

# **Vliv startérové kultury na vybrané parametry modelových vzorků fermentovaných masných výrobků**

Antonín Illík

---

Bakalářská práce  
2022



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická

---

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická  
Ústav technologie potravin

Akademický rok: 2021/2022

# ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Antonín Illík**  
Osobní číslo: **T18107**  
Studijní program: **B2901 Chemie a technologie potravin**  
Studijní obor: **Chemie a technologie potravin**  
Forma studia: **Prezenční**  
Téma práce: **Vliv starterové kultury na vybrané parametry modelových vzorků fermentovaných masných výrobků**

## Zásady pro vypracování

### *Teoretická část*

1. Vlastnosti a složení fermentovaných masných výrobků.
2. Technologie výroby fermentovaných masných výrobků.
3. Úloha mikroflóry při zrání fermentovaných masných výrobků.

### *Praktická část*

1. Výroba modelových vzorků fermentovaných masných výrobků.
2. Sledování vybraných parametrů modelových vzorků fermentovaných masných výrobků.
3. Vyhodnocení výsledků a formulace závěrů práce.

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

Seznam doporučené literatury:

- [1] Leroy, F., Geyzen, A., Janssens, M. et al. Meat fermentation at the crossroads of innovation and tradition: A historical outlook. *Trends in Food Science and Technology*, 31: 130-137. 2013
- [2] Lorenzo, J.M., Gómez, M., Fonseca, S. Effect of commercial starter cultures on physicochemical characteristics, microbial counts and free fatty acid composition of dry-cured foal sausage. *Food Control* 46: 382-389. 2014
- [3] Węsierska, E., Szoltyśik, M., Rak, L. Physico-chemical, biochemical and microbiological properties of traditional Polish pork fermented products during ripening. *Food Bioprocess Technology*, 6: 2986-2995. 2013
- [4] Leroy, F., Verluyten J., De Vuyst L. Functional meat starter cultures for improved sausage fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 106: 270-285. 2006
- Elektronické zdroje dostupné z knihovny UTB ve Zlíně

Vedoucí bakalářské práce: **prof. RNDr. Leona Buňková, Ph.D.**  
Ústav inženýrství ochrany životního prostředí

Oponent bakalářské práce: **Ing. Pavel Pleva, Ph.D.**  
Ústav inženýrství ochrany životního prostředí

Datum zadání bakalářské práce: **31. prosince 2021**

Termín odevzdání bakalářské práce: **20. května 2022**

L.S.

---

**prof. Ing. Roman Čermák, Ph.D.**  
děkan

---

**Ing. Robert Gál, Ph.D.**  
ředitel ústavu

Ve Zlíně dne 25. února 2022

## **PROHLÁŠENÍ AUTORA BAKALÁŘSKÉ PRÁCE**

Beru na vědomí, že:

- bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému a dostupná k nahlédnutí;
- na moji 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;
- podle § 60 odst. 1 autorského zákona má Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- podle § 60 odst. 2 a 3 autorského zákona mohu užít své dílo – 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);
- pokud bylo k vypracování bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tj. k nekomerčnímu využití), nelze výsledky bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- pokud je výstupem 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.

### **Prohlašuji,**

- že jsem na bakalářské práci pracoval samostatně a použitou literaturu jsem citoval. V případě publikace výsledků budu uveden jako spoluautor.
- že odevzdaná verze bakalářské práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou obsahově totožné.

Ve Zlíně, dne:

Jméno a příjmení studenta:

.....  
podpis studenta

## **ABSTRAKT**

Bakalářská práce je zaměřená na výrobu fermentovaných masných výrobků a po dobu zrání na vývoj startérových kultur ve výrobcích pomocí mikrobiologického rozboru. Ve fermentovaných masných výrobcích byly sledovány především tyto indikátorové skupiny mikroorganismů: celkový počet mikroorganismů, počet mléčných tyčinek, stafylokoků, kvasinek a plísní a koliformních bakterií. Hlavním cílem této práce bylo v pravidelných intervalech kontrolovat mikrobiologické změny pomocí kultivace vzorků na živných půdách. U modelových vzorků o menším průměru byl zaznamenán rychlejší růst mikroorganismů. Modelové vzorky zaočkované kontrolní kulturou LHP-DRY (*Pediococcus acidilactici* a *Pediococcus pentosaceus*) vykazovaly během kultivace nejnižší počet mezofilních aerobních a fakultativně anaerobních mikroorganismů.

Klíčová slova: Fermentovaný masný výrobek, startérová kultura, mikrobiologický rozbor

## **ABSTRACT**

The bachelor thesis is focused on the production of fermented meat products and during the maturation period on the development of starter cultures in fermented products. The total number of microorganisms, bacteria of the genus *Lactobacillus*, *Staphylococcus*, yeasts and fungi and coliform bacteria were monitored in fermented meat products. The main goal of this work was to check microbiological changes at regular intervals by culturing samples on living soils. In model samples with a smaller diameter, faster growth of microorganisms was observed. The control culture of LHP-DRY (*Pediococcus acidilactici* and *Pediococcus pentosaceus*) showed the lowest number of microorganisms during cultivation.

Keywords: Fermented meat products, starter cultures, microbiology analysis

Velké poděkování patří hlavně prof. RNDr. Leoně Buňkové, Ph.D. za pomoc při zpracování bakalářské práce a za čas a trpělivost, kterou mi věnovala. Dále děkuji paní laborantce Ing. Veronice Kučabové za pomoc při mikrobiologickém rozboru.

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

# OBSAH

ÚVOD.....	9
<b>I TEORETICKÁ ČÁST .....</b>	<b>11</b>
<b>1 SUROVINY PRO VÝROBU FERMENTOVANÝCH MASNÝCH VÝROBKŮ.....</b>	<b>12</b>
1.1 MASO .....	12
1.1.1 Bílkoviny.....	12
1.1.2 Tuky .....	13
1.1.4 Sacharidy.....	14
1.2 SÁDLO.....	14
1.3 SŮL .....	15
1.3.1 Kuchyňská sůl .....	15
1.3.2 Dusitanová solicí směs .....	16
1.4 CUKRY .....	16
1.5 KOŘENÍ .....	17
1.6 MIKROBIÁLNÍ KULTURY .....	18
1.6.1 Bakterie mléčného kvašení .....	18
1.6.2 Stafylokoky .....	18
1.7 OBALOVÁ STŘEVA.....	19
<b>2 TECHNOLOGIE VÝROBY FERMENTOVANÝCH MASNÝCH VÝROBKŮ.....</b>	<b>20</b>
2.1 MĚLNĚNÍ, MÍCHÁNÍ .....	20
2.2 NARÁŽENÍ DO STŘEV .....	21
2.3 FERMENTACE .....	21
2.4 UZENÍ.....	22
2.5 SUŠENÍ .....	22
<b>3 ÚLOHA MIKROFLÓRY PŘI ZRÁNÍ FERMENTOVANÝCH MASNÝCH VÝROBKŮ.....</b>	<b>24</b>
3.1 BAKTERIE MLÉČNÉHO KVAŠENÍ.....	24
3.2 MIKROORGANISMY TVOŘÍCÍ BARVU A CHUŤ .....	25
3.3 MIKROORGANISMY PRO KRYTÍ POVRCHU .....	25
3.4 PROTEKTIVNÍ KULTURY.....	26
<b>II PRAKTICKÁ ČÁST .....</b>	<b>27</b>
<b>4 CÍL PRÁCE .....</b>	<b>28</b>
<b>5 VÝROBA MODELOVÝCH VZORKŮ FERMENTOVANÝCH MASNÝCH VÝROBKŮ .....</b>	<b>29</b>
5.1 POUŽITÉ STROJE PRO VÝROBU .....	29

5.2	SLOŽENÍ MODELOVÝCH VZORKŮ FERMENTOVANÝCH MASNÝCH VÝROBKŮ .....	29
5.3	POSTUP VÝROBY MODELOVÝCH VZORKŮ FERMENTOVANÝCH MASNÝCH VÝROBKŮ .....	30
5.4	ZRÁNÍ A FERMENTACE .....	33
<b>6</b>	<b>MIKROBIOLOGICKÁ ANALÝZA MODELOVÝCH VZORKŮ FERMENTOVANÝCH MASNÝCH VÝROBKŮ .....</b>	<b>34</b>
6.1	ODBĚR VZORKŮ .....	34
6.2	ŘADA ZŘEDĚNÍ .....	34
6.3	OČKOVÁNÍ NA TUHÉ ŽIVNÉ PŮDY .....	35
6.4	ZJIŠŤOVANÉ DRUHY MIKROORGANISMŮ .....	35
<b>7</b>	<b>VÝSLEDKY A DISKUSE .....</b>	<b>39</b>
7.1	SLEDOVÁNÍ VYBRANÝCH ZNAKŮ IZOLOVANÝCH KULTUR .....	39
7.3	HODNOCENÍ NÁRŮSTU BAKTERIÍ MLÉČNÉHO KVAŠENÍ .....	42
7.4	HODNOCENÍ NÁRŮSTU KOAGULÁZA-NEGATIVNÍCH STAFYLOKOKŮ .....	44
7.5	HODNOCENÍ NÁRŮSTU KVASINEK A PLÍSNÍ .....	47
7.6	HODNOCENÍ NÁRŮSTU KOLIFORMNÍCH BAKTERIÍ .....	48
7.7	SENZORICKÉ HODNOCENÍ .....	49
7.8	SOUHRNNÁ DISKUZE .....	49
	<b>ZÁVĚR .....</b>	<b>51</b>
	<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....</b>	<b>52</b>
	<b>SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK .....</b>	<b>55</b>
	<b>SEZNAM OBRÁZKŮ .....</b>	<b>56</b>
	<b>SEZNAM TABULEK .....</b>	<b>57</b>



## ÚVOD

Potraviny byly vždy zastoupeny rozmanitým sortimentem. Již v roce 2000 př. n. l. fresky a písemné eposy negativizovaly elitářské kulinářské požitky, zatímco středověké prezentace pokrmů byly charakterizovány oddělením od skutečné spotřeby potravin, které zdůrazňovaly spíše symbolické významy. Od období renesance se potraviny v ikonografických a písemných pramenech stále více zobrazovaly a tento trend přetrvával i v raném novověku, kdy stále více zobrazoval potraviny v různých a odlišných prostředích a projevoval bohatství nebo šetrnost. Ve dvacátém století došlo naopak k obrovskému nárůstu zastoupení potravin v důsledku expanze a globalizace různých médií. Příběhy o jídle byly a stále jsou rozmanité a často protichůdné. Například zobrazení zdraví prospěšných potravin je náchylné k protichůdným popisům. [11]

Například v roce 1868 Justus Liebig tvrdil, že kvašení chleba pomocí kvasinek zhoršilo výživovou kvalitu a v roce 1906 belgický učitel ekonomiky napsal: „Potraviny musí být čerstvé; fermentované způsobují zažívací potíže“. Oba příklady odrážejí obavy z 19. století týkající se kvašených potravin, které přetrvávaly až do 20. století. [7]

V současné době jsou fermentované potraviny pozitivně hodnoceny pro své výživné a další prospěšné vlastnosti. Produkce fermentovaných mlék a dalších probiotických fermentovaných potravin se do značné míry prosazovala kvůli účinkům prospěšných mikroorganismů, které jsou hojně přítomny v těchto potravinách. Přesto několik z těchto fermentovaných potravin může stále vyvolávat určitou míru podezření, zejména pokud jde o potenciální negativní dopady na zdraví, jako je tomu u některých čerstvých farmářských sýrů a některých masných výrobků. [10]

Čerstvé maso je vysoce výživné, ale extrémně rychle se kazící potravina, a jeho udržitelnost a trvanlivost byla pro rané civilizace velkou výzvou. V důsledku toho se objevily metody konzervace masa využívající solení a sušení za vhodných klimatických podmínek. Tyto konzervační techniky vedly k nižším hodnotám aktivity vody, a tak chránily maso před znehodnocením a před patogenními mikroorganismy. Zatímco u neporušených kusů masa stačilo pouhé solení a sušení, jiné frakce, které se skládaly z rozmělněného masa, odřezků jatečně upraveného těla a tuku, vyžadovaly kvůli vyšší oxidační a mikrobiální nestabilitě další fermentační proces. U fermentovaného masa se solené mleté maso a tuk obvykle plní společně do obalů, původně do zvířecích střev, aby se vytvořily anaerobní podmínky. Dále je fermentace masa výsledkem produkce kyseliny mléčné některými druhy bakterií

mléčného kvašení, které jsou podporovány anaerobním prostředím, po kterém následuje fáze sušení, aby se produkt dále stabilizoval a vyzrál. Sekvence solení, plnění, fermentace a sušení tak vytváří několik antimikrobiálních překážek, což vede k trvanlivosti několika měsíců. Kromě bakterií mléčného kvašení se zpracováním vybírají koaguláza-negativní stafylokoky, které metabolicky přispívají k chuti, barvě a oxidační stabilitě fermentovaných masných výrobků. Často dochází k žádoucímu nárůstu plísní na povrchu produktu, zejména ve středomořské oblasti. V severní Evropě, kde klimatické podmínky neumožňují rozsáhlé sušení a vhodný vývoj plísní, byly původně zavedeny další způsoby uzení a ohřevu, které dále zabraňují kažení v důsledku nežádoucí činnosti bakterií. [1]

## **I. TEORETICKÁ ČÁST**

# 1 SUROVINY PRO VÝROBU FERMENTOVANÝCH MASNÝCH VÝROBKŮ

Základními surovinami pro výrobu fermentovaných masných výrobků jsou kvalitní a čerstvé vepřové a hovězí maso a vepřové sádlo. Poměr těchto mas je v našich podmínkách ve střední Evropě přibližně 1/3 libového hovězího masa, 1/3 libového vepřového masa a 1/3 vepřového hřbetního sádla. [1]

## 1.1 Maso

Jedná se o základní surovinu pro výrobu fermentovaných masných výrobků s převahou vepřového a hovězího masa. Dále jsou také využívány i jiné druhy masa, jako je například maso koňské a krůtí. Maso patří mezi nejvyhledávanější potraviny vůbec, z důvodu vysokého podílu bílkovin, vitaminů skupiny B (B2, B6 a B12), dále pak i vitamínu D a železa. Hlavní složkou bývá voda, která u čerstvě poraženého masa tvoří až 75 % objemu. Obsah plnohodnotné bílkoviny v mase je v rozmezí 16–20 %. Za zmínku stojí i obsah tuku, ten je pak v rozmezí 1–5 % v závislosti na výkrmu, pohlaví a stáří jatečného kusu. [2]

### 1.1.1 Bílkoviny

Z nutričního hlediska se jedná o jednu z nejcennějších složek masa. Obsah bílkovin ve svalovině bývá okolo 20 % hmotnosti. Bílkoviny můžeme rozdělit do třech skupin, a to podle své rozpustnosti ve vodě, solných roztocích a podle umístění ve svalových strukturách. Jedná se o skupiny sarkoplasmatických, myofibrilárních a stromatických bílkovin. [3]

