

**MENDELOVA UNIVERZITA V BRNĚ
AGRONOMICKÁ FAKULTA**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BRNO 2015

KATEŘINA ZELINKOVÁ

Mendelova univerzita v Brně
Agronomická fakulta
Ústav Technologie potravin



**Agronomická
fakulta**

**Mendelova
univerzita
v Brně**



Probiotické mikroorganismy v masné výrobě
Bakalářská práce

Vedoucí práce:
Ing. Michal Mihok, Ph.D.

Vypracoval:
Kateřina Zelinková

Brno 2015

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem práci:.....
.....

.....vypracoval/a samostatně a veškeré použité prameny a informace uvádím v seznamu použité literatury. Souhlasím, aby moje práce byla zveřejněna v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách ve znění pozdějších předpisů a v souladu s platnou *Směrnici o zveřejňování vysokoškolských závěrečných prací*.

Jsem si vědom/a, že se na moji práci vztahuje zákon č. 121/2000 Sb., autorský zákon, a že Mendelova univerzita v Brně má právo na uzavření licenční smlouvy a užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona.

Dále se zavazuji, že před sepsáním licenční smlouvy o využití díla jinou osobou (subjektem) si vyžádám písemné stanovisko univerzity, že předmětná licenční smlouva není v rozporu s oprávněnými zájmy univerzity, a zavazuji se uhradit případný příspěvek na úhradu nákladů spojených se vznikem díla, a to až do jejich skutečné výše.

V Brně dne:.....

.....
podpis

Poděkování

Dovoluji si tímto poděkovat panu Ing. Michalu Mihokovi, PhD. a paní Ing. Haně Šulcerové, Ph.D., za příkladné vedení, cenné rady a připomínky, které mi pomohl při vypracování této práce.

ABSTRAKT

Tato bakalářská práce se zabývá masnými fermentovanými výrobky s plísní na povrchu. Účinky plísní na sensorické vlastnosti těchto výrobků a možnosti použití probiotických eukaryot, hlavně plísní, k jejich úpravě. Plísně používané na povrchovou úpravu salámů mohou vést k žádoucímu i nežádoucímu efektu. Do nežádoucích efektů patří růst nechtěných plísní a tvorba jejich toxických sekundárních metabolitů. Žádoucí efekt je spojen se zlepšením jejich údržnosti, textury, chuti a vůně. Probiotika jsou mikroorganismy, které mají kladný vliv na trávicí trakt jak člověka, tak zvířat. Musí být odolné vůči stresu a být schopné projít trávicím traktem bez poškození. Díky tomu se zachovává jejich pozitivní vliv na trávení.

KLÍČOVÁ SLOVA

Plíseň, fermentované masné výrobky, probiotické mikroorganismy, masné výrobky s plísní na povrchu, mykotoxiny, tvorba aromatu

ABSTRACT

This bachelor thesis is about molded fermented meat products and the possibility to use the probiotic organisms on the surface of these products. The molds can form desirable and undesirable effects. One of the undesirable effect is the fact that the molds can form toxic second metabolites. The molds are used as a coverage on the fermented meat products to form specific sensory substances. Probiotics are microorganisms which confer health benefits to the digestive tract of their host. Any microorganism capable of surviving in the digestive tract of host, tolerate stres and keep such effect can be considered a candidate.

KEYWORDS

Molds, fermented meat products,probiotics, molded meat products, mycotoxins, aroma forming

OBSAH

1	ÚVOD.....	8
2	PLÍSNĚ.....	9
2.1	Rod <i>Alternaria</i>	9
2.2	Rod <i>Aspegillus</i>	10
2.3	Rod <i>Penicillium</i>	10
2.4	Rod <i>Cladosporium</i>	12
2.5	Rod <i>Fusarium</i>	13
2.6	Rod <i>Mucor</i>	13
3	PLÍSNĚ VE FERMENTOVANÝCH MASNÝCH VÝROBCÍCH.....	15
3.1	Kontaminující plísně.....	16
3.1.1	Nežádoucí sekundární metabolity plísní v masné výrobě.....	17
3.2	Kulturní plísně	19
3.3	Aplikace plísňových kultur	20
3.4	Tvorba aromatických sloučenin plísněmi.....	22
3.4.1	Primární a sekundární metabolity.....	23
3.4.2	Degradace enzymatických proteinů a lipolýza.....	24
3.4.3	Formace aromatu pomocí enzymů	25
3.5	Výrobci a sortiment kulturních plísní	28
3.5.1	Cr. Hansen	28
3.5.2	Lyocarni	28
4	PROBIOTICKÉ MIKROORGANISMY.....	29
4.1	Vlastnosti probiotik.....	29
4.1.1	Odolnost proti stresu	30
4.1.2	Schopnost přežít v trávicím traktu	30
4.1.3	Schopnost udžet se ve trávicím traktu.....	31
4.2	Eukaryotická probiotika versus prokaryotickým probiotikům.....	31
4.3	Eukaryotická probiotika	31
4.4	Prospěšné účinky eukaryotických probiotik	32
4.4.1	Nutriční výhody	32
5	MASNÉ VÝROBKY S PLÍSNÍ NA POVRCHU.....	34
5.1	Balení.....	34

5.2	Trvanlivost a skladovatelnost.....	34
5.3	Produkce trvalých fermentovaných masných výrobků v Evropě.....	36
5.3.1	Maďarsko	36
5.3.2	Itálie.....	36
5.3.3	Španělsko	38
6	POŽADAVKY LEGISLATIVY PŘI VÝROBĚ FERMENTOVANÝCH MASNÝCH VÝROBKŮ.....	40
6.1	Chemická a mikrobiologická kritéria.....	41
6.1.1	Podle veterinárního zákona	41
6.1.2	Podle zákona o potravinách.....	41
7	ZÁVĚR.....	42
8	LITERATURA	43
	Internetové zdroje	Chyba! Záložka není definována.
	Zdroje obrázky.....	Chyba! Záložka není definována.

1 ÚVOD

Existuje mnoho masných výrobků. Jedními z nich jsou fermentované masné výrobky s plísní na povrchu. Na povrchové ošetření plísní se nejčastěji používají plísňe z rodu *Penicillium*.

Plísňe jsou eukaryotické mikroskopické vláknité mikroorganismy, které svou přítomností mění aroma a chuť masných výrobků. S použitím plísní je spojené riziko vzniku jejich sekundárních metabolitů, mykotoxinů. Mykotoxiny jsou toxické látky, které často mají karcinogenní účinky na organismus. Z toho důvodu se musíme vyvarovat jejich vzniku. Toho docílíme tak, že dodržujeme legislativní požadavky při výrobě a distribuci masných výrobků.

Plísňe pro povrchovou úpravu masných fermentovaných výrobků se používají zejména z důvodu ovlivnění sensorických vlastností těchto výrobků. Nejčastěji používané plísňe jsou *Penicillium chrysogenum* a *Penicillium nalgiovense*. Ty díky své proteolytické a lipolytické aktivitě zlepšují nejen vzhled a texturu fermentovaných masných výrobků, ale i jejich chuť a aroma.

