

Univerzita Pardubice

Fakulta chemicko-technologická

Bakalářská práce

2021

Michaela Zimová

Univerzita Pardubice

Fakulta chemicko-technologická

Stanovení dusitanů v masných výrobcích

Bakalářská práce

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok 2020/2021

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Michaela Zimová**
Osobní číslo: **C18115**
Studijní program: **B2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Hodnocení a analýza potravin**
Téma práce: **Stanovení dusitanů v masných výrobcích**
Zadávající katedra: **Katedra analytické chemie**

Zásady pro vypracování

1. Proveďte literární rešerši zabývající se masem, jeho zpracováním a zráním.
2. Zaměřte se na stanovení dusitanů v masných výrobcích, jejich vlivem na lidský organismus a důvod jejich přidávání do masných výrobků.

Rozsah pracovní zprávy:
Rozsah grafických prací:
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Podle pokynů vedoucího práce.

Vedoucí bakalářské práce:

Ing. Aleš Eisner, Ph.D.
Katedra analytické chemie

Datum zadání bakalářské práce:

5. února 2021

Termín odevzdání bakalářské práce:

2. července 2021

L.S.

prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

prof. Ing. Karel Ventura, CSc.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 20. února 2021

Prohlašuji:

Práci s názvem Stanovení dusitanů v masných výrobcích jsem vypracoval samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využil, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byl jsem seznámen s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 14.7.2021

Michaela Zimová

Chtěla bych poděkovat vedoucímu mé bakalářské práce panu Ing. Alešovi Eisnerovi Ph.D., za vedení práce a cenné rady při zpracování. Dále bych chtěla poděkovat rodině za podporu a pomoc během studia.

ANOTACE

Práce se zabývá masem včetně jeho složení, prospěšných látek a stavby svalového vlákna. Část práce je věnována anomáliím v procesu zrání masa a samotným technologiím jeho zpracování. Pozornost je věnována dusitanům, jejich stanovení a vlivu na zdraví člověka.

KLÍČOVÁ SLOVA

maso, dusitany, stanovení, technologie zpracování

TITLE

Determination of nitrite in meat products

ANNOTATION

The work deals with meat including its composition, beneficial substances and the structure of muscle fiber. Part of the work is devoted to anomalies in the maturing process of meat and to the processing technologies themselves. Attention is devoted to nitrites, their determination and effect on human health.

KEYWORDS

meat, nitrite, determination, processing technology

SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK.....	11
SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK	12
ÚVOD.....	13
1 Maso	14
1.1 Složení masa.....	14
1.2 Prospěšné látky v mase	16
1.3 Stavba svalového vlákna.....	16
2 Zrání masa.....	18
2.1 Proteolýza.....	19
2.1.1 Proteolytické soustavy.....	19
3 Zbarvení masa.....	21
3.1 Látky v čerstvém mase.....	21
3.2 Barviva tepelně zpracovaného masa	21
4 Anomálie v procesu zrání masa	22
4.1 „PSE“ maso.....	22
4.2 „RSE“ maso	23
4.3 „DFD“ maso.....	23
5 Technologie zpracování masa	24
5.1 Vytvrzování.....	24
5.1.1 Solení.....	24
5.1.2 Antimikrobiální účinek	24
5.1.3 Antioxidační účinek.....	25
5.2 Fermentace.....	25
5.3 Dehydratace (sušení).....	26
5.3.1 Změny během sušení	26
5.4 Uzení.....	27
5.5 Masné výrobky	28

5.5.1 Sušená šunka	28
5.5.2 Fermentovaná klobása	29
5.5.3 Vařená šunka	29
6 Dusitany	31
6.1 Charakteristika nitrososloučenin	31
6.1.1 Výskyt, hlavní zdroje a jejich obsah v potravinách	32
6.1.2 N–nitrosaminy	32
6.1.3 N–nitrosamidy	33
6.1.4 S–, O–a C–nitrososloučeniny	33
6.2 Vliv dusitanů na lidské zdraví	34
6.2.1 Vliv dusitanů na nitrosativní stres	34
6.3 Koloběh dusičnanů a dusitanů	35
6.4 Metabolismus dusitanů/dusičnanů	35
6.5 Normy dusitanů	35
7 Stanovení dusitanů	37
7.1 Voltametrické stanovení dusitanů pomocí polyvinylimidazolu	37
7.2 Voltametrické stanovení dusitanů po reakci s ranitidinem produkujícím 2– methyلفuranový kation	38
7.3 Analytické metody	39
7.3.1 Kolorimetrie	39
7.3.2 Vysokoučinná kapalinová chromatografie	40
7.3.3 Plynová chromatografie	40
7.3.4 Ionexová chromatografie	40
8 Mikrobiologie masa	41
8.1 Mikrobiální kontaminanty	41
8.1.1 Kvasinky	41
8.1.2 Bakterie	41

8.1.2.1 Rod Pseudomonas	42
8.1.2.2 Bakterie mléčného kvašení	42
8.1.2.3 Brochothrix thermosphacta	42
ZÁVĚR	43
SEZNAM CITACÍ	44

SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK

Tabulka 1 – Obsah hlavních minerálních prvků v mg/100 g různých druhů mas	15
Tabulka 2 – Obsah vybraných vitamínů v různých druzích syrových mas v mg/100 g.....	15
Tabulka 3 – Obsah těkavých nitrosaminů ve vybraných potravinách v µg/kg.....	32
Obrázek 1 – Struktura svalové buňky–svalového vlákna.....	17
Obrázek 2 – Rozdíl mezi PSE (vlevo) a RFN vepřovým masem.....	23
Obrázek 3 – Příprava salámu na měření	38

SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

ADP – adenosindifosfát

ATP – adenosintrifosfát

CLA – konjugovaná kyselina linolová

CME – chemicky modifikované elektrody

CPE – uhlíkové pastové elektrody

DCB – hovězí maso tmavé v nákroji

DFD – tmavé, pevné, suché maso

DNA – deoxyribonukleová kyselina

HPLC – vysokoúčinná kapalinová chromatografie

IMPT – intramuskulární pojivová tkáň

NADH – nikotinamidadenindinukleotid

NDEA – N – nitrosodiethylamin

NDMA – N – nitrosodimethylamin

NPIP – N – nitrosopiperidin

NPYR – N – nitrosopyrrolidin

PAU – polycyklické aromatické uhlovodíky

pH – záporně vzatý dekadický logaritmus koncentrace vodíkových iontů v roztoku

PSE – bledé, měkké, vodnaté maso

RFN – růžově – červené, pevné, nevodnaté maso

RNS – reaktivní dusíkaté radikály

RSE – růžově – červené, měkké, vodnaté maso

SWV – square wave voltametrie

UV – ultrafialové

ÚVOD

Maso představuje veškeré požitelné části jatečně upravených těl zvířat. Primárně dělíme maso na hovězí, vepřové a kuřecí. Dále rozlišujeme také rybí, krůtí, králičí maso či zvěřinu. Jedná se o nejvyhledávanější potravinu pro výživu obyvatelstva bohatou na vitamíny a minerály, především na vitamín B₁₂ nezbytný pro lidský organismus.

Cílem bakalářské práce je analýza masa a stanovení dusitanů v masných výrobcích včetně jejich vlivu na zdraví člověka.

První kapitola bakalářské práce se zabývá všeobecnými informacemi o masu z hlediska jeho složení, struktury svalového vlákna a obsahu zdraví prospěšných látek, jako jsou antioxidanty a omega-3 mastné kyseliny.

Druhá kapitola je zaměřena na jednotlivé fáze během procesu zrání masa. Jedná se o fáze nastávající po porážce zvířete. Během těchto fází se ze svalu stává maso, které získává vůni, strukturu, zbarvení, křehkost a šťavnatost. Celý proces zrání masa je umožněn činností proteolytických enzymů.

Třetí kapitola pojednává o zbarvení masa, které závisí na obsahu hemoglobinu, myoglobinu a cytochromů. Zabývá se také látkami v čerstvém masu, kde každá z nich má vliv na některou z vlastností pro dané maso.

Čtvrtá kapitola se zabývá odchylkami během procesu zrání masa. Nejčastěji jsou způsobeny změnami pH či teploty. Výrazný vliv vzniku těchto odchylek je způsoben stresem zvířete před porážkou. Masa s těmito odchylkami jsou označována za nekonzumovatelná a dochází k jejich likvidaci, případně je lze využít při výrobě měkkých salámů.

Následující kapitoly popisují technologie zpracování masa spočívající v konzervaci, fermentaci, sušení a uzení včetně příkladů masných výrobků a jejich zpracování. Nedílnou součástí této práce jsou dusitany, diskutované téma i v současnosti. Dusitany představují riziko tvorby nitrososloučenin a mají také poměrně značný vliv na nitrosativní stres. Dusitany lze stanovit voltametričnými nebo spektrofotometrickými metodami a také pomocí kolorimetrie, vysokoúčinné kapalinové chromatografie, plynové chromatografie nebo ionexové chromatografie.

1 Maso

1.1 Složení masa

Maso je převážně tvořeno vodou a to ze 75 %, dále bílkovinami (20 %), tuky (3 %) a zbylá 2 % tvoří vitamíny a minerály. Voda představuje nezbytnou část, jedná se o reakční prostředí. Množství vody v mase závisí na druhu, věku, výživě. V případě masa hovoříme o 3 podobách vody, a to vody vázané, povrchové a volné. Největší část tvoří voda volná, která je v mase udržována pomocí kapilárních sil. Vázaná voda je součástí globulárních proteinů, ve kterých je vázána pomocí vodíkových iontů. Zbývající voda povrchová produkuje jednu nebo dvě molekulární vrstvy na povrchu biopolymerů.

Další nedílnou složkou masa jsou bílkoviny, jejichž množství je téměř stejné ve všech druzích masa. Bílkoviny lze dělit na 3 základní skupiny, a to myofibrilární, sarkoplazmatické a stromatické.

Myofibrilární proteiny představují 50–53 % všech bílkovin v mase, sarkoplazmatické zahrnují přibližně 30–34 % a zbývajících 10–15 % připadá na bílkoviny stromatické. Z hlediska myofibrilárních bílkovin rozlišujeme vláknité, regulační a strukturální proteiny. Například vláknité proteiny tvoří primární stavbu myofibril, zástupci jsou aktin a myosin. Mezi sarkoplazmatické bílkoviny řadíme myoglobin nebo převážnou část enzymů glykolytické dráhy. Jedná se o globulární proteiny s poměrně nízkou molekulovou hmotností. Stromatické bílkoviny tvoří intramuskulární pojivovou tkáň, jejíž struktura se v závislosti na druhu a věku zvířete mění.