#### Sarkoplasmatické bílkoviny

Sarkoplasmatické bílkoviny lze snadno extrahovat ve studené vodě, představují podíl 30 až 35 % svalových proteinů. Zahrnují myoglobin a enzymy přítomné v mitochondriích, lysozomech nebo přímo v cytosolu. [12]

V technologii masa mají největší význam hemová barviva: myoglobin a hemoglobin aj., která způsobují červené zbarvení masa a krve. [7] Množství myoglobinu ve svalu je závislé na rozsahu a typu svalové aktivity, na zásobování svalu krví a na věku zvířete. Barevné pigmenty masa jsou tvořeny z 95 % myoglobinem a přibližně 5 % hemoglobinem. [12]

### **Myofibrilární bílkoviny**

Myofibrilární bílkoviny představují 50–53 % všech bílkovin v mase. Mezi myofibrilární bílkoviny patří proteiny tvořící kontraktální tlustá a tenká filamenta – myosin a aktin, dále regulační proteiny, jako je komplex tropomyosin – troponin a také bílkoviny, které pomáhají tvořit strukturu myofibril, jako jsou titin či nebulin. [12]

Jsou rozpustné v roztocích solí a tvoří myofibrily, nerozpouští se v deionizované vodě. Tato vlastnost hraje důležitou roli při tvorbě struktury masných výrobků při zrání. [13]

### **Stromatické bílkoviny**

Bývají charakteristické tím, že nejsou rozpustné ve vodě, ani v solných roztocích a můžeme je najít ve vlákních pojivových tkání, které mohou tvořit ve svalovině obaly svalových struktur. [13]

Můžeme je dále najít ve vazivech, šlachách, kůžích a kostech. Mohou se také vyskytovat ve svalovinách. Tvoří je fibrilárními proteiny a jsou známé jako kolageny, elastiny a keratiny. [14]

#### **1.1.2 Tuky**

Tuky tvoří v mase největší podíl (99 % lipidů). V menší míře jsou přítomny polární lipidy (fosfolipidy), doprovodné látky aj. Rozložení tuku v těle zvířat je velmi nerovnoměrné. Malá část bývá uložena přímo uvnitř svaloviny (intramuskulární, vnitrosvalový). Zbylá část je uložena v podkožním tuku neboli tukové tkáni, která tvoří dvě hlavní funkce, a to zásobní a ochrannou. [1]

Po chemické stránce jsou tuky estery vyšších mastných kyselin a glycerolu. Živočišný tuk obsahuje kromě triacylglycerolů jiné látky. Jedná se například o vitaminy, minerální látky, cholesterol, bílkoviny, a i malé množství vody. V tucích se také vyskytují kyseliny, jako jsou palmitová, stearová a olejová. [9]

#### **1.1.3 Minerální látky**

Minerální látky bývají obsaženy zhruba 1% podílem v mase. Nejčastěji mají specifické funkce jak z technologického hlediska, tak i z hlediska metabolismu. V mase můžeme nejčastěji najít minerální látky jako například hořčík, draslík, vápník, železo a zinek. [2]

### 1.1.4 Sacharidy

Sacharidy hrají v díle úlohu substrátu (potravy) zejména pro bakterie mléčného kvašení a jsou fermentovány převážně na kyselinu mléčnou. Přídavek sacharidů při vlastní výrobě, který je jednou z důležitých složek díla trvanlivých masných výrobků, ovlivňuje hlavně intenzitu procesu fermentace. [6]

Obecně množství 1 g (nebo 0,1 %) glukózy přidané k 1 kg díla snižuje hodnotu pH o 0,1. Aplikace 8–10 g glukózy (dextrózy) snižuje pH trvanlivého fermentovaného salámu (TFS) z hodnoty kolem 5,7 na 4,6 – 4,8. [3]

Během postmortální glykogenolýzy se malá část glykogenu přemění na glukózu a glukózo-6-fosfát. Obsah glukózy u čerstvého hovězího a vepřového masa po přísné úpravě je řádově 4,5 a 8  $\mu\text{mol/g}$  čerstvé hmotnosti. Toto množství neumožňuje snížení pH dostatečné k inhibici nežádoucích bakterií. Proto se fermentovatelné sacharidy přidávají do syrových salámových směsí. [11]

## 1.2 Sádlo

Sádlo patří mezi živočišné tuky, které je nejčastěji získáváno z prasat. Jedná se o velmi kalorickou surovinou, například vepřové obsahuje až 3600 kJ/100 g. Sádlo se skládá z 99 % tuku, z toho 40 % tvoří nasycené mastné kyseliny. Zbylý podíl ve složení sádla zastávají mononenasycené tuky (45 %) a polynenasycené tuky (11 %). [6]

Vepřové sádlo pro trvanlivé masné výrobky má být jadrné, tuhé, a proto se využívá pouze hřbetní sádlo. Výborné je sádlo z krční části, tzv. hřivky. [1] Jadrné sádlo je vhodné pro výrobky, které vyžadují kontrastní mozaiku. [9]

Měkké sádlo obsahuje řídký tuk, který rychle žlukne. Při mělnění se tento tuk uvolňuje z tukových buněk a obklopuje rozmělněné částičky masa tenkým tukovým filmem. Nedojde tak k jejich spojení prostřednictvím bílkovinného lepidivého roztoku, který vzniká působením kuchyňské soli, myofibrilárních bílkovin a vody obsažené v mase. Při plnění do obalového střeva se mazlavý tuk rovněž usazuje pod obalovým střevem a nepropouští na povrch vodu. Následkem je prodloužení sušení výrobků, jejich měkká konzistence a nižší trvanlivost. [5]

### 1.3 Sůl

Jedná se o chlorid sodný (NaCl), který se považuje za jednu z nejstarších přísad do potravin. Po chemické stránce je obsažena v poměru 39,3 % sodíku a 60,7 % chloru. Při rozpuštění ve vodě se molekuly hydrolyzují. [12]

Sodíkové ionty a chloridové anionty, které se navážou na postranní řetězce bílkovin, mezi sebou působí jako odpudivé síly. [17]

Existují různé postupy pro solení masa, mezi hlavní patří solení suché a mokré.

#### Suché solení

Existují dvě hlavní možnosti při použití metody solení nasucho, a to s přetlakem nebo bez přetlaku. Při solení masa se uvnitř masa vytvoří přetlak, který se liší v závislosti na umístění uvnitř hromádky. Tato variabilita tlaku podporovaného každým s naskládaných produktů může přispět k variabilitě pozorované během solení masa. Další možností je případná drenáž během solení nasucho. Další alternativou je pohánět krystaly soli vysokou rychlostí, které pronikají do produktu. Někdy se NaCl nanáší na povrch pomocí masáže nebo bubnováním, čímž se zvyšuje rychlost přírůstku NaCl, pravděpodobně v důsledku změny tlaku během solení. [7]

#### Mokré solení

Při tomto postupu je maso uloženo do nádoby s takzvaným lákem na určitou dobu. Lák bývá nejčastěji směsí vody s procentuálním poměrem 20–40 % soli. Maso je vkládáno v poměru 3:1 nejvýše 2:1. V praxi 200 g masa na 100 ml láku. Tímto procesem sůl z láku prostupuje do masa. Provádí se z technologického hlediska, aby maso získalo svou specifickou chuť. Další důležitou roli hraje i z mikrobiologického hlediska, jelikož mnoha mikroorganismům sůl vadí. [12]

#### 1.3.1 Kuchyňská sůl

Kuchyňskou sůl lze přirozeně najít v mase v koncentracích 60 až 80 miligramů na 100 gramů. Ve vyráběných masných výrobcích je obsah chloridu sodného daleko vyšší. Sůl také zvyšuje hydrataci bílkovin, schopnost vázat vodu, zlepšovat texturu a viskozitu masných výrobků. Slanost je vnímaná jako slaná chuť, bývá vyšší u výrobků s vysokým obsahem tuku

a nižší u výrobků s vyšším obsahem bílkovin. Závisí i na obsahu masa v masném výrobku, proto je jednodušší snížit obsah soli u výrobků s vyšším obsahem tuku. [1]

Sůl snižuje aktivitu vody v mase a masných výrobcích, čímž působí jako konzervant. Snížením obsahu soli dochází ke zkrácení doby trvanlivosti a ke zvýšení rizika pomnožení nežádoucích mikroorganismů. Dochází navíc k prodloužení doby výroby u trvanlivých masných výrobků, což se odráží na ceně. [12]

Snížením obsahu soli se také sníží vaznost vody a tím dochází k vyšším ztrátám během vaření. Chlorid sodný přispívá k charakteristické chuti masa, zvýrazňuje a dotváří celkový vjem a chuť masa a masných výrobků. [7]

### 1.3.2 Dusitanová solicí směs

Solicí dusitanová směs zajišťuje technologické přednosti soli, dusitanu sodného a dalších ingrediencí, jakými jsou sacharóza, dextróza a suchý škrobový sirup. Tyto ingredience zajišťují technologickou bezpečnost, dlouhou životnost a chutnost masných produktů. V dusitanové solicí směsi obsahující pouze jedlou sůl a dusitan sodný není hygroskopický dusitan sodný dlouhodobě stabilní. Podle tense vodní páry se ve vzduchu pomaleji či rychleji rozkládá. [18]

K solení díla se pro výrobu fermentovaných masných výrobků v našich podmínkách používá dusitanová solicí směs, a to v množství 2,4 až 3 % (v hotovém výrobku v důsledku ztráty vody při sušení je obsah kuchyňské soli 3,2 až 4,5 %). [1]

Dusitan obsažený ve směsi se ve výrobku projevuje v několika směrech: podílí se na vybarvení, na tvorbě aroma, má konzervační a antioxidační efekt. Pro dosažení charakteristické barvy masných výrobků je nutné množství dusitanu 30 až 50 mg na 1kg díla. Aroma ovlivní 20 až 40 mg/kg. Konzervační efekt zajistí přídavek 80 až 150 mg/kg díla a antioxidačně působí 20 až 50 mg/kg. Dusitan je považován v technologii trvanlivých masných výrobků jako první překážka proti nežádoucím bakteriím. [3]

## 1.4 Cukry

Rozmanitost a množství přidaných sacharidů je důležité, protože určují rychlost a rozsah tvorby kyseliny mléčné a složení mikroflóry fermentovaných masných výrobků. Pokud se přidá velké množství rychle metabolizovatelných sacharidů (např. glukózy), dojde tak rychle ke snížení pH, že jsou potlačeny požadované metabolické aktivity nemléčné mikroflóry.



Zatímco přidání příliš malého množství sacharidů může mít za následek růst nežádoucích organismů během fermentace, zejména při vysokých zracích teplotách. [6]

Běžně se používají monosacharidy (glukóza nebo fruktóza), disacharidy (sacharóza, laktóza), oligosacharidy (škrobový sirup). Glukóza i sacharóza jsou vzájemně zastupitelné. Pro fermentované masné výrobky s dobou zrání 4 týdny a více je optimální přídavek 0,3 % glukózy nebo sacharózy. Pro salámy s rychlejším a kratším zráním (maximálně 3 týdny) se doporučuje přidávat 0,5 – 0,7 %. [1]

Laktóza způsobuje pomalejší pokles hodnot pH, je tedy třeba počítat s vyšším obsahem zbytkové koncentrace sacharidu v díle, a proto se doporučuje půlprocentní přídavek laktózy do fermentované masné výrobky pomalu zrajících a 1 % pro salámy s rychlejší fermentací. [5]

U většiny polosuchých fermentovaných masných výrobků je cílové pH po fermentaci 4,8 – 5,0, což zajišťuje požadovanou mikrobiologickou stabilitu a rychlý nárůst pevnosti masného díla. K dosažení této hodnoty se obvykle přidává 0,4 – 0,8 % rychle fermentovatelných sacharidů (např. glukózy). Nižší množství (0,2 – 0,3 %) se doporučuje, pokud se jako vytvzovací prostředek použije spíše dusičnan než dusitan, a pokud se cílové pH po fermentaci je asi 5,3, např. při výrobě italského salámu. [6]

## 1.5 Koření

Jedna z důležitých složek, které ovlivňují konečnou chuť výrobku, je koření. Celkový přídavek koření, který se při výrobě masných výrobků přidává, dosahuje 5 až 10 g/kg díla. Koření v mase vykazuje antioxidační účinek, například rozmarýn, tymián, šalvěj nebo muškátový oříšek. Antimikrobiální účinek, který je vyvolaný přítomností fytoncidů, byl popsán u koření, jako je kmín, paprika, pepř, zázvor, česnek, hřebíček a skořice. [12]

Složení koření je rozmanité, jsou zde obsaženy bílkoviny, lipidy a sacharidy v různém množství v závislosti na daném koření. Můžou obsahovat velké množství vitaminů B, C a E. Specifické chutě získává díky přítomnosti alkaloidů, glykosidů a silic. Ve světě je uváděno přes 210 druhů rostlin, které se využívají jako koření. V České republice jsou nejznámější koření z tropických zemí kontinentů, jako jsou Asie, Afrika a Amerika. [13]

## 1.6 Mikrobiální kultury

Fermentace masa je starý proces, který se opírá o původní mikrobiotu a dnes se provádí za kontrolovaných podmínek s přidavkem startérových kultur. Kultury pro přípravu masa se skládají z kombinace bakterií mléčného kvašení a koaguláza-negativních stafylokoků. [2]

Mezi bakterie mléčného kvašení, které jsou součástí startérových kultur pro výrobu fermentovaných masných výrobků se řadí zástupci rodu *Pediococcus* nebo různé druhy odvozené od původního rodu *Lactobacillus*, jako je *Latilactobacillus sakei* nebo *Latilactobacillus curvatus*. *Staphylococcus xylosus* a *Staphylococcus carnosus* jsou dva hlavní druhy stafylokoků používané jako součást startérových kultur v technologii těchto výrobků. Studie staré desítky let o mikroorganismech používaných jako startérové kultury přinesly informace o jejich potenciálních funkcích v masných výrobcích. Bakterie mléčného kvašení jsou dobře známé jako okyselující činidla a producenti bakteriocinů ovlivňující technologické vlastnosti a mikrobiální stabilitu produktů. [19]

### 1.6.1 Bakterie mléčného kvašení

Mléčné tyčinky (původně rod *Lactobacillus*) jsou odpovědné za tvorbu malých peptidů a aminokyselin, které přispívají k procesu fermentace, buď jako přímé látky zlepšující chuť, nebo jako prekurzory jiných sensoricky aktivních sloučenin během zrání fermentovaných masných výrobků. [4]