V této práci se také zabývám možnostmi použití probiotických plísní na povrchovou úpravu těchto výrobků. Probiotické organismy, jsou organismy, které mají blahodárný účinek na trávicí trakt hostitele. Aby bylo probiotikum nazýváno probiotikem, musí splňovat několik podmínek, z nichž je nejdůležitější průchod trávicím traktem hostitele bez poškození a zachování pozitivního účinku na trávicí trakt hostitele. Do probiotik patří prokaryotické i eukaryotické mikroorganismy. Mezi eukaryotické probiotika patří kromě plísní (*Asprgillus*, *Penicillium*) i kvasinky (*Sacharomyces*, *Candida*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Torulopsis*) a některé druhy řas.

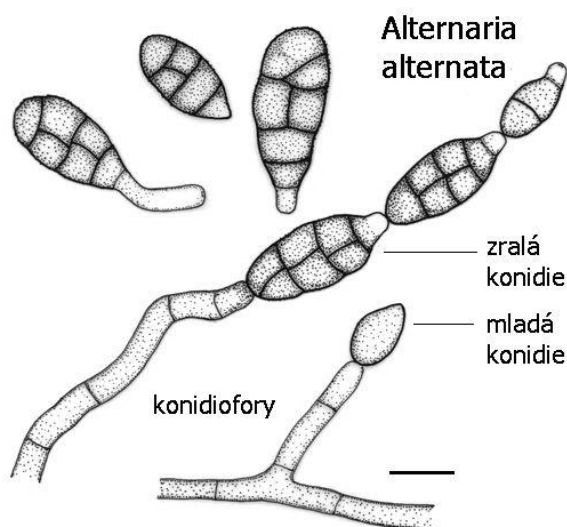
2 PLÍSNĚ

Plísně jsou eukaryotické mikroskopické vláknité mikroorganismy, které patří mezi houby (*Fungi*). Technicky důležité plísně patří do dvou taxonomických jednotek. Jedna z nich je třída *Zygomycetes*. Patří mezi *Zygomycotina*. Typické pro ně je jednobuněčné tzv. nepřehrádkované mycelium. Rozmnožují se buď pohlavně tvorbou tzv. zygospor, nebo nepohlavně pomocí endospor. Další jednotkou je podkmen *Ascomycotina*. Rozmnožují se buď askosporami, to je pohlavním rozmnožování, nebo exosporami (nepohlavní rozmnožování). Mají přehrádkové mycelium. Dříve do plísni patřil podkmen *Deuteromycotina*, takzvané houby nedokonalé (Bibek Ray and Arun Bhunia, 2014; Šilhánková, L., 2008).

Mezi potravinářsky významné rody patří rod *Alternaria*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Cladosporium*, *Fusarium* a rod *Mucor* (Batt, Carl A and Mary Lou, 2014).

2.1 Rod *Alternaria*

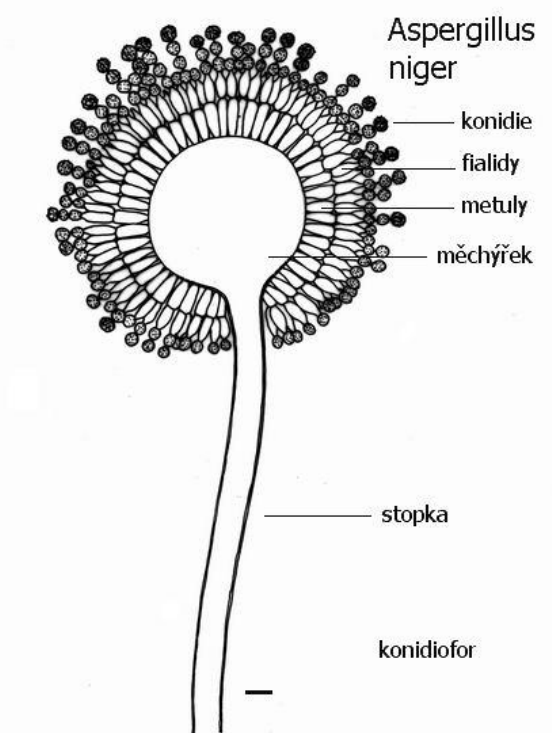
Do tohoto rodu patří kolem padesáti druhů plísni. Tvoří jakoby hedvábné nebo pavučinově vláknité kolonie. Mají krátké často nevětvené konidiofory, které jsou přepážkované a jsou hruškovitě zakončené. Vyskytují se hlavně v produktech rostlinné výroby, plodech a velmi frekventovaně na obilovinách. Způsobuje kažení ovoce, zeleniny a také citrusů. *A. solani* zapříčiňuje nemoc brambor, *A. brassicae* parazituje na kapustě. *A. alternata* tvoří toxiny (Bibek Ray and Arun Bhunia, 2014; Görner, F. a Valík, L., 2004).



Obrázek 1: Nákres *Alternaria alternata* (is. muni, 2006)

2.2 Rod *Aspegillus*

Do rodu *Aspergillus* patří hlavně velmi rychle rostoucí mikromycety. Plně vybarvené kolonie se tvoří asi do tří dnů po inkubaci. Obsahují širokou škálu pigmentů, mohou mít barvu od žluté přes zelenomodrou, až do černošedé. Mají septované hyfy a dvojitě konturovanou stěnu s konidiofory kulovitě zakončenými. Na tyto zakončení navazují výběžky, které nesou řetězky různě pigmentovaných konidií. V této době je známo několik set druhů *Aspergillů*. Infekce u člověka, však vyvolává pouze dvacet z nich. Jsou jednak původci systémových mykóz a povrchových infekcí. Zároveň jsou producenti mykotoxinů, z nichž nejznámější je aflatoxin, který se může stát zdrojem i hromadných otrav. *Aspergillus* je používán hlavně k fermentaci Asijských pokrmů. Například *Aspergillus sojae* je využíván ke kvašení sóji a rýže (Batt, Carl A and Mary Lou, 2014; Görner, F. a Valík, L., 2004; Votava, M., 2006).