Intramuskulární pojivová tkáň (IMPT) produkuje 3 stavební složky, a to endomysium, perimysium a epimysium. Endomysium představuje vrstvu tenké pojivové tkáně separující dílčí svalová vlákna. K denuraci endomysia dochází při teplotě 50 °C, při teplotě 55 °C lze pozorovat dílčí degradaci a při teplotě 60 °C je struktura endomysia úplně rozložena. V případě perimysia se jedná také o vrstvu pojivové tkáně, která vykazuje schopnost odlučovat jednotlivé svazky svalu, tzv. snopce. Platí, že perimysium tvoří okolo 90 % celkové IMPT a je denurováno při teplotě 65 °C. Poslední epimysium představuje obal pojivové tkáně, který ohraničuje a separuje dílčí svaly.

Na rozdíl od bílkovin je tuk v mase velmi proměnlivou složkou a je patrné, že větší množství tuku nalezneme ve vepřovém boku než v kuřecím mase. Tuk lze rozdělit na podkožní (60–70 %), ledvinový (5 %), intermuskulární (20–35 %) a intramuskulární. Z chemického hlediska rozlišujeme triacylglyceroly a fosfolipidy. V případě triacylglycerolů hovoříme o esterech vyšších mastných kyselin a glycerolu a jedná se o zásobní tuk.

Naopak u fosfolipidů je glycerol esterifikovaný dvěma molekulami mastné kyseliny a fosforečnou skupinou, na kterou je navázán serin, etanolamin, cholin, glycerol nebo inositol. Fosfolipidy se podílí na tvorbě buněčných membrán [1].

V případě masa také nesmíme opomenout vitamíny a minerály, a to především vitamíny skupiny B, dále minerály–železo, zinek, měď, draslík, fosfor, hořčík a sodík. Například nejbohatším masem na zinek je telecí a hovězí [1]. Z hlediska vitamínů B v mase nalezneme především vitamíny B₁ (thiamin), B₂ (riboflavin), niacin (kyselina nikotinová a nikotinamid neboli vitamin PP), B₆ a B₁₂. Pro lidský organismus je velmi důležitý především vitamín B₁₂, jelikož je přijímán pouze z potravin živočišného původu. Podílí se na tvorbě červených krvinek a je nezbytný pro správnou funkci nervů a mozku. Nedostatkem vitamínu B₁₂ trpí vegetariáni a vegani, kteří nekonzumují maso a nedostatek tohoto vitamínu se projevuje anémií, únavou, závratěmi [2]. Zastoupení vitamínů a minerálů představují následující dvě tabulky.

Tabulka 1 – Obsah hlavních minerálních prvků v mg/100 g různých druhů mas [1]

	<i>vepřové</i>	<i>hovězí</i>	<i>telecí</i>	<i>kuřecí</i>	<i>králičí</i>
Vápník	7–8	10–11	9–14	11–19	2,7–9,3
Fosfor	158–223	168–175	170–214	180–200	222–234
Draslík	300–370	330–360	260–360	260–330	428–431
Sodík	59–76	51–89	83–89	60–89	37–47
Selen (v µg)	8,7	17	<10	14,8	9,3–15

Tabulka 2 – Obsah vybraných vitamínů v různých druzích syrových mas v mg/100 g [1]

	<i>vepřové</i>	<i>hovězí</i>	<i>telecí</i>	<i>kuřecí</i>	<i>králičí</i>
vitamin B ₁	0,38–1,12	0,07–0,10	0,06–0,15	0,06–0,12	0,18
vitamin B ₂	0,10–0,18	0,11–0,24	0,14–0,26	0,12–0,22	0,09–0,12
vitamin PP	4,0–4,8	4,2–5,3	5,9–6,3	4,7–13,0	3,0–4,0
vitamin B ₆	0,50–0,62	0,37–0,55	0,49–0,65	0,23–0,51	0,43–0,59
vitamin B ₁₂ (v µg)	1,0	2,5	1,6	<1,0	8,7–11,9
kyselina listová (v µg)	1	5–24	14–23	8–14	10
vitamin E (α-tokoferol)	0–0,11	0,09–0,20	0,12	0,26	0,16
vitamin D (v µg)	0,5–0,9	0,5–0,8	1,2–1,3	0,2–0,6	Stopy

Maso, mléko, vejce, drůbež a ryby bývají označovány za „kompletní“ bílkoviny, jelikož obsahují všech 9 esenciálních aminokyselin (histidin, izoleucin, leucin, lysin, methionin, fenylyalanin, threonin, tryptofan a valin). Maso jako takové je zdrojem vysoce kvalitních

bílkovin. Udává se, že syrové maso obsahuje 20–22 g bílkovin/100 g potravin a uvařené maso 26–35 g bílkovin/100 g potravin [2].

1.2 Prospěšné látky v mase

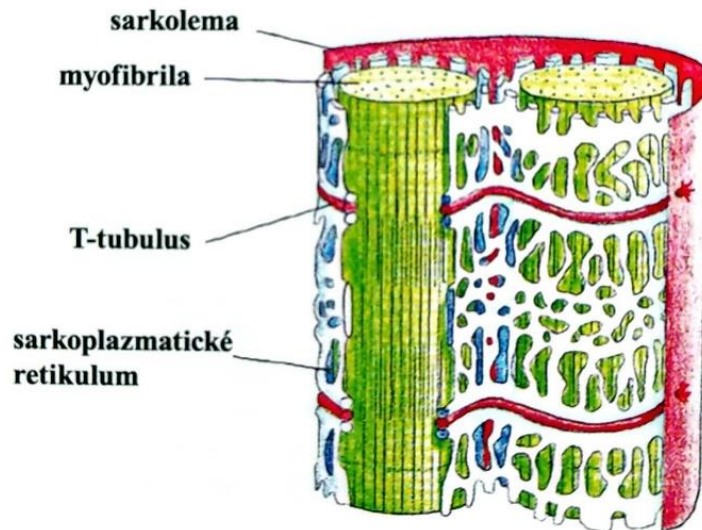
Jaké jsou výhody konzumace masných výrobků? Především získá zdraví prospěšných látek. Rybí maso je bohaté především na omega-3 mastné kyseliny, které snižují riziko kardiovaskulárních onemocnění. Bílkoviny přítomné v mase snižují tělesnou hmotnost a krevní tlak. Aminokyseliny, jako je taurin pozitivně ovlivňuje zrak a snižuje riziko srdečních chorob a glutamin se podílí na metabolických procesech a inhibici některých onemocnění. Aminokyseliny obecně podporují nervový systém.

V hovězím, vepřovém a jehněčím mase nalezneme antioxidanty karnosin a anserin, které pomáhají hojení ran a slouží jako prevence před vznikem onemocnění, která jsou spojena se stresem. Karnitin se uplatňuje u ischemické choroby srdeční.

Zajímavou sloučeninou je „CLA“ vyskytující se v jehněčím a hovězím mase. Tato sloučenina má antikarcinogenní a antiaterogenní účinky, zlepšuje kardiovaskulární systém a podporuje hubnutí [2].

1.3 Stavba svalového vlákna

Svalové vlákno je tvořeno buněčnými jádry, která nalezneme pod plazmatickou membránou (sarkolemou). Jejich šířka odpovídá 10–100 μm . Svalové buňky mají také cytoplazmu, kterou lze pojmenovat jako sarkoplazmu a ta je pokryta myofibrilami válcovité stavby. Tyto myofibrily jsou produkovány sarkomerami a jejich produkce se účastní více než 65 bílkovin, které obstarávají svalový stah.



Obrázek 1 – *Struktura svalové buňky–svalového vlákna* [1]

Sarkomera zajišťuje příčně pruhovaný vzhled svalové buňky. Jedná se o úsek mezi dvěma tzv. Z–liniemi, ve kterých se zaměňují silnější a tenčí úseky. Silnější úseky představují tzv. A proužky a jedná se o tlustá filamenta, ve kterých je zastoupena bílkovina myosin. Naopak tenčí vlákna představují tzv. I vlákna, zde se jedná o tenká filamenta, ve kterých je zastoupen protein aktin. Z hlediska svalových bílkovin je maso bohaté především na myosin, který zaujímá jednu třetinu všech svalových bílkovin, 20 % zaujímá aktin a cca 7 % tropomyosin. Zbylou část zaujímají proteiny, jako je titin, C–protein, nebulin, myomesin, desmin, troponin a další [1].

2 Zrání masa

Mezi organoleptické vlastnosti masa lze zařadit zbarvení, vůni, strukturu, křehkost a šťavnatost. Organoleptické vlastnosti jsou ovlivňovány změnami, které nastávají po porážce jatečných zvířat, a tento proces se nazývá zrání masa, kdy se ze svaloviny stává maso. Období zrání je odlišné pro různé druhy mas. V případě drůbeže hovoříme o jednom maximálně dvou dnech, naopak u prasete by proces zrání měl trvat nejméně 2 dny. Nejdelší proces zrání nastává u masa hovězího, které by mělo zrát alespoň 2 týdny. Celý tento proces je umožněn činností proteolytických enzymů, které se nacházejí ve svalových buňkách. Rozlišujeme celkem 3 fáze v procesu zrání masa.

První fáze představuje období od porážení zvířete do momentu propuknutí posmrtných změn—rigor mortis. Tato fáze trvá 1–8 hodin v závislosti na charakteru zvířete a dalších vnějších podmínkách. V závěru fáze se maso stává tuhým. Jakmile je tělo zvířete vykrveno, přichází časový úsek, po který jsou svaly neustále kontraktilní, neboť je k dispozici kreatinfosfát na obnovu ATP z ADP. Ovšem dojde-li ke spotřebování jeho zásob, hladina ATP začne ihned sestupovat a dochází ke ztrátě schopnosti uvolnění myosinu z aktomyosinového komplexu. Následně se formují nové „rigor“ vazby mezi aktinem a myosinem a tato situace vzniká při koncentraci ATP 1 $\mu\text{mol/g}$ tkáně a pH 5,9. Po spotřebování veškerých zásob kreatinfosfátu získá sval energii štěpením glykogenu za anaerobních podmínek. Při tomto štěpení ovšem dochází k ukládání kyseliny mléčné v buňkách. Přítomnost kyseliny mléčné způsobuje pokles aktivity enzymů, které se účastní štěpení glykogenu a zároveň klesá také intenzita glykogenolýzy.

Druhá fáze představuje rigor mortis, při kterém dochází ke zkrácení svalových vláken. Aby došlo k druhé fázi v procesu zrání masa, musí být splněny již dříve zmíněné podmínky, a to pokles koncentrace ATP na 1 $\mu\text{mol/g}$ a pH 5,9. Obě tyto podmínky spolu s Ca^{2+} ionty povzbuzují spojení myosinových hlavic s aktinovými filamenty a podélný posun aktinových vláken do středu sarkomer. Následuje přisunutí Z-linií a zmenšení délky sarkomer. Jelikož není možná regenerace ATP a tím dodávka energie svalovému vláknu, dochází k nevratnému zkrácení sarkomer a vzhledem k nedostatku energie není možné zpětné odebírání Ca^{2+} iontů ze sarkoplazmy zpět do sarkoplazmatického retikula. Během období rigor mortis jsou aktinová a myosinová vlákna spojena nevratně a v jeho průběhu klesá pH na výslednou hodnotu. V případě skopového, vepřového a hovězího masa je výsledná hodnota pH rovna 5,5. Jednotlivé druhy mas ale vyžadují rozdílnou dobu pro dosažení této hodnoty pH. Hovoříme-li o vepřovém mase, jedná se o 4–8 hodin, pro skopové maso 12–24 hodin

a pro hovězí 24–48 hodin. Dojde – li k odchylkám během zrání masa (např. PSE maso), může být této hranice dosaženo už za 5–10 minut.