Fermentaci můžeme rozdělit na dva kroky, které jsou zodpovědné za vznik chutě a vůně. Jedná se o bakterie, které jsou buď homofermentativní, anebo heterofermentativní. Homofermentativní bakterie mléčného kvašení vytváří hlavně jednu kyselinu, a to kyselinu mléčnou, zatímco heterofermentativní bakterie mléčného kvašení jsou schopny vytvořit hned několik kyselin jako například kyselinu octovou, jablečnou nebo propionovou. [12]

### 1.6.2 Stafylokoky

Koaguláza negativní stafylokoky patří mezi významnou složkou startérových kultur pro výrobu fermentovaných masných výrobků a plní dosti významnou roli. Stafylokoky ovlivňují fermentované masné výrobky svými vlastnostmi, a to přesněji enzymy v sekundární proteolýze, při níž uvolňují aminokyseliny. Stafylokoky mají významnou funkci při redukci dusičnanů. Významné kmeny, které mají tuto funkci, jsou *S. xylosus*, *S. carnosus*, *S. equorum*, *S. succinus*, *S. saprophyticus*. [4]

## 1.7 Obalová střeva

Celulózová střeva se vyrábí z viskózy, která je získávána chemickým procesem z rostlinných vláken, které jsou velmi bohaté na celulózu. Tato střeva bývají nejčastěji využívána k průmyslové výrobě párků, možné je ale i vyrábět fermentované minisalámy, nejčastěji v kalibrech od 12 do 32 mm různých typů drobných masných výrobků. Celulózová střeva jsou typická tím, že se musí před konzumací výrobku sloupnout. Po sloupnutí zůstává naprosto neporušený, lesklý a hladký povrch výrobku. [3]

Přírodní střeva jsou klasickým obalem pro původní masné výrobky a stále jsou velmi oblíbená pro svoje přirozené vlastnosti (roztžitelnost při narážení a smržitelnost při uzení, vaření a sušení). Přírodní střeva jsou připravována z různých částí zažívací trubice hospodářských zvířat. Předností přírodních střev je, že jsou stravitelné a velice dobře se spojují s náplní. Nevýhodou přírodních střev je jejich vyšší mikrobiální kontaminace, která se snižuje promýváním v roztoku organických kyselin (např. kyseliny vinné a jejich solí apod.). Další nevýhodou je rychlé žluknutí zbytku tuku a vyšší ztráty hmotnosti odpadem technologicky přidané vody. [1]

Kolagenní střeva, jak je patrné z názvu, se vyrábí z kolagenu. Kolagen je získáván z dobytka, a to z mladého hovězího, nebo také vepřového. Střeva bývají ve dvou variantách, v menších a větších kalibrech. Střeva mají jednu výhodu, a to tu, že jsou jedlá. Kolagenní střeva jsou velmi vhodná pro širokou škálu drobných masných výrobků. Kolagenní střívka se svými vlastnostmi podobají střevům přírodním. [3]

Oproti přírodním střevům bývají klihovková střeva tlustší, méně elastická, avšak pro průmyslové účely narážení jsou dodávána kalibrována, řázněná v roubících, což umožňuje vysokou produktivitu narážení. Propouštějí snadno aromatické složky udícího kouře, vodní páru, což se využívá při výrobě trvanlivých, sušených a všech uzených výrobků. [1]

## 2 TECHNOLOGIE VÝROBY FERMENTOVANÝCH MASNÝCH VÝROBKŮ

Typická příchuť sušených fermentovaných uzenin je výsledkem pečlivé rovnováhy mezi těkavými (alkoholy, ketony, aldehydy a furany) a netěkavými sloučeninami (aminokyseliny, peptidy, cukry a nukleotidy), které pocházejí ze surovin (maso, koření, dusitany a další přísady) nebo jsou generované biochemickými reakcemi probíhajícími během fermentace a zrání. [12]

### 2.1 Mělnění, míchání

Mělnění a míchání patří mezi dvě základní operace při zpracování masných výrobků. V dnešní moderní výrobě nelze tyto operace od sebe oddělit, jelikož velmi často probíhají současně. Na moderních mělnících zařízeních, jako jsou vysokootáčkové mísové kutry, nebo různá kontinuální zařízení (mělniče), dochází jednak ke zmenšování částí masa tak i k jejich homogenizaci, promíchávání jednotlivých druhů, či mísení s vodou a dalšími přídatnými látkami. [3]

Základním mělnícím strojem v masné výrobě je řezačka, na které se nejprve zpracovává surovina určená k dalšímu mělnění, poté i hruběji mělněná surovina určená pro vložku. [9]

Jelikož většina evropských produktů má velikost zrna mezi 0,8–3 mm, je tedy pro vytvoření této struktury ideálním zařízením kutr. Kutr se skládá z otočné mísy, ve které se na hřídeli (nožové hlavě) otáčí nože, které rozsekávají masitou surovinu a současně vznikající dílo promíchávají. Při mělnění díla se doporučuje plnit mísu kutru přibližně z poloviny, aby se tak zajistil plynulý tok masa a sádla. [5]

Bílkoviny, především aktin a myosin, tvoří viskózní trojrozměrnou strukturu – matrix (vzniká rozpuštěním bílkovin v roztoku soli). Matrix, kde jsou zachyceny částičky svaloviny, přesněji kolagenu a tuku. Stabilitu této soustavy můžeme ovlivnit buď výrobním postupem nebo přidanými ingrediencemi či samotným zpracováním. Platí, že čím více je narušena struktura svalových vláken, tím více se uvolňují svalové bílkoviny, které následně tvoří prostorovou strukturu. Znamenalo by to tedy, že čím intenzivněji kutrujeme dílo, tím máme stabilnější spojku. To ovšem platí pouze v ideálních podmínkách. V případě, že maso obsahuje tuk, hrozí riziko překutrování – rozmělnění tuku na příliš malé částice, které mají tak velký povrch, že je prostředí s rozpuštěnými bílkoviny nedokáže stabilizovat. Také je třeba respektovat teplotu, jelikož se dílo při teplotách nad 12 °C stává nestabilní. [3, 5, 9]

## 2.2 Narážení do střev

Poté co je dílo rozmělněno na požadovanou velikost částic, je přemístěno do tzv. narážecího zařízení, které následně čerpá dílo do obalových střev. Průměr těchto obalových střev se běžně pohybuje mezi 1,5 – 9 cm. Dílo, které je takto plněno do dlouhého obalového střeva, je nutné rozdělit na požadované délky od cca 5 cm do 1 m. [11]

Teplota pro narážení je závislá na složení a struktuře vložky, použitím obalovém střevě a celkově způsobu narážení. Běžně se uvádí teplota kolem -1 až -2 °C. Používá-li zpracovatel při plnění stroj s řezací hlavou, doporučuje se teplota nižší, a to -3 až -4 °C. Nižší teploty už nejsou vhodné, neboť při nich dochází k ztuhnutí díla v plničce. Plnění díla by mělo nastat bezprostředně po vyjmutí z kutru, resp. po přípravě díla. [3]

Celkový vzhled výrobku, jak na povrchu, tak i v nákreji, se podstatně zlepší odvzdušněním díla při narážení vakuovou narážečkou. V kombinaci s použitím vakua při mělnění, míchání a narážení dojde k úspoře na obalech. Tato úspora může činit až 5 %. Vakuum má také příznivý vliv na rychlost a stabilitu probarvovacích procesů. Dalším požadavkem při narážení je, aby se nerozmazávala vložka (zrněný tuk), ke které dochází hlavně vlivem nevhodného typu narážečky a málo podchlazené tukové tkáně před zahájením kutrování. V této závislosti je také důležité, aby se tak nezhoršil vzhled při nákreji. [8]

## 2.3 Fermentace

Fermentace je jedním z důležitých procesů, které nastávají po vlastní výrobě, a to přesněji po naplnění do střev dílem a po přesunu do zracích komor, kde k fermentaci dochází. Zrací komora je zařízení, kde je daným programem řízena teplota, vlhkost a pohyb vzduchu. Tyto parametry patří k velmi důležité fázi výroby, jelikož ovlivní výsledné organoleptické vlastnosti výrobku, a také dobu trvanlivosti. Obecně platí, že nižší inkubační teploty vyžadují delší dobu fermentace. Např. při nízkých teplotách od 21 do 24 °C může fermentace trvat i 2 dny, zatímco při 29 až 32 °C trvá fermentace 12 – 16 hodin. [11]

Abychom v průběhu fermentace příliš neuspěchali sušení výrobků, je z počátku relativní vlhkost v komoře udržována na hodnotě 90 – 95 %, dále se pak také vyhýbáme vysokému proudění vzduchu. [15]

Abychom získali optimální okyselení, pečlivě vybíráme fermentační kritéria. Obecně má na fermentační proces vliv velké množství faktorů, z nichž jsou nejdůležitější kultury bakterií

(zejména mléčného kvašení), teplota, koncentrace soli a aktivita vody, dále pak přítomné cukry, počáteční pH, míra inokulace, mikrobiální kontaminace surovin, průměr střeva, použité koření a koncentrace dusitanů. Tyto faktory jsou v procesu fermentace důležité z hlediska jejich vlivů na růst bakterií přítomných v kultuře. [15]

## 2.4 Uzení

Kouř používaný při uzení je velmi složitá směs nejrůznějších látek, které se vyskytují ve třech skupenstvích: plynném, kapalném a tuhém. V plynném skupenství můžeme pozorovat dispergující fázi rozptýlené částičky. Pevné i kapalně skupenství jsou tak nepatrné, že je pouhým okem nevidíme. Tyto částičky vznikají při ochlazení zplodin hoření, kdy některé zplodiny kondenzují. [9]

Uzení probíhá v klimatizovaných komorách, které jsou „zakuřovány“ studeným kouřem o teplotě maximálně 25 °C. Kouř je uvolňován ve vyvíječích a potrubím přiváděn v pravidelných časových intervalech do komor po dobu 7–8 dní. Jeho účinek spočívá v aromatizaci výrobků a v jeho povrchovém vybarvení. Látky obsažené v kouři mají zvláště v povrchových vrstvách uzelených masných výrobků také dobrý antioxidační efekt. Velký význam má kouř také pro stabilizaci obalového střeva, kdy zabraňuje růstu plísní a mikroorganismů na povrchu výrobku. [1]

Většina autorů zabývající se touto problematikou zastává názor, že hlavní technologicky významné složky kouře jsou fenoly, karbonylové sloučeniny (aldehydy, ketony) a karboxylové kyseliny. V dřívějších dobách se udilo především kvůli konzervačnímu účinku, avšak dnes je uzení využíváno spíše k aromatizaci výrobku. [9]

## 2.5 Sušení

Fáze sušení je definována jako doba od konce fermentačního cyklu do doby, kdy výrobek dosáhne požadované ztráty hmotnosti a aktivity vody pro mikrobiální stabilitu, a doby, kdy je dosaženo požadovaného vyzrání. Správné textury a pevnosti suchého fermentovaného výrobku je dosaženo během sušení, jelikož je odstraněna voda a jsou denaturovány bílkoviny. Avšak některé polosuché masné výrobky, které mají velmi krátkou dobu výroby a ztrátu hmotnosti 10 – 15 %, mohou být usušeny již během fermentačního cyklu. Na druhou stranu některé tradiční italské a maďarské salámy se suší až 3 – 6 měsíců. [15]

Je-li odpařování z povrchu rychlejší než difuze vody z hlubších vrstev díla, vytvoří se tzv. kroužek v nákreji, který se jeví jako tmavší, zaschlý prstenec různé tloušťky. Difuze vody z hloubky je tím značně ztížena, jelikož se povrch uzavře. Střed nákreje zůstává dlouho nesoudržný, s vysokým obsahem vody a umožňuje tak rychlý a nežádoucí rozvoj mikroorganismů, který vede ke kažení výrobků. [8]

Rychlost sušení je tedy závislá zejména na relativní vlhkosti a na rychlosti vzduchu v sušicí komoře, ale do značné míry také na hodnotě pH během předchozího fermentačního procesu. To znamená, že rychlost sušení je nepřímo ovlivněna faktory, které mají vliv na okyselení. Samotné sušení probíhá vždy při nízkých teplotách, a to okolo 10 – 16 °C, kdy se během procesu snažíme také snížit relativní vlhkost z 85 % až na hodnotu v některých případech 65 – 70 %. Ideální hodnotou relativní vlhkosti by měla být hodnota zhruba o 8 % nižší, než je samotná aktivita vody uprostřed výrobků. Podstatnou roli hraje i vzduch v místnosti. Rychlost ventilace by měly být okolo 0,3 m/s. Tento parametr ale dost ovlivňuje specifický výrobek či komora. [15]

### 3 ÚLOHA MIKROFLÓRY PŘI ZRÁNÍ FERMENTOVANÝCH MASNÝCH VÝROBKŮ

Úloha mikroflóry při zrání je část výrobního procesu, která je podporována bakteriemi. Fermentace masných výrobků byla vždy založena na přítomnosti bakterií mléčného kvašení a bakterií čeledí *Micrococcaceae* a *Staphylococcaceae*. [21]

Mnoho netěkavých sloučenin, jako jsou peptidy a aminokyseliny podílejících se na charakteristickém vývoji chuti, se tvoří během hydrolýzy masných bílkovin. V tomto ohledu má maso přímou nebo nepřímou účast na tomto jevu, a do značné míry určuje senzorické vlastnosti konečného produktu. [16]

#### 3.1 Bakterie mléčného kvašení

Bakterie mléčného kvašení jsou nesporegenní grampozitivní bakterie. Vytvářejí při fermentaci sacharidů hlavní produkt kyselinu mléčnou. Přítomnost kyseliny mléčné pak značně ovlivňuje chuť, vzhled a trvanlivost fermentovaných masných výrobků. [23]

##### Mléčné tyčinky

Mléčné tyčinky (*Lactobacillus* a od něj odvozené rody) jsou dominantní bakterie mléčného kvašení nacházející se ve většině produktů z masa, a jsou původní mikroflórou podílející se na fermentaci. Vybírají se nejdolnější kmeny, které se začleňují do startérových kultur. Všechny mléčné tyčinky ve startérových kulturách jsou homofermentativní mikroaerofilní tyčinky. Tyto tyčinky rostou při nízkém oxidačně-redukčním potenciálu a jejich hlavní funkce je přeměna cukru na kyselinu mléčnou jako jediný produkt. Nejčastěji bývají používány bakterie *Lactiplantibacillus pentosus*, *Lactiplantibacillus plantarum*, *Latilactobacillus sakei* a *Latilactobacillus curvatus*. [22]

##### *Pediococcus*

Zástupci rodu *Pediococcus* jsou v malém množství přirozenou součástí původních fermentovaných masných výrobků. Nejčastěji v salámech amerického typu, kde je používána vysoká teplota při výrobě. Dnes se využívají ve všech startérových kulturách. Jsou schopny štěpit většinu disacharidů, a tím vytvářet u výrobku typickou fermentační kyselou chuť. Využívají se zde bakterie *P. pentosaceus* a *P. acidilactici*. [15]



