lactobacillus sakei*

L. c. - *Lactobacillus curvatus*

Lc. l. ssp. l. - *Lactococcus lactis ssp. lactis*

P. p. - *Pediococcus pentosaceus*

P. a. - *Pediococcus acidilactici*

bk - bez kultury

Celkové AMK na 100% sušinu a reálnou sušinu

Množství celkových aminokyselin je vyjádřeno jako suma všech stanovených AMK u dané kultury a v daném odběru a je uvedeno v g/kg. V tabulce pro kontrolu množství čisté svalové bílkoviny byly převedeny na procenta, pro snadnou kontrolu procentuálního obsahu ČSB daného vyhláškou. Celkový obsah aminokyselin byl stanoven pomocí AAA 400. Stanovované aminokyseliny byly asparagin, threonin, serin, glutamová kyselina, prolin, glycin, alanin, valin, leucin, izoleucin, tyramin, phenylalanin, histidin, lysin, arginin, cystein a methionin.

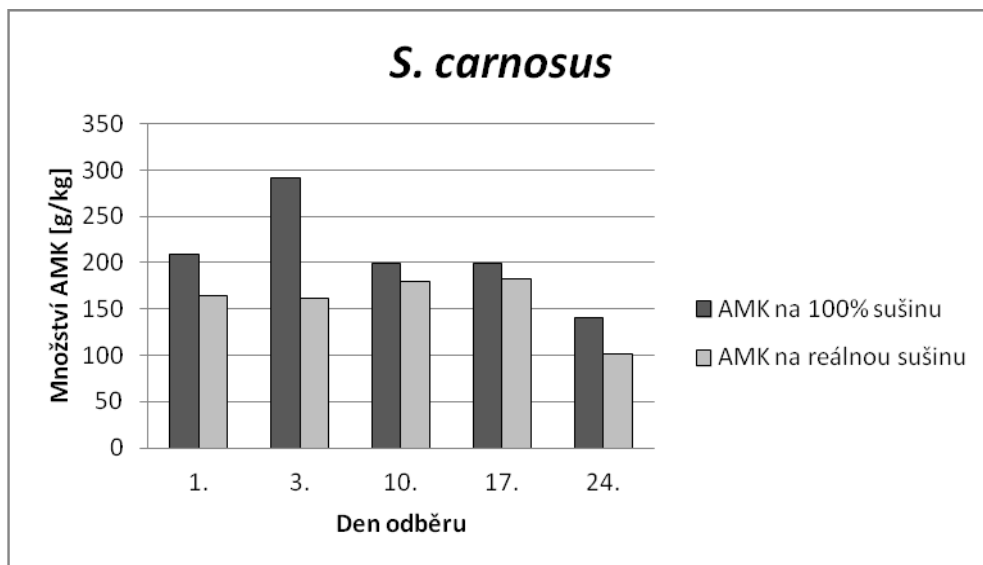
Tabulka 6: Množství celkových AMK na 100% sušinu

Celkové AMK na 100% sušinu [g/kg]					
Vzorek	Odběr				
	1. den	3. den	10. den	17. den	24. den
<i>S. c.</i>	209,44 ± 0,09	291,18 ± 1,25	198,91 ± 0,53	198,87 ± 0,40	140,50 ± 0,69
<i>L. s.</i>	184,94 ± 0,25	165,25 ± 0,70	223,44 ± 0,57	159,38 ± 0,11	174,23 ± 0,19
<i>L. c.</i>	246,84 ± 0,16	346,97 ± 0,40	343,47 ± 3,10	340,67 ± 1,10	268,65 ± 0,52
<i>Lc. l. ssp. l</i>	277,14 ± 0,08	247,20 ± 0,54	206,15 ± 1,09	211,41 ± 0,30	195,07 ± 0,14
<i>P. p.</i>	197,61 ± 0,18	222,91 ± 0,16	275,32 ± 0,16	230,71 ± 0,35	203,56 ± 0,27
<i>P. a.</i>	246,30 ± 0,31	225,53 ± 0,42	221,51 ± 0,91	190,82 ± 0,19	175,57 ± 0,14
bk	317,94 ± 0,12	246,76 ± 0,54	183,91 ± 0,10	185,82 ± 0,16	187,38 ± 0,03

Tabulka 7: Množství celkových AMK na reálnou sušinu v přepočtu na procenta

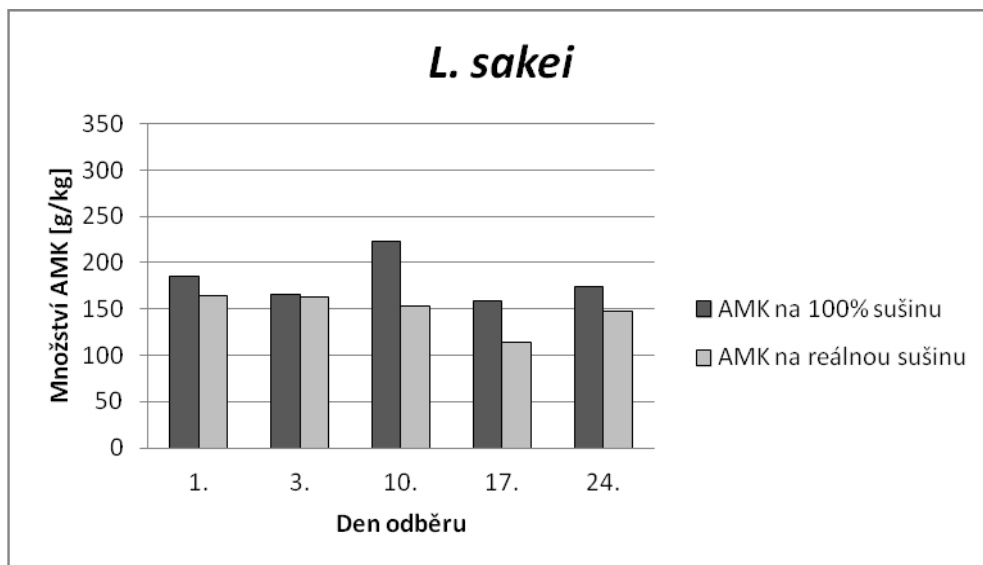
Celkové množství AMK na reálnou sušinu [%]					
Vzorek	Odběr				
	1. den	3. den	10. den	17. den	24. den
<i>S. c.</i>	16,44 ± 0,01	16,19 ± 0,13	17,95 ± 0,05	18,26 ± 0,04	10,10 ± 0,07
<i>L. s.</i>	16,39 ± 0,03	16,31 ± 0,07	15,28 ± 0,06	11,41 ± 0,01	14,75 ± 0,02
<i>L. c.</i>	20,21 ± 0,02	18,28 ± 0,04	26,20 ± 0,31	22,14 ± 0,11	18,66 ± 0,05
<i>Lc. l. ssp. l</i>	14,75 ± 0,01	13,59 ± 0,05	13,33 ± 0,11	18,20 ± 0,03	13,94 ± 0,01
<i>P. p.</i>	16,71 ± 0,02	19,04 ± 0,02	16,60 ± 0,02	15,14 ± 0,04	20,35 ± 0,03
<i>P. a.</i>	19,57 ± 0,03	13,17 ± 0,04	14,63 ± 0,09	13,34 ± 0,02	17,22 ± 0,01
bk	16,49 ± 0,01	13,49 ± 0,05	11,53 ± 0,01	12,37 ± 0,02	13,27 ± 0,01

Hodnoty ve 24. dni odběru ukazují konečnou koncentraci celkových aminokyselin ve výrobku. Uvažujeme-li celkový obsah AMK rovný obsahu čisté svalové bílkoviny (ČSB) je patrné, že ne všechny výrobky splňují legislativní limity pro obsah ČSB dány vyhláškou 69/2016 Sb. O požadavcích na maso, masné výrobky, produkty rybolovu a akvakultury a výrobky z nich, vejce a výrobky z nich, Zákona 110/1997 O potravinách a tabákových výrobcích. V této vyhlášce jsou limity pro obsah ČSB dány pro fermentované výrobky v rozsahu 14 - 16 %. Vzorek s přidavkem kultury *S. carnosus* měl výslednou koncentraci celkových AMK 10,10 ± 0,07 %. *L. sakei* 14,75 ± 0,02 %. Vysoký obsah byl stanoven u vzorku s přidavkem *L. curvatus* a to 18,66 ± 0,05 %. Téměř limitní hodnotě odpovídal vzorek s kulturou *Lc. lactis ssp. lactis* s 13,94 ± 0,01 %. Výrazně pozitivně přesahující minimální limit byl vzorek s mikrobiální kulturou *P. pentosaceus* s 20,35 ± 0,03 %. Poměrně vysoký podíl celkových AMK měl i poslední vzorek s přidavkem kultury *P. acidilactici* a to 17,22 ± 0,01 %. U kontrolního vzorku bez přidavku kultury byl obsah celkových AMK stanoven na 13,24 ± 0,01 %.