Třetí fáze je typická úbytkem tuhé konzistence masa a během této fáze maso křehne [1].

2.1 Proteolýza

Proteolýza svalových bílkovin spočívá v degradaci bílkovin činností proteolytických enzymů–proteáz. Proteázy řadíme mezi enzymy třídy hydroláz, které mají schopnost štěpit proteiny, hydrolyzují peptidické vazby aminokyselin. Dle prostoru, ve kterém štěpí bílkoviny, rozlišujeme exoproteázy a endoproteázy. Exoproteázy odštěpují aminokyseliny od terminálního konce proteinů, zatímco endoproteázy štěpí proteiny uvnitř peptidického řetězce a tím narušují terciární strukturu proteinu.

2.1.1 Proteolytické soustavy

Během proteolýzy se prosazují 4 důležité proteolytické soustavy–kalpainy, proteazomy, katepsiny a kaspázy.

Kalpainy byly poprvé objeveny v roce 1964 a lze je zařadit mezi cysteinové proteázy, které jsou závislé na vápenatých iontech. Jejich soustava je vytvářena celkem 15 izoformami enzymu kalpainu a kalpastatinu, jeho inhibitoru. V případě izoform jsou známy především μ -kalpain a m -kalpain. U svalové tkáně kromě již zmíněných dvou kalpainů se navíc vyskytuje kalpain 3 neboli p94. Na rozdíl od μ -kalpainu a m -kalpainu tento kalpain neovlivňuje křehkost masa. m -kalpain a μ -kalpain štěpí totožné myofibrilární proteiny, u kterých vyvolávají degradaci v průběhu procesu zrání a tato degradace se nevztahuje na aktin a myosin. Tyto dva typy kalpainů jsou tvořeny ze dvou podjednotek–katalytické a regulační. Jejich činnost usměřňuje iontová síla prostředí a hodnota pH. A právě tempo poklesu hodnoty pH může působit na proteolýzu myofibrilárních bílkovin zapříčiněné kalpainovým systémem. Dojde-li k prudkému poklesu pH ve fázi post-mortem, uspíší se autolýza a aktivace μ -kalpainu. Jestliže dochází k pozvolnému poklesu pH, maso se stává křehkým a vykazuje lepší vaznost vody. Odlišnost μ -kalpainu a m -kalpainu je velmi limitována, a tudíž nenastává degradace bílkovin až na aminokyseliny ani degradace myofibrilárních bílkovin aktinu a myosinu.

Proteazomy jsou válcovité vnitrobuněčné struktury vyskytující se v prokaryotických i eukaryotických buňkách. Jedná se o místo, ve kterém probíhá hydrolytické štěpení bílkovin. Při trávení bílkovin hraje klíčovou roli protein zvaný ubikvitin, který se připojí na bílkovinu.

Celý proces probíhá tak, že se na cílový substrát připojí nejméně 4 ubikvitinové bílkoviny a takto vyznačené proteiny jsou identifikovány proteazomem.

Katepsiny představují lysosomální cysteinové proteázy uplatňující se nejen v degradaci bílkovin. Svůj význam mají také u nádorových onemocnění, osteoporózy, artritidy a imunitních onemocnění. V procesu zrání masa se mnohdy uplatňují katepsiny B, L, H a D. Katepsin L hydrolyzuje nejpočetnější kvantum myofibrilárních bílkovin. Jejich působení je ideální v slabě kyselém prostředí, naopak v neutrálním pH jsou pasivní. Mezi inhibitory katepsinů lze zařadit cystatiny a thyropiny.

Kaspázy řadíme mezi cysteinové proteázy štěpící peptidické vazby za kyselinou asparagovou. Známo je celkem 14 kaspáz nacházejících se v různých typech tkání a buněk. Bylo dokázáno, že právě po vykrvení ve svalových buňkách začne probíhat apoptóza s účinkem kaspáz. Po několika minutách od porážení dochází k transformaci svalů na maso [1].

3 Zbarvení masa

Důležitým způsobem konzervace masa a masných výrobků je solení. Odstín masa souvisí s obsahem myoglobinu, hemoglobinu a cytochromů. Výchozím barvivem masa je myoglobin. Hemoglobin během vykrvení zvířat mizí ze svaloviny a podíl myoglobinu závisí na staří, genotypu a fyziologických nárocích svalu živého zvířete. Postupně s rostoucím věkem zvířete dochází k hromadění myoglobinu ve svalech. V mase rozeznáváme 3 formy myoglobinu, a to redukovaný deoxymyoglobin, oxymyoglobin a metmyoglobin. Výsledná barva čerstvého masa je vždy dána kombinací všech 3 forem myoglobinu. Nakrojíme-li čerstvé maso, jeho barva je dána množstvím purpurově červeného myoglobinu. Ovšem na vzduchu v důsledku difuze kyslíku do vnější vrstvy masa nastává oxygenace myoglobinu na světle červený oxymyoglobin. Naopak při malé koncentraci kyslíku, typickým příkladem může být skladování masa, dochází k pozvolné oxidaci obou pigmentů vzdušným kyslíkem na hnědočervený metmyoglobin, který dává jasný signál, že maso již není dostatečně čerstvé.

3.1 Látky v čerstvém mase

Převážnou část látek v čerstvém mase zastupují látky redukující, například thiolové skupiny proteinů a oxidované reduktázy zahrnující jako kofaktory NADH a jiné látky. Tyto látky redukují metmyoglobin na myoglobin. Vůni masa zajišťují především těkavé látky – karbonylové sloučeniny, produkty rozkladu dusíkatých látek nebo sloučenin síry (organické sulfidy, merkaptany). Je třeba podotknout, že chuť maso získává až po tepelném zpracování, v syrovém stavu nemá žádné aroma, chutná po krvi. Na lahodnost masa mají vliv látky netěkavé, například aminokyseliny, mastné kyseliny, uhlovodíky, peptidy, puriny, pyrimidiny a anorganické soli.

3.2 Barviva tepelně zpracovaného masa

Zpracovává-li se maso při teplotě nad 65 °C, dochází k denaturaci myoglobinu a rozkládá se na globin a hem. Hem se procesem autooxidace mění na hematin. V závislosti na intenzitě a době záhřevu nastává přeměna uspořádání barviv masa, odtrhne se centrální atom železa, degraduje protoporphyrinový skelet. Čerstvé červené maso se změní na červenohnědé až šedohnědé [3].

4 Anomálie v procesu zrání masa

Čerstvé vepřové maso se označuje zkratkou „RFN“, kde R představuje „red–dish–pink“ (růžově–červené), F „firm“ (pevné) a N „non–exudative“ (nevodnaté) a jehož pH odpovídá 5,6–5,9. Zde se jedná o pH, které je dosaženo 24 hodin po porážce zvířete a úbytek odkapem činí maximálně 2,5 %. Anomáliemi od standardu vzniká „PSE“, „RSE“ a „DFD“ maso.

4.1 „PSE“ maso

Nejzásadnějším defektem vepřového masa je anomálie „PSE“ neboli bledé, měkké, vodnaté maso. Tuto anomálii lze odhalit určením pH, barvy a úbytkem odkapem. V případě vitálního zvířete se hodnota pH ve svalovině rovná 7,4 a za běžných podmínek dojde v intervalu 6–8 hodin od porážení ke snížení pH na 5,6–5,7. Ovšem u zvířat, která ovládá stres, nabývají tyto hodnoty pH již v průběhu 45 minut od porážení. Tělesná teplota prasete se pohybuje okolo 39 °C. Po porážce v průběhu 45 minut tato teplota klesá na 38–36 °C. Objeví-li se místo poklesu teplot nárůst na 40–42,5 °C pravděpodobně se jedná o „PSE“ maso. Tudíž nastane-li situace, že krátkodobě po porážce se střetne nízká hodnota pH s vysokou teplotou, nastává částečná denaturace myosinu a sarkoplazmatických bílkovin a membrány svalových buněk budou permeabilní.

A z toho plyne, že maso, u kterého se vyskytuje anomálie „PSE“, hůře absorbuje vodu. Jak lze vzniku anomálie „PSE“ zabránit? Především ohleduplným manipulováním se zvířetem, správným omráčením, brzkým vykrvením a efektivním zchlazením (v průběhu 90 minut pod 35 °C). Může se ale jednat o genetickou predispozici, kterou není možné odvrátit.

Defekty masa jsou velmi často způsobeny stresem, který zvířata ovlivňuje. Jedná se o stres spojený s nakládkou, přepravou a vyložením na jatkách. Aby se předešlo vzniku defektu PSE, je navrhováno, aby zvířata měla před porážkou prostor pro odpočinek. Udává se, že v letních měsících by se mělo řádově jednat o 2–4 hodiny, zatímco v zimním období nejdéle o 2 hodiny. Značnější náchylnost k defektu „PSE“ se vyskytuje v letních měsících.



Obrázek 2 – Rozdíl mezi PSE (vlevo) a RFN vepřovým masem [1]

4.2 „RSE“ maso

„RSE“ neboli reddish–pink, soft, exudative, v překladu růžově–červené, měkké, vodnaté maso je obdobou defektu „PSE“ ovšem s výjimkou toho, že svalová tkáň v případě „RSE“ masa zachovává červené zbarvení jako normální maso („RFN“). Jedná se o slabší stupeň anomálie „PSE“.

4.3 „DFD“ maso

„DFD“ neboli dark, firm, dry, v překladu tmavé, pevné, suché maso. Tento defekt je typický u hovězího masa, především u mladých býků, ale může se také objevit u vepřového či skopového masa. Na rozdíl od „PSE“, „DFD“ není podmíněno genetikou jedince, způsobují ho nepříznivé podmínky ve stádiu před porážkou. Jestliže jsou zvířata vystavena dlouhodobému stresu, dochází ke spotřebování rezerv svalového glykogenu, což způsobuje velmi malou koncentraci kyseliny mléčné v maso. Velkým problémem je vysoké pH, jehož hodnota nabývá 24–48 hodin po porážce minimálně 6,2. „DFD“ maso se vyznačuje tmavou barvou, nevýrazným aroma, velmi lepkavým povrchem a lze ho odhalit 24–36 hodin po porážce. Na rozdíl od „PSE“, výskyt „DFD“ je čtenější v zimních měsících.

V případě tohoto defektu u mladých býků hovoříme o „DCB“ neboli dark cutting beef, v překladu hovězí maso tmavé v nákroji. Fibrilární struktury bobtnají a lepší vazba kyslíku na myoglobin dává masu tmavé zbarvení. Toto maso lépe poutá vodu a lze ho využít při produkci měkkých salámů [1].