### 3.2 Mikroorganismy tvořící barvu a chuť

Při procesu zrání dochází k tvorbě chuti a barvy. Pro fermentované masné výrobky mají hlavní roli dvě skupiny mikroorganismů. Nejčastěji to jsou bakterie mléčného kvašení (BMK), o kterých bylo pojednáno výše, koaguláza negativní koky (CNK), případně některé kvasinky. [12]

#### *Staphylococcus*

Bakterie rodu *Staphylococcus* jsou fakultativně anaerobní grampozitivní koky, mají schopnost snížit množství dusičnanů, ale také dusitanů. Tyto bakterie disponují různými enzymy zodpovědnými za chuť fermentovaných masných výrobků. Jedná se konkrétně o aktivitu katalázy, lipolytickou a proteolytickou aktivitu, díky kterým dochází k degradaci aminokyselin či mastných kyselin a tím také k tvorbě sensoricky aktivních sloučenin, které dávají masným výrobkům specifickou chuť a vůni. Nejčastěji používané mikroorganismy jsou *S. carnosus*, *S. xylosum*. [22]

#### *Debaryomyces*

Jedná se o kvasinky, které mají schopnost přežívat v prostředí s vyššími koncentracemi solí. Kvasinky nesnižují množství dusičnanů, naopak spotřebovávají kyselinu mléčnou a octovou. Během zrání touto spotřebou zvyšují pH. Tento druh kvasinek má velmi pozitivní a důležitý vliv na rozvoj chutě masných výrobků. [15]

### 3.3 Mikroorganismy pro krytí povrchu

Ušlechtilé plísňe na masných výrobcích jsou velmi rozšířené. Propůjčují výrobku charakteristický vzhled a chuť. Plísňe, stejně jako kvasinky, oxidují kyselinu mléčnou, čímž zvyšují pH. Plísňe se vyvíjejí na povrchu výrobku a spotřebovávají kyslík, produkují také katalázu, čímž snižují chemickou oxidaci lipidů. Snížením oxidace tedy zabraňují žluknutí tuků a dodávají výrobkům jednu důležitou vlastnost, a to trvanlivost. Díky svým metabolickým aktivitám ovlivňují tvorbu chutě. Plísňe rodu *Penicillium* jsou nejčastěji používané, hlavně kmeny *P. nalgiovense*. Využívá se ale i jiných rodů, a to např. *Aspergillus* a *Scopulariopsis*. [24]

### 3.4 Protektivní kultury

Nejčastěji jsou používány kultury mikroorganismů, které svými vlastnostmi vytvářejí prostředí ve fermentovaných masných výrobcích, které se pro případné nežádoucí mikroorganismy stává nevhodným. [15]

Při kontaminaci ve výrobě se mohou vyskytovat v masných výrobcích nežádoucí mikroorganismy, jako je např. *Listeria monocytogenes*. Toto riziko je potřeba snížit, a to tím, že se použijí kmeny, které jsou schopny zničit buněčnou membránu tohoto mikroorganismu nebo snížit jeho výskyt. Určité kmeny bakterií, které mají schopnost tímto působením snížit riziko, jsou např. *Pediococcus acidilactici* a *Latilactobacillus curvatus* (dříve *Lactobacillus curvatus*), a to díky svým metabolitům (bakteriocinům) pediococinu a curvacinu. [15]

## **II. PRAKTICKÁ ČÁST**

## 4 CÍL PRÁCE

Hlavním cílem práce bylo sledovat vývoj mikroflóry u vybraných modelových vzorků fermentovaných masných výrobků. Po dobu zrání byly odebírány v pravidelném intervalu vzorky a ty byly kultivovány na daných živných půdách.

Dílčí cíle byly stanoveny následovně:

- vyrobit fermentované masné výrobky o různém průměru s vybranými startérovými kulturami mikroorganismů,
- v časových intervalech sledovat zastoupení vybraných indikátorových skupin mikroorganismů,
- zpracovat výsledky mikrobiologické analýzy a formulovat závěry práce.

## 5 VÝROBA MODELOVÝCH VZORKŮ FERMENTOVANÝCH MASNÝCH VÝROBKŮ

### 5.1 Použité stroje pro výrobu

- Kutr Command 500 K (Seydellmann, Země výroby Německo) (Obr. 1)
- Řezačka masových částí (Talsa, Země výroby Španělsko)
- Vakuová narážečka na masné výrobky Sausage-linker, Filler (Vemag, Země výroby Německo)
- Klimatizovaná zrací komora s regulátorem teploty (Masoprofit ČR, Země výroby Itálie)
- Pomocné pomůcky: deska na krájení masa, kuchyňské nože, uzenářské hůlky, propustné obaly (Cutisin) 24 a 55 mm průměr

### 5.2 Složení modelových vzorků fermentovaných masných výrobků

V tabulce 1 nalezneme složení surovinové směsi, která byla použita pro výrobu modelových vzorků fermentovaných masných výrobků.

Tabulka 1: *Surovinová skladba modelových vzorků fermentovaných masných výrobků*

Název suroviny	Navážka [g]
Hovězí plec	2500
Hřbetní sádlo	2500
Vepřová kýta	2500
Dusitanová solící směs	150
Dextróza	5,4
Startérová kultura LHP-DRY	2

Startérové kultury, které byly při výrobě použity a přidány do díla jsou charakterizovány v tabulce 2. U každé startérové kultury byla stanovena navážka dodavatelem.

Tabulka 2: Startérové kultury použité pro výrobu modelových vzorků a jejich označení

Kultura	Navážka [g]	Označení	Latinský název
Bactoferm C-P-77	2,5	C	<i>Staphylococcus carnosus</i>
Bactoferm S-SX	2,5	X	<i>Staphylococcus xylosus</i>
LHP-DRY	2	K	<i>Pediococcus acidilactici</i> a <i>P. pentosaceus</i>
Bactoferm CS-299	1	S	<i>Staphylococcus carnosus</i>

### 5.3 Postup výroby modelových vzorků fermentovaných masných výrobků

- I. Kousky hřbetního sádla byly nakrájeny na kousky o velikosti 10\*10 mm.
- II. Plec hovězí byla pomleta pomocí řezačky masa přes otvory o velikosti 8 mm.
- III. Vepřová kýta (1. část – 1800 g, přesněji vložka) byla pomleta pomocí řezačky masa přes otvory o velikosti 8 mm.
- IV. Vepřová kýta (2. část – 700 g, přesněji spojka) byla pomleta pomocí řezačky masa přes otvory o velikosti 3 mm.
- V. Byla přidána dextróza, dusitanová solící směs a startérová kultura.
- VI. Pro spojení se tyto suroviny byly promíseny v kutru (Obrázek 1).
- VII. Před samotným plněním do propustných kolagenních obalů byla střeva namáčena v 5% roztoku soli.
- VIII. Na vakuové narážečce připravené pro plnění masných výrobků, bylo dílo plněno do propustných kolagenních obalů (cutisinu) (Obrázek 2).
- IX. Po uvázání konce střeva se dílo plnilo do obalových střev o průměru 24 a 55 mm. (Výrobky, které byly plněny do obalových střev o průměru 24 mm, lze označit jako malé párky a naopak výrobky, které byly plněny do střev o větším průměru 55 mm, měly charakter salámů) (Obrázek 3; Obrázek 4).
- X. Takto naplněné vzorky byly přesunuty do zrací komory (Obrázek 5).



Obrázek 1: Kutr Command 500 K



Obrázek 2: Narážení do celulókových střev



Obrázek 3: Uzlování naplněného díla



Obrázek 4: Uzlování





Obrázek 5: Zrací komora

#### 5.4 Zrání a fermentace

Při procesu fermentace, sušení a skladování byl zvolen postup, který je uveden v tabulce 3. Tento postup byl zvolen tak, aby bylo dosaženo optimálního vývoje mikroorganismů. Jsou zde důležité faktory jako je čas a teplota, které ovlivňovaly celý tento proces a následně i vývoj mikroflóry ve fermentovaných masných výrobcích.

Tabulka 3: *Proces fermentace*

Čas [den]	Proces	Teplota [°C]
1.	Fermentace	28-29
2.-21.	Sušení	18-28
22.-78.	Skladování	6-8

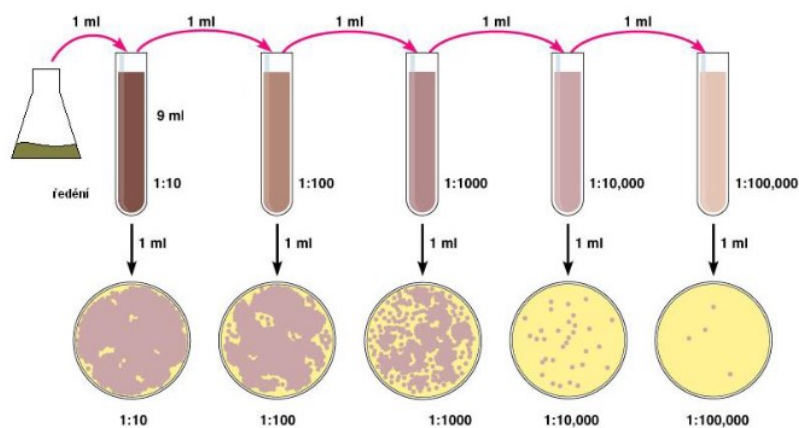
## 6 MIKROBIOLOGICKÁ ANALÝZA MODELOVÝCH VZORKŮ FERMENTOVANÝCH MASNÝCH VÝROBKŮ

### 6.1 ODBĚR VZORKŮ

Vzorek fermentovaného salámu (5 g) byl sterilně odebrán a smíchán se 45 ml fyziologického roztoku. Směs byla zhomogenizovaná v homogenizátoru (180 sekund) a tím bylo získáno ředění  $10^{-1}$ . Homogenizaci bylo zabráněno, aby při odebírání vzorků překážely velké částice v hrdle mikropipety a aby zkreslily výsledky. Byl použit fyziologický roztok jako ředící roztok o pH 7,1.

### 6.2 Řada zředění

Hlavní účel ředění (obr. 6) je dosažení koncentrace mikroorganismů v daném vzorku tak, aby se narostlé kolonie v naočkovaných živných půdách vzájemně nedotýkaly. Provádí se to také z důvodu, aby byly mikroorganismy na živných půdách dobře počitatelné.



Obrázek 6: Schéma řady zředění [20]

### 6.3 Očkování na tuhé živné půdy

Očkování na živné půdy bylo prováděno ve sterilním prostředí u kahanu. Na živnou půdu bylo pomocí mikropipety inokulováno 0,1 ml příslušně ředěné kultury, které následně bylo pomocí sterilní skleněné hokejky rozetřeno po celé ploše agarů v Petriho misce.

### 6.4 Zjišťované druhy mikroorganismů

V tabulce 4 jsou uvedeny vybrané indikátorové skupiny mikroorganismů, které byly v rámci naší studie sledovány. Tabulka také uvádí selektivní kultivační půdy, na kterých byly tyto mikroorganismy kultivovány.

Tabulka 4: Živné půdy se sledovanými mikroorganismy

Kultivační půda	Sledované mikroorganismy
PCA	Celkový počet mikroorganismů
MRS	Bakterie mléčného kvašení
MSA	Stafylokoky
CHYGA	Kvasinky a plísňe
ENDO agar	Koliformní bakterie

#### 6.4.1 Stanovení celkového počtu mikroorganismů

Stanovením celkového počtu mikroorganismů (CPM) bylo provedeno dle normy EN ISO 4833-2:2013. Norma specifikuje horizontální metodu stanovení počtu mikroorganismů počítáním kolonií vyrostlých na dané pevné půdě. [25] Pro stanovení celkového počtu mikroorganismů byl použit Plate count agar (tabulka 5).

Tabulka 5: Složení živné půdy PCA

Složka	m [g]
Voda	1000
Agar	15
Hydrolyzát kaseinu	5
Kvasničný extrakt	2,5
Glukóza	1

Všechny složky byly po navážení a nalití vody sterilizovány v autoklávu při teplotě 121 °C po dobu 15 minut a poté rozlity na misky. Po utužení byly plotny zaočkovány příslušným

inokulem. Takto naočkované plotny byly inkubovány aerobně při teplotě 30 °C po dobu 72 hodin. [25]

#### 6.4.2 Stanovení mléčných tyčinek

Norma EN ISO 15214:1998 se zabývá stanovením laktobacilů (nyní po rozčlenění rodu *Lactobacillus* do dalších rodů. Selektivní živná půda označována MRS se v potravinářství používá ke stanovení počtu mléčných tyčinek (laktobacilů). Využívá se konkrétně pro stanovení bakterií v mase, masných výrobcích a dalších potravinách. [26] Složení této půdy je uvedeno v tabulce 6.

Tabulka 6: Složení živné půdy MRS [27]

Látka	m[g]
Masový pepton	10
Hovězí extrakt	8
Kvasničný extrakt	5
Glukosa	20
Polysorbát 80	1
Citran amonný	2
Octan sodný	5
Heptahydrát síranu hořečnatého	0,2
Tetrahydrát síranu manganatého	0,05
Hydrogenfosforečnan (di)draselný	2
Agar	12

Příprava živné půdy:

Bylo naváženo 65,25 g půdy do 1000 ml destilované vody a zahříváno do úplného rozpuštění. Následně byla provedena sterilace v autoklávu při 121 °C po dobu 15 minut. Sterilizovaná živná půda byla rozlévána do plastových Petriho misek za aseptických podmínek. Po zchlazení byly Petriho misky zavřeny a po vychlazení uloženy do lednice. Poté bylo očkováno inokulum, které bylo kultivováno při teplotě 30 °C po dobu 72 hodin v anaerostatu. [26]

#### 6.4.3 Stanovení stafylokoků

Pro stanovení stafylokoků je nejčastěji využívána agarová půda s manitolem a s vyšší koncentrací soli (Manitol Salt Agar, MSA; tabulka 7).

Zpracovaná živná půda se upravuje na pH 7,4 při 25 °C, poté je autoklávovaná při 121 °C 15 minut. Samotná kultivace probíhá při 37 °C po dobu 24 – 48 hodin.