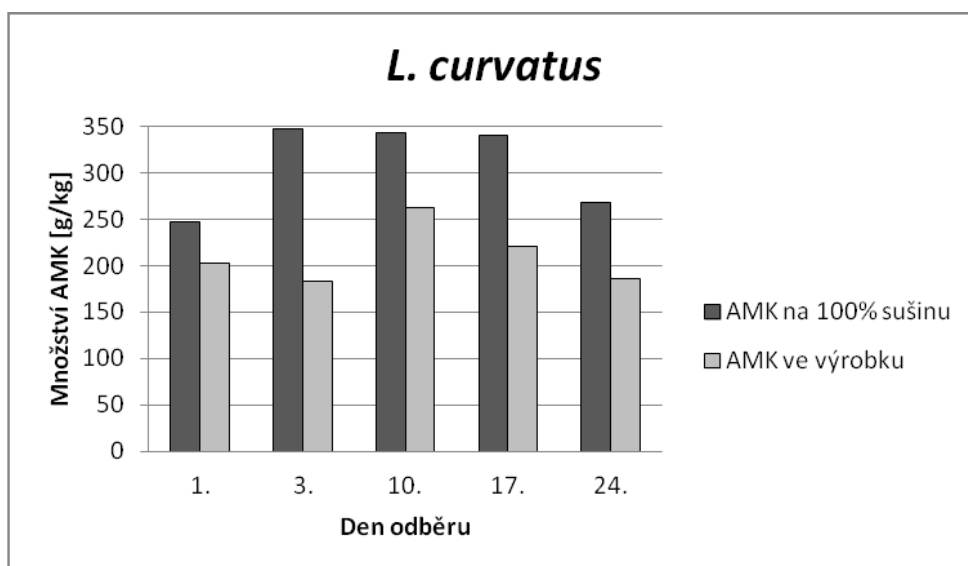
Obrázek 25: Poměr celkových AMK na 100% a reálnou sušinu u vzorku s kulturou *S. carnosus*.

Obsah celkových AMK vztažených na 100% sušinu se zvýšil od prvního odběru z hodnoty 209,44 g/kg na 291,18 g/kg při odběru 3. den, zatímco ve stejném intervalu zůstaly AMK vztažené na reálnou sušinu téměř konstantní. V odběrech 10. a 17. den od výroby byly obě hodnoty velmi podobné vztažené na 100% sušinu 198,91 a 198,87 a na reálnou sušinu 179,54 a 182,57. U odběru po ukončení zrání byl zaznamenán pokles obou hodnot vztažených jak ke 100% sušině, tak k reálné. Tyto hodnoty byly 140,50 pro 100% a 100,95 pro reálnou sušinu.



Obrázek 26: Poměr celkových AMK na 100% a reálnou sušinu u vzorku s kulturou *L.sakei*.

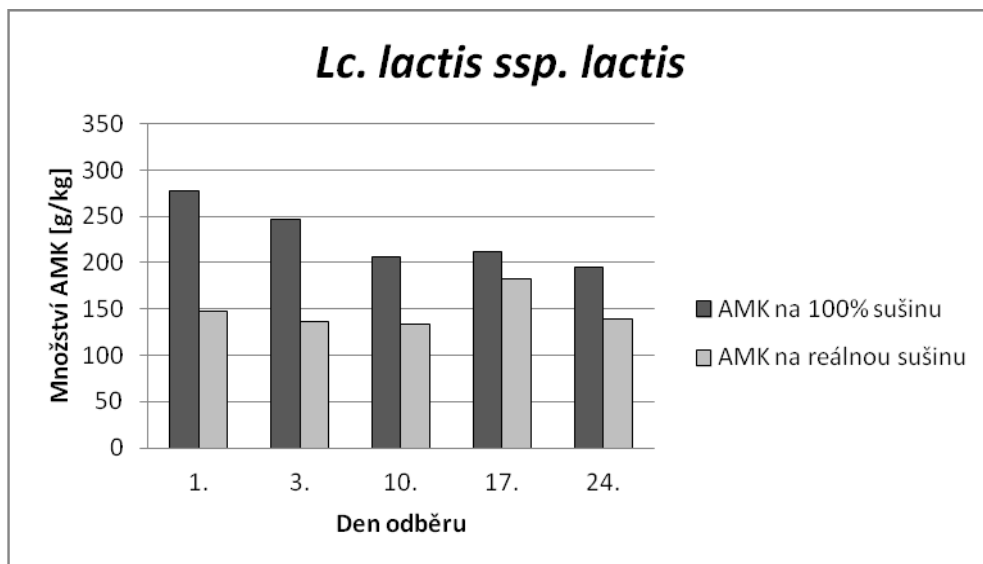
U vzorku s přidavkem *L. sakei* se hodnoty celkových AMK vztažené na 100% sušinu pohybovaly ve všech odběrech nad hodnotou 150 g/kg v 10. odběru potom až nad hodnotou 220 g/kg. Podobná situace byla zaznamenána v případě AMK na reálnou sušinu, kdy byly všechny hodnoty v blízkosti 150 g/kg jen hodnota v 17. dni odběru poklesla k 110 g/kg.



Obrázek 27: Poměr celkových AMK na 100% a reálnou sušinu u vzorku s kulturou *L.curvatus*.

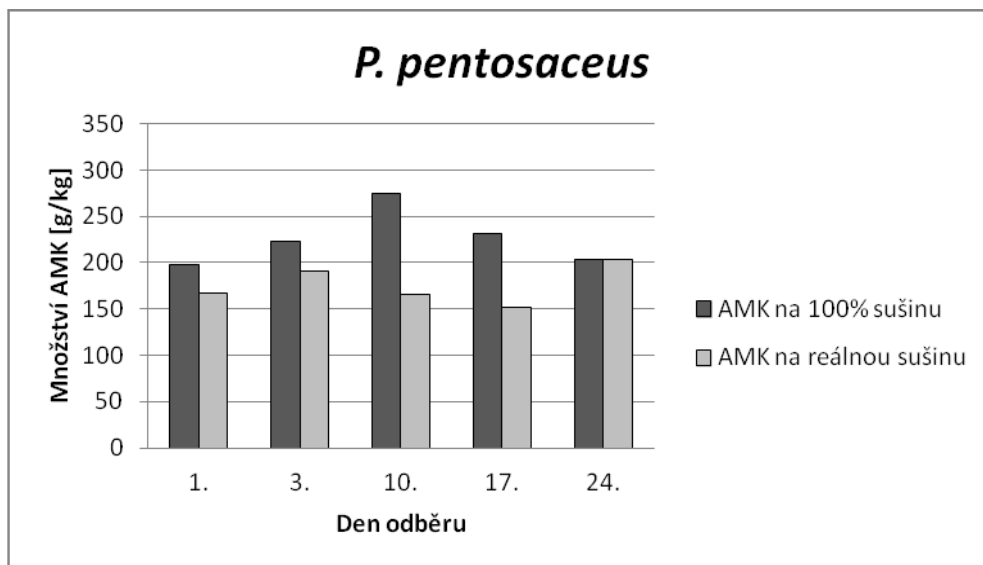
Nejvyšší obsah AMK byl zaznamenán u vzorku s přidavkem *L. curvatus*, kdy u hodnot vztažených na 100% sušinu došlo ke zvýšení množství z téměř 246, 84 na hodnoty téměř 350 g/kg, ve 3., 10. i 17. dni odběru (346,97; 343,47; 340,67). Ke snížení obsahu došlo u

konečného odběru a to k hodnotě 268, 65. U obsahu celkových AMK na reálnou sušinu došlo k mírnému poklesu z hodnoty 202, 14 na 182,82 g/kg. Poté došlo v odběru 10. den ke zvýšení na 262,03 následované mírným poklesem přes hodnotu 221,40 v 17. dni až na 186,63 v posledním odběru.



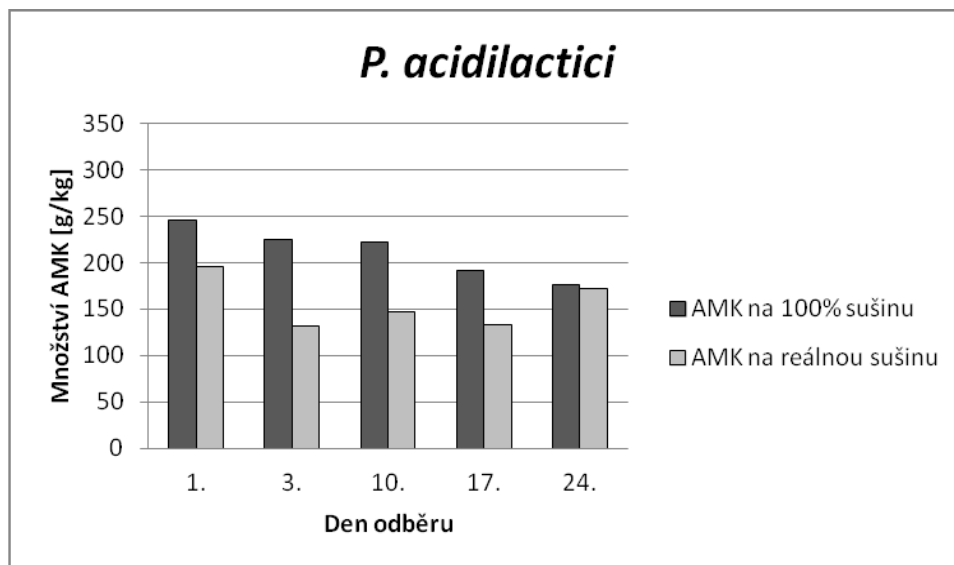
Obrázek 28: Poměr celkových AMK na 100% a reálnou sušinu u vzorku s kulturou *Lc. lactis ssp. lactis*.