Obrázek 2: Nákres *Aspergillus niger* (is. muni, 2006)

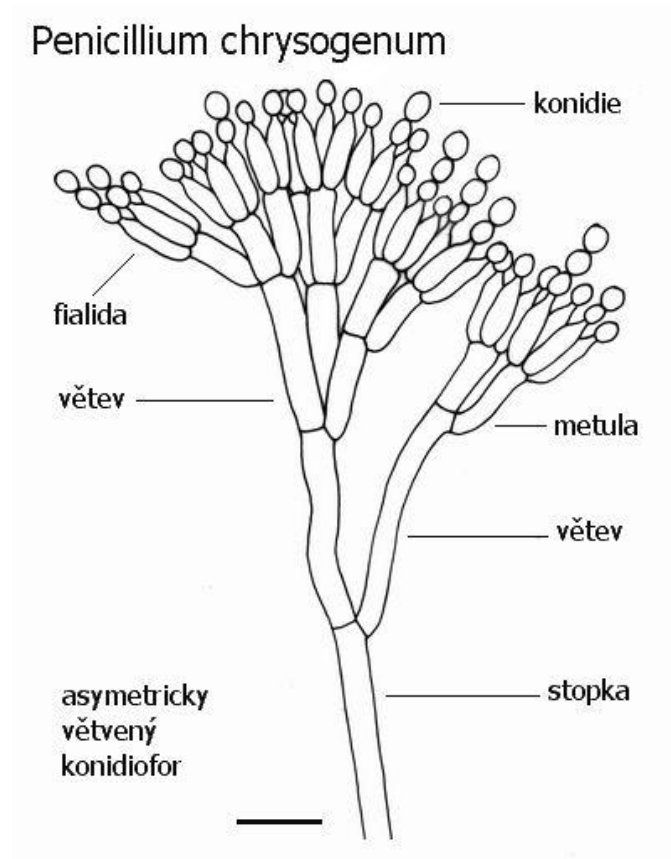
2.3 Rod *Penicillium*

Tento rod vytváří kolonie, které jsou velmi pestře a rozličně pigmentované. Mají velmi rychlý růst, identifikace jejich druhů je náročná. Některé duhy jsou využívány jako startovací kultury při fermentaci. Některá *Penicillia* používané

v potravinářství mohou tvořit mykotoxiny. Některé jsou i patogenní například *Penicillium marneffe* vyvolává infekce, které postihují plíce, játra i kůži.

Konidiofory jsou vzpřímené, izolovaně septované, na konci symetricky nebo asymetricky větvené. Na konci větvení jsou fialidy, svazky odškrucujících se konidií uspořádaných v dlouhých řetězcích. Konídie jsou jednobuněčné kruhové nebo oválné, zelené, hnědé, modré, červené nebo jinak barevné. Některé druhy se rozmnožují také pohlavně a tvoří kulaté aska, ve kterých jsou umístěné askospóry.

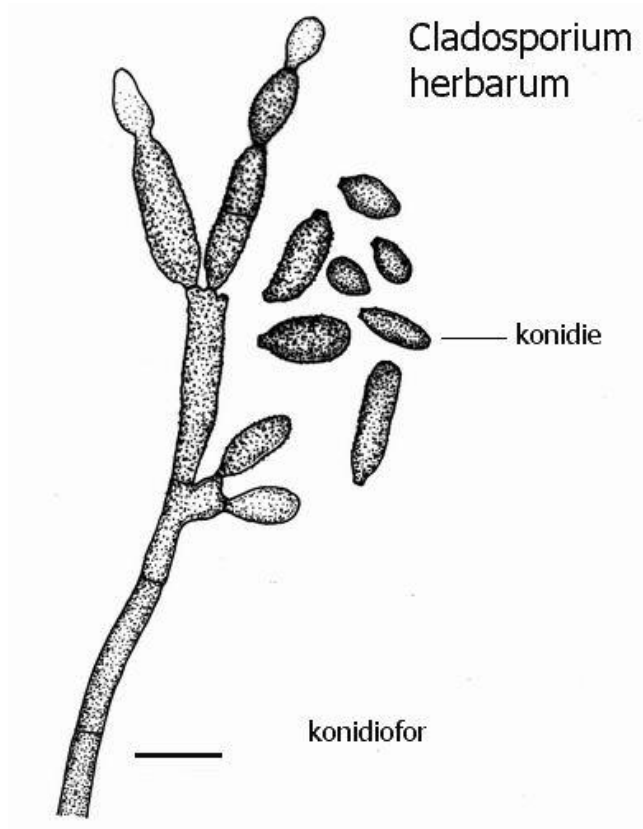
Penicillia jsou velmi často používány k fermentaci potravin. Produkuje pektinázy, amylázy, proteinázy, lipázy a jiné enzymy. Ty rozbíjí komplexní sloučeniny obsažené v potravinách na jednodušší látky potřebné k jejich růstu. (Batt, Carl A and Mary Lou, 2014; Bibek Ray and Arun Bhunia, 2014; Votava, M., 2006).



Obrázek 3:nákres *Penicillium Chrysogenum* (is. muni, 2006)

2.4 Rod *Cladosporium*

Má tmavě barevné a ploché kolonie, mycelium septované, vzdušné hyfy jsou většinou tmavězelené, substrátové hyfy modrozelené až černozeleň. Konidiofóry jsou nepravidelně větvené, septované, na koncích s kratšími nebo delšími rozvětvenými řetízky konidií. Konídie jsou obvykle kulovité nebo válcovité, jednobuněčné, málokdy septované. Nachází se na obilí, ovoci a zelenině, v masných výrobcích (Görner, F. a Valík, L., 2004).

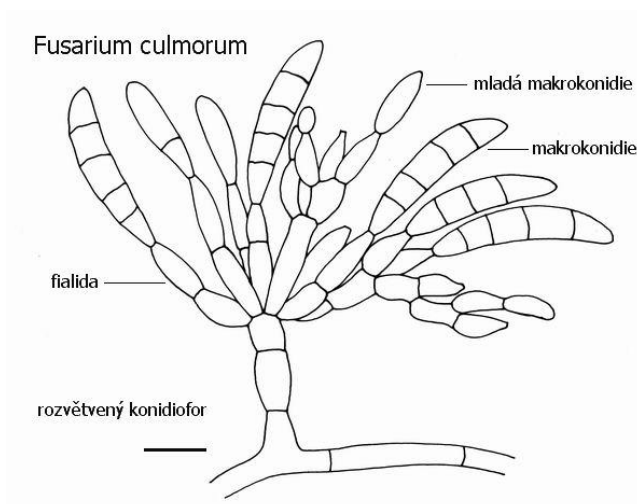


Obrázek 4: Nákres *Cladosporium herbarum* (is.muni, 2006)

2.5 Rod *Fusarium*

Vzdušné mycelium je řídké a nepravidelné, pestře zbarvené. Pigmenty mohou difundovat do substrátu. Krátké konidiofory, uspořádaně izolované, nebo ve skupinách tvoří početné velké tenkostěnné větvenovité vícebuněčné konidie. Někdy se tvoří malé, převážně jednobuněčné kulovité nebo hruškovité, hladkostěnné mikrokonidie. Podobně mohou vznikat kulovité hrubostěnné chlamydospóry.

Tvoří toxin: T-2 toxin, navalenon, diacetoxyscirpenol a zearalenon. Kromě toho, že tvoří mykotoxiny, jsou *Fusaria* patogení pro obiloviny ve všech stádiích růstu i při posklizňových úprav (Bibek Ray and Arun Bhunia, 2014; Görner, F. a Valík, L., 2004).