5 Technologie zpracování masa

5.1 Vytvrzování

Konzervace se nejprve realizovala sypáním soli na povrch masa. Ve vhodnou dobu bylo maso vloženo do solného roztoku. V současnosti se využívají oba způsoby. Granulovaná sůl se dříve označovala „kukuřice“ podle corned beef, v překladu solené hovězí maso. Krystalická forma a velikost soli mohou ovlivnit její konzervační vlastnosti. Především uzená masa se oceňují pro svou organoleptickou kvalitu využívající se při konzervování masa k vývoji a stabilizaci barvy masa a rozvoji charakteristické vůně. V posledních desetiletích byla snaha snižovat konzervační přísady, což způsobilo vyšší kazivost produktů a nutnost opětovného chlazení.

5.1.1 Solení

Při vkládání masa do solného nálevu jsou vnější svaly vystaveny mnohem vyšší koncentraci soli, než jaká byla stanovena při následném dosažení rovnováhy mezi masem a solným nálevem. Na druhou stranu, vnitřní svaly budou vystaveny pomalému zvyšování koncentrace soli. Koncentrace soli v nálevu (a doba kontaktu s masem) a mikroskopická struktura svaloviny představují značné činitele pro pronikání soli během vytvrzování, ovšem nejsou jedinými činiteli. Například zvýšená teplota zvyšuje rychlost průniku a difúze, a to požaduje přísnější hygienická opatření, jelikož se zvyšuje riziko mikrobiální kontaminace. Jsou-li soli přidávány časně posmrtně, dříve, než dojde k úplnému vychladnutí jatečně upraveného těla, dochází k rychlejšímu rozptylu, vyšší výtěžnosti surového produktu a k menším ztrátám při vaření. Například průnik soli do masa, které bylo zmrazeno a rozmrazeno, byl asi o 20 % větší než u masa čerstvého, protože svalová struktura je ovlivněna zmrazením a rozmrazením. U slaniny a vařené šunky se využívají soli obsahující fosforečnany, především polyfosforečnany umožňující lepší vaznost vody.

5.1.2 Antimikrobiální účinek

V první řadě během skladování se uzená masa nejprve kazí z důvodu změny barvy masa, zadruhé z důvodu oxidačního žluknutí tuku a v neposlední řadě z důvodu mikrobiálních změn. Zatímco zabalení masného výrobku do obalu brání kontaminaci produktu, manipulací s masem před samotným zabalením se ovšem riziko kontaminace zvyšuje. Vakuové obaly pomáhají zabránit oxidaci tuku a pigmentů v masných výrobcích.

5.1.3 Antioxidační účinek

Dusitany mají antioxidační účinky, inhibují oxidaci tuku, která je pravděpodobně způsobena chelací nehemového železa. Oxidační žluknutí snižuje uzení, částečně kvůli fenolickým antioxidantům, které obsahuje [2].

5.2 Fermentace

Fermentace masa byla po staletí založena na vývoji žádoucí domácí flóry, její složení bylo ovšem často obměňováno vzhledem k mnoha proměnným, například místu produkce, surovinám, obsluze. Od minulých desetiletí se fermentovaná masa obvykle produkuje s využitím mikrobiálních startérů. Mikrobiota fermentovaného masa byla identifikována molekulárními technikami na základě objevu DNA a nejzásadnějšími mezi bakteriemi mléčného kvašení jsou *Lactobacillus sakei* a *Lactobacillus curvatus*, mezi koaguláza–negativními stafylokoky *Staphylococcus xylosus* a mezi kvasinkami *Debaryomyces hansenii*. Při fermentaci se uplatňují především bakterie mléčného kvašení. *Lactobacillus sakei* a *Lactobacillus curvatus* se využívají v evropských uzeninách a pěstují se při mírných teplotách. Naopak například *Lactobacillus plantarum* a *Pediococcus acidilactici* využívající se ve Spojených státech amerických, rostou při teplotě 30–35 °C. *Staphylococcus* se charakterizuje exopeptidázou a lipolytickou aktivitou podílející se na vývoji chuti.

Startovací kultury jsou vytvořeny na základě tradičních kultur pěstovaných v tradiční fermentaci. Tyto kultury musí snášet vysoký obsah soli, kyselé pH a nízkou aktivitu vody. Také musí dobře růst při teplotě fermentace, obsahovat adekvátní enzymy pro dosažení požadovaných organoleptických vlastností produktu. Důležitá je také absence dekarboxylázy, aby bylo zabráněno tvorbě aminů, nebo oxidačních enzymů, aby nedošlo k oxidaci.

Během procesu fermentace dochází k přeměně sacharidů na kyselinu mléčnou bakteriemi mléčného kvašení. V závislosti na množství vytvořené kyseliny mléčné klesá hodnota pH. O tom, kolik vznikne kyseliny mléčné, záleží na druhu použité mikrobiální kultury, složení a obsahu sacharidů a teplotě fermentace. Pokles pH částečně kompenzují svalové proteiny rozpustné v roztocích solí, částečně hydrolyzované svalové proteiny a také tvorba amoniaku. Kromě kyseliny mléčné vznikají vedlejší produkty, například kyselina octová, acetoin a další. Pokles pH je důležitý především kvůli potlačení tvorby nežádoucích patogenů. Většina enzymatických reakcí podílejících se na tvorbě chuti je však při pH nižším než 5

částečně nebo zcela úplně inhibována. Aktivitu enzymů ovlivňuje nejen pH, ale také obsah soli, dusitanů, dusičnanů, sacharidů, sušení, zrání nebo přítomnost koření a ochucovadel [2].

5.3 Dehydratace (sušení)

Nedostatek vlhkosti způsobuje zastavení růstu mikroorganismů vyskytujících se na masných výrobcích nebo je přímo usmrcuje. V případě dehydratace či vymrazování je voda znepřístupněna přímým odstraněním nebo při sušení. Během procesu sušení dochází ke zvýšení extracelulárního osmotického tlaku. Tyto procesy umožňují předcházení mikrobiálních změn a uchování požitelnosti. Vytvořená komodita se diferencuje více od čerstvého masa než masa chlazeného. Následným procesem vaření jsou tyto rozdíly již méně zjevné.

Včasné postupy sušení, které se zachovaly i v odlehlých oblastech světa, obsahovaly vystavení proužků libového masa slunečnímu záření. Takto se vyráběl například „*pemmican*“ severoamerickými indiány. Nebo kombinací solení a sušení na vzduchu lze připravit „*charqui*“ vyráběné v Jižní Americe či „*biltong*“, který je typický pro Jižní Afriku. Tyto výrobky se liší od čerstvého masa a jsou považovány za méně kvalitní. Konzervaci lze zesílit fermentací pomocí halofilních mikroorganismů.

Dalším krokem byl vývoj samotných sušáren, které měly velké dveře a okna umožňující korigovat vzduch v místnosti otevíráním či zavíráním oken víceméně dle venkovní teploty a vlhkosti. Stupeň sušení se hodnotil dotýkáním se výrobku, prohlížela se také barva a tvar. V současnosti jsou nejběžnějšími sušárnami konvekční sušárny plně automatizovatelné počítačem, který řídí teplotu, průtok vzduchu, distribuci proudění vzduchu a relativní vlhkost podle obsahu vlhkosti ve výrobku a jeho velikosti, tvaru a struktury. Moderní sušárny pracují nezávisle na vnějších podmínkách a dovolují kvalitnější řízení sušení.

5.3.1 Změny během sušení

Diference mezi dehydratovaným a čerstvým masem se snižuje, lze-li vodu, která byla z masa odstraněna znovu včlenit při rehydrataci. Ztráta vody ze syrového masa je doprovázena omezujícím se prostorem mezi skupinami svalových vláken a mezi jednotlivými vlákny. Rychlost odstraňování vlhkosti a smršťování svalových vláken je rychlejší u předvařeného než u syrového masa.

Rychlost sušení zpomaluje relativně vysoký obsah tuku, ačkoliv má na sušení z počátku jen malý vliv. Je-li obsah tuku vyšší než 35 % suché hmotnosti, prodlužuje se doba dehydratace a je-li obsah tuku nad 40 % suché hmotnosti, struktura suchého masa již není schopna udržet

roztavený tuk a ten odkapává. Naopak je-li obsah tuku nižší než 35 % suché hmotnosti, dehydratované maso s dostatečným obsahem vody lze získat v kontinuální horkovzdušné sušárně a ve stanovené době sušení i přes proměnlivost obsahu tuku. Obecně platí, že vlhkost dehydratovaného masa je příliš nízká na to, aby umožnila růst bakterií, ale pokud stoupne nad 10 %, po několika týdnech se může objevit růst plísní, především plísně rodu *Aspergillus* a *Penicillium* [2].

5.4 Uzení

Kouř, tvořený pozvolným spalováním pilin z tvrdého dřeva, které je tvořeno z 40–60 % celulórou, 20–30 % hemicelulórou a 20–30 % ligninem, potlačuje růst mikroorganismů, zmírňuje oxidaci tuků a dodává chuť sušenému masu. Uzení bylo tradičně prováděno nekontrolované a spočívalo ve spalování dřeva pod masem. Řízené uzení se provádí v pecích. Dnes se využívají především moderní udírny ovládané počítačem umožňující regulaci teploty kouře a jeho proudění, obsahují také zařízení pro čištění a neutralizaci kouře.

V závislosti na druhu masného výrobku lze využít 3 druhy uzení, a to uzení studeným kouřem, teplým kouřem nebo horkým kouřem. O uzení studeným kouřem hovoříme při teplotě 12–25 °C, probíhá řádově několik hodin až dní a využívá se při přípravě sušených klobás a vepřového bůčku. Uzení teplým kouřem probíhá při teplotě 25–45 °C několik hodin. Tento typ uzení se používá při výrobě pečených uzenin či šunky. Uzení horkým vzduchem probíhá při teplotě 45–90 °C po dobu až 12 hodin.

Vzhledem ke druhu dřeva a parametrech doutnání může kouř obsahovat různý podíl oxidu uhelnatého, oxidu uhličitého, alkoholů, karbonylových sloučenin, karboxylových kyselin, esterů, uhlovodíků, oxidů dusíku a fenolů. Fenoly vyskytující se v kouři jsou guajakol, syringol a jejich deriváty se vyskytují při teplotě 400–600 °C. Kouř také může obsahovat až 60 druhů polycyklických aromatických uhlovodíků (PAU), některé z nich vykazují mutagenní nebo karcinogenní účinky. S ohledem na nebezpečí karcinogenity uzeneho masa bylo provedeno mnoho pokusů o produkci kouře bez karcinogenů, například kondenzací, následně frakční destilací a čištěním.

Chuť dodaná uzením se liší podle podmínek použitých k výrobě kouře. Kromě toho bude stejný kouř produkovat různá aroma s různými druhy masa. Do určité míry proto chuť uzeneho výrobku závisí na reakci mezi složkami kouře a funkčními skupinami masných bílkovin. Proto fenoly a polyfenoly reagují se skupinami -SH a karbonyly s amino skupinami.