U vzorku s kulturou *Lc. lactis ssp. lactis* došlo k pozvolnému poklesu celkových AMK vztažených na 100% sušinu z hodnoty 277,14 g/kg přes hodnoty 247,20 ve 3., 206,15 v 10. a 211, 41 v 17. odběru ke konečné hodnotě naměřené v posledním odběru 195,07 g/kg. AMK vztažené na reálnou sušinu vykazovaly mírný pokles v prvních třech odběrech z hodnoty 147, 46 g/kg na 135,94 a 133,32 g/kg. Poté došlo ke zvýšení na hodnotu 181, 98 g/kg v 17. odběru následovanou opětovným poklesem v odběru 24. na hodnotu 139, 41 g/kg.



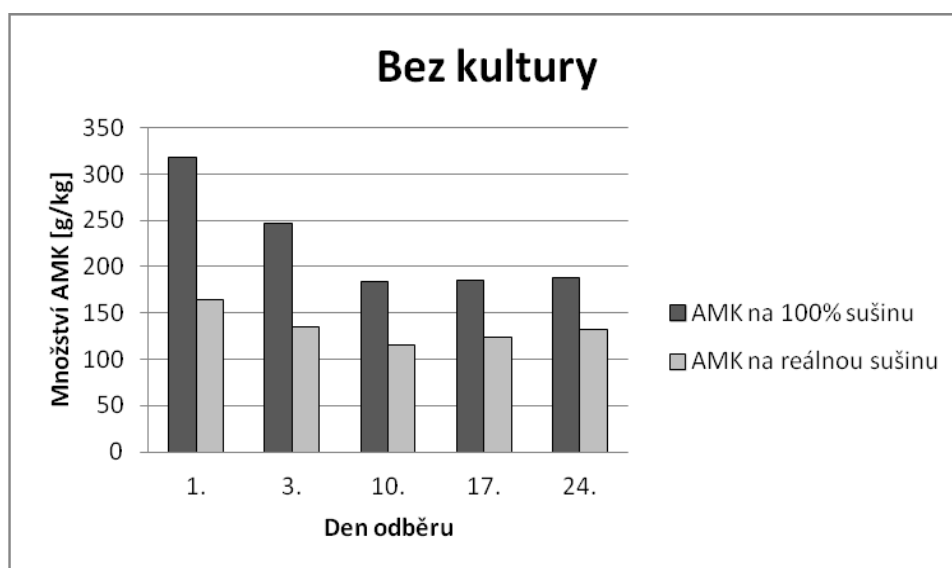
Obrázek 29: Poměr celkových AMK na 100% a reálnou sušinu u vzorku s kulturou *P. pentosaceus*.

Na grafu srovnání AMK pro vzorek s přidavkem *P. pentosaceus* lze pozorovat postupné zvyšování množství AMK na 100% sušinu s vrcholem v odběru 10. den a poté postupný pokles až k poslednímu odběru. Z hodnoty 197,61 g/kg došlo přes hodnotu 222,91 ke zvýšení obsahu AMK až k 275,32 g/kg. Následný pokles byl na hodnotu 230,71 a 203,56 g/kg v předposledním a posledním odběru. AMK na reálnou sušinu vykazovaly odlišný trend, kdy nejdříve došlo k mírnému zvýšení ze 167,10 na 190,41 g/kg, následně však v odběrech 10. a 17. den k poklesům na 166,02 a 151,39 g/kg. V posledním odběru došlo opět k navýšení a to na hodnotu 203,48 g/kg.



Obrázek 30: Poměr celkových AMK na 100% a reálnou sušinu u vzorku s kulturou *P. acidilactici*.

Vzorek s přidavkem *P. acidilactici* vykazoval pokles celkových AMK na 100% sušinu v každém odběru vůči odběru předchozímu. V jednotlivých odběrech 1., 3., 10., 17. a 24. den klesaly hodnoty následovně z 246,30 na 225,53; 221,51; 190,82 až na 175,57 g/kg. Obsah celkových AMK na reálnou sušinu vykazoval odlišný trend, kdy v odběru 3. den klesl z počáteční hodnoty 195,74 na 131,73 g/kg. Poté došlo k mírnému zvýšení na 146,26 následované opětovným poklesem na 133,44 g/kg a ve finálním odběru bylo zaznamenáno zvýšení na 172,21 g/kg.



Obrázek 31: Poměr celkových AMK na 100% a reálnou sušinu u vzorku bez přidavku mikrobiální kultury.

Referenční vzorek vykazoval podobný trend jako vzorky s přidavkem kultury kdy byl u AMK na 100% sušinu zaznamenán pokles z 317,94 na 246,76 g/kg ve 3. dni a 183,91 g/kg v 10. dni. Hodnota zaznamenaná v 10. odběru se v dalších odběrech příliš nelišila a byla stanovena na 185,82 g/kg v 17. a 187,38 g/kg ve 24. odběrovém dni. AMK na reálnou sušinu nejdříve mírně poklesly z původní hodnoty 164,85 na 134,85 3. den a 115,33 g/kg 10. den. Naopak v 17. a 24. dni byl zaznamenán mírný nárůst na 123,74 a 132,67 g/kg.

Celkové, volné a vázané AMK

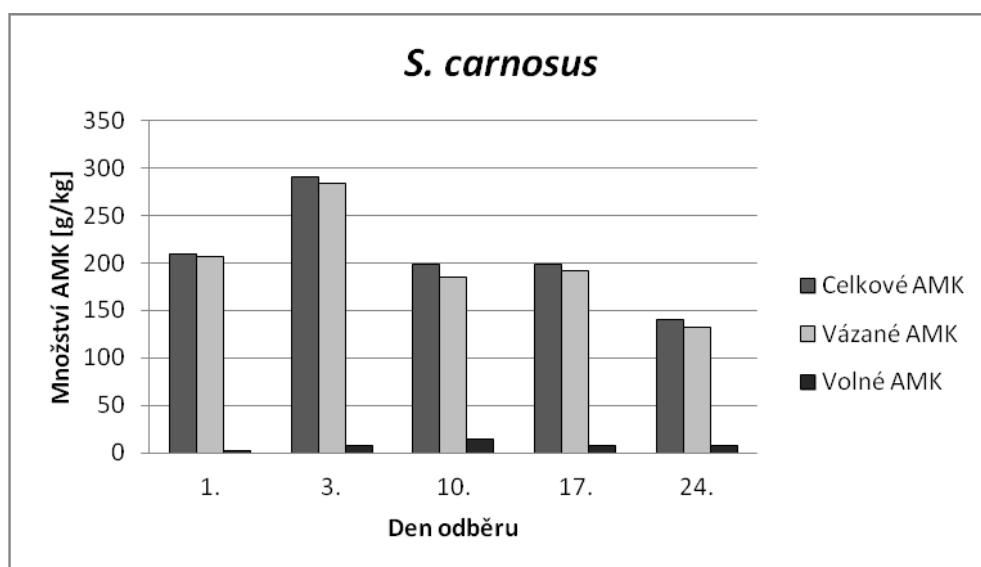
Množství celkových, volných a jejich odečtením získaných vázaných aminokyselin je vyjádřeno jako součet jednotlivých stanovených aminokyselin dané kultury v daném odběru. Všechny AMK jsou vyjádřeny v gramech na kilogram 100% sušiny. U celkových AMK byly stanoveny aminokyseliny: asparagin, treonin, serin, glutamová kyselina, prolin, glycin, alanin, valin, leucin, isoleucin, tyramin, phenylalanin, histidin, lysin, arginin, cystein a methionin. Volné AMK byly stanoveny pomocí HPLC s předkolonovou derivatizací AQC a detekovány pomocí UV/VIS detektoru s diodovým polem (DAD). Stanovované volné aminokyseliny byly: serin, histodin, arginin, treonin, alanin, prolin, tyrosin, methionin, ornithin, lysin, isoleucin, leucin, phenylalanin a tryptofan.