Tabulka 7: Složení živné půdy MSA

Složka	m [g]
Voda	1000
Agar	15
Chlorid sodný	75
D-manitol	10
Hovězí bujon	1
Pepton	10
Fenolová červeň	0,025

#### 6.4.4 Stanovení kvasinek a plísní

Účelem stanovení bylo zjistit zastoupení počtu kvasinek a plísní. Pro toto stanovení byla využita živná půda CHYGA (Chloramfenicol yeast glucose agar, tabulka 8), chloramfenikol v této půdě inhibuje růst bakterií. [28]

Tabulka 8: Složení živné půdy CHYGA

Složka	m [g]
Voda	1000
Agar	15
Chloramfenikol	0,1
Kvasničný extrakt	2,5
Glukóza	20

Po navážení příslušného množství půdy a přidání vody byla živná půda autoklávovaná při 121 °C po dobu 15 minut. Po vychlazení a vyočkování byly Petriho misky kultivovány při teplotě 25 °C, po dobu 2–5 dnů. [28]

#### 6.4.5 Stanovení enterobakterií

Pro stanovení enterobakterií byl využit ENDO agar (tabulka 9), který obsahuje žlučové soli a krystalovou violet, které mají inhibiční účinky pro většinu grampozitivních mikroorganismů. [29]

Tabulka 9: Složení živné půdy ENDO agar

Složka	m [g]
Pepton speciál	8
Laktosa	10
Chlorid sodný	3
Hydrogenfosforečnan (di)draselný	2
Siřičitan sodný	2,5
Basický fuchsin	0,2
Agar	12

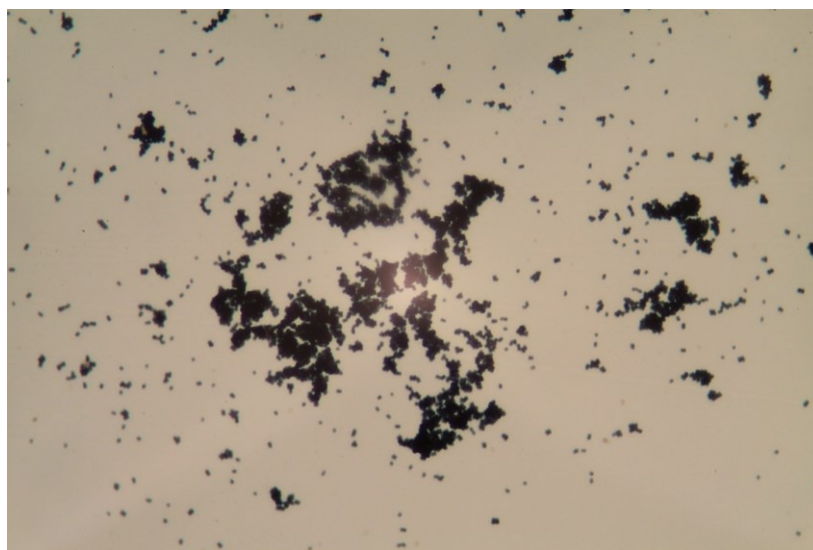
Byla použita dehydratovaná hmota, která se smíchala s vodou a po rozpuštění byla upravena na hodnotu pH 7,4. Živná půda byla autoklávovaná při 121 °C 15 minut. Po rozlití následovalo očkování suspenze. Petriho misky se suspenzi se následně inkubovaly v termostatu při teplotě 37 °C po dobu 24 hodin. [29]

## 7 VÝSLEDKY A DISKUSE

### 7.1 Sledování vybraných znaků izolovaných kultur

Po kultivaci mikroorganismů (MO) byla provedena mikroskopická kontrola izolovaných bakterií pomocí Gramova barvení, zda se jedná o bakterie grampozitivní (G+) nebo gramnegativní (G-). Samotný princip spočívá v diagnostické metodě, kdy se obarví fixovaný preparát, který je následně podroben moření krystalovou violetí. Po opláchnutí destilovanou vodou je převrstven Lugolovým roztokem a záhy odbarven acetonem. Poslední a důležitý krok nastává, když je preparát dobarvován safraninem. Sklo se pak opláchně vodou, osuší a následně lze pozorovat.

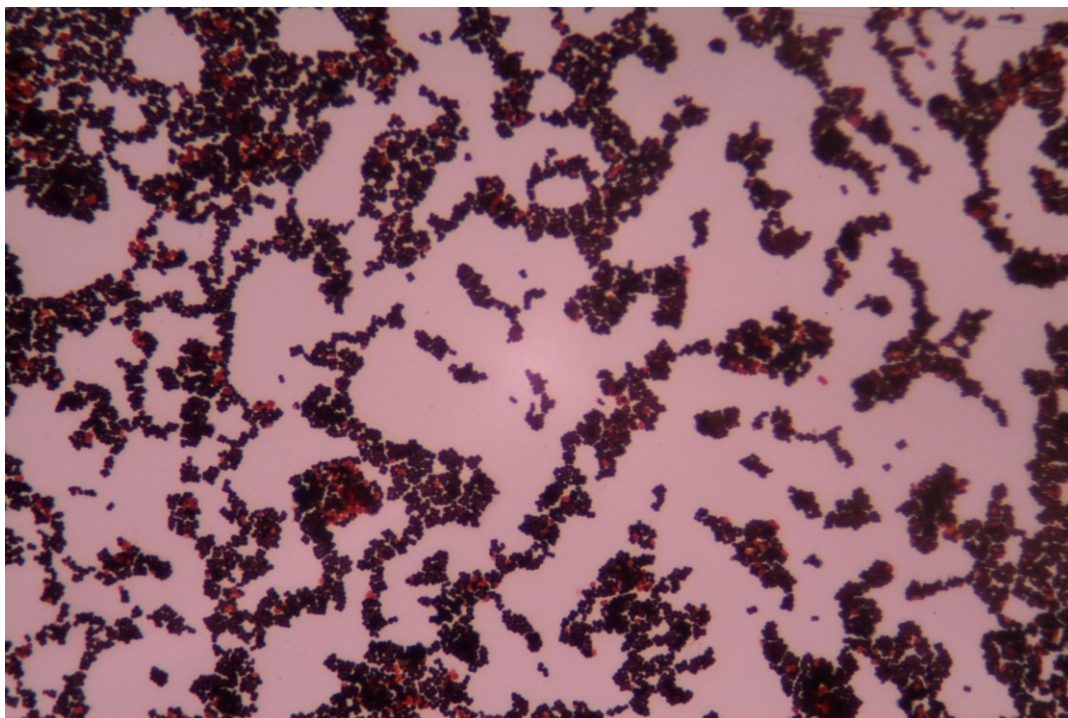
Gramnegativní mikroorganismy jsou červené až růžové, zatímco grampozitivní bakterie jsou fialově až namodralé.



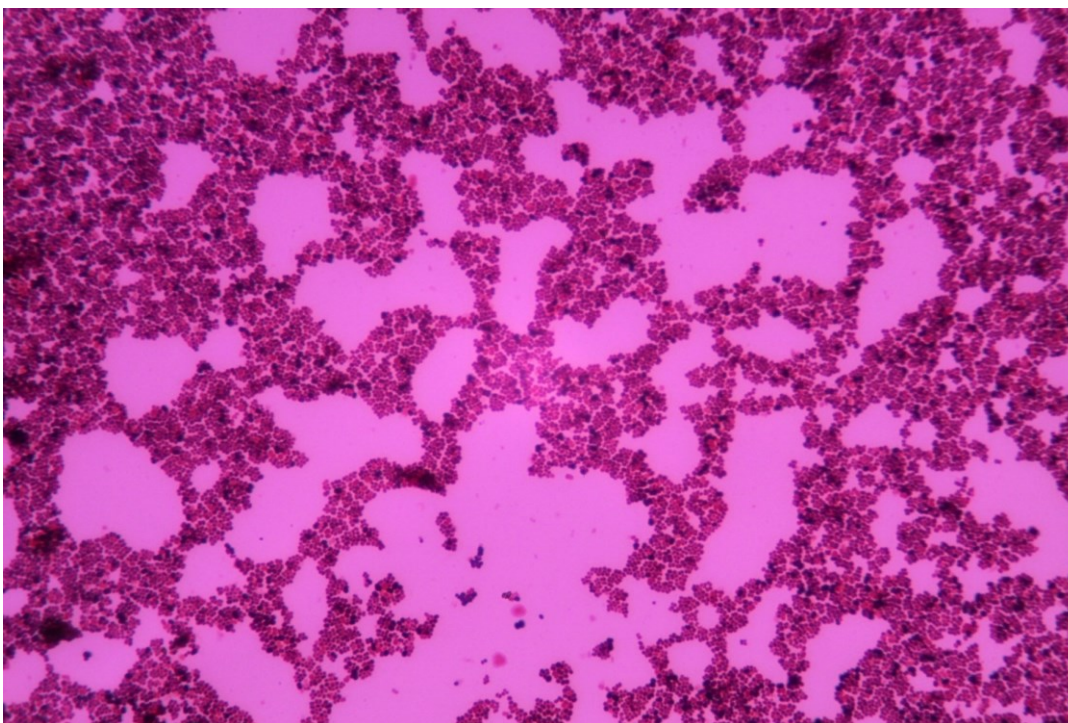
Obrázek 7: *Pediococcus* ve výrobku po 24 hodinách od výroby

Při posledním měření dne 15. 4. 2021 byly pořízeny snímky z mikroskopu pro kontrolu, zda se po dané době vyskytovaly pediokoky (Obr 7-9).





Obrázek 8: *Grampozitivní koky ve fermentovaném masném výrobku o průměru 24 mm*



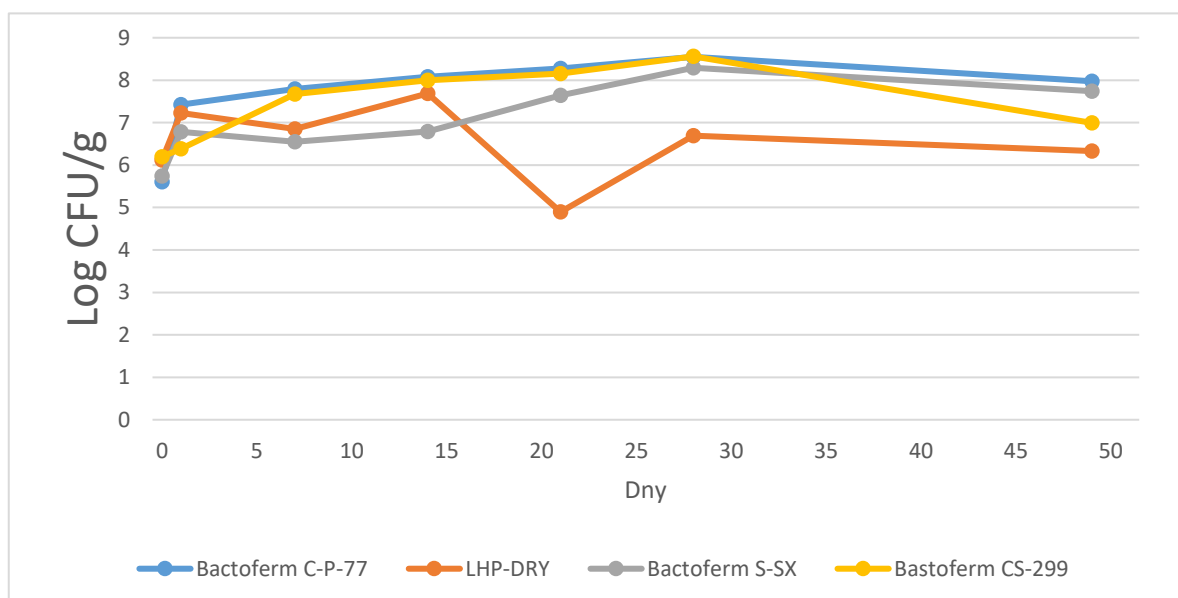
Obrázek 9: *Grampozitivní koky ve fermentovaném masném výrobku o průměru 55 mm*



## 7.2 Hodnocení nárůstu mezofilních aerobních a fakultativně anaerobních mikroorganismů

Z grafu na obrázku 10 je patrné, že ve výrobku o průměru 24 mm ("párku") mikroorganismy do třech týdnů vykazovaly stabilní nárůst. Kromě výrobků, kde byla přidána kontrolní kultura LHP-DRY *Pediococcus acidilactici* a *P. pentosaceus*, došlo po třech týdnech ke snížení mikrobiální aktivity. V případě výrobků, kde byly přidány stafylokokové kultury, došlo k výraznějšímu nárůstu celkového počtu mikroorganismů. Tato skutečnost je pravděpodobně způsobena nárůstem počtu kulturních stafylokoků, které byly schopny růstu za těchto podmínek.

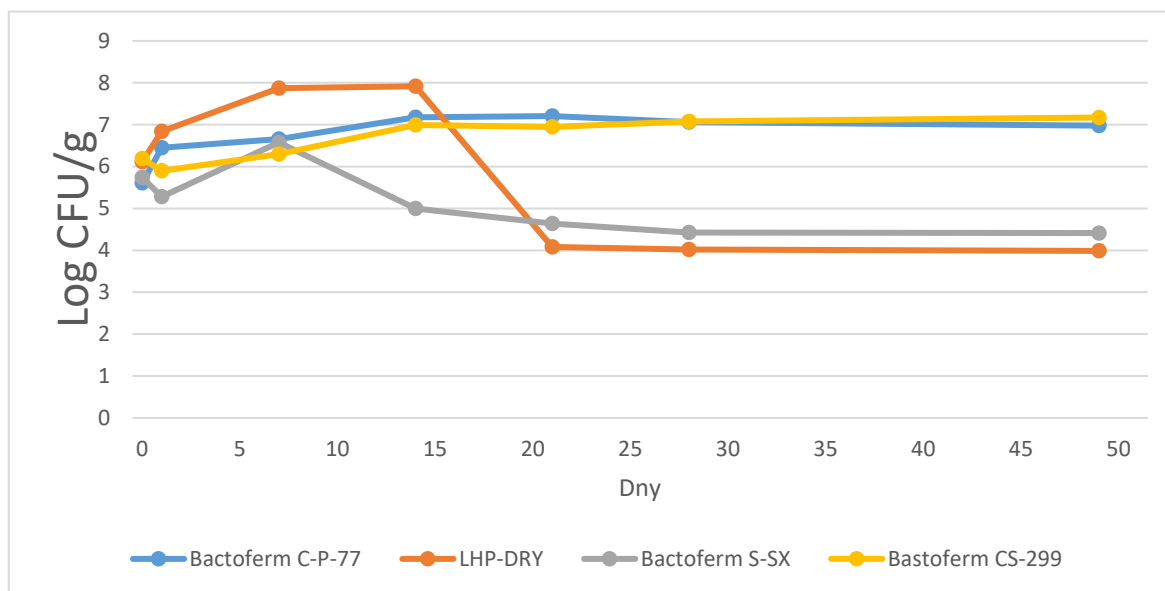
Od třetího týdne lze pozorovat u výrobků zaočkovaných kulturou Bactoferm CS-299 znásobení počtu mikroorganismů během jednoho týdne na více jak dvojnásobek, z  $1,4 \cdot 10^8$  CFU/g na  $3,6 \cdot 10^8$  CFU/g. Z grafu je patrné, že ve výrobcích zaočkovaných kulturou Bactoferm C-P-77 došlo k obdobnému nárůstu. Po kontrolním měření po 7. týdnech od výroby bylo zaznamenáno, že u všech fermentovaných masných výrobků docházelo k mírnému úbytku v počtu mikroorganismů. Toto bylo nejspíše způsobeno vyčerpáním živin pro mikroorganismy a nástupem počátku fáze zpomalení/zrychleného umírání.