Barva propůjčená uzením může být světle žlutá až tmavě hnědá, v závislosti na druhu dřeva a podmínkách uzení. Je také ovlivněna vytápěním a skladováním [2].

5.5 Masné výrobky

5.5.1 Sušená šunka

Sušená šunka se vyrábí již po staletí nejen ve středomořských oblastech ale také v Číně. Představuje lahodný produkt, jehož zpracování spočívá v solení, sušení a zrání. Vyznačuje se intenzivní a charakteristickou strukturou a chutí. Mezi typické evropské šunky patří španělská jamón Ibérico a jamón Serrano, francouzská jambon de Bayonne, italská prosciutto di Parma, prosciutto San Daniele a prosciutto Toscano, belgická jambon d'Ardenne, portugalská Presunto a Istrijský pršut. Většina šunek je chráněna certifikáty—Chráněné označení původu, Chráněné zeměpisné označení nebo Zaručené tradiční speciality.

Producenty šunek ve Spojených státech amerických jsou Severní Karolína, Tennessee, Missouri, Kentucky a Virginie. Šunky se v těchto státech začaly vyrábět již v roce 1600 a před konzumací prochází uzením a vařením. Šunka se také vyrábí v Číně, jedná se především o šunku Jinhua vyráběnou v Ťin-chua, Xuanwei vyráběnou v Junnan a Rugao vyráběnou v Jiangsu.

Při výrobě sušené šunky se nejprve prohlídne a změří pH kýty, kýta se následně zváží a povrch se potře konzervační soli. Následuje solení, při kterém je kýta zcela pokryta solí nebo množstvím úměrným váze šunky. Během 11–15 dní dochází k průniku soli a konzervačních látek do šunky a dochází k jejich rozptýlu. Po ukončení solení se šunka umyje od přebytku soli, pověsí, a to z důvodu, aby během následujících 2 až 3 měsíců došlo k rozptýlení soli a konzervačních látek celým kusem šunky. Další fází je sušení/zrání, která trvá 9-12 měsíců v závislosti na době, kdy úbytek hmotnosti dosáhne 32–34 %. Teplota sušení se pohybuje od 16 do 25 °C a relativní vlhkost mezi 60 a 85 % v závislosti na stupni sušení. Samotný proces sušení probíhá v sušárnách, které řídí počítač ovládající teplotu, relativní vlhkost a rychlost vzduchu.

Tloušťka výrobku ovlivňuje dobu sušení a zcela zásadní je také kontrola vody výrobku. V případě nadměrného odpařování dochází k dehydrataci a jevu známému jako tvrdnutí poskytujícímu tvrdou strukturu a tmavé zbarvení na vnější straně šunky.

Dochází-li k dalšímu zrání, šunka je pokryta sádlem, zrání probíhá při teplotě 10–15 °C po dobu 18, 24 nebo 36 měsíců. Sádlem se potírají z toho důvodu, aby nedošlo k přílišnému vysychání. Šunky díky delší době zrání, získají znamenitou a intenzivní chuť.

Uzení se také může použít při výrobě sušené šunky, ale využívá se pouze u kýt zpracovávaných méně než 3–4 měsíce čili kýty vyráběné v Severní Evropě či Spojených státech amerických [2].

5.5.2 Fermentovaná klobása

Proces výroby klobás zahrnuje rozmělnění vepřového a/nebo hovězího masa a vepřového tuku nejčastěji v mlýnku. Následně se k rozmělněné směsi přidá solící a kořenící směs. Vytvoří se homogenní směs, která se pod vakuem naráží do střívek. Střívka rozlišujeme přírodní, na bázi kolagenu či syntetická. Po naplnění jsou klobásy zavěšeny na stojanech v klimatizovaných sušárnách. Fermentace začne probíhat, jakmile se začnou vyvíjet a růst mikroorganismy. Probíhají biochemické změny, především enzymatický rozklad lipidů, sacharidů a proteinů a také gelaci bílkovin a sušení. Rozměr fermentace a sušení záleží na oblasti a podnebí. V Evropě je typická konzumace syrových sušených klobás bez dalšího ohřevu, naopak ve Spojených státech amerických ještě následuje ohřívání. Fermentované klobásy čínského typu jsou polosuché a jí se i po ohřátí.

Ve Spojených státech amerických se klobásy fermentují při vysokých teplotách doprovázené lehkým ohřevem jako druh pasterizace, místo sušení a s cílem usmrtit trichinely. Proto se používají jako mikrobiální startéry *Lactobacillus plantarum* nebo *Pediococcus acidilactici*, které řádně rostou při vyšších teplotách. Proces sušení bývá vynechán a fermentace probíhá při 38 °C.

V Evropě se jako mikrobiální kultury využívají *Lactobacillus sakei* a *Lactobacillus curvatus* pěstující se v mírných teplotách. Klobásy bývají více ochucené a jen ojediněle se udí, fermentace probíhá při teplotách nižších než 24 °C, sušení při mírných teplotách řádově pár týdnů anebo měsíců a také dochází k pozvolnému poklesu pH.

Doba zrání/sušení se řádově pohybuje od 7 do 90 dnů v závislosti na druhu výrobku, průměru, stupni suchosti, obsahu tuku a požadované chuti a intenzitě [2].

5.5.3 Vařená šunka

Ve Spojených státech amerických se označuje jako gammon. Jedná se o vepřové maso ze zadní kýty prasete podléhající procesu vaření a případně i uzení. Hlavními spotřebiteli

toto výrobku jsou Francouzi, Španělé a Italové. Tyto šunky získávají většinou název podle regionu, ve kterém se vyrábí, například italské prosciutto cotto, francouzské Jambon de Bourgogne nebo Jambon de Reims.

Kýty se uchovávají v chladničce nebo se zmrazí a před zpracováním rozmrazí. U kýty se kontrolují především hygienické podmínky a pH. Pokud má příliš nízké pH, tak se získá šunka, která bude světlá, měkká a vodnatá. Šunka má nižší schopnost vázat vodu, což vede k zisku sušší šunky a ztrátám při vaření. Do slaného nálevu se přidává dusitan sodný nebo draselný kvůli lepší konzervaci a tvorbě růžové barvy. Nálev může také obsahovat sacharidy, například sacharózu, kukuřičný sirup nebo dextrózu, které poskytují výrobku lahodnou chuť. Dále mohou být k nálevu přidány askorbát sodný, erythorban sodný zajišťující vymizení dusitanu, který je redukován na oxid dusnatý. U šunek nízké jakosti se do solného nálevu přidávají fosforečnany, polyfosfáty nebo pyrofosfáty z důvodu lepšího zadržování vody. Slaný nálev se vmasíruje do kýty.

Po rovnoměrném rozložení soli se kýty uchovávají v kovových formách, které jim dají finální tvar, nebo lze použít speciální plastové sáčky. Následuje vaření, které probíhá za dodržení podmínek teploty a času, aby se inaktivovaly patogeny a mikroorganismy. Proces vaření probíhá tak, aby čas/teplota získaná ve všech částech šunky korespondovala 2 minutám při teplotě 72 °C. Ve skutečnosti se teplota ve středu šunky může měnit v rozmezí 68 °C a 75 °C. Teplo se přenáší z ohřívacího média na povrch šunky konvekci, z povrchu šunky do vnitřních částí kondukcí. Rozlišujeme celkem 3 postupy vaření. Nejstarší spočívá v zahřívání na ustálenou teplotu, který se dnes již příliš nevyužívá. V současnosti se používají 2 postupy zakládající se v zahřívání do dosažení teploty 68 °C uvnitř šunky nebo v postupném zahřívání v každém kroku o 25–30 °C. Po ukončení procesu vaření musí být šunka během maximálně 10 hodin ochlazená na teplotu nižší než 5 °C, aby nedošlo k opětovnému množení mikroorganismů.

Finální jakost vařené šunky závisí na použité surovině, složení a množství solného nálevu, době, teplotě vaření a dalších faktorech. Sensorické vlastnosti šunky se vyvíjí účinkem enzymatických a chemických pochodů v průběhu vaření. Nepovinnou úpravou při výrobě vařené šunky může být uzení, které kýtě dodá uzený nádech. Šunky jsou následně baleny pod vakuem nebo v ochranné atmosféře [2].

6 Dusitany

Pojem dusitan obecně odkazuje na anion NO_2^- , ale také na kyselinu dusitou HNO_2 . Při obvyklém pH okolo 5,7 se dusitany velmi rychle rozpouští ve vodě a 99 % existuje jako aniont NO_2^- . Nepatrné množství nerozděleného HNO_2 je v rovnováze s N_2O_3 , který je v rovnováze s NO a NO_2 [2].

Zdrojem dusitanů je nejen maso jako takové, ale konkrétně také sušené maso a zelenina. Příjem dusitanů se pohybuje od 0 do 20 mg za den, přičemž jednotlivec přijme 1,2–3,0 mg dusitanu každý den [4]. Zajímavostí je, že dusitany se v krvi mění na dusičnany asi za 110 sekund, naopak v plazmě se jedná o mnohem delší proces, řádově o 20–30 minut. Z hlediska zastoupení dusitanů v masných výrobcích se jedná především o dusitan draselný a sodný. Společně s dusičnany a chloridem sodným jsou součástí solících směsí, které se využívají při úpravě masa. Dále slouží především k ochucení a zachování růžového zbarvení, mírní nárůst mikroorganismů, jmenovitě *Clostridium botulinum* a *Clostridium perfringens* [5]. Dusitany nepůsobí na aktivitu enzymů, jako jsou aminopeptidázy a lipázy, které mají podíl na kvalitě výrobku a nejsou účinné při kontrole gramnegativních enterálních patogenů [6].

Dusitany představují riziko tvorby škodlivých N–nitrososloučenin [5]. V mase se setkáváme především s N–nitrosodimethylaminem, N–nitrosodiethylaminem, N–nitrosopyrrolidinem a jejich koncentrace má sklon se s časem, vysokou teplotou a kyselostí zvyšovat. N–nitrososloučeniny vznikají reakcí kyseliny dusité se sekundárními aminy, které jsou přirozenou součástí během nakládání masa a produkce masných výrobků. Společně s dusitany se do masa dodává kyselina askorbová rozkládající nadbytečnou kyselinu dusitou, jež je prekurzorem nitrosačnicích činidel. Očekává se, že právě reakcí kyseliny dusité s kyselinou askorbovou dočasně vzniká odpovídající 2–ester, který se rozloží na askorbylradikál a oxid dusnatý. Kyselina askorbová také brání produkci nitrosaminů. Dusitany se v potravinách získávaných kvašením produkují redukcí dusičnanů mikrobiálními reduktasami.

6.1 Charakteristika nitrososloučenin

Karcinogenita N–nitrosaminů byla prokázána již v roce 1956. Nitrososloučeniny vznikají z organických sloučenin účinkem nitrosačnicích činidel. Nitrosační činidla do potravin pronikají během technologického zpracování jako potravinářská aditiva, kontaminanty nebo sušením potravin přímým ohřevem, z kouře, který obsahuje oxidy dusíku. V potravinách

se mohou také objevit prostřednictvím migrace z různých zdrojů, například z některých obalů. Velmi významným zdrojem nitrosaminů je tabákový kouř.