Tabulka 8: Množství volných AMK na 100% sušinu

Volné AMK na 100% sušinu [g/kg]					
Vzorek	Odběr				
	1. den	3. den	10. den	17. den	24. den
S. c.	2,82 ± 0,01	7,35 ± 0,01	14,13 ± 0,03	7,33 ± 0,01	7,71 ± 0,01
L. s.	3,13 ± 0,01	4,15 ± 0,01	7,17 ± 0,01	6,82 ± 0,01	5,93 ± 0,01
L. c.	3,35 ± 0,01	32,37 ± 0,01	17,81 ± 0,01	8,61 ± 0,01	7,51 ± 0,01
Lc. l. ssp. l	7,54 ± 0,01	6,52 ± 0,01	8,46 ± 0,01	7,99 ± 0,01	8,70 ± 0,01
P. p.	5,42 ± 0,01	3,72 ± 0,01	9,12 ± 0,01	9,91 ± 0,01	5,30 ± 0,01
P. a.	3,27 ± 0,01	5,94 ± 0,01	7,04 ± 0,01	7,68 ± 0,01	6,50 ± 0,01
bk	5,02 ± 0,01	5,96 ± 0,01	10,17 ± 0,01	5,58 ± 0,01	6,81 ± 0,04

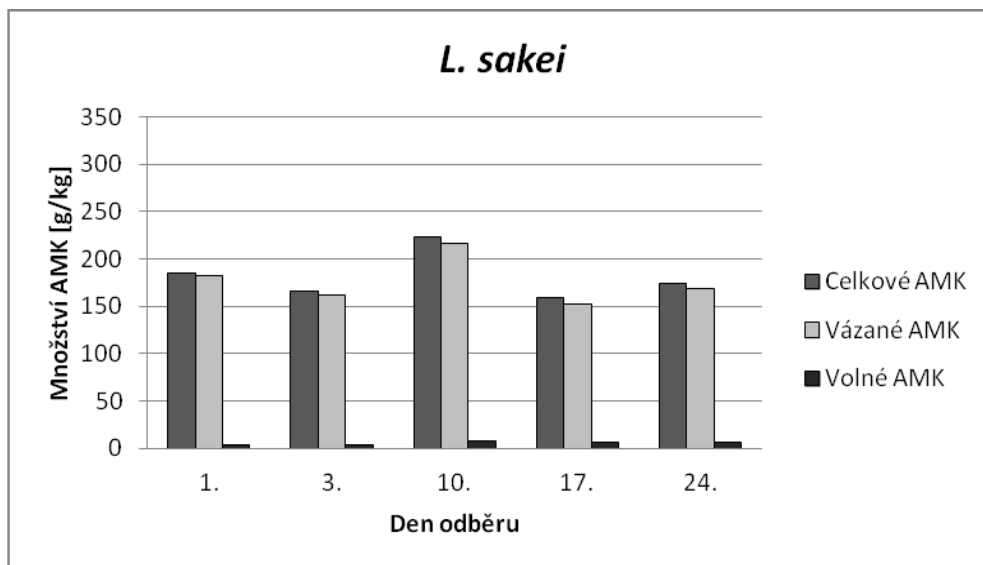
Tabulka 9: Množství vázaných AMK na 100% sušinu

Vzorek	Vázané AMK na 100% sušinu [g/kg]				
	Odběr				
	1. den	3. den	10. den	17. den	24. den
S. c.	206,62	283,83	184,78	191,54	132,79
L. s.	181,81	161,11	216,27	152,56	168,30
L. c.	243,49	314,60	325,66	332,07	261,13
Lc. l. ssp. l	269,59	240,68	197,69	203,42	186,37
P. p.	192,19	219,20	266,13	220,80	198,26
P. a.	243,03	219,59	214,47	183,15	169,07
bk	312,92	240,80	173,74	180,24	180,58



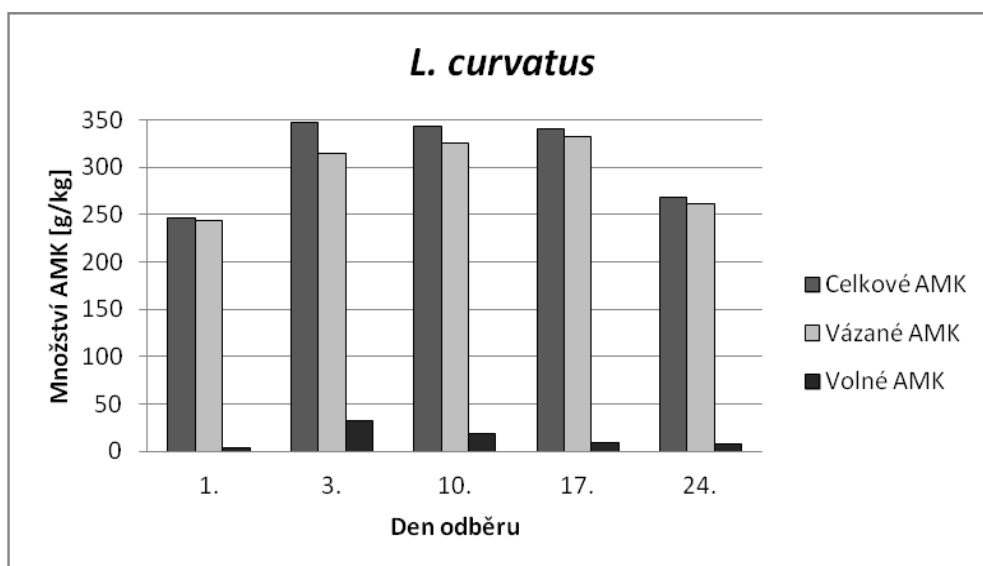
Obrázek 32: Poměr celkových, volných a vázaných AMK v průběhu zrání u vzorku s přidavkem *S. carnosus*.

Z grafu vzorku s přidavkem mikrobiální kultury *S. carnosus* je patrný nejprve nárůst a poté pokles jak celkových AMK tak volných. Celkové množství AMK se nejvíce zvýšilo mezi 1. a 3. odběrovým dnem z hodnoty 209,44 g/kg na 291,18 g/kg při odběru 3. den. V odběrech 10. a 17. den od výroby byly obě hodnoty velmi podobné 198,91 a 198,87. Následující hodnota poklesla na 140,50 g/kg. U volných AMK byl zaznamenán pozvolný nárůst z 2,82 přes 7,35 až ke 14,13 g/kg v odběru 10. den. V 17. odběru byl zaznamenán pokles volných AMK na 7,33 g/kg a ve 24. dni mírný nárůst na hodnotu 7,71 g/kg.



Obrázek 33: Poměr celkových, volných a vázaných AMK v průběhu zrání u vzorku s přídavkem *L. sakei*.

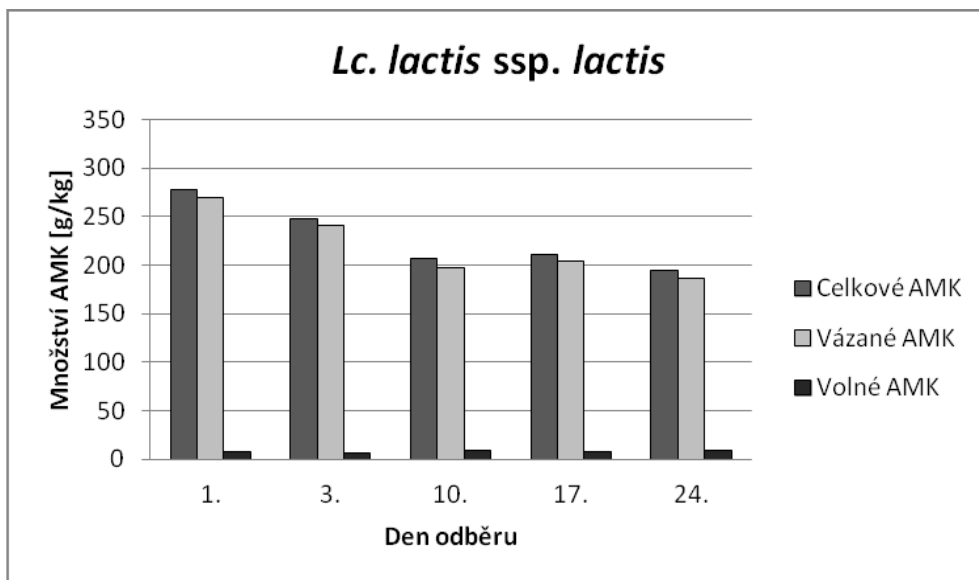
U vzorku s přídavkem *L. sakei* se hodnoty celkových AMK pohybovaly ve všech odběrech nad hodnotou 150 g/kg v 10. odběru až nad hodnotou 220 g/kg. U volných AMK byl zaznamenán mírný nárůst od počáteční hodnoty 3,13 přes 4,15 až k 7,17 g/kg, následovaný mírným poklesem na 6,82 a 5,93 g/kg v posledním odběru.



Obrázek 34: Poměr celkových, volných a vázaných AMK v průběhu zrání u vzorku s přídavkem *L. curvatus*.