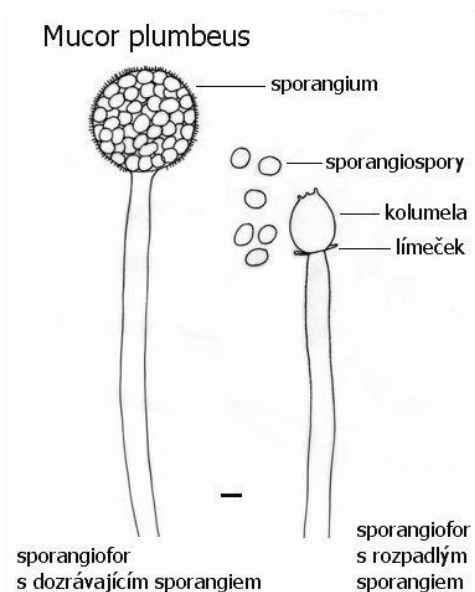
Obrázek 5: Nákres *Fusarium culmorum* (is.muni, 2006)

2.6 Rod *Mucor*

Vzdušné mycelium je vatovité, zpočátku bílé, později tmavé, rychle se rozrůstá. Hyfy jsou málo větvené a většinou nejsou septované. Substrátové mycelium

bývá málo vyvinuté. Některé druhy vytvářejí v tekutých produktech kvasinkovité shluky buněk. V hyfách se částečně tvoří sůdkovité nebo kulovité hrubostěnné silné granulované tmavězelené chlamydo-spóry. Má silné, stojící větvené nebo nevětvené nosiše sporangií, které na konci nesou po jedné sporangii. Sporangie jsou kulovité, z počátku světlé, později hnědé nebo tmavěhnědé až černé, dobře viditelné pouhým okem.

Mucor mucedo se využívá ve fermentačním průmyslu na výrobu proteolytických enzymů a *M. pusillus* na výrobu mikrobiálního syřidla (Bibek Ray and Arun Bhunia, 2014; Görner, F. a Valík, L., 2004).



Obrázek 6: Nákres *Mucor plumbeus* (is.muni,2006)

3 PLÍSNĚ VE FERMENTOVANÝCH MASNÝCH VÝROBCÍCH

Růst některých plísní může mít pozitivní vliv na chuť a aroma fermentovaných masných výrobků, díky jejich účasti na degradaci lipidů a proteinů. Bylo zjištěno, že se enzymy *P. chrysogenum* a *P. nalgiovense* podílejí na lipolytických a proteolytických aktivitách, které jsou prekurzory chuti a vylepšují texturní vlastnosti výrobku. Plísně také působí proti oxidaci sušených masných výrobků, mohou vylepšit chuť, vůni a kvalitu skladování. Nicméně tyto pozitivní vlivy nebyly dokázány. Většinou jsou plísně pokládány za důvod kažení, které snižuje kvalitu potravin a tím zvyšuje ekonomické náklady (Benito *et al.*, 2005; Martin *et al.*, 2006; Tabuc *et al.*, 2004; Martin *et al.*, 2006).

Plísně používané pro potraviny nesmí být ani patogenní ani toxické. Zlepšují chuť, vzhled a stabilitu výrobků. Dále musejí inhibovat nežádoucí mikroorganismy (Leistner 1990).

Zrání a zrací techniky používané ke zpracování masných výrobků vedou k výrazné povrchové kolonizaci velkým množstvím plísní. Ve vyzrálých produktech může na povrchu růst populace mikroorganismů. Kromě bakterií jako jsou *micrococci* a *stafilococci* se zde můžou vyskytovat i kvasinky a plísně. Ty mohou kolonizovat povrch fermentovaných masných výrobků větší částí doby zrání, která je většinou 12-24 měsíců. Kvasinky tvoří film po celém povrchu masného výrobku. Díky jejich enzymatické aktivitě přispívají vývoji konečných sensorických charakteristik. Plísně vyvíjí své *mycelium* po tom co kvasinky vyrostly. Nekonrolovaný růst plísní může mít škodlivý účinek jako je změna technologických vlastností a nutriční hodnoty výrobku. Produkci toxických sekundárních metabolitů, mykotoxinů a tvorbu alergenních látek a šíření mykózy u pracovníků zaměstnaných v masném průmyslech. Plísně používané v potravinářském průmyslu musí splňovat tato kritéria:

- Mít antioxidační vlastnosti, přispívající ke správnému vybarvení
- Zabránit povrchu masných výrobků, aby byly slizké a lepkavé.
- Přispívat k lipolýze a proteolýze, současně s vývojem charakteristických aromatických sloučenin (Martin *et al.*, 2004; Simonici *et al.*, 2007; Lori *et al.*, 2008).

Ve fermentovaných masných výrobcích s povrchovou plísní se tato mykoflóra skládá z kvasinek a plísní. Kvasinky hrají hlavní roli při fermentaci a plísně jsou základem pro vznik žádoucího vzhledu a vyhovujících technologických a sensorických vlastností. V první fázi procesu jsou převládající mikroflórou kvasinky, je jich tu kolem 95%. Po prvních dvou týdnech jsou kvasinky i plísně přítomny ve stejném množství a na konci fermentačního procesu převažuje plísňová mykoflóra. To se děje z důvodu postupné redukce aktivity vody na povrchu výrobků (Toldrá 2008).

Aby se zlepšila kvalita masných výrobků, mohou být na jejich povrch použity některé plísně jako startovací kultury. Zlepšení kvality nastává z důvodu, že mycelium:

- Zabraňuje nadměrnému sušení, což umožňuje ztrátu vody, a tedy podporuje homogenní dehydrataci produktu.

- Chrání tuk proti oxidaci, protože jej metabolizuje a spotřebovává peroxidy, čímž brání žluknutí.

- Snižuje množství kyslíku na povrchu produktu, tím zabraňuje oxidaci a vylepšuje barvu masa.

- Přispívá na vylepšení chutě finálního produktu (zvláště při použití přírodních střev) protože způsobuje rozpad tuku, bílkovin a kyseliny mléčné, což umožňuje zvýšení pH (Toldrá 2008).

Kontaminace plísní je většinou provázena nepříjemným vzhledem, vůní a změnami chuti a snížením nutričních hodnot potravin. Některé plísně jsou schopny produkovat mykotoxiny a antibiotika, což představuje potenciální nebezpečí pro spotřebitele (Papagianni et al., 2007).

3.1 Kontaminující plísně

Mikroskopické vláknité houby často kontaminují rostlinné a živočišné produkty, které se tímto stávají zdroji nemocí jak pro lidi tak zvíř. Důvodem pro zvyšování zájmu o tyto houby je jejich schopnost tvořit sekundární metabolity – mykotoxiny. Ty mají nepříznivé účinky jako je karcinogeneze, mutagenita a mají vysokou termostabilitu. Podmínky prostředí ve výrobních prostorách, mrazácích a obchodech bývají vhodnými pro rozvoj plísní uvnitř produktů a na jejich povrchu. Kažení potravin způsobené bakteriemi, kvasinkami a plísněmi je složitý proces, který je určen různými faktory. Mezi ně patří například složení potravin a podmínky prostředí, ve kterém jsou. Pokud podmínky vyhovují všem třem kategoriím, bakterie většinou rostou rychleji než kvasinky a kvasinky rychleji než plísně. Plísně často kontaminují

krmivo i potraviny. Když je teplota a relativní vlhkost prostředí optimální pro kontaminaci, vznikají mykotoxiny. Relativně nízká aktivita vody ($a_w < 0,9$) a nízké hodnoty pH ($\text{pH} < 6,0$), jsou zvláště výhodné pro vývoj plísní. Mnoho plísní bylo popsáno jako patogeny. Ty jsou nejčastěji nalezeny v potravinách s dlouhou dobou zrání. Rod *Penicillium*, rod *Aspergillus* a rod *Cladosporium* byly nalezeny v těchto produktech. Skladba a vývoj mykoflóry je ovlivněn typem produktu, dobou zpracování a podmínkami zrání (Mižáková *et al.* 2002).