Nitrososloučeniny zahrnují ve své molekule nitrososkupinu, $-N=O$. Nejrozšířenější skupinou jsou N–nitrososloučeniny, které zahrnují N–nitrosaminy, odvozené od sekundárních aminů, a také N–nitrosamidy, odvozené od N-substituovaných amidů karboxylových kyselin. Dále rozlišujeme také O–, S–, a C–nitrososloučeniny [3].

6.1.1 Výskyt, hlavní zdroje a jejich obsah v potravinách

Nitrososloučeniny nalezneme především v uzených sýrech a masech, odtučněném sušeném mléce, rybách, pivě a destilátech, konkrétně ve whisky.

Jak lze produkci nitrososloučenin korigovat? Poklesem koncentrací dodávaných dusitanů, sušením potravin nepřímým ohřevem, použitím kyseliny askorbové, která potlačuje nitrosaci nebo redukcí teploty při zpracování.

Množství těkavých nitrosaminů v potravinách vystihuje následující tabulka. O jejich vzniku a koncentraci rozhoduje celá řada faktorů, jako například přítomnost a množství příslušných aminokyselin a jejich prekurzorů, druh a množství nitrosacích činidel, pH prostředí, teplota a doba reakce, složení poživatiny, způsob tepelného zpracování a další.

Tabulka 3 – *Obsah těkavých nitrosaminů ve vybraných potravinách v $\mu\text{g}/\text{kg}$ [3]*

Potravina	Nitrosamin ^{a)}	Obsah	Potravina	Nitrosamin	Obsah
nakládané maso	NDMA, NDEA, NPYR, NPIP	stopy-55	odtučněné sušené mléko	NDMA	0,1-3,7
smažená slanina	NPYR, NDMA, NPIP	stopy-200	fermentovaná zelenina	NDMA, NPYR	stopy-5
slanina (mikrovlnný ohřev)	NDMA, NPYR	stopy-1,2	čaj	NDMA	stopy-1,2
ryby	NDMA	stopy-10	alkoholické nápoje	NDMA	stopy-4,9
sýr	NDMA	stopy-15	pivo	NDMA	stopy-68

^{a)}NDMA = N-nitrosodimethylamin, NDEA = N-nitrosodiethylamin, NPIP =N-nitrosopiperidin, NPYR = N-nitrosopyrrolidin

6.1.2 N–nitrosaminy

N–nitrosaminy dělíme na těkavé a netěkavé nitrosaminy. Těkavé nitrosaminy představují nízkomolekulární relativně nepolární látky. Nejtoxictějším zástupcem je N–nitrosodimethylamin vznikající z dimethylaminu nebo prostřednictvím dimethylaminu z jiných aminosloučenin, například sarkosinu, kreatinu nebo cholinu. Mezi další zástupce N–nitrosopiperidin, N–nitrosopyrrolidin a N–nitrosomorfolin. N–nitrosopyrrolidin

a N–nitrosodimethylamin se objevili ve slanině po smažení. Netěkavé nitrosaminy jsou naopak polárnějšími sloučeninami a jedná se primárně o N–nitrosaminokyseliny. Nejčastějšími zástupci lze uvést například N–nitrosothiazolidin–4–karboxylová kyselinu a N–nitroso–2–methyl–thiazolidin–4–karboxylová kyselinu.

Prekurzory netěkavých, ale i některých těkavých nitrosaminů bývají aminokyseliny a od nich odvozené aminy. Nitrosoaminokyseliny tvoří asi 1 % celkového obsahu N–nitrososloučenin vyskytujících se v potravinách. Například z prolinu vzniká N–nitrosoprolin a jeho dekarboxylací se následně tvoří N–nitrosopyrrolidin a N–nitrosoprolin vzniká též z ornithinu.

Prekurzory některých netěkavých nitrosaminů vznikají reakcemi neenzymového hnědnutí nebo nitrosací N–alkylsubstituovaných guanidinů a N–alkylsubstituovaných močovin. U N–nitrosaminů byl prokázán mutagenní, teratogenní a karcinogenní účinek.

6.1.3 N–nitrosamidy

N–substituované amidy vznikají zahříváním karboxylových kyselin s aminy. Jednoduše vznikají z mastných kyselin, jejich esterů a aminů. Jsou-li teploty vyšší než 150 °C, reagují za vzniku amidů také aminokyseliny. Mechanismus vzniku nitrosamidů je totožný s mechanismem vzniku N–nitrosaminů ze sekundárních aminů.

6.1.4 S–, O–a C–nitrososloučeniny

Kromě N–nitrososloučenin se můžeme v potravinách setkat také s S–nitrososloučeninami. V mase byl prokázán především S–nitrosocystein, který vzniká reakcí dusitanů se sulfhydrylovou skupinou volného cysteinu i cysteinu vázaného v bílkovinách. U této sloučeniny byl prokázán mutagenní a mikrobicidní účinek. S–nitrosocystein řadíme mezi Nitrosothioly, které se prosazují při tvorbě typické vůně uzeného masa a také v tzv. transnitrosačních reakcích.

Z hlediska C–nitrososloučenin víme, že stabilní jsou pouze deriváty, ve kterých se nitrososkupina váže na terciární uhlík. V případě nitrososkupiny na primárním nebo sekundárním uhlíku dochází k nevratné izomeraci na isonitrososloučeniny, známé jako oximy aldehydů nebo ketonů. Příslušné oximy se prosazují jako složky vůně uzeného masa. Za vzniku nitrososloučenin a oximů reagují s nitrosačními činidly některé fenoly [3].

6.2 Vliv dusitanů na lidské zdraví

Mezi pozitiva přítomnosti dusitanů v potravinách patří především vliv na kardiovaskulární systém, snížení krevního tlaku, zlepšení glukózové tolerance a snížení výskytu zánětů [7].

Jedním z negativních důsledků dusitanů působících na lidský organismus je onemocnění methemoglobinémie, též zvaná jako syndrom modrého dítěte. Toto onemocnění spočívá v oxidaci Fe^{2+} hemoglobinu na Fe^{3+} a dochází k převodu na methemoglobin a tkáňové hypoxii. Postihuje děti do 6 měsíců věku a do těla se dusičnany dostávají z kontaminované vody, především ze studny [3,5].

O tom, zda dusitany způsobují rakovinu žaludku, se vedou spory. Od roku 2015 se hledají možné alternativy za dusitany používané při zpracování masa. Dosud ovšem nebyla nalezena žádná látka, která by plně nahradila funkci dusitanů. Pozitivní výsledek na dusitany byl prokázán u červeného masa a s ním spojený karcinom dlaždicových buněk jícnu. V některých studiích se jako zdroj exogenních dusitanů uvádí uzené či zpracované maso, ale zapomíná se na vliv nitrosaminů. S nitrosaminy přicházíme do styku prostřednictvím kouře, vody, piva a pracovního prostředí. Teorie vlivu dusitanů na vznik rakoviny je velmi málo pravděpodobná [4].

6.2.1 Vliv dusitanů na nitrosativní stres

Dusitany hrají v psychologii člověka značnou roli. Některé fyziologické vlastnosti související s NO odvozeným od dusitanů jsou u lidí spojeny s arteriálním krevním tlakem, imunitní odpovědí a tvorbou biofilmu. Ovšem v kyselém prostředí či za podmínek oxidačního stresu může být přeměněn na řadu reaktivních dusíkatých radikálů. Výsledkem je oxidační/nitrosativní stres, který může způsobit celou řadu chronických a akutních onemocnění. Úroveň nitrosativního stresu souvisí s koncentrací a dobou expozice „RNS“ a také se schopností buněčných antioxidantů je odstraňovat. Mezi „RNS“ patří oxid dusnatý, oxid dusičitý a peroxynitrit. V živých systémech je jejich tvorba regulována díky tomu, že se účastní různých biologických funkcí. Výskyt dusitanů a oxidu dusnatého za podmínek nitrosativního stresu na relativně vysokých úrovních může být spojen s mnoha nežádoucími účinky, jako je mutagenese nebo karcinogeneze [4].

6.3 Koloběh dusičnanů a dusitanů

Podstatnou úlohu v koloběhu a procesu transformace exogenního $\text{NO}_3^- - \text{NO}_2^- - \text{NO}$ představují slinné žlázy a ústní bakterie. Dusitany jsou vytvářeny oxidací oxidu dusnatého a redukcí dusičnanů komenzální bakterií v ústech a zažívacím traktu. Až 85 % dusitanů lze získat endogenní přeměnou z dusičnanů. Exogenní dusitany jsou takřka zcela pohlceny v duodenu a jejunu, většina se přemění na NO a fungují jako poměrně stálý zásobník NO.

Dlouhodobě se prováděl experiment na myších. Tyto myši dostávaly potravu s nedostatkem dusičnanů a dusičnanů. Experiment prokázal, že myši postihne metabolický syndrom, endoteliální dysfunkce a kardiovaskulární smrt po 22 měsících dusitanové a dusičnanové diety [8].

6.4 Metabolismus dusitanů/dusičnanů

Dusitany a dusičnany se v těle eliminují, cirkulují a dusičnany se redukují na dusitany a oxidy dusíku, které zabezpečují vyrovnanost dusičnanů, dusitanů a oxidu dusnatého. Endogenní dusitany a dusičnany jsou tvořeny metabolickou drahou L-arginin/ NO-syntáza a jsou výsledným produktem oxidace oxidu dusnatého. NO se vytváří v endotelových buňkách, kde dochází k metabolizaci L-argininu na citrulin s produkcí NO v dráze katalyzované syntázami oxidu dusnatého. Uvolněný NO je velice reaktivní a jeho přebytek je oxidován v krvi na dusitany a dusičnany pomocí oxyhemoglobinu nebo oxymyoglobinu.

Dusičnany jsou v kyselém prostředí nestabilní a rozkládají se na dusitany a oxid dusičitý. Tím pádem dusitany, které jsou důsledkem metabolismu dusičnanů, stejně jako ty, které se přijímají potravinami, mohou v gastrointestinálním traktu zreagovat s prekurzory N-nitrososloučenin, například s aminy či amidy a vytvořit N-nitrososloučeniny. Zvláště reakce dusitanů se sekundárními aminy způsobuje vznik karcinogenních nitrosaminů. Co se týká primárních aminů, ty tvoří s dusitany velmi nestálé nitrosaminy, které se ihned rozkládají na alkohol a dusík. Terciární aminy s dusitany nereagují vůbec [4].

6.5 Normy dusitanů

V současné době je akceptováno 150 mg/kg dusitanů ve zpracovaném mase a 100 mg/kg ve sterilizovaných masných výrobcích. Akceptovatelný denní příjem dusitanů činí 0,06–0,07 mg na kilogram tělesné hmotnosti za den [4].

Dle vyhlášky č. 306/2004 Sb., se povoluje používání dusitanu sodného nebo draselného při výrobě potravin pouze ve směsi se solí nebo jako náhradu soli. Obsah (vyjádřený

jako NaNO_2) ve směsi smí být nejvýše 0,9 % (pro použití v hromadné výrobě potravin) nebo 0,35 % (pro použití v domácnostech) [9].