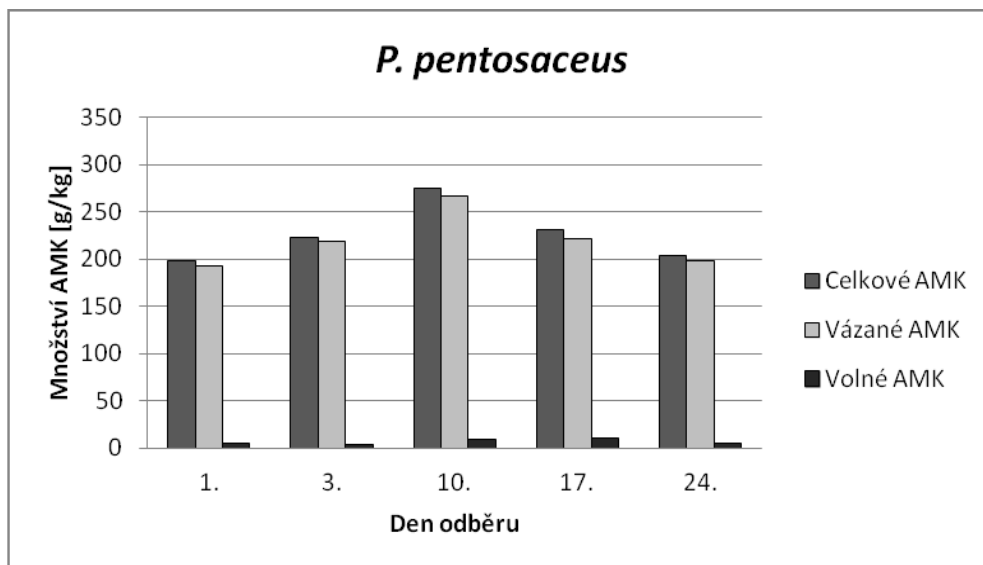
Nejvyšší obsah AMK byl zaznamenán u vzorku s přídavkem *L. curvatus*, kdy u hodnot vztahených na 100% sušinu došlo ke zvýšení množství z 246,84 na hodnoty téměř 350 g/kg, ve 3., 10. i 17. dni odběru (346,97; 343,47; 340,67). Ke snížení obsahu došlo u ko-

nečného odběru a to k hodnotě 268,65. Množství volných AMK se poměrně prudce zvýšilo mezi 1. a 3. odběrovým dnem, kdy došlo ke zvýšení z 3,35 na 32,37 g/kg. Následoval pozvolný pokles přes 17,81 g/kg v 10. odběru, 8,61 g/kg v 17. odběru na 7,51 g/kg v posledním odběru.



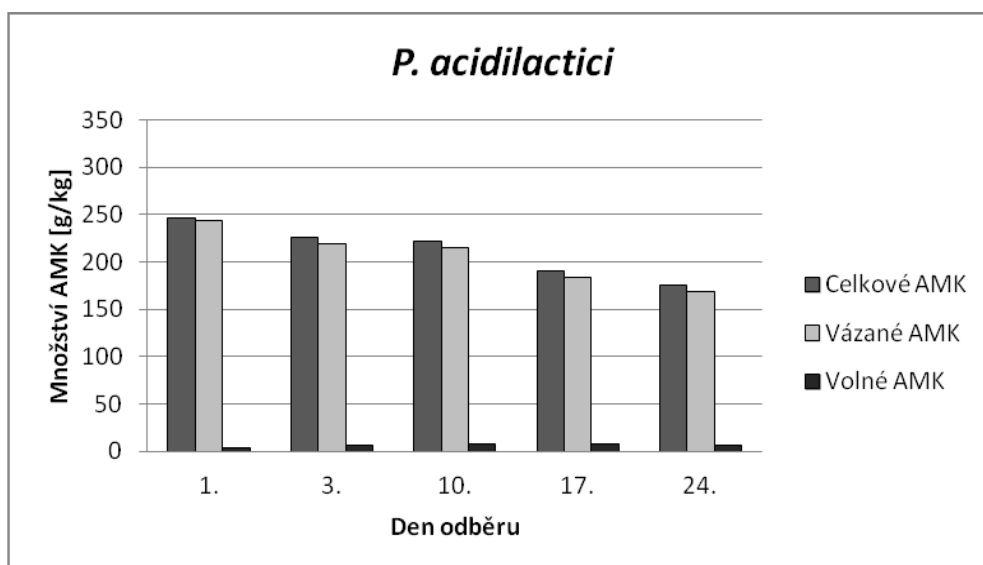
Obrázek 35: Poměr celkových, volných a vázaných AMK v průběhu zrání u vzorku s přísadkou *Lc. lactis ssp. lactis*.

U vzorku s kulturou *Lc. lactis ssp. lactis* došlo k pozvolnému poklesu celkových AMK z hodnoty 277,14 g/kg přes hodnoty 247,20 ve 3., 206,15 v 10. a 211,41 v 17. odběru ke konečné hodnotě naměřené v posledním odběru 195,07 g/kg. Volné aminokyseliny se u vzorku v průběhu zrání měnily jen lehce. V prvním dni odběru byla naměřena hodnota 7,54 g/kg, která ve 3. dni mírně poklesla na 6,52 g/kg. V 10. dni bylo naměřeno mírné zvýšení na 8,46 g/kg následované poklesem na 7,99 a opětovným zvýšením na 8,70 v posledním odběrovém dni.



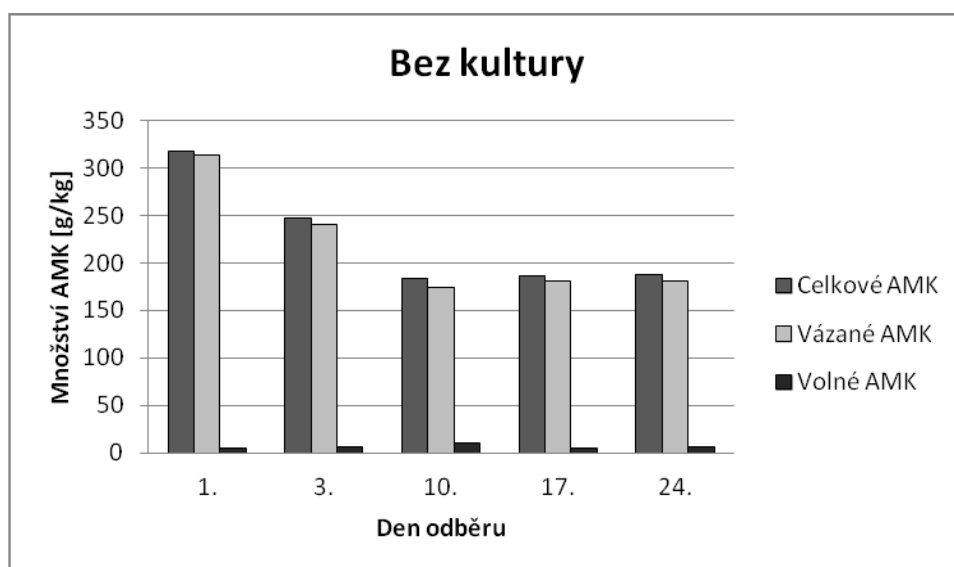
Obrázek 36: Poměr celkových, volných a vázaných AMK v průběhu zrání u vzorku s přísadkem *P. pentosaceus*.

Na grafu srovnání AMK pro vzorek s přísadkem *P. pentosaceus* lze pozorovat postupné zvyšování množství AMK přes hodnoty 197,61 g/kg a 222,91 g/kg k nejvyšší naměřené hodnotě v odběru 10. den 275,32 g/kg. Následovaný poklesem na hodnotu 230,71 a 203,56 g/kg v předposledním a posledním odběru. Naměřené volné AMK opět vykazují podobný trend postupného nárůstu a poklesu. Odběr 1. den 5,42 g/kg byl následován mírným poklesem na 3,72 ve 3. dni a poté zvýšením na 9,12 g/kg ve dni 10. a na 9,91 g/kg v 17. dni. Poslední odběr znamenal pokles obsahu volných AMK a to na 5,30 g/kg.



Obrázek 37: Poměr celkových, volných a vázaných AMK v průběhu zrání u vzorku s přísadkem *P. acidilactici*.

Vzorek s přidavkem *P. acidilactici* vykazoval pokles celkových AMK v každém odběru vůči odběru předchozímu. V jednotlivých odběrech 1., 3., 10., 17. a 24. den klesaly hodnoty následovně z 246,30 na 225,53; 221,51; 190,82 až na 175,57 g/kg. Obsah volných AMK se zvýšil z počáteční hodnoty 3,27 na 5,94 ve 3., 7,04 v 10. a 7,68 g/kg v 17. odběrovém dni. V posledním odběru byl zaznamenán mírný pokles na 6,50 g/kg.



Obrázek 38: Poměr celkových, volných a vázaných AMK v průběhu zrání u vzorku bez přidavku mikrobiální kultury.

Referenční vzorek vykazoval podobný trend jako vzorky s přidavkem kultury, kdy byl u AMK na 100% sušinu zaznamenán pokles z 317,94 na 246,76 g/kg ve 3. dni a 183,91 g/kg v 10. dni. Hodnota zaznamenaná v 10. odběru se v dalších odběrech příliš nelišila a byla stanovena na 185,82 g/kg v 17. a 187,38 g/kg ve 24. odběrovém dni. Množství volných AMK se zvýšilo z původní hodnoty 5,02 na 5,96 ve 3. a 10,17 g/kg v 10. dni. Následoval mírný pokles v 17. dni na 5,58 g/kg a mírný nárůst v odběru 24. den na 6,81 g/kg.