Obrázek 10: Celkový počet mikroorganismů ve výrobku o průměru 24 mm (párka)

Na obrázku 11 lze pozorovat, že v období od 1. dne od výroby do 1. týdne byl pozorován pozvolný nárůst mikroorganismů u výrobků o průměru 55 mm zaočkovaných kulturou Bactoferm C-P-77 a kontrolní kulturou LHP-DRY. Mikroorganismy ve výrobcích

zaočkovaných kulturami Bactoferm CS-299, S-SX se chovaly odlišně, během prvního týdne došlo v těchto modelových vzorcích k mírnému poklesu celkového počtu mikroorganismů. V druhém týdnu se počet mikroorganismů pohyboval v rozmezí  $0,9-1 \cdot 10^8$  CFU/g. Od 3. týdne je patrné, že počet mikroorganismů se až do posledního měření téměř nezměnil.



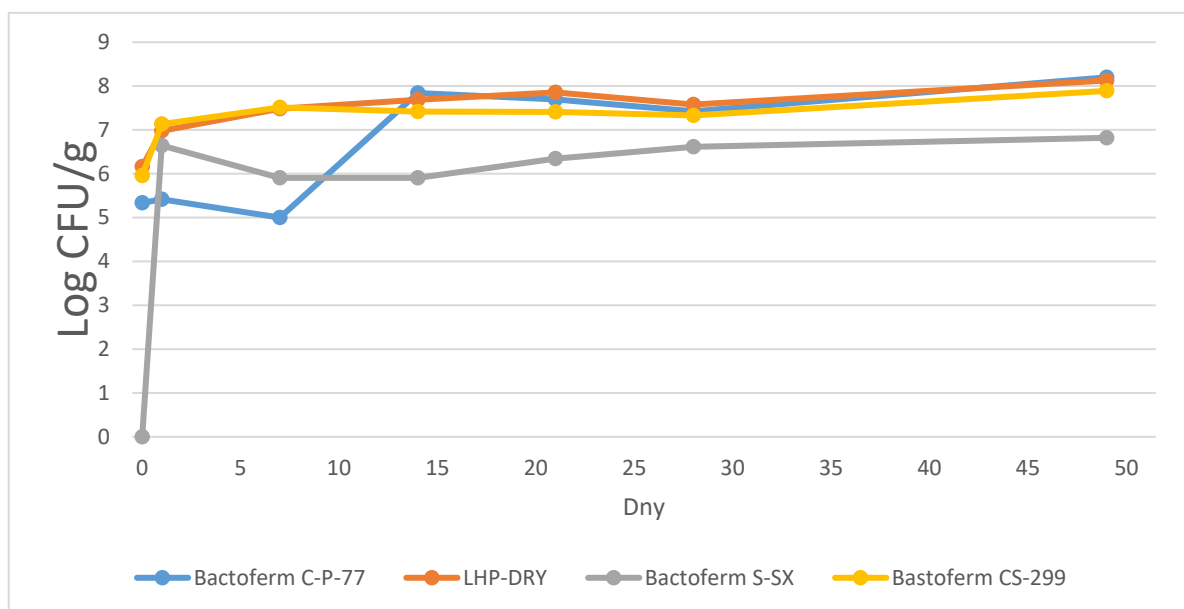
Obrázek 11: Celkový počet mikroorganismů ve výrobku o průměru 55 mm (tyč)

Při porovnání grafů na obrázcích 10 a 11 (výrobky o větším a menším průměru) je patrné, že u výrobků, které byly menší, byl znatelně větší nárůst mikroorganismů. Během prvních dvou týdnů byl nárůst mikroorganismů u obou typů výrobků obdobný. Existuje hned několik faktorů, které mohly zapříčinit u fermentovaných masných výrobků o průměru 24 mm (párku) větší nárůst než u tyčí. Při zpracování byl každý malý výrobek zpracováván (uzlován) ručně, prostupnost vzduchu do nitra výrobku byla lepší než do výrobku o průměru 55 mm. Výrobek tak mohl být lepším médiem pro mikroorganismy. Fermentovaný masný výrobek o menším průměru obsahoval 14. den od výroby vyšší celkový počet mikroorganismů oproti výrobku s větším průměrem. Maximální hodnoty počtu mikroorganismů byly dosaženy u modelových vzorků s kulturou Bactoferm CS-299, přesněji  $1,1 \cdot 10^8$  CFU/g.

### 7.3 Hodnocení nárůstu bakterií mléčného kvašení

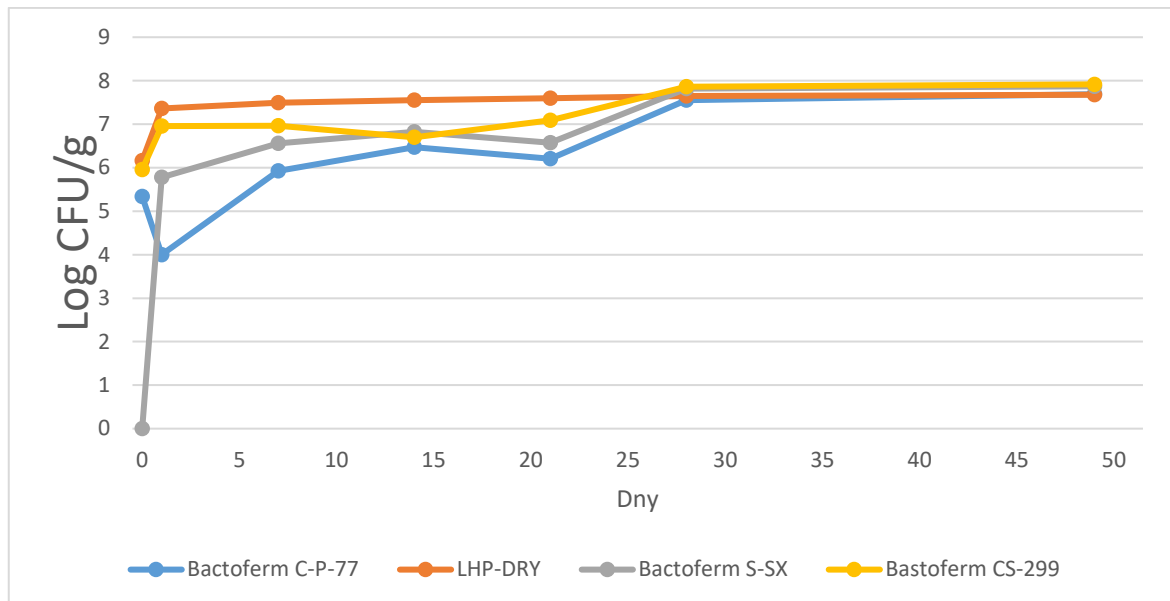
Vývoj bakterií mléčného kvašení v průběhu zrání vykazoval u každé kultury jiné hodnoty, jak lze vidět na obrázku 12. U výrobků zaočkovaných kulturami LHP-DRY

(kontrolní kultura) a Bactofem CS-299 se projevil poměrně rychlý nárůst mléčných bakterií během 1. dne, respektive týdne. Po 4 týdnech od výroby počet BMK u výrobků o průměru 24 mm zaočkovaných kulturou LHP-DRY dosáhl hodnoty  $7 \cdot 10^7$  CFU/g. U modelových vzorků zaočkovaných kulturou Bactoferm CP-77 téměř nedošlo během 1. týdne k nárůstu sledovaných bakterií, mezi 1. a 2. týdnem nastal rozdíl, kdy došlo ke zvýšení počtu BMK až na hodnotu  $6,9 \cdot 10^7$  CFU/g, sedmý týden dosahovaly hodnoty  $1,6 \cdot 10^8$  CFU/g. U výrobků, do nichž byla přidána kultura Bactoferm CS 299, došlo k nárůstu počtu BMK už během 1. týdne a poté po dobu 3. týdnů došlo jen k mírnému snížení počtu sledovaných bakterií. Po 4. týdnu bylo možné pozorovat obdobný trend jako u kultur LHP-DRY a Bactoferm CS-299, tedy nárůst mikroorganismů až na hodnotu  $7,7 \cdot 10^7$  CFU/g.



Obrázek 12: Nárůst bakterií mléčného kvašení ve výrobku o průměru 24 mm (párek)

V modelových vzorcích o větším průměru (55 mm) zaočkovaných kontrolní kulturou LHP-DRY, došlo během prvního týdne k nárůstu počtu BMK do hodnot  $3 \cdot 10^7$  CFU/g a poté počet BMK začínal pomalu stagnovat a výrazněji se neměnil až do poslední analýzy. U modelových vzorků zaočkovaných ostatními testovanými kulturami nastal výraznější zlom 3. týden. Vzorky zaočkované kulturami Bactoferm S-SX a CS-299 se chovaly obdobně. Ve 3. týdnu se hodnoty počtů BMK u výrobků s průměrem 55 mm (tyčí) zaočkovaných kulturou Bactoferm S-SX pohybovaly kolem  $3,8 \cdot 10^7$  CFU/g, následující týden byl zaznamenán nárůst na hodnotu  $6,6 \cdot 10^7$  CFU/g. Při kontrolním měření sedmý týden už nebyl nárůst tak skokový, hodnota po 7. týdnech od výroby dosahovala  $7,5 \cdot 10^7$  CFU/g.



Obrázek 13: *Nárůst bakterií mléčného kvašení ve výrobku o průměru 55 mm (tyč)*

Už na první pohled je zřejmé z obrázku 12, že menší výrobky (párky) prospívají množení mléčných bakterií. U menších výrobků dosahovaly maximální hodnoty BMK po 3 týdnech u kultury LHP-DRY  $7,1 \cdot 10^7$  CFU/g, zatímco u větších výrobků zaočkových stejnou kulturou dosahovala ve stejném období hodnoty o něco nižší, a to  $4 \cdot 10^7$  CFU/g (obrázek 13).

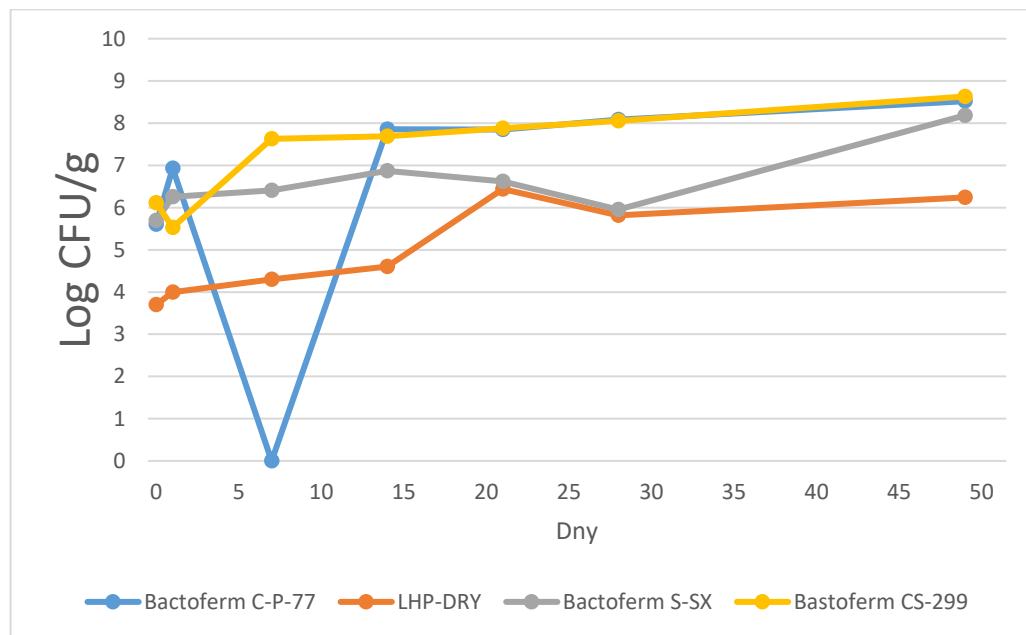
Výrobky zaočkované kulturou Bactoferm CS-299 vykazovaly obdobný trend, ale u menšího výrobku nastal zlom po 4. týdnu, zatímco u většího výrobků nastal zlom už ve 3. týdnu. Kultura Bactoferm S-SX se jeví jako lepší pro větší výrobky, jako je tyč o průměru 55 mm. Poslední testovaná kultura Bactoferm C-P-77 vykazovala během 1. týdne u obou výrobků pomalý náběh. Mezi 2. a 4. týdnem nedocházelo u obou typů výrobků zaočkovaných touto kulturou k výraznějšímu zvýšení počtu BMK, podobný trend byl pozorován až do konce experimentu (do 7. týdne).

#### 7.4 Hodnocení nárůstu koaguláza-negativních stafylokoků

Od počátku výroby během prvních 24 hodin od výroby byly u výrobků o menším průměru zaznamenány minimální nárůsty koaguláza-negativních stafylokoků, jak lze vidět na obrázku 14. U modelového vzorku s kulturou Bactoferm CS-299 byl zaznamenán nárůst v prvním týdnu, kdy zjištěné hodnoty počtu stafylokoků dosahovaly  $4,2 \cdot 10^7$  CFU/g. Po uplynutí dvou týdnů se hodnota mírně zvýšila na  $7,5 \cdot 10^7$  CFU/g. Z obrázku 14 je patrné, že

se nárůst stafylokoků v modelovém vzorku zvyšoval až do konce experimentu. Při posledním měření 7. týden od výroby byl zjištěný počet stafylokoků  $4,3 \cdot 10^8$  CFU/g. Modelový vzorek o průměru 22 mm zaočkovaný kulturou Bactoferm C-P-77 vykazoval obdobné trendy v chování stafylokoků jako výrobky zaočkované kulturou Bactoferm CS-299. Během prvních 24 hodin byl nárůst minimální, pozvolný nárůst byl do konce 1. týdne od výroby. Ve druhém týdnu byl zaznamenán nárůst k hodnotě  $7,2 \cdot 10^7$  CFU/g a ten stagnoval až do třetího týdne měření. Od třetího týdne byl zjištěn nárůst stafylokoků na hodnoty  $1,1 \cdot 10^8$  CFU/g a při kontrolním měření poslední týden experimentu dosahoval hodnot  $3,3 \cdot 10^8$  CFU/g. Modelový výrobek, do kterého byla na počátku výroby přidána kultura Bactoferm S-SX, vykazoval do 4. týdne nižší hodnoty počtu stafylokoků. Zlom nárůstu stafylokoků byl zaznamenán mezi 4. a 7. týdnem, v 7. týdnu potom dosahovaly hodnoty  $1,5 \cdot 10^8$  CFU/g.