Kontaminující plísně jsou ty, které svojí přítomností zhoršují kvalitu masných výrobků a to z důvodu produkce jejich sekundárních metabolitů – mykotoxinů. Do masa se tyto toxiny mohou dostat již z kontaminovaného krmiva. Jejich přítomnost záleží na mnoha faktorech, jako jsou místo původu, teplota, roční období, sklizeň a skladování krmiv. Pokud tyto toxiny nejsou kontrolovány, mohou se dostat jak do těla zvířat, tak lidí (Dashti *et al.*, 2009).

V masných výrobcích je produkce mykotoxinů ovlivněna aktivitou vody. Snižování množství sekundárních metabolitů plísní je tedy možné pomocí kontoly vodní aktivity a přizpůsobením délky sušení a sušících teplot, při kterých masné výrobky zrají. Například produkce aflatoxinu byla podle Gqalenohe, *et al.* (1997) snížena o 50-60 % při snížení vodní aktivity na 0,97 a 0,95.

Mezi nejčastěji se objevující kontaminující plísně ve fermentovaných masných výrobcích jsou rody *Penicillium*, *Cladosporium*, *Aspergillus* a *Eurotium*. Podle Asefa, *et al.* (2009), kteří psali o kontaminujících plísních v norských sušených salámech, byl největší výskyt právě *Penicillia*, který byl přítomný z 88,3% ze všech izolovaných vzorků. Nejvíce zastoupený druh *Penicillia* bylo *P. nalgiovense*, který byl přítomný v 38%. *P. solitum* bylo získáno v 13% a *P. commune* v 10%. Další izolované rody plísní byly *Cladrosporium* v 6% a *Eurotium* v 4,9%.

3.1.1 Nežádoucí sekundární metabolity plísní v masné výrobě

3.1.1.1 Mykotoxiny

Nejvíce zastoupenými sekundárními metabolity produkované plísněmi jsou mykotoxiny. Mykotoxiny jsou v malých dávkách toxické pro obratlovce a jiná zvířata. Když suroviny a potraviny vykazují známky rostoucích plísní, je pravděpodobné že v nich budou přítomny i mykotoxiny. Jejich přítomnost je ovlivněna kompozicí substrátu, teplotou, vodní aktivitou, pH a jinými faktory.

Mykotoxiny jsou heterogenní skupinou, která se skládá většinou z nepolárních, nízko molekulárních a chemicky stabilních molekul. V masných výrobcích se nejvíce objevují 5 mm pod povrchem. Nemoci způsobené mykotoxiny se nazývají mykotoxikózy, mohou být akutní, chronické, nebo subchronické (Sunesen, L. O. and Stahnke, L. H., 2003; Diaz, 2005).

Vliv na organismus může být různý. Závislý na dávce, která způsobuje náhlé porušení jater a ledvin. Dále mohou mykotoxiny být karcinogenní, imunologické a způsobovat alergie. Tím, že se mykotoxiny dostávají do těla jatečných zvířat z krmiva, a dále do našeho organismu se zvyšuje jejich množství. V masných výrobcích se nejvíce nacházejí plísně rodu *Penicillium*. (Sunesen, L. O. and Stahnke, L. H., 2003)

Mykotoxinům nebyla věnována větší pozornost až do 20. století. Jedinou skupinou mykotoxinů, o které byl zájem, byly námelové alkaloidy, a to z důvodu, hromadných otrav domácích zvířat i lidí. Až v 60. letech 20. století, kdy byly objeveny aflatoxiny, které hromadně trávily krůty v Anglii, se vrátil zájem o zkoumání mykotoxinů (Votava, M., 2006).

Dnes je již známo, že mikromycety, tvořící toxiny, je možno nalézt ve všech ústředních taxonomických skupinách hub. Nejdůležitějšími toxiny jsou ty, produkované zástupci rodů *Alternaria*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Myrothecium*, *Penicillium*, *Phoma* a *Stachybotrys*. Mykotoxiny jsou produkovány i jinými rody mikromycet (Votava, M., 2006).

- ***Aflatoxin, sterigmatocystiny a versicolorin***

Je známo mnoho typů *aflatoxinů* (B2, G1, G2) i jejich účinky, které mají na organismus. *Aspergillus flavus* a *Aspergillus parasiticus* jsou hlavními producenty *aflatoxinů*. Nejvíce se vyskytují v podzemnici olejné a obilninách. Největší toxicitu má aflatoxin B1, který způsobuje hepatokarcinogenitu, mutagenitu a jiné nemoci. Jsou známé jako silné lidské karcinogeny (Votava, M., 2006; Tirmenstein and Mangipudy, 2014).

Sterigmatocystin je prekurzor aflatoxinu B. Produkuje ho rod *Aspergillus* a to hlavně *A. bipolaris*, *A. flavus*, *A. nidulellus*, *A. versicolor* a jiné. Další rody, které produkují *sterigmatocystin* jsou *Chaetonium* a *Monocillium*. Tento toxin působí negativně na játra a ledviny, ale byly prokázány jeho antibiotické a protirakovinné účinky. *Versicoloriny* jsou prekurzory aflatoxinů i *sterigmatocystinu*, mají velmi slabou toxicitu. (Votava, M., 2006)

- **Ochratoxiny**

Do této skupiny patří *ochratoxin A*, *4-hydroxyochratoxin A* a *ochratoxin a*. (Votava, M., 2006) Nejtoxičtější je *ochratoxin A*, který je produkovaný mnoha druhy *Aspergillů* a *Penicillií*, jako jsou *A. ochraceus*, *A. alliaceus*, *A. marinus*, *A. ostianus*, *Penicillium chrysogenum*, *P. purpureescens*, *P. variabile*, *P. verrucosum*, *P. viridicatum* atd. Má nefrotoxické účinky, imunosupresivní, teratogenní, cytotoxické a karcinogenní účinky (Pitt, 2014).

- **Citrinin**

Mezi producenty citrininu patří *Penicillium citrinum*, *P. canescens*, *P. expansum*, *P. roqueforti*, *Aspergillus candidus*, *A. flavipes*, *A. terreus* apod.

Prvotně byl citrinin charakterizován jako antiprotozoární a antimykotické (hlavně proti kvasinkám). Pro savce má karcinogenní, mutagenní a nefrotoxické účinky (Singh *et al.*, 2014).

- **Patulin**

Patulin produkují rody *Aspergillus*, *Byssochlamys*, *Paecilomyces* a *Penicillium*. Je antibakteriální, antimykotický, cytotoxický, karcinogenní a antimitotický účinek proti savčím buňkám (Pitt, 2014).