Diskuze

Sušina vzorků byla vyhodnocena jako průměrná hodnota každého vzorku v každém odběru. Z původní průměrné hodnoty $51,88 \pm 1,58$ % vzrostla během 24-denního zrání na hodnotu $71,26 \pm 1,27$ %. Podobná hodnota konečné sušiny (69, 97 a 71,42 %) byla zaznamenána Ionescu et. al. v experimentu s přidavkem *Staphylococcus carnosus* a kombinace *Lactobacillus plantarum* s *Pediococcus acidilactici*, při době zrání 32 dní. Ionescu et. al. dále uvádí, že přítomnost mikrobiální kultury má pozitivní vliv na sušení výrobku, neboť okyselením dila k izoelektrickému bodu ztrácí myofibrilární bílkoviny schopnost vazby vody (2007). Hodnoty konečné sušiny jsou poměrně vysoké, což může být zapříčiněno více faktory. Výrobce se tímto nadměrným sušením může jistit, že úbytek vody ve výrobku bude takový, aby bylo jisté, že splní legislativně daný limit na množství čisté svalové bílkoviny. Dalším důvodem může být nedostatečná modifikace metody pro stanovení sušiny fermentovaných masných výrobků. Úbytky hmotnosti korelují se zvýšením obsahu sušiny, neboť zaznamenávají ztráty vody výrobku v průběhu zrání. Průměrná hodnota úbytků hmotnosti na konci zrání u jednotlivých kultur byla stanovena na $27,11 \pm 1,24$ %.

U měření hodnot pH výrobku v průběhu zrání byl zaznamenán podobný trend u všech vzorků. U všech vzorků došlo k výraznému poklesu mezi odběry 1. a 3. den, tedy v průběhu fermentace. Po fermentaci byl zaznamenán opětovný mírný nárůst a poté pokles na konci zrání. Tento nárůst může být způsoben produkcí amoniaku a biogenních aminů, které jsou výsledkem enzymatické aktivity (Hughes et. al., 2002). K žádoucímu okyselení došlo i v případě kultury, jejíž vlastnosti nespočívají primárně v okyselení dila např. *Staphylococcus carnosus*, ale k výraznému okyselení došlo i v případě srovnávacího vzorku bez přidavku mikrobiální kultury. Zde se jako možné vysvětlení nabízí přirozená fermentace, která probíhá pomnožením již přítomných a v mase přirozeně se vyskytujících mikroorganismů (BMK, mikrokoky, stafylokoky), (Hutners, 2006). Dalším a možná pravděpodobnějším vysvětlením může být fakt, že všechny výrobky byly vyráběny v provozních podmínkách a přestože po každé výrobě došlo k důkladnému čištění všech strojů a vybavení, není zcela vyloučena možná kontaminace suroviny mikroorganismy z předchozí dávky dila v kutru. K nejvýraznějšímu poklesu pH, pod 4,8, došlo u výrobků s mikrobiální kulturou *L. sakei* a *P. acidilactici*.

Mikrobiologickou analýzou byla sledována dynamika růstu mikroorganismů. Byl sledován celkový počet mikroorganismů na půdě PCA, bakterie mléčného kvašení na půdě MRS, u

přídavku stafylokoků jejich počty na půdě MSA, u přídavku pediokoků jejich počty na půdě M17 a počty plísní a kvasinek na půdě CHYGA a počty enterobakterií na půdě ENDO. V případě posledních dvou zmiňovaných byl v průběhu zrání zaznamenán pokles z původních hodnot až 6 log KTJ/g pod 2 log KTJ/g v posledním odběru. U vzorku s přídavkem stafylokoka byl jejich počet po celou dobu zrání blízký hodnotě 6 log KTJ/g, což souhlasí s výsledky (Hughes et. al., 2002). Oproti tomu počty laktobacilů, pediokoků a laktokoka se ve všech případech včetně srovnávacích vzorku pohybovaly mezi 8 - 9 log KTJ/g, tyto hodnoty jsou v souladu se zjištěními Aro Aro (2010). Výrazný počet bakterií mléčného kvašení a i nezanedbatelný počet stafylokoků byl zaznamenán i u srovnávacího vzorku bez přídavku mikrobiální kultury. Tento nárůst je zřejmě zapříčiněn kontaminací díla v provozních podmínkách.

Proteolýza je jedním z hlavních mechanismů degradace bílkovin během zrání fermentovaných masných výrobků. Proteolýzou bílkovin vznikají aminokyseliny, které jsou přímo i nepřímo zodpovědné za řadu organoleptických vlastností výrobku. Aminokyselinová skladba fermentovaných masných výrobků je rozmanitá, nestálá a podléhá mnoha změnám. U celkového množství aminokyselin byl u vzorku bez přídavku mikrobiální kultury, s přídavkem *Lc. lactis* ssp. *lactis*, a s přídavkem *P. acidilactici* pozorován klesající trend, kdy došlo k přirozenému úbytku bílkovin na úkor vznikajících aminokyselin. Na počátku zrání se hodnoty celkových AMK pohybovaly mezi 184,94 - 317,94 g/kg na konci zrání potom 140,50 - 268,65 g/kg. Ostatní vzorky také vykazovaly snížení množství celkových AMK na konci zrání, průběh zrání však nebyl vždy jen klesající. Rozdíly v množství celkových aminokyselin mohly být způsobeny nerovnoměrností surovinové skladby mezi mícháním vzorkům, kdy se interval míchání pohyboval mezi 3-4 dny po dobu osmi týdnů. U koncentrace volných aminokyselin byl téměř ve všech případech zaznamenán podobný trend a to nárůst do ukončeného prvního týdne zrání, následovaný mírným poklesem koncentrace volných AMK. Nejvyšší koncentrace volných aminokyselin byla u všech vzorků zaznamenána u odběru 10. den po naražení kromě vzorku s kulturou *L. curvatus*, kde došlo k vůbec největšímu navýšení koncentrace volných aminokyselin a to na 32,37 g/kg již ve 3. dni zrání. Podobný trend popsal Hughes et. al., zvýšení množství volných aminokyselin vysvětluje činností endogenních (v mase přítomných) a exogenních enzymů (enzymy přítomných mikroorganismů a startovacích kultur) a jejich následný pokles vysvětluje tím, že jejich rozklad působením bakterií je intenzivnější než jejich produkce (2002).

ZÁVĚR

Tato diplomová práce se zabývá analýzou a složením fermentovaných masných výrobků. V první části jsou tyto výrobky charakterizovány a je popsána technologie jejich výroby a změny v průběhu zrání a fermentace.

Cílem diplomové práce bylo vyrobit 6 druhů fermentovaných salámů s přidavky jednotlivých mikrobiálních kultur a kontrolní vzorek bez přidavku kultury a podrobit tyto výrobky chemické a mikrobiální analýze v několika odběrech v průběhu zrání. Produkty byly vyráběny v běžných provozních podmínkách výroby a lišily se pouze přidanou kulturou.

Výsledky analýz lze shrnout následovně:

- Sušina vzorků byla poměrně vysoká (71,26 %) a může znamenat snahu výrobce o splnění limitu čistých svalových bílkovin, či nedostatečnou modifikaci použité metody. Zároveň sušina správně korelovala s úbytky hmotnosti.
- pH u všech vzorků výrazně pokleslo po fermentaci, což značí jednak správný průběh fermentace, jednak pravděpodobnou kontaminaci vzorku bez přidavku mikrobiální kultury.
- Stanovení procentuální koncentrace celkových aminokyselin ukázalo, že vzorky s přidavkem *S. carnosus*, *Lc. lactis* ssp. *lactis* a vzorek bez přidavku mikrobiální kultury nesplňují legislativní požadavky na minimální obsah čistých svalových bílkovin
- U vzorku s přidavkem kultury *L. curvatus* byla zaznamenána nejvyšší koncentrace celkových (262,03 g/kg, odběr 10. den) i volných (32,37 g/kg, odběr 3. den) aminokyselin.
- Všechny ostatní vzorky (kromě *L. curvatus*) vykazovaly nejvyšší koncentraci volných aminokyselin při odběru 10. den po naražení a to v rozpětí 7,04 - 14,13 g/kg.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

ARO ARO, Marcos J. et. al., 2010. The effect of starter cultures on proteolytic changes and amino acid content in fermented sausages. *Food Chemistry* [online]. 2010, 119, s. 279-285. [cit-2018-04-20] Dostupné z: www.elsevier.com/locate/foodchem

BECK, Hans C., Maria A., HANSEN a Frants R, LAURITSEN, 2005. Catabolism of Leucine to Branched-chain Fatty Acids in *Staphylococcus Xylosus*. *Journal of Applied Microbiology* [online]. Únor 2005, 96 (5): 1185-1193 [cit. 2018-03-29]. ISSN:1364-5072. Dostupné z:

http://apps.webofknowledge.com.proxy.k.utb.cz/full_record.do?product=WOS&search_mode=GeneralSearch&qid=1&SID=C3xhISMScsAZM65E7Ku&page=1&doc=2

COCCONCELLI, Pier S. a Cecilia FONTANA, 2010. Starter cultures for meat fermentation. In: TOLDRÁ, Fidel. *Handbook of meat processing*. 1st. Edition. Ames, Iowa: Wiley-Blackwell, 2010. ISBN 978-0-8138-2182-5.