7 Stanovení dusitanů

Nejpoužívanější metodou stanovení dusitanů je spektrofotometrické stanovení, a to především díky své jednoduchosti a finančně nenáročné proveditelnosti. Spektrofotometrické stanovení je založeno na diazotaci či nitrosaci dusitanu s detekčními činidly a následném stanovení koncentrace dusitanů na základě změřené absorbance reakčního produktu [10].

Ke stanovení množství dusitanů v potravinách bylo v posledních letech vyvinuto mnoho metod – spektrofotometrických, chromatografických a polarografických. Přívětivou metodou jsou především metody voltametrické, a to z důvodu rychlé odezvy a snadného použití. Pomocí těchto metod bylo pozorováno elektrochemické chování dusitanů na površích pevných elektrod. Tyto elektrody bývají vyrobeny z platiny, skelného uhlíku nebo zlata. Lze taktéž použít chemicky modifikované elektrody (CME), které si získaly pozornost v posledních desetiletích kvůli citlivosti a selektivitě elektroanalytických metod. K dalším výhodám těchto elektrod patří nízké náklady a krátká doba analýzy. Převratem jsou ale v posledních letech především uhlíkové pastové elektrody (CPE) patřící k slibným elektrochemickým nebo bioelektrochemickým sensorům širokého použití [11].

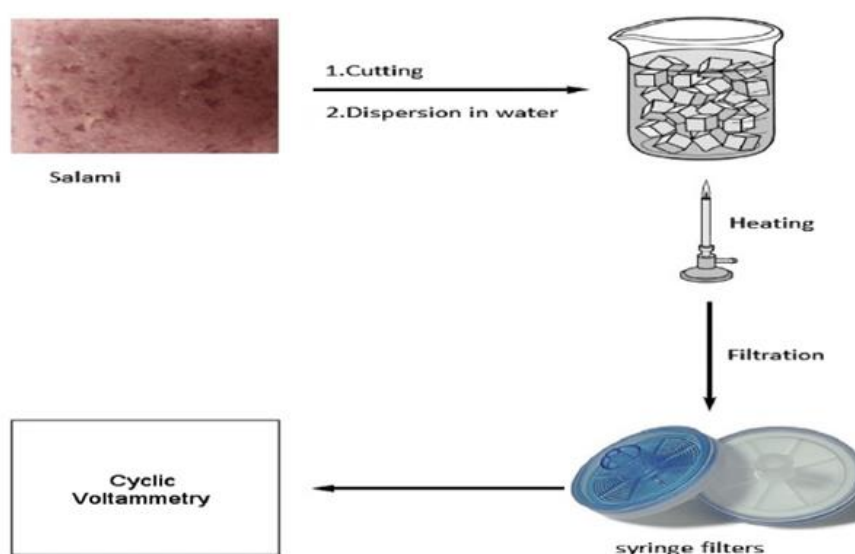
7.1 Voltametrické stanovení dusitanů pomocí polyvinylimidazolu

Tato metoda stanovení využívá tříelektrodový systém – referentní Ag/AgCl elektrodu, platinovou elektrodu a pracovní uhlíkovou pastovou elektrodu. Polyvinylimidazol se získá polymerací N-vinylimidazolu. Sušení probíhá při teplotě 80 °C po dobu 1 hodiny a poté se polyvinylimidazol rozmělní na jemný prášek. CPE byla připravena smícháním práškového grafitu a připraveného polyvinylimidazolu ve formě prášku, ke kterým byl přidán silikonový olej a vytvořila se homogenní pasta. Takto připravená pasta se naplnila polyethylenovou trubicí a špička elektrody se vyleštila hladkým papírem. Připravená elektroda byla ještě doplněna měděným drátem. Po každém experimentu je třeba elektrodu vyleštit.

Stanovení spočívá v tom, že se použijí různé masné výrobky (salám, klobása) nakrájené na plátky (cca 20 g), ke kterým se přidá 200 ml deionizované vody. Vzorek s deionizovanou vodou je míchán 2 minuty v mixéru a následně vložen na 20 minut do vodní lázně o teplotě 50 °C. Po ochlazení je vzorek zředěn na 250 ml a zfiltrován přes Whatmanův filtr a následně přes membránový filtr. 1 ml roztoku se přidá do pufovacího roztoku. Schéma přípravy vzorku je zobrazeno na obrázku 3. Před voltametrickým měřením dochází k odstranění kyslíku z roztoku po dobu 5 minut dusíkem. Dusitany se stanoví cyklickou voltametrií.

Hlavním cílem této práce bylo vymyslet jednoduchou, levnou a rychlou metodu, která bude umožňovat stanovení dusitanů v masných výrobcích. Ideálním pufrům byl zvolen fosfátový pufr, a to zejména pro vysokou citlivost na rozdíl od acetátového pufru. Ukázalo se, že polyvinylimidazol v kombinaci s uhlíkovou pastovou elektrodou mají výbornou elektrokatalytickou aktivitu pro stanovení dusitanů. Pomocí diferenčně pulzní voltametrie byla stanovena mez detekce, která je pro dusitanové ionty 9×10^{-8} mol/l.

Voltametrická metoda poskytuje uspokojivé výsledky, dostatečnou reprodukovatelnost, citlivost, selektivitu a méně nákladné vybavení než například v případě chromatografických a spektroskopických metod. Využívá se pro stanovení dusitanových iontů v různých druzích masa [11].



Obrázek 3 – Příprava salámu na měření [11]

7.2 Voltametrické stanovení dusitanů po reakci s ranitidinem produkujícím 2–methylfuranový kation

Dusitany velmi často reagují s aminy za vzniku karcinogenních nitrosaminů, a proto je velmi důležité sledovat jejich přítomnost v masných výrobcích z důvodu jejich bezpečnosti. Studie prokázaly pozitivní výsledek v testech na genové mutace, indukci strukturních chromozomálních aberací a transformace buněk v buňkách savců.

Vědecké práce naznačují, že amperometrické metody využívající sofistikované senzory na základě nanomateriálů umožňují alternativní přístupy k monitorování dusitanů v klobásách, uzeném masu a rybách. Zde se jedná o novou voltametrickou metodu umožňující sledování

dusitanů v masných výrobcích, spočívající v katodické redukci 2-methyl-2H-furan-3-onu s postranním řetězcem odvozeným od ranitidinu.

Vhodným voltametrickým senzorem pro stanovení obsahu dusitanů v klobásách byla zvolena pastová elektroda ze skelného uhlíkového prášku pokrytá tenkou vrstvou elektrochemicky redukováného oxidu grafenu a adsorbované povrchově aktivní látky dodecylbenzensulfonátu sodného. K tomuto stanovení se používají standardní roztoky hydrochloridu ranitidinu, N,N-dimethylformamidu, sulfanilamid, N-(1-naftyl)ethylendiamin, dusitan sodný, ledová kyselina octová, 85 % kyselina fosforečná, hydrogenfosforečnan sodný, dihydrogenfosforečnan sodný, dodecylsírán sodný a dodecylbenzensulfonát sodný.

Voltametrická měření se provádí pomocí potenciostatu/galvanostatu, který se připojí k počítači a je kontrolován příslušným počítačem. Pracovní elektrodou je zde pastová elektroda ze skelného uhlíkového prášku, referentní Ag/AgCl elektroda a třetí elektrodou je elektroda platinová. Skleněná uhlíková pastová elektroda se jeví jako uspokojivá elektroda pro nepřímé stanovení dusitanů v Britton–Robinsonově pufru.

Vzorek masného výrobku (párky, uzené maso, lunchmeat) se nakrájí na malé kousky a 40 g vzorku se přeneso do kádinky s 0,1 M Britton – Robinsonovým pufrům o pH 2. Vzniklá homogenní směs se zahřeje na teplotu 50 °C po dobu 20 minut, poté ochladí na laboratorní teplotu a zředí na objem 250 ml. Následuje filtrace přes Whatmanův filtr a membránový filtr z acetátového vlákna. Získaný filtrát se použije na analýzu s využitím square wave voltametrie (SWV) [12].

7.3 Analytické metody

7.3.1 Kolorimetrie

Kolorimetrie je založena na reakci dusitanu, sulfanilamidu a N-1-naftylethylendiaminu v kyselém prostředí za vzniku červeného azobarviva. Kolorimetrické stanovení představuje základ pro stanovení dusitanů v uzeném maso a také sýru, sušeném mléce, odpadní a mořské vodě. Kolorimetrické stanovení lze využít v případě analýzy dusičnanů po předchozí redukci na dusitany. Kolorimetrické testy jsou náchylné k interferenci z mnoha zdrojů včetně neúplné redukce dusičnanů na dusitany. Kromě chemických vlivů mohou být kolorimetrická stanovení ovlivněna také fyzikálními interferencemi pocházejících ze zákalu v měřicím roztoku. Mez detekce je v případě kolorimetrie pro dusitany i dusičnany okolo 1 mg/kg [13].

7.3.2 Vysokoučinná kapalinová chromatografie

HPLC se využívá pro analýzu dusitanů a dusičnanů v uzeném mase, zelenině, pivu a vodě. Umožňuje poměrně rychlou analýzu a stanovení obou aniontů současně. K jejich stanovení se využívá HPLC s přímou UV detekcí. Mez detekce se u vysokoučinné kapalinové chromatografie pro dusitany a dusičnany pohybuje v rozmezí 0,1-1 mg/kg.

7.3.3 Plynová chromatografie

Také plynová chromatografie se uplatňuje při stanovení dusičnanů a dusitanů ve vodě a v potravinách. Veškeré postupy plynové chromatografie obsahují produkci těkavého derivátu, extrakci do organického rozpouštědla a měření pomocí selektivního detektoru [13].

7.3.4 Ionexová chromatografie

Jedná se o analytickou metodu, ve které jsou dusitany extrahovány ze zpracovaných vzorků mas a poté analyzovány ionexovou chromatografií s UV detekcí. Modelovými vzorky byly použity šunka a salám. Vzorek salámu či šunky se smíchá s deionizovanou vodou a pomocí mixéru se vytvoří homogenní směs. Takto vzniklá homogenní směs se zahřeje na teplotu mezi 70–80 °C po dobu 15 minut. Následně se směs zchladí na laboratorní teplotu a odstředí po dobu 10 minut, kdy dojde k vyloučení supernatantu a následuje filtrace přes Whatmanův filtr. Filtrát je odebrán pro další analýzu.

Dusičnany a dusitany byly odděleny kolonou IonPac s použitím 5 mM hydroxidu sodného po dobu 10 minut, následně byla kolona promyta 100 mM hydroxidem sodným po dobu 5 minut a na závěr byl použit 5 mM hydroxid sodný po dobu 10 minut. Průtok eluentu byl 1 ml/min. Analyty byly detekovány pomocí UV detekce při 225 nm.