3.1.1.2 **Antibiotika**

Antibiotika jsou další sekundární metabolity plísní. Podle Sunsen L. a Stahnke L. H. (2003) bylo dokázáno, že tyto metabolity mohou být přítomny ve fermentovaných masných výrobcích, například rod *Penicillium* je schopný produkovat kyselinu penicilinovou. Tato kyselina zmizela po 24 hodinách, nejspíše z důvodu její reakce s aminokyselinami. U fermentovaných salámu se na začátku zrání společně s koloniemi plísní objevili 1,25 μg penicilinu* cm^{-2} v obalech, 0,66 μg penicilinu* cm^{-2} na vrchních 4 mm salámu a 0,08 μg penicilinu* cm^{-2} v hlobce 4-8 mm, v jádře salámu nebyl penicilin nalezen. U hotových salámů nebyl nalezen žádný penicilin, zřejmě z důvodu dlouhého vystavení vysoké kyselosti prostředí (Sunesen, L. O., Stahnke, L. H., 2003).

3.2 **Kulturní plísně**

Fermentace salámů za použití kulturních plísní ve středozezemských oblastech je velmi běžná. Bylo dokázáno, že povrchové očkování salámu s netoxickými plísněmi, jako jsou rod *Penicillium* nebo rod *Mucor*, se podílí na jejich senzoričké kvalitě.

Je to způsobeno oxidací laktátu, proteolýzou, degradací amino kyselin, lipolýzou, zdržením procesu žluknutí tuků a redukcí ztráty vody díky pomalému vypařování (sušení). Plísně také přispívají k celkové přitažlivosti konečných produktů díky jejich charakteristickému bílému až nažedlému vzhledu. Plísně stabilizují barvu výsledných produktů pomocí aktivity kataláz, chrání produkt před přímým světlem a také usnadňují odstraňování obalů. Charakteristickou popkornovou vůni plísňového fermentovaného salámu má za následek vznik 2-acetyl-1-pyrrolinu, který se vytváří konverzí prolinu, často obsaženém v kolageních obalech salámů. Konverzi prolinu způsobují právě plísně. Nicméně, stejně jak u bakteriálních startovacích kultur, i výběr kmenů plísní musí být opatrný, kvůli jejich proteolytickým a lipolitickým vlastnostem. Z tohoto důvodu se může velmi lišit efekt na konečném produktu v závislosti na použité technologii. (Leroy, F., *et al.*, 2006; Sunesen, L. O., Stahnke, L. H., 2003)

Očkování salámů plísněmi bylo tradičně děláno pomocí flóry přítomné ve zpracovávané rostlině. Této flóře se říká takzvaná domácí flóra. Její hlavní složkou byly *Penicillia*, *Aspergilli* nebo *Scopulariopsis*. Postupná změna v produkci salámů od malých místních výrobců až po velké továrny a zvýšení vědomí o bezpečnosti pro spotřebitele zapříčinilo industrializaci výroby plísňových startovacích kultur. První toxikologicky a technologicky vyhovující plísní jako startovací kultury masných výrobků bylo použito *P. nalgiovense*. Dnes všichni hlavní dodavatelé startovacích kultur nabízejí plísně jako část své nabídky (Sunesen, L. O., Stahnke, L. H., 2003).

Aplikace komerčně vyráběných plísní na povrch salámu zlepšilo bezpečnost a snížilo produkci mykotoxinů. Navíc prodejci masných výrobků dosáhli stejnorodější vůni, chuti, rychlosti sušení a jednoduššího vzhledu (Sunesen, L. O. and Stahnke, L. H., 2003; Ludeman V. *et al.*, 2010).

3.3 Aplikace plísňových kultur

Komerčně dostupné plísňové startovací kultury jsou dodávány buď jako koncentrované hypertonické tekuté suspenze, nebo jako mrazem sušený prášek. Čerstvě „sklizené“ spóry se rychleji kolonizují na povrchu salámů, ale tato výhoda musí být porovnána s údržností tekutých kultur, které ji mají 6 týdnů až 6 měsíců při teplotě 0-5 °C. Kdežto mrazem sušený prášek má údržnost kolem 2 let při teplotě nižší než 18 °C. Mrazem sušené prášky je vhodné před aplikací nechat několik hodin v pokojové teplotě, abychom zajistily rychlejší kolonizaci. Roztoky

by měly být připravovány denně, protože spory v roztocích velmi rychle umírají. Kultury jsou aplikované po jejich rozředění. Aplikace probíhá sprejováním nebo namáčením do roztoku, který má definitivní množství v 1 ml vody 10^6 kolonie tvořících jednotek (KTJ). Bylo dokázáno, že máčením v roztoku, nejvyšší počet $\text{KTJ} \cdot \text{cm}^{-2}$ byl přenesen na obaly masných výrobků na začátku lázně. Užíváním koncentrace spór $10^5, 10^6$ a $10^7 \text{KTJ} \cdot \text{ml}^{-1}$ mělo za následek aplikaci přibližně $2 \times 10^3, 2 \times 10^4$ a $2 \times 10^5 \text{KTJ} \cdot \text{cm}^{-2}$. To znamená, že pouze 1/50 z koncentrace startovací kultury je aplikována na salámy ve vzpřímené poloze. Přidání sacharidů nebo proteinů do suspenze nezvýšilo přenos spór a nebyly zjištěny žádné rozdíly u přírodních a celulózových střev. Růstová kapacita měřená jako hustota mycelia byla výrazně lepší u přírodních střev, hlavně na začátku růstu. Na přírodních střevech byly nalezeny hlubší a větší kolonie než na kolagenových obalech. Bylo demonstrováno, že zpočátku bylo 10^1 - $10^2 \text{KTJ} \cdot \text{cm}^{-2}$, tato koncentrace se zvýšila během prvních 10 dnů na 10^6 až 10^7 (Sunesen, L. O. and Stahnke, L. H., 2003; Comi, G. and Lacumin, L., 2013).

Během počátečního procesu je důležité kontrolovat vlhkost nad povrchem salámu. Pokud je studené naražené dílo přeneseno do teplé a vlhké sušárny, kondenzovaná voda může smýt konidie na povrchu salámu. Při fermentačním procesu se musí sledovat vlhkost vzduchu a rychlost proudění vzduchu. Pokud aktivita vody na povrchu výrobků klesne pod 0,80 ani klíčení ani růst neproběhne (Sunesen, L. O., Stahnke, L. H., 2003).

Lehké zauzení před naočkováním startovací kulturou se provádí především u výrobků z Maďarska. Naočkování plísněmi by mělo být odloženo, dokud se sloučeniny kouře, které jsou toxické pro plísně, odpaří. Podle kombinace plísňových startovacích kultur a podmínek sušení, začnou plísně kolonizovat povrch salámů mezi třemi dny a několika týdny po očkování. Spóry *Penicillia roqueforti* klíčily během 12-15 h v bohatém médiu obsahujícím uhlík a dusík a o pH 6,5 při teplotě 26 °C. Poté rostou klíčky 0,5 mm denně. Plísně rozkládají laktát a uvolňují amoniak z bílkovin, a tím zvyšují pH. Proto musíme dávat pozor, aby patogenní bakterie jako je *Staphylococcus aureus* byly předem inhibovány nízkou hodnotou pH. U masných výrobků malého obvodu je doporučeno přidávat do díla sacharidy. Dodáním sacharidů do díla se sníží jeho pH, jelikož přítomné lactobacily je rozloží na kyselinu mléčnou (Sunesen, L. O., Stahnke, L. H., 2003).