ČESKO, *Vyhláška 69/2016 o požadavcích na maso, masné výrobky, produkty rybolovu a akvakultury a výrobky z nich, vejce a výrobky z nich. Zákona 110/1997 O potravinách a tabákových výrobcích* [online] [cit-2018-04-04] Dostupné z:

http://eagri.cz/public/web/mze/legislativa/pravni-predpisy-mze/tematicky-prehled/Legislativa-MZe_uplna-zneni_vyhlaska-2016-69.html

DALMIS, Ülku a Ayla SOYER, 2008. Effect of processing methods and starter culture (*Staphylococcus xylosus* and *Pediococcus pentosaceus*) on proteolytic changes in Turkish sausages (sucuk) during ripening and storage. *Meat Science* [online]. 2008, 80, s. 345-354.[cit-2018-04-08] Dostupné z:

<https://www-sciencedirect-com.proxy.k.utb.cz/science/article/pii/S0309174007004202>

DIKEMAN, Michael and Carrick, DEVINE, 2014. *Encyclopedia of meat science* [online]. 2nd edition, volume 2, Oxford: Elsevier, © Academic Press. ISBN (print): 978-0-12-384731-7. [cit-2018-04-10]. Dostupné z:

https://app.knovel.com/web/toc.v/cid:kpEMSE0003/viewerType:toc/root_slug:encyclopedia-meat-sciences/

EVROPSKÁ UNIE, 2011. *Nářízení Komise 1129/2011*, příloha II [online] ze dne 11. 11. 2011. [cit-2018-04-15]. Dostupné z:

<https://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/TXT/PDF/?uri=CELEX:32011R1129&from=CS>

FEINER, Gerhard, 2008. *Meat Products Handbook: practical science and technology*. Cambridge: Woodhead Pub. ISBN: 9781845690502.

FRECE, Jadranka et. al., 2014. Lactococcus lactis ssp. lactis as Potential Functional Starter Culture. *Food Technology & Biotechnology* [online]. Dec. 2014, 52(4), s. 489-494. [cit-2018-04-21]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5079153/>

GARDINI, Fausto et. al., 2002. Use of Staphylococcus Xylosus as a Starter Culture in Dried Sausages: Effect on the Biogenic Amine Content. *Meat Science*, 2002, (61) 3 s. 275-283. ISSN:0309-1740.

HUGHES, M. C. et. al., 2002. Characterization of proteolysis during the ripening of semi-dry fermented sausages. *Meat Science* [online]. 2002, (62) s. 205.2016. [cit-2018-04-17]. Dostupné z: www.elsevier.com/locate/meatsci

HUI, Y. H., 2001. *Meat science and applications*. New York: Marcel Dekker. ISBN 0824705483.

HUI, Y. H., 2012. *Handbook of Meat and Meat Processing*. (2nd Edition). Boca Raton: CRC Press. ISBN: 1439836833.

HUTKINS, Robert W, 2006. *Microbiology and technology of fermented foods*. 1st. edition. Ames: Blackwell Pub., IFT press. ISBN- 9780813800189.

IONESCU, Aurelia et. al., 2007. The Effect of Starter Cultures on the Physical and Biochemical Characteristic of Dried Sausages. *Scientific Study & Research*. 2007, 7 (3). ISSN 1582-540X

KADLEC, Pavel, 2002. *Technologie potravin I*. Praha: VŠCHT. ISBN 978-80-7080-509-1.

KALHOTKA, Libor et. al., 2012. Changes in Counts of Microorganisms and Biogenic Amines Production During the Manufacture of Fermented Sausages Polican. *The Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*. 2012, (2) 2 s. 667-683. ISSN:1338-5178.

KAMENÍK, Josef, 2011. *Hygiena a technologie masa: trvanlivé masné výrobky*. Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita Brno. ISBN 978-80-7305-602-5.

KATINA, Jan, 2016. *Označování masných výrobků*. Česká technologická platforma pro potraviny. 2. přepracované vydání. Praha: Potravinářská komora České republiky. ISBN 978-80-87719-42-8.

KRÖCKEL, Lothar, 2013. The Role of Lactic Acid Bacteria in Safety and Flavour Development of Meat and Meat Products, chapter 5. In: *Lactic Acid Bacteria, R&D for Food, Health and Livestock Purposes* [online]. KONGO, Marcelino J. ISBN 978-953-51-0955-6, [cit-2018-04-20]. Dostupné z: <https://www.intechopen.com/books/lactic-acid-bacteria-r-d-for-food-health-and-livestock-purposes>

LACHOWICZ, Kazimierz, Joanna ŻOCHOWSKA-KUJAWSKA and Malgorzata SOBCZAK, 2012. Fermented Meat Products. In: *Fermentation Effects on Food Properties*. MEHTA, Bhavbhuti M., Alfaf, KAMAL-ELDIN a Robert IWANSKI. Boca Raton: CRC press. ISBN 13: 978-1-4398-5335-1

MATTHEWS, Karl R., Kalmia. E., KNIEL a Thomas MONTVILLE, 2017. *Food microbiology: an introduction*, Section 3 : Other microbes important in food - Lactic acid bacteria and their fermentation products [online]. Washington DC: American Society for Microbiology [cit-2018-04-06] Dostupné z: https://app.knovel.com/web/toc.v/cid:kpFMAIE017/viewerType:toc/root_slug:food-microbiology-an

OCKERMAN, Herbert W. a Lopa, BASU, 2015. Fermented Meat Products : Production and Consumption. In: TOLDRÁ Fidel. *Handbook of fermented meat and poultry*. 2nd edition, Hoboken, NJ: Wiley, Blackwell, 2015. ISBN 9781118522691.

PIPEK, Petr, 1998. *Technologie masa II*. Praha: Karmelitánské nakladatelství. ISBN 80-7192-283-8.

RAI, Krishna P., Chunhui ZHANG, Wen S., XIA, 2009. Effects of pure starter cultures on physico-chemical and sensory quality of dry fermented Chinese-style sausage. *Journal of Food Science and Technology*. March-April 2010, **47** (2), 188-194. ISSN 0975-8402

STADNIK, Joanna a Zbigniew J. DOLATOWSKI, 2015. Free Amino Acids and Biogenic Amines Content during Ageing of Dry-cured Pork Loins with *Lactobacillus casei* LOCK 0900 Probiotic Strain. *Food Science and Technology Research* [online]. 2015, 21 (2), 167-174. Japanese Society for Food Science and Technology [cit-2018-04-10]. Dostupné z: <http://www.jsft.or.jp>

STARUCH, Ladislav a kol., 2006. Vplyv prídavku štartovacích kultúr a probiotík na kvalitu a bezpečnosť fermentovaných mäsových výrobkov. In: *Bezpečnosť a kontrola: Zborník prác z medzinárodnej vedeckej konferencie*. Nitra: Slovenská poľnohospodárska univerzita. ISBN-80-80696-810.

STEINHAUSER, Ladislav, 1995. *Hygiena a technologie masa*. Brno: LAST. ISBN 80-900260-4-4.

TOLDRÁ, Fidel, 2010. *Handbook of meat processing*. 1st. Edition. Ames, Iowa: Wiley-Blackwell. ISBN 978-0-8138-2182-5.

TOLDRÁ, Fidel, 2015. *Handbook of fermented meat and poultry*. 2nd. edition. Hoboken, NJ: Wiley, Blackwell, 2015. ISBN 9781118522691.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

ADP	adenosindifosfát
AMK	aminokyselina
ATP	adenosintrifosfát
a_w	aktivita vody
bk	bez kultury
BMK	bakterie mléčného kvašení
ČSB	čistá svalová bílkovina
DSS	dusitanová solicí směs
FTS	fermentovaný trvanlivý salám
HCl	kyselina chlorovodíková
L. c.	<i>Lactobacillus curvatus</i>
L. s.	<i>Lactobacillus sakei</i>
Lc. l. ssp. l.	<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i>
P. a.	<i>Pediococcus acidilactici</i>
P. p.	<i>Pediococcus pentosaceus</i>
RPV	rychlost proudění vzduchu
RVV	relativní vlhkost vzduchu
S. c.	<i>Staphylococcus carnosus</i>