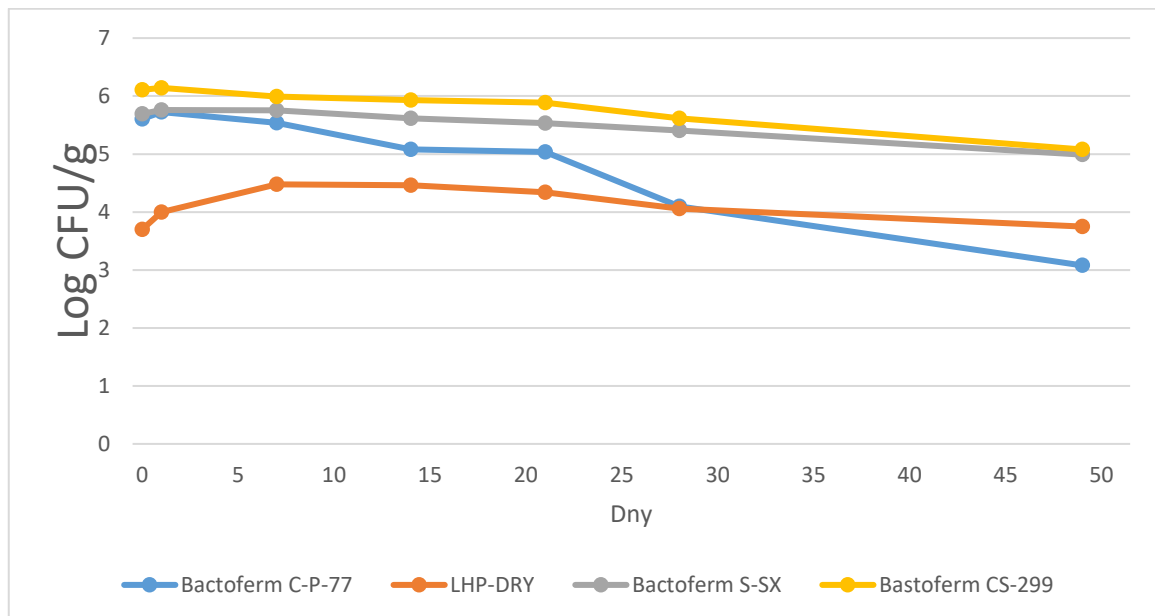
Výrobek s kontrolní kulturou LHP-DRY vykazoval nižší hodnoty počty stafylokoků, jelikož tato kultura obsahovala pouze pediokoky, a to přesněji *Pediococcus acidilactici* a *P. pentosaceus*.



Obrázek 14: Nárůst stafylokoků ve výrobku o průměru 24 mm (párek)

Při porovnání většího výrobku (obrázek 14) s malým výrobkem (obrázek 15) je zřejmé, že vývoj stafylokoků vykazoval obdobný trend, jako tomu bylo v případě aerobních a fakultativně anaerobních mezofilních mikroorganismů. Ve větších fermentovaných

masných výrobcích ("salámech") se stafylokoky v modelových výrobcích zpočátku vyvíjely pomaleji, postupně se však jejich zastoupení zvyšovalo až na hodnoty cca  $1,5 \cdot 10^8$  CFU/g. Zatímco u menších FMV se počet stafylokoků od výroby postupně snižoval. Největší rozvoj u obou typů výrobků byl pozorován s přidavkem kultury Bactoferm CS-299.



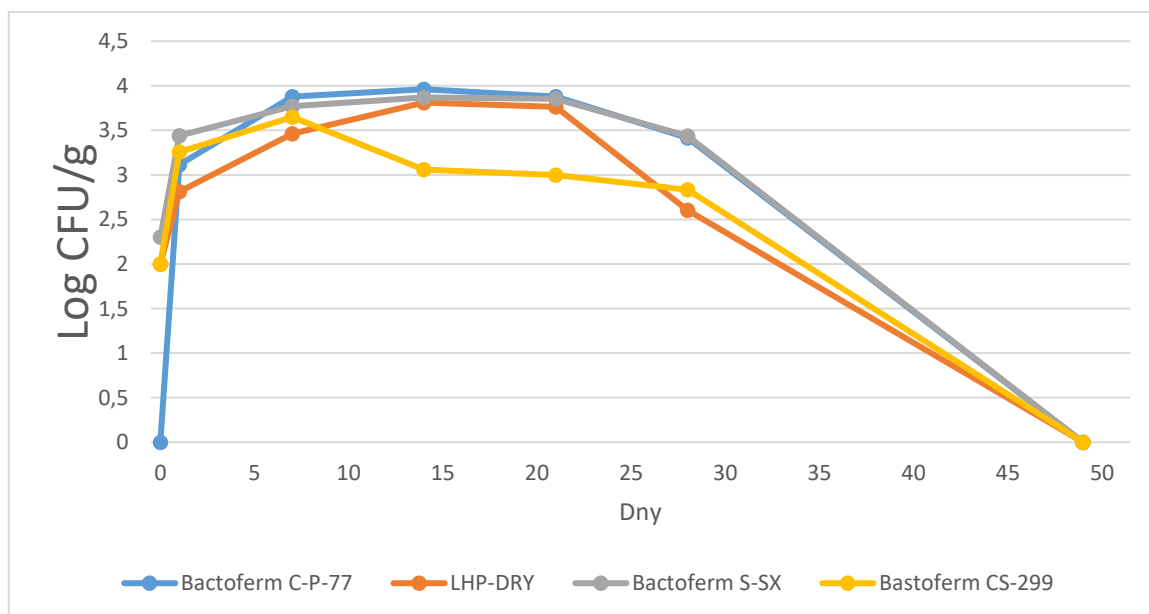
Obrázek 15: *Nárůst stafylokoků ve výrobku o průměru 55 mm (tyč)*

Jak vidíme na obrázku 15, tak u výrobků o průměru 55 mm zaočkovaných kulturou Bactoferm CS-299 byl na počátku zjištěn nejvyšší počet stafylokoků, a časem se jejich počet snižoval až na hodnotu o cca jeden řád nižší v sedmém týdnu od výroby. Výrobky s přidavkem kultury Bactoferm S-SX vykazovaly v den výroby  $4,9 \cdot 10^5$  CFU/g stafylokoků, s postupem času se taktéž hodnoty snižovaly na hranici  $9 \cdot 10^4$  CFU/g, které byly naměřeny v sedmém kontrolním týdnu. V modelových tyčích s přidanou kulturou Bactoferm C-P-77 byly po 24 hodinách od výroby zjištěny největší hodnoty počtu stafylokoků, které byly na hranici  $5,3 \cdot 10^5$  CFU/g. S časem se počet stafylokoků u těchto výrobků postupně snižoval, kdy po sedmi týdnech od počátku výroby nastal pokles o cca 2 řády.

Poslední modelové výrobky zaočkované kulturou LHP-DRY, která neobsahovala stafylokoky, vykazovaly znatelně nižší hodnoty počtu stafylokoků než u jiných výrobků. Výjimkou byl sedmý týden, kdy u těchto výrobků byl zjištěn vyšší počet stafylokoků než u vzorků zaočkovaných kulturou Bactoferm C-P-77.

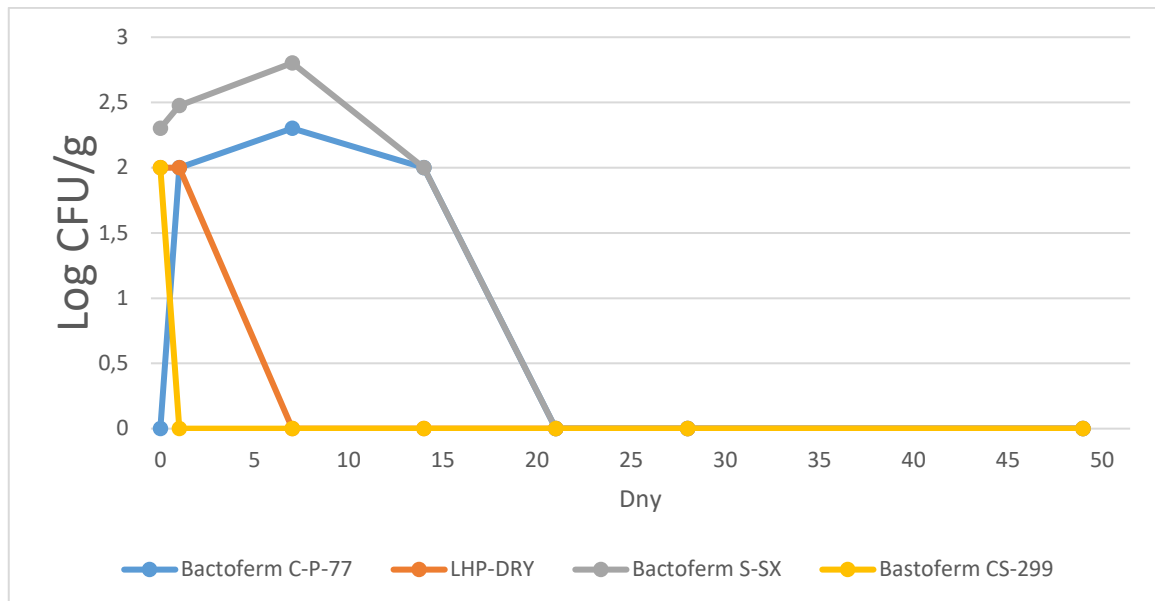
## 7.5 Hodnocení nárůstu kvasinek a plísní

Výrobky zaočkované kulturami LHP-DRY, Bactoferm S-SX a Bactoferm C-P-77 vykazovaly obdobný trend ve vývoji kvasinek a plísní. U těchto výrobků došlo během prvního týdne ke zvýšení počtu kvasinek až na hodnoty cca 4 log CFU/g, poté se během dalších dvou týdnů počet kvasinek a plísní výrazněji neměnil, od třetího týdne se počet kvasinek a plísní u modelových vzorků zaočkovaných výše zmíněnými kulturami rychle snižoval. Nejdůležitější poznatek byl, že při kontrolním měření po 49 dnech od výroby nebyl zaznamenán ani u jednoho modelového vzorku nárůst kvasinek a plísní, jak ukazuje obrázek 16. Všechny kultury vytvořily po této době ve výrobku nepříjemné podmínky jak pro kvasinky (pravděpodobně snížením hodnoty vodní aktivity), tak pro plísně změnou pH.



Obrázek 16: *Nárůst kvasinek a plísní ve výrobku o průměru 24 mm (párek)*

Jak můžeme vidět na obrázcích 16 a 17, rozvoj kvasinek a plísní ve fermentovaných masných výrobcích byl větší u modelových výrobků o menším průměru (párek), kde dosahoval hodnot v rozmezí  $4 - 9,2 \cdot 10^3$  CFU/g, než u větších modelových výrobků, kde byla zaznamenána maximální hodnota  $6,4 \cdot 10^2$  CFU/g.



Obrázek 17: *Nárůst kvasinek a plísni ve výrobku o průměru 55 mm (tyč)*

Už na první pohled lze na obrázku 17 vidět, že výrobky s přídavkem kultury Bactoform CS-299 vykazovala po celou dobu, kromě dne výroby, nulové hodnoty počtu kvasinek a plísni. Výrobky zaočkované kulturou Bactoform S-SX vykazovaly 7. den měření největší hodnoty počtu kvasinek a plísni, a to  $6,4 \cdot 10^2$  CFU/g, poté se počet kvasinek a plísni v těchto vzorcích snižoval, až po třech týdnech nebyla v těchto výrobcích detekována přítomnost kvasinek a plísni. U modelových vzorků o průměru 55 mm s kontrolní kulturou LHP-DRY byly v den výroby a 1. den od výroby zaznamenány stejné hodnoty počtu kvasinek a plísni, a to  $1 \cdot 10^2$  CFU/g. Poté už v těchto fermentovaných masných výrobcích přítomnost kvasinek a plísni nebyla zjištěna.

## 7.6 Hodnocení nárůstu koliformních bakterií

Během kultivace vzorků všech testovaných modelových vzorků FMV (zaočkovaných čtyřmi různými startérovými kulturami) nebyly na živných půdách pro enterobakterie, včetně koliformních bakterií (ENDO agar) zaznamenány žádné nárůsty enterobakterií nebo koliformních bakterií. Tento výsledek ukazuje na to, že při výrobě byly dodrženy všechny technologické postupy a také byly dodrženy podmínky správné hygienické praxe.



## 7.7 Senzorické hodnocení

Během odebrání modelových vzorků byla prováděna i senzorická analýza. Panel hodnotitelů se z důvodu epidemických opatření v důsledku onemocnění Covid 19 a distanční výuky skládal pouze z omezeného počtu osob, které se podílely na výrobě modelových vzorků nebo mikrobiologické analýze. Z důvodu velmi nízkého počtu hodnotitelů, tak senzorická analýza nemohla poskytnout objektivní výsledky.

Při senzorickém hodnocení (párová porovnávací zkouška) byly většinou preferovány modelové vzorky obsahující kontrolní kulturu LHP-DRY (*Pediococcus acidilactici* a *P.pentosaceus*), která neobsahovala koaguláza negativní stafylokoky. Já osobně jsem při senzorické analýze preferoval menší modelové vzorky o průměru 24 mm vyrobené s přidavkem kultury LHP-DRY a kultury Bactoferm CS-299 (*Staphylococcus carnosus*).

## 7.8 Souhrnná diskuze

Na základě zhodnocení byla zaznamenána data početního zastoupení aerobních a fakultativně anaerobních mezofilních mikroorganismů (tzv. celkového počtu mikroorganismů), počtu mléčných koků a tyčinek, stafylokoků, kvasinek a plísní a enterobakterií, včetně koliformních bakterií. Výsledky byly zaznamenány do tabulek a vyhodnoceny. Hlavní zastoupení tvořily skupiny bakterií mléčného kvašení a koaguláza negativních stafylokoků, které byly používány ve startérových kulturách určených pro výrobu fermentovaných masných výrobků.

Leroy S. *et al.* [30] uvádějí, že nejdůležitější roli, kterou ovlivňovaly vlastnosti výrobku během fermentačního procesu, měly bakterie mléčného kvašení, a to zejména v produkci organických kyselin, hlavně samotné kyseliny mléčné. Produkci kyseliny mléčné činností těchto bakterií bylo zapříčiněno snížení pH v modelovém vzorku a tím zvýšení jeho údržnosti. Další faktory, kterými se přidané startérové kultury podílely na výsledných charakteristických vlastnostech FMV, byly vývoj chuti, barvy a typické vůně pro tyto výrobky. Tento fakt lze zaznamenat i z obrázků 12 a 13, které popisují vývoj bakterií mléčného kvašení v modelových vzorcích, a z obrázků 14 a 15 se zastoupením koaguláza negativních stafylokoků v modelových výrobcích, které tak mohly ovlivnit výsledné organoleptické vlastnosti testovaných výrobků.