Běžně nejsou plísně alergeny, ale byly zjištěny případy alergií na plísně u některých zaměstnanců výroben, kde je velká koncentrace plísňových spór. Alergie byla zjištěná u *P. roqueforty*, *P. camemberty*, *P. commune*, *P. nalgiovense* a *P. chrysogenum* (Sunesen, L. O., Stahnke, L. H., 2003).

Existují netoxické plísně například *Penicillium nalgiovense* a *Penicillium chrysogenum*, které se dají použít jako ochranné startovací kultury. Dá se předpokládat, že tyto ochranné kultury zabraňují nekontrolovatelné kontaminaci plísněmi během sušení a fermentace, ale tento fakt ještě nebyl prokázán. Přídavek těchto kultur, brání růstu toxigenních plísní během zrání, kde je možná kontaminace produktů nechtěnými plísněmi (Bernáldez, V. *et al.*, 2013).

3.4 Tvorba aromatických sloučenin plísněmi

Mnoho studií popisuje těkavé sloučeniny, které se objevují ve fermentovaných salámech pokrytých plísněmi. Ale jen málo studií komentuje vliv růstu plísní na kompozici těkavých látek. Jiné studie porovnávají efekt na očkování salámů různými plísněmi. Ty ukazují jen nepatrné rozdíly mezi *Penicillium chrysogenum* a *P. nalgiovense* na chuti a aromatu salámů. Například *Penicillium camemberti* dodává více vůně a chuti salámům, než *Penicillium nalgiovense*, ale jejich barva a konzistence jsou stejné. (Sunesen, L. O., Stahnke, L. H., 2003; Casaburi, A. *et al.*, 2008)

Aromatické sloučeniny se tvoří během fermentace následujícími způsoby:

- Těkavé aromatické látky se tvoří pomocí lipolýzy a hydrolýzy fosfolipidů.

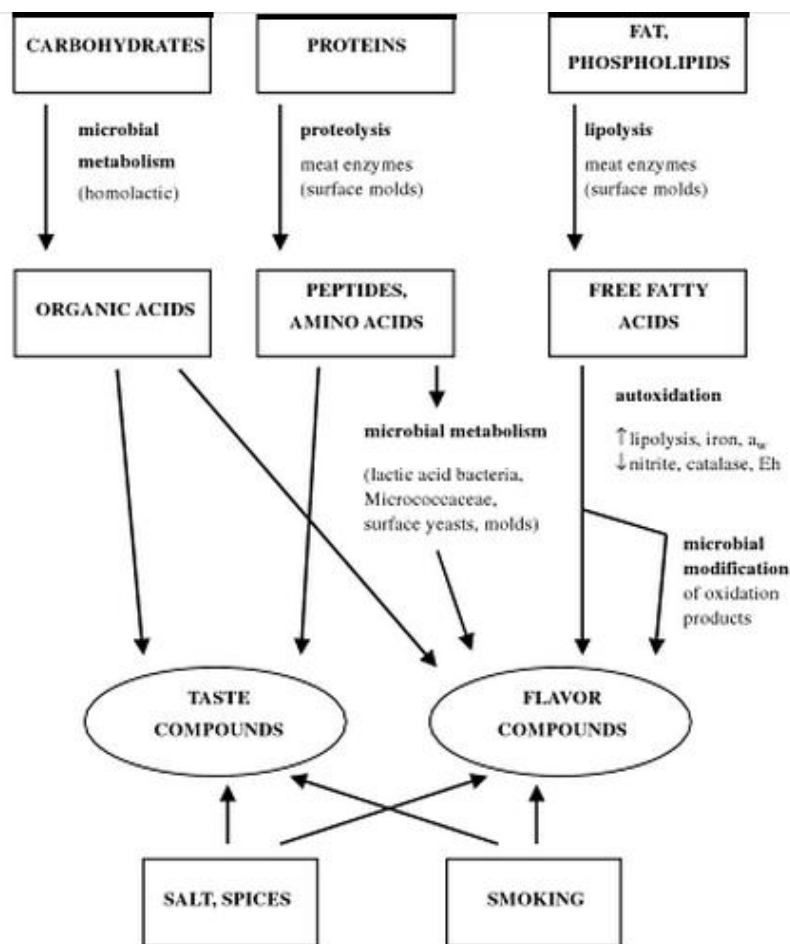
Na tyto procesy navazuje oxidace volných mastných kyselin.

- Mikroorganismy, které produkují organické kyseliny. Tyto kyseliny přeměňují aminokyseliny a peptidy na aromatické alkoholy, aldehydy a kyseliny. Ty modifikují produkty oxidace lipidů esterifikací acylové skupiny nebo redukcí aldehydů.

- Dále může být aroma fermentovaných masných výrobků vylepšeno přidáním koření nebo naočkováním povrchu plísněmi a kvasinkami (Farnworth, 2003).

Produkty oxidace lipidů, mastných kyselin a fermentace těkavých látek jako jsou kyselina octová, diacetyl a fenylethanol přispívají k celkovému aromatu. Srovnání chuťových a aromatických látek různých masných výrobků dokazuje, že vysoký obsah mastných kyselin negativně ovlivňuje aroma výrobku. Nenasycené mastné kyseliny jsou náchylné k autooxidaci v přítomnosti kyslíku. Mnoho produktů oxidace tuků jsou vysoce těkavé a málo aromatické. Aldehydy vznikající oxidací lipidů se dále přeměňují pomocí mikrobiálních reductáz. Míra oxidace lipidů je zvýšená

v přítomnosti hemového i nehemového železa. Zvýšená koncentrace NaCl během zrání také zlepšuje oxidaci tuků. Přítomné nitráty nebo nitráty vzniklé mikrobiální činností mají antioxidační vlastnosti. Přítomnost mikroorganismů je velmi důležitá pro omezení oxidace. K omezení oxidace dochází díky schopnosti mikroorganismů odstraňovat peroxidy a tím zabraňují vzniku nevhodného vybarvení díla (Farnworth, 2003)



Obrázek 7: Schematický přehled o mechanismu tvorby chuťových látek během fermentace (Farnworth, 2003).