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1 Redukce dusičnanu na dusitan působením nitrát reduktázy za vzniku oxidu dusnatého, který reakcí s myoglobinem tvoří nitroxymyoglobin, ten při vyšších teplotách (nízkém pH) tvoří stabilní nitroxymyochromogen (upraveno dle: Hutkins, 2006).	19
Obrázek 2 Zjednodušené schéma fermentace glukózy na kyselinu mléčnou (Upraveno dle: Hui, 2001).	29
Obrázek 3 Zjednodušené schéma metabolismu proteinů v průběhu fermentace FTS (upraveno dle: Hui, 2001).	30
Obrázek 4 Zjednodušené schéma metabolismu aminokyselin v průběhu zrání FTS (upraveno dle: Hui, 2001).	30
Obrázek 5 Zjednodušené schéma metabolismu lipidů v průběhu zrání FTS (upraveno dle: Hui, 2001).	31
Obrázek 6 Interakce BMK a kataláza - pozitivních koků v průběhu fermentace masných výrobků (Staruch et al., 2006).	35
Obrázek 7 Sušina vzorků v jednotlivých odběrech v průběhu zrání.	50
Obrázek 8 pH referenčního vzorku bez přidané mikrobiální kultury v průběhu zrání	51
Obrázek 9 pH vzorku s přidavkem kultury <i>Staphylococcus carnosus</i> v průběhu zrání.	52
Obrázek 10 pH vzorku s přidavkem kultury <i>Lactobacillus sakei</i> v průběhu zrání.	52
Obrázek 11 pH vzorku s přidavkem kultury <i>Lactobacillus curvatus</i> v průběhu zrání.	53
Obrázek 12 pH vzorku s přidavkem kultury <i>Lactococcus lactis ssp. lactis</i> v průběhu zrání.	54
Obrázek 13 pH vzorku s přidavkem kultury <i>Pediococcus pentosaceus</i> v průběhu zrání.	54
Obrázek 14 pH vzorku s přidavkem kultury <i>Pediococcus acidilactici</i> v průběhu zrání.	55
Obrázek 15 Srovnání pH vzorků v průběhu zrání	55
Obrázek 16 Srovnání hmotnostních úbytků vzorků v průběhu zrání.	56
Obrázek 17 Počáteční mikrobiální kontaminace suroviny před přidavkem startovací kultury – CPM a BMK v 1g suroviny.	57
Obrázek 18 Kontrolní vzorek bez přidavku startovací kultury – CPM, BMK a stafylokoky v 1 g vzorku.	58

Obrázek 19 CPM a počty stafylokoků (půda MSA) v 1 g vzorku s přidavkem mikrobiální kultury <i>Staphylococcus carnosus</i>	59
Obrázek 20 CPM a BMK (půda MRS) v 1 g vzorku s přidavkem mikrobiální kultury <i>Lactobacillus sakei</i>	59
Obrázek 21 CPM a BMK (půda MRS) v 1 g vzorku s přidavkem mikrobiální kultury <i>Lactobacillus curvatus</i>	60
Obrázek 22 CPM a BMK (půda MRS) v 1 g vzorku s přidavkem mikrobiální kultury <i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i>	60
Obrázek 23 CPM a počty pediokoků (půda M17) v 1 g vzorku s přidavkem mikrobiální kultury <i>Pediococcus pentosaceus</i>	61
Obrázek 24 CPM a počty pediokoků (půda M17) v 1 g vzorku s přidavkem mikrobiální kultury <i>Pediococcus acidilactici</i>	61
Obrázek 25 Poměr celkových AMK na 100% a reálnou sušinu u vzorku s kulturou <i>S. carnosus</i>	64
Obrázek 26 Poměr celkových AMK na 100% a reálnou sušinu u vzorku s kulturou <i>L.sakei</i>	65
Obrázek 27 Poměr celkových AMK na 100% a reálnou sušinu u vzorku s kulturou <i>L.curvatus</i>	65
Obrázek 28 Poměr celkových AMK na 100% a reálnou sušinu u vzorku s kulturou <i>Lc. lactis</i> ssp. <i>lactis</i>	66
Obrázek 29 Poměr celkových AMK na 100% a reálnou sušinu u vzorku s kulturou <i>P. pentosaceus</i>	67
Obrázek 30 Poměr celkových AMK na 100% a reálnou sušinu u vzorku s kulturou <i>P. acidilactici</i>	68
Obrázek 31 Poměr celkových AMK na 100% a reálnou sušinu u vzorku bez přidavku mikrobiální kultury.....	68
Obrázek 32 Poměr celkových, volných a vázaných AMK v průběhu zrání u vzorku s přidavkem <i>S. carnosus</i>	70
Obrázek 33 Poměr celkových, volných a vázaných AMK v průběhu zrání u vzorku s přidavkem <i>L. sakei</i>	71
Obrázek 34 Poměr celkových, volných a vázaných AMK v průběhu zrání u vzorku s přidavkem <i>L. curvatus</i>	71

Obrázek 35 Poměr celkových, volných a vázaných AMK v průběhu zrání u vzorku s přídavkem <i>Lc. lactis</i> ssp. <i>lactis</i>	72
Obrázek 36 Poměr celkových, volných a vázaných AMK v průběhu zrání u vzorku s přídavkem <i>P. pentosaceus</i>	73
Obrázek 37 Poměr celkových, volných a vázaných AMK v průběhu zrání u vzorku s přídavkem <i>P. acidilactici</i>	73
Obrázek 38 Poměr celkových, volných a vázaných AMK v průběhu zrání u vzorku bez přídavku mikrobiální kultury.	74

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 Členění masných výrobků a masných polotovarů na druhy a skupiny (Česko - vyhláška 69/2016).....	36
Tabulka 2 Požadavky na obsah čisté svalové bílkoviny a tuku ve vybraných fermentovaných výrobcích (Česko - vyhláška 69/2016).....	37
Tabulka 3 Sušina výrobků v průběhu zrání.....	50
Tabulka 4 pH vzorků v průběhu zrání.....	51
Tabulka 5 Hmotnostní úbytky výrobků v průběhu zrání.....	56
Tabulka 6 Množství celkových AMK na 100% sušinu.....	63
Tabulka 7 Množství celkových AMK na reálnou sušinu v přepočtu na procenta.....	63
Tabulka 8 Množství volných AMK na 100% sušinu.....	69
Tabulka 9 Množství vázaných AMK na 100% sušinu.....	70

SEZNAM PŘÍLOH

PI Časový průběh experimentu

PII Program zrací komory

PIII Průběh stanovení celkových AMK na AAA 400

PŘÍLOHA P I: ČASOVÝ PRŮBĚH EXPERIMENTU

Časový průběh analýz vzorků	
Pá, 21.10.2016	A0, B0
Po, 24.10.2016	A1, B1
Út, 25.10.2016	/
Pá, 28.10.2016	/
Po, 31.10.2016	A2, B2
Út, 1.11.2016	C0
Pá, 4.11.2016	D0, C1
Po, 7.11.2016	A3, B3, D1
Út, 8.11.2016	E0
Pá, 11.11.2016	C2, E1, F0, X0
Po, 14.11.2016	A4, B4, D2, F1, X1
Út, 15.11.2016	G0
Pá, 18.11.2016	C3, E2, G1, H0
Po, 21.11.2016	D3, F2, H1, X2
Pá, 25.11.2016	C4, E3, G2
Po, 28.11.2016	D4, F3, H2, X3
Pá, 2.12.2016	E4, G3
Po, 5.12.2016	F4, H3, X4
Pá, 9.12.2016	G4
Po, 12.12.2016	H4

PŘÍLOHA PII: PROGRAM ZRACÍ KOMORY

Program zrací komory			
proces	časový rozsah [h]	vlhkost [%]	teplota komory [°C]
sušení	/	95%	22
sušení	7	90%	26
sušení	3	86%	26
kouř	0,5	86%	26
pauza	0,5	95%	26
kouř	0,5	95%	26
pauza	0,5	95%	24
sušení	3	86%	26
sušení	7	85%	26
sušení	6	84%	26
kouř	0,5	95%	24
pauza	0,5	95%	24
kouř	0,5	95%	24
pauza	0,5	95%	24
sušení	8	84%	24
kouř	0,5	95%	22
pauza	0,5	95%	22
kouř	0,5	95%	22
pauza	0,5	95%	22
sušení	8	84%	22
kouř	0,5	95%	22
pauza	0,5	95%	22
kouř	0,5	95%	22
pauza	0,5	95%	22
sušení	8	82%	20
kouř	0,5	95%	20
pauza	0,5	95%	20
kouř	0,5	95%	20
pauza	0,5	95%	20
sušení	99	80%	18

PŘÍLOHA PII: PRŮBĚH STANOVENÍ CELKOVÝCH AMK NA AAA

400

AAA 400, Čtyřpufrový systém pro stanovení hydrolyzátů a pořadí eluce jednotlivými pufrů

Parametr	Roztok					
	ředící	č. 1	č. 2	č. 3	č. 4	č. 5
pH	2,20	2,70	3,00	4,25	8,00	14,00
koncentrace Na ⁺ (mol/l)	0,20	0,20	0,20	0,40	1,12	0,20
koncentrace citronanu (mol/l)	0,067	0,066	0,067	0,067	0,067	/
k. citronová monohydrát (g)	14,00	11,11	10,00	7,53	/	/
k. citronová bezvodá (g)	12,80	10,16	9,14	6,88	/	/
citronan sodný dihydrát (g)	/	4,04	5,60	9,06	19,60	/
chlorid sodný (g)	11,50	9,29	8,36	18,00	52,60	/
hydroxid sodný (g)	/	/	/	/	/	8,00
thiodiglykol (ml)	5,00	2,50	2,50	2,50	/	/
azid sodný (g)	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	/
další látky	/	/	/	/	2,5 g H ₃ BO ₃ , 1,5 ml 50% NaOH	/
pořadí eluce aminokyselin	/	Cya-Asp- Mets-Thr- Ser-Glu	Glu-Pro- Gly-Ala- Cys-Val	Met-Ile- Leu	Tyr-Phe- His-Lys- NH ₃ -Arg	/