Corbiere Morot-Bizot *et al.* [31] uvádějí, že vlastnosti, které nesou startérové kultury *S. carnosus* a *S. xylosus* ve FMV jsou znatelně ovlivněny surovinami, které byly do díla přidány, přesněji poměrovou částí mezi tučným a libovým masem. Tento poměr ovlivňuje vývoj mikroflóry ve fermentovaných masných výrobcích. Poměry sacharidů (zejména monosacharidů nebo di- a trisacharidů) obsažených v tučném a libovém mase jsou odlišné a kultury je tak využívají jinou rychlostí, a to má za následek rychlejší nebo pomalejší vývoj charakteristických vlastností fermentovaných masných výrobků.

Katsaras a Leistner [32] uvádějí, že ve fermentovaných masných výrobcích se rychle množí jak bakterie mléčného kvašení, tak koaguláza negativní stafylokoky, a to hned od počátku zrání. V našem případě byl nárůst těchto bakterií zaznamenán také v čase mezi výrobou a prvním dnem měření. Zmíněná studie ukazuje na data v rozmezí  $10^7$ – $10^9$  CFU/g. V tomto rozmezí se pohybovaly i naše hodnoty.

Kameník [6] uvádí faktor působení BMK proti nežádoucím mikroorganismům. Zejména se jedná o tvorbu mikrobioty v masném fermentovaném výrobku v prvních dnech.

V našem experimentu u větších modelových výrobků o průměru 55 mm první den nárůst stagnoval a následně se začal snižovat. U menších modelových výrobků o průměru 24 mm nastal zlom mezi 4. a 7. týdnem měření. Hodnoty ve 4. týdnu byly zaznamenány tak při kontrolním měření 7. týdne nebyly naměřeny žádné hodnoty, ani u jedné z kultur modelových výrobků.

Z výsledků, které byly zaznamenány v období od nultého dne (den výroby) až po kontrolní měření 49. den bylo patrné, že vývoj mikrobioty byl ovlivněn průměrem obalového kolagenního střeva. U menších modelových výrobků o průměru 24 mm (párek) byl zaznamenán dynamičtější růst než u výrobků o průměru 55 mm.

Při porovnání modelových fermentovaných masných výrobků byly při senzorické analýze (byť byla v důsledku epidemie způsobené onemocněním Covid 19 provedena pouze ve značně omezených podmínkách – viz výše) vyhodnoceny následující vlastnosti modelových výrobků. Menší modelové výrobky o průměru 24 mm měly charakteristiku tvrdší a pevnější struktury a samotná barva byla hnědožlutá. Tyto vlastnosti modelový výrobek pravděpodobně získal tím, že prostup vzduchu a teploty byl do nitra výrobků větší a rychlejší. Větší výrobek o průměru 55 mm měl charakteristiku měkčí struktury. Barva odpovídala typickému fermentovanému masnému výrobku, typicky načervenalá s viditelným proložením masné a tukové struktury.

## ZÁVĚR

Cílem této práce bylo sledovat vývoj mikroflóry v modelových fermentovaných masných výrobkách v průběhu zrání. Teoretická část byla věnována složení a zpracování modelových vzorků. Dále popisovala úlohu startérových kultur při výrobě fermentovaných masných výrobků, a také to, jak svými vlastnostmi ovlivňují finální organoleptické vlastnosti výrobků (chuť, vůni, barvu).

Praktická část byla zaměřena na výrobu modelových vzorků fermentovaných masných výrobků a sledování vývoje jejich mikroflóry kultivační metodou v průběhu zrání. Při samotné výrobě byly vyrobeny modelové vzorky o průměru 24 a 55 mm. Do těchto modelových vzorků byly při výrobě přimíchány startérové kultury Bactoferm CS-299 (*Staphylococcus carnosus*), Bactoferm S-SX (*Staphylococcus xylosus*) a Bactoferm C-P-77 (*Staphylococcus carnosus*). Kontrolní vzorky obsahovaly kulturu LHP-DRY (*Pediococcus acidilactici* a *P. pentosaceus*). V pravidelných intervalech byla prováděna mikrobiologická analýza a zaznamenávány hodnoty počtů aerobních a fakultativně anaerobních mezofilních mikroorganismů (celkového počtu mikroorganismů), mléčných koků a tyčinek, stafylokoků, kvasinek a plísní a enterobakterií, včetně koliformních bakterií. Získané výsledky byly zpracovány ve formě grafů.

Výsledky modelových výrobků o menším o průměru 24 mm (párků) byly do 4. týdne pozorování stabilní s mírným nárůstem sledovaných skupin mikroorganismů. V období od 4. do 7. týdne počet mikroorganismů stagnoval (nebyly pozorovány významné změny v počtu vybraných indikátorových skupin mikroorganismů), popřípadě docházelo k mírnému poklesu počtu mikroorganismů, pravděpodobně v důsledku jejich usmrcení. U modelových vzorků o větším průměru 55 mm (tyčí) byly zaznamenány výkyvy ve vývoji mikroflóry. Počet aerobních a fakultativně anaerobních mikroorganismů (CPM) se v modelových výrobcích o větším průměru s přidanými kulturami LHP-DRY a Bactoferm S-SX v období 1. až 3. týdne snižoval, zatímco u modelových výrobků s kulturami Bactoferm C-P-77 a CS-299 od 2. týdne se počet mikroorganismů výrazněji neměnil.

**SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY**

- [1] STEINHAUSER, Ladislav. *Hygiena a technologie masa*. Brno: Last, 1995. 643 s. ISBN 8090026044.
- [2] KADLEC, P. a kol. *Technologie potravin I*. 1.vyd. Praha: VŠCHT, 2002. 300 s. ISBN 9788070805091.
- [3] KAMENÍK, J. a kol. *Technologie a hygiena potravin živočišného původu*. Brno: VFU, 2014. 69 s. ISBN 8073057220.
- [4] FADDA Silvina, *Role of lactic acid bacteria during meat conditioning and fermentation*, Meat Science, CERELA CONICET, San Miguel De Tucuman, Tucuman, Argentina, 2010, 67 s. ISSN 0309-1740.
- [5] KAMENÍK, J. a kol. *Trvanlivé masné výrobky*. Brno: VFU, 2011. 91-92 s. ISBN 978-80-7305-106-8.
- [6] KAMENÍK, J., Bohumíra JANŠTOVÁ a Alena SALÁKOVÁ. *Technologie a hygiena potravin živočišného původu*. 1st ed. Brno: VFU, 2014. ISBN 978-80-7305-722-0.
- [7] TOLDRÁ, Fidel. *Dry-cured Meat Products*. Trumbull, Conn.: *Food & Nutrition Press*, 2002, ISBN 1-57444-587-1.
- [8] STEINHAUSER, Ladislav. *Produkce masa*. Tišnov: Last, 2000. 17 s. ISBN 80-900260-7-9.
- [9] LÁT, J. *Technologie masa*. 2., přeprac. a dopln. vyd. Praha: SNTL, 1984. 662 s. ISBN (Váz.).
- [10] KERTH CH. R., *The Science of Meat Quality*, Texas A&M University, USA, 2013. ISBN 978-0-8138-1543-5.
- [11] HUTKINS, R. W., *Microbiology and Technology of Fermented Foods*, IFT Press, 2006. 190-241 s. ISBN 978-0813800189
- [12] KAMENÍK, J. *Hygiena a technologie masa: trvanlivé masné výrobky*. Brno: VFU, 2012. 117 s. ISBN 978-80-7305-602-5.
- [13] KADLEC, P. *Technologie potravin II*. 1. vyd. Praha: VŠCHT, 2002. 236 s. ISBN 80-7080-510-2.

- [14] VELÍŠEK, J. a J. HAJŠLOVÁ. *Chemie potravin 1*. Tábor: OSSIS, 2009. ISBN 9788086659176.
- [15] Baktoferm Metat Manual, *Výroba fermentovaných masných výrobků se startovacími kulturami Chr. Hansen*, příručka pro zákazníky firmy Chr. Hansen
- [16] MEHTA, Bhavbhuti M., KAMAL-ELDIN, Afaf, IWANSKI, Robert Z. *Fermentation effects on food properties*, 2012. ISBN 9781138199460
- [17] FEINER, G.: *Meat products handbook: practical science and technology*, Rakousko, 2008. 648 s. ISBN 1845690508.
- [18] Dusitanová solící směs [online]. [cit. 2021-11-23]. Dostupné z: <http://www.ks-cz.com/cs-data/documents/food-grade-kscz-food-processing-nitrite-pickling-PRAGANDA-cz.pdf>
- [19] LEROY, F., A. GEYZEN, M. JANSSENS, et al. *Meat fermentation at the crossroads of innovation and tradition: A historical outlook*. Trends in Food Science and Technology. 2013. 130-137 s. DOI: 10.1016/j.tifs.2013.03.008
- [20] Schéma řady zředění [online]. [cit. 2022-01-19]. Dostupné z: [https://s3.cl2.du.cesnet.cz/elearning311/76/11/7611dcff2d3ab82ac27d01274e0515455527bfaf?response-content-disposition=inline%3B%20filename%3D%22VP\\_lab\\_navody\\_19\\_e-learning\\_CZ\\_13](https://s3.cl2.du.cesnet.cz/elearning311/76/11/7611dcff2d3ab82ac27d01274e0515455527bfaf?response-content-disposition=inline%3B%20filename%3D%22VP_lab_navody_19_e-learning_CZ_13)
- [21] LEROY, F., J. VERLUYTEN, L. DE VUYST. *Functional meat starter cultures for improved sausage fermentation*. International Journal of Food Microbiology. 2006, 270-285 s. DOI: 10.1016/j.tifs.2013.03.008
- [22] LORENZO, J.M., GÓMEZ, M., FONSECA, S. *Effect of commercial starter cultures on physicochemical characteristics, microbial counts and free fatty acid composition of dry-cured foal sausage*. Food Control 46.382-389. 2017. DOI:10.1007/s11694-016-9445-6
- [23] Kandler O. *Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria*. J Microbiol 1983; s 209-224.
- [24] WESIERSKA, E., SZOLTYSIK, M., RAK, L. *Physico-chemical, biochemical and microbiological properties of traditional Polish pork fermented products during ripening*. Food Bioprocess Technology. 2013. DOI:10.1007/s11947-012-0941-3

- [25] ČSN ISO 4833-2 Horizontální metoda pro stanovení počtu mikroorganismů – Část 2: Technika roztěrem a počítání kolonií vykultivovaných při 30 °C
- [26] ČSN ISO 15214 Mikrobiologie potravin a krmiv – Horizontální metoda stanovení počtu mezofilních bakterií mléčného kvašení
- [27] MRS [online]. [cit. 2021-12-15] Dostupné z : [https://www.himedia.cz/katalog/produkty/mikrobiologie/dehydratovana-kultivacni-media/product/M641I\\_lactobacillus-mrs-agar-mrs-agar](https://www.himedia.cz/katalog/produkty/mikrobiologie/dehydratovana-kultivacni-media/product/M641I_lactobacillus-mrs-agar-mrs-agar)
- [28] ČSN ISO 21527-1 Horizontální metoda stanovení počtu kvasinek a plísní – Část 1: Technika počítání kolonií u výrobků s aktivitou vody vyšší než 0,95
- [29] ČSN ISO 4832- Horizontální metoda stanovení počtu koliformních bakterií – Technika počítání kolonií
- [30] LEROY S., GIAMMARINARO P., CHACORNAC J.-P., LEBERT I., TALON R. : Biodiversity of indigenous staphylococci of naturally fermented dry sausages and manufacturing environments of small-scale processing units. *Food Microbiology* , 294–301. 2010. DOI:10.1016/j.fm.2009.11.005
- [31] CORBIERE Morot-Bizot S., LEROY S., TALON R. : Monitoring of staphylococcal starters in two French processing plants manufacturing dry fermented sausages. *Journal of applied mikrobiology*. 2007. DOI:10.1111/j.1365-2672.2006.03041.x
- [32] KATSARAS, K. a L. LEISTNER. *Fermented Meats*. 1995. ISBN 978-1-4613-5904-3.

**SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK**

PCA	Plate count agar
MSA	Mannitol salt agar base
CHYGA	Chloramfenicol yeast glukose agar
MRS	Man, Rogosa a Sharpe agar
TFS	Trvanlivé fermentované salámy
FMV	Fermentovaný masný výrobek
CPM	Celkový počet mikroorganismů
MO	Mikroorganismy
CNK	Koaguláza negativní koky
BMK	Bakterie mléčného kvašení
CFU/g	(Colony forming units/gram) Jednotky tvořící kolonie/gram

**SEZNAM OBRÁZKŮ**

Obrázek 1: Kutr Command 500 K.....	31
Obrázek 2: Narážení do celulózových střev .....	31
Obrázek 3: Uzlování naplněného díla.....	32
Obrázek 4: Uzlování .....	32
Obrázek 5: Zrací komora .....	33
Obrázek 6: Schéma řady zředění [20].....	34
Obrázek 7: <i>Pediococcus</i> ve výrobku po 24 hodinách od výroby .....	39
Obrázek 8: <i>Gram</i> pozitivní koky ve fermentovaném masném výrobku o průměru 24 mm ...	40
Obrázek 9: <i>Gram</i> pozitivní koky ve fermentovaném masném výrobku o průměru 55 mm....	40
Obrázek 10: Celkový počet mikroorganismů ve výrobku o průměru 24 mm (párek) .....	41
Obrázek 11: Celkový počet mikroorganismů ve výrobku o průměru 55 mm (tyč) .....	42
Obrázek 12: <i>Nárůst</i> bakterií mléčného kvašení ve výrobku o průměru 24 mm (párek) .....	43
Obrázek 13: <i>Nárůst</i> bakterií mléčného kvašení ve výrobku o průměru 55 mm (tyč).....	44
Obrázek 14: <i>Nárůst</i> stafylokoků ve výrobku o průměru 24 mm (párek) .....	45
Obrázek 15: <i>Nárůst</i> stafylokoků ve výrobku o průměru 55 mm (tyč) .....	46
Obrázek 16: <i>Nárůst</i> kvasinek a plísní ve výrobku o průměru 24 mm (párek) .....	47
Obrázek 17: <i>Nárůst</i> kvasinek a plísní ve výrobku o průměru 55 mm (tyč).....	48



**SEZNAM TABULEK**

Tabulka 1: <i>Surovinová skladba modelových vzorků fermentovaných masných výrobků ....</i>	29
Tabulka 2: <i>Startérové kultury použité pro výrobu modelových vzorků a jejich označení ...</i>	30
Tabulka 3: <i>Proces fermentace .....</i>	33
Tabulka 4: <i>Živné půdy se sledovanými mikroorganismy .....</i>	35
Tabulka 5: <i>Složení živné půdy PCA .....</i>	35
Tabulka 6: <i>Složení živné půdy MRS [27] .....</i>	36
Tabulka 7: <i>Složení živné půdy MSA .....</i>	37
Tabulka 8: <i>Složení živné půdy CHYGA.....</i>	37
Tabulka 9: <i>Složení živné půdy ENDO agar .....</i>	38