Ve vzorku šunky bylo stanoveno 11,6 mg/kg dusitanů a 5,37 mg/kg dusičnanů. Ve vzorku salámu bylo stanoveno 108 mg/kg dusitanů a 98,5 mg/kg dusičnanů [14].

8 Mikrobiologie masa

U zdravých zvířat se mikroorganismy do těla dostávají prostřednictvím kůže, peří, trávicích a močových cest. Mikroorganismy přítomné na zvířatech kontaminují jatečně upravená těla, zejména během kuchání a stahování z kůže. Kontaminaci po porážce zvířete a následného zpracování může způsobit také vzduch, voda nebo povrchy zařízení, které nejsou zcela sterilní. Kontaminaci mikroorganismy může způsobit také sám člověk například nedodržením správných hygienických návyků. Především u již zpracovaných jídel, myšleno hotových jídel může dojít ke kontaminaci přidáním různých přísad, které jsou již samy kontaminovány.

8.1 Mikrobiální kontaminanty

8.1.1 Kvasinky

Kvasinky neoznačujeme za mikroorganismy primárně způsobující kažení masných výrobků, a tudíž nedochází k jejich časté identifikaci a izolaci. Mezi kvasinky řadíme rody *Candida*, *Cryptococcus*, *Rhodotorula* a *Debaryomyces*. Tyto rody se vyznačují především schopností růst při nízkých teplotách. Například v jehněčím mase byly objeveny kvasinky rodu *Candida*, konkrétně *Candida lipolytica*, *Candida zeylanoides*, *Candida sake* nebo *Cryptococcus laurentii*. Ve zpracovaných masných výrobcích (slanina, šunka, salám, paštika) nalezneme až 12 druhů kvasinek, jmenovitě například *Candida zeylanoides*, *Candida alimentaria* či *Debaryomyces hansenii*.

Neustále jsou popisovány nové druhy kvasinek po jejich izolaci z masných výrobků. Příkladem může být *Kazachstania psychrophila*, izolovaná z vakuově baleného hovězího masa nebo *Yarrowia porcina* získaná z masa vepřového [2].

8.1.2 Bakterie

Následkem balení a skladování masných výrobků při nízké teplotě, v modifikované atmosféře nebo vakuově balené umožňuje růst psychrotrofních a fakultativně anaerobních druhů bakterií. Především se jedná o čeleď *Enterobacteriaceae*: *Acinetobacter*, *Enterobacter*, *Hafnia*, *Proteus*, *Serratia*, *Aeromonas*, *Alcaligenes*, *Providencia* a *Pseudomonadaceae* nebo kmen bakterií *Firmicutes* zahrnující rody *Brochothrix*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Leuconostoc*, *Weissella*, *Lactobacillus* a *Lactococcus*.

8.1.2.1 Rod *Pseudomonas*

V masných výrobcích můžeme naléznout *Pseudomonas lundensis*, *Pseudomonas fragi* a *Pseudomonas fluorescens*. Jedná se o psychrotrofní druhy bakterií vyskytující se ve vodě, vzduchu a velmi často se vyskytují na jatečně upravených tělech zvířat. Tyto bakterie mají schopnost tvořit biofilm. Rod *Pseudomonas* byl nalezen především ve zkaženém mletém hovězím mase, které bylo skladováno v modifikované atmosféře.

8.1.2.2 Bakterie mléčného kvašení

Bakterie mléčného kvašení představují rozsáhlou skupinu více než 10 rodů, největším rodem je rod *Lactobacillus*, který zahrnuje více než 100 druhů. V masných výrobcích bylo popsáno velké množství druhů bakterií mléčného kvašení. Většina těchto druhů je pro daný produkt prospěšná a některé z nich se používají jako biokonzervační látky. Ovšem mezi druhy bakterií mléčného kvašení se ukázalo, že některé kmeny patřící do rodu *Lactobacillus*: *Lactobacillus sakei*, *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus algidus*, *Lactobacillus fuchuensis* a *Lactobacillus oligofermentans* znehodnocují drůbeží maso nebo rybí výrobky.

Rod *Lactococcus* zahrnuje druh *Lactococcus piscium* odpovědný za máslové pachy. U tohoto druhu vědecké studie prokázaly potenciální schopnost fermentace několika sacharidů, ale všimli si, že postrádá fosfoketolázovou cestu přítomnou ve 12 dalších laktokokových sekvenovaných genomech. V genomu jsou ovšem přítomny čtyři různé způsoby využití pyruvátu s potenciální následnou tvorbou mnoha znehodnocujících látek – acetyl nebo acetoin, které mohou odpovídat za máslové pachy.

Rod *Leuconostoc* pojímá několik druhů, u kterých bylo jednoznačně dokázáno, že korespondují za vady vůně či vzhledu masných výrobků.

8.1.2.3 *Brochothrix thermosphacta*

Rod *Brochothrix*, patřící do *Listeriaceae*, zahrnuje dva druhy: *Brochothrix thermosphacta* a *Brochothrix campestris*. Jedná se o bakterie vyskytující se ve vzduchu, modifikované atmosféře a vakuově balených výrobcích. Izolují se již několik let ze zkažených masných výrobků z hovězího, vepřového, jehněčího, drůbežího nebo rybího masa. I přes zvýšený výskyt těchto bakterií máme k dispozici velmi málo informací o jejich metabolismu [2].

ZÁVĚR

Maso obsahuje vodu, bílkoviny, vitaminy a minerály. Jedná se o zdroj obživy, konzumující se již od pravěku. Představuje také značný zdroj omega-3 mastných kyselin, aminokyselin a antioxidantů.

Z hlediska vitaminů je maso bohaté na vitamin B₁, B₂, niacin, B₆ a B₁₂. Jedná se o vitaminy rozpustné ve vodě. Především vitamin B₁₂ je v masných výrobcích hojně zastoupen. Nedostatkem toho vitamínu trpí především vegetariáni a vegani, kteří nepřijímají živočišnou stravu. Velmi často se u nich poté vyskytují zdravotní problémy, například chudokrevnost, únava nebo závratě.

Dusitany jsou neustálým a velmi diskutovaným tématem i v současnosti. Překvapivou skutečností ovšem je, že lze naléznout i pozitivní vlivy dusitanů na zdraví člověka, a ne pouze ty negativní. Překvapivým zjištěním může být například jejich pozitivní vliv na krevní tlak či kardiovaskulární systém. Nalezneme ovšem také jejich negativní vlivy, jako je například onemocnění methemoglobinémie neboli syndrom modrého dítěte. Dusitany bývají často označovány za potenciální původce rakoviny žaludku a jícnu. Význam mají také v konzervaci potravin, kde jsou nenahraditelné. V současné době je akceptováno 150 mg/kg dusitanů ve zpracovaném mase a 100 mg/kg ve sterilizovaných masných výrobcích. Akceptovatelný denní příjem dusitanů činí 0,06–0,07 mg na kilogram tělesné hmotnosti za den.

SEZNAM CITACÍ

- [1] KAMENÍK, Josef. *Maso jako potravina: produkce, složení a vlastnosti masa*. Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita, 2014. ISBN 978-80-7305-673-5.
- [2] TOLDRÁ, Fidel.(2017). *Lawrie's Meat Science* (8th edition). Elsevier [online]. [cit. 2021-4-7]. <https://app.knovel.com/hotlink/toc/id:kpLMSE0011/lawries-meat-science/lawries-meat-science>
- [3] VELÍŠEK, Jan a Jana HAJŠLOVÁ. *Chemie potravin*. Rozš. a přeprac. 3. vyd. Tábor: OSSIS, 2009. ISBN 978-80-86659-16-9.
- [4] KARWOWSKA, Małgorzata a Anna KONONIUK. Nitrates/Nitrites in Food—Risk for Nitrosative Stress and Benefits. *Antioxidants* [online]. 2020, 9(3) [cit. 2021-4-18]. ISSN 2076-3921. doi:10.3390/antiox9030241
- [5] GOVARI (M. ΓΚΟΒΑΡΗ), M. a A. PEXARA (A. ΠΕΞΑΡΑ). Nitrates and Nitrites in meat products. *Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society* [online]. 2018, 66(3), 127-140 [cit. 2021-4-6]. ISSN 2585-3724. doi:10.12681/jhvms.15856
- [6] FLORES, Mónica a Fidel TOLDRÁ. Chemistry, safety, and regulatory considerations in the use of nitrite and nitrate from natural origin in meat products - Invited review. *Meat Science* [online]. 2021, 171 [cit. 2021-5-9]. ISSN 03091740. doi:10.1016/j.meatsci.2020.108272
- [7] HORD, Norman G, Yaoping TANG a Nathan S BRYAN. Food sources of nitrates and nitrites: the physiologic context for potential health benefits. *The American Journal of Clinical Nutrition* [online]. 2009, 90(1), 1-10 [cit. 2021-3-9]. ISSN 0002-9165. doi:10.3945/ajcn.2008.27131
- [8] MA, Linsha, Liang HU, Xiaoyu FENG a Songlin WANG. Nitrate and Nitrite in Health and Disease. *Aging and disease* [online]. 2018, 9(5) [cit. 2021-5-8]. ISSN 2152-5250. doi:10.14336/AD.2017.1207
- [9] Vyhláška 306/2004 Sb., kterou se stanoví druhy a podmínky použití přídatných a pomocných látek při výrobě potravin
- [10] CASONI, Dorina, Roxana Rebecca BADIU a Tiberiu FRENȚIU. "Spectrophotometric determination and assessment of potential health risk of nitrite from meat and processed meat products ." *Studia Universitatis Babeş-Bolyai Chimia* [online]. 2019, 64(2 T1), 265-277 [cit. 2021-4-15]. ISSN 12247154. doi:10.24193/subbchem.2019.2.22
- [11] YILDIZ, Gulcemal, Nevin OZTEKIN, Ayca ORBAY a Filiz SENKAL. Voltammetric determination of nitrite in meat products using polyvinylimidazole modified carbon paste electrode. *Food Chemistry* [online]. 2014, 152, 245-250 [cit. 2021-5-6]. ISSN 03088146. doi:10.1016/j.foodchem.2013.11.123
- [12] BERISHA, Liridon, Arsim MALOKU, Majlinda HALITI, Granit JASHARI, Ardian UKMATA a Milan SÝS. Voltammetric determination of nitrites in meat products after reaction with ranitidine producing 2-methylfuran cation. *Microchemical Journal* [online]. 2020, 159 [cit. 2021-5-3]. ISSN 0026265X. doi:10.1016/j.microc.2020.105403

[13] MASSEY, R.C. Methods for the analysis of nitrate and nitrite in food and water. *Nitrates and Nitrites in Food and Water* [online]. Elsevier, 1996, 1996, s. 13-32 [cit. 2021-6-7]. ISBN 9781855732827. doi:10.1533/9781855736559.13

[14] SIU, Daniel C a Alan HENSHALL. Ion chromatographic determination of nitrate and nitrite in meat products. *Journal of Chromatography A* [online]. 1998, 804(1-2), 157-160 [cit. 2021-7-14]. ISSN 00219673. doi:10.1016/S0021-9673(97)01245-4