3.4.1 Primární a sekundární metabolity

Metabolity plísní jsou rozděleny na primární a sekundární. Primární metabolity jsou aminokyseliny, vitamíny, nukleové kyseliny a meziproducty citrátového cyklu. Většina z nich je důležitá pro růst plísní. Sekundární metabolity jsou mnohem více omezeny v jejich distribuci mezi plísněmi, většinou jsou produkovány pouze jedním až patnácti druhy. Sekundární metabolity jsou důležité z ekologického hlediska v chemické signalizaci mezi druhy plísní. Důvod formace mnoha sekundárních metabolitů plísní by měl být vyhledáván v jejich společné evoluci s hmyzem, jelikož spolu koexistovaly o 100 milionů let déle než se savci. Tudiž mykotoxiny

nejspíše vznikly jako chemická obrana proti hmyzu. Těkavé sloučeniny mohou působit jako repelenty v obranném systému a mohou ovlivnit nebo dokonce inhibovat růst plísní a sporulaci. Oxid uhličitý jako metabolit plísní ovlivňuje růst a metabolismus jiných mikroorganismů. (Sunesen, L. O., Stahnke, L. H., 2003)

3.4.2 Degradace enzymatických proteinů a lipolýza

Účinek plísní na aroma salámů je kromě jejich antioxidantnosti především jejich schopnosti produkovat enzymy, které degradují lipidy a proteiny. Lypázy a proteazy jsou oboje produkovány tehdy, pokud mají plísně nedostatek živin, také jsou produkovány při sníženém množství živin v masných výrobcích. Studie o těchto procesech jsou méně detailní u salámů než u sýrů. (Sunesen, L. O., Stahnke, L. H., 2003)

3.4.2.1 *Proteolýza*

Proteolýza ve svalovině se děje díky aktivitě kathepsinů, hlavně díky kathepsinu D, který je zodpovědný za degradaci sarkoplasmatických a myofibriálních proteinů, zatímco mikrobiální enzymy, jsou důležitější při konečné fázi zrání masných výrobků. Endogenní i mikrobiální peptidázy, jsou potřebné pro kompletní hydrolýzu oligopeptidů. Z toho důvodu by se mohla podílet aktivita těchto enzymů na kvalitě konečných produktů. Byly objeveny pozitivní korelace mezi intenzitou aroma v plísňových zralých salámech a stupně proteolýzy. Čím vyšší je stupeň proteolýzy, tím je intenzivnější aroma. Proteolytická schopnost je vysoce závislá na médiu, pH a teplotě. Komerční kultury produkují nejlepší aroma a docílí se jejich použitím stejnorodého povrchu. Tyto kultury produkují více, jak ve vodě rozpustného dusíku, tak nebílkovinných dusíkatých látek. Po použití komerčních kultur se množství volných aminokyselin zdvojnásobil, až ztrojnásobil u umělých i přírodních střev. Aminokyseliny a dusík obsahující sloučeniny mají vliv pouze na chuť salámů nikoliv na jejich aromatu. Deaminace aminokyselin pomocí plísní je zodpovědná za čpavkovou vůni v zracích místnostech pro salámy (Sunesen, L. O., Stahnke, L. H., 2003; Casaburi, A., *et al.*, 2008; Ludemann V. *et al.*, 2004).

3.4.2.2 *Lipolýza*

Lipolýza je proces, při kterém dochází k degradaci mastných kyselin na alkany, alkeny, alkoholy, aldehydy a ketony. Některé z nich zlepšují vývoj chutě a vůně. Mastné kyseliny se středně dlouhým a dlouhým řetězcem se chovají

jako prekurzory pro aromatické sloučeniny, kdežto mastné kyseliny s krátkým řetězcem (C<6) vedou k silnému sýrovému zápachu masných výrobků. K lipolýze dochází díky přítomnosti lipáz ve tkáních masa a zároveň díky přidáním bakterií mléčného kvašení a plísní. Produkce lipáz a jejich aktivita je specifická a závislá na substrátu, pH, a teplotě. Lipázy různých rodů plísní vykazují různé účinky na esterové vazby v triglyceridech, vzhledem k substrátu. Na vepřovém sádle se ukázalo, že lipolytická aktivita byla velmi limitovaná, když předtím plísně rostly na agaru s extraktem ze sladu, zatímco předešlým růstem na obohaceném médiu se získalo lipolyticky více aktivních kmenů plísní. Lipázy plísní převážně hydrolyzují triglyceridy mastných kyselin s krátkým řetězcem. K lipolýze dochází na rozhraní oleje a vody, a proto rychlost hydrolýzy esterových vazeb je funkcí povrchu lipidového substrátu. Ve výrobě masných výrobků by to znamenalo, že v přítomnosti dostatečně aktivních lipáz, by se lipolýza a vznik aromatických sloučenin zvýšil se stupněm pomletí, jelikož se tím zvětší povrch oblasti, kde dochází k interakci lipidů a částic proteinů, ale žádná literatura tuto domněnku nepotvrdila (Sunesen, L. O., Stahnke, L. H., 2003; Casaburi, A. *et al.*, 2008).

3.4.3 Formace aromatu pomocí enzymů

Jak už bylo zmíněno, jen pár studií (Sunesen, L. O. and Stahnke, L.H., 2003; Casaburi, A. *et al.*, 2008; Ludemann V. *et al.*, 2004) se zajímalo o vliv růstu plísní v masných výrobcích na formování aroma. Ale informace z jiných oblastí jako jsou mléčné produkty, dávají celkem jasný obraz o sloučeninách, které jsou důležité a o jejich vzniku. Kdy degradace proteinů a lipolýza je často prerekvizita pro další enzymatické metabolismy, které vedou ke vzniku aromatických sloučenin.

3.4.3.1 Methyl ketony

Přítomnost a produkce methyl ketonů v plísnových salámech je často přisuzován β -oxidativní aktivitě plísní. Tyto předpoklady jsou nejspíše založené na intenzivních experimentech se spórami a myceliem *P. roqueforty* prováděných na mléčných produktech. Methyl ketony hrají významnou roli v chuti „modrých sýrů“ a jsou také důležité pro chuť a vůni fermentovaných masných výrobků. Nicméně, ve studiích o fermentovaných salámech jim byla přikládána jen nepatrná pozornost. Většinu karbonylových sloučenin v mléčných výrobcích produkuje *P. camemberti*. Většina plísní rodu *Penicillium* a *Aspergillus* jsou schopny methyl ketony produkovat.

Tyto plísně přeměňují mastné kyseliny na methyl ketony pomocí β -oxidace. Oxidace s největší pravděpodobností probíhá stejně jak β -oxidace savců, dokud nedojde ke vzniku komplexu ketoacyl-CoA. Savci jsou schopni rozštěpit β -ketoacyl CoA pomocí thiolázy na acetyl CoA a na Acyl CoA. Ty jsou substituovány deacylací thiohydrolázou na β -keto kyselinu. Následuje dekarboxylace na 2-alkanon, tak rychle, že tento děj byl navrhnout jako hnací síla k odklonu od normální β -oxidace. β -ketoctanoyl-CoA je preferovaný substrát pro deacylaci. Mastné kyseliny s krátkým a středně dlouhým řetězcem jsou deacylovány a mastné kyseliny s dlouhým řetězcem mohou také dát vznik 2-alkanolů po postupném cyklu β -oxidace. Redukce 2-alkanonů na 2-alkanoly pokračuje snadno v přítomnosti *Penicillia camemberty*, a může minimalizovat toxický efekt methyl ketonů, ale také slouží pro regeneraci oxidovaných nukleotidů NAD a NADP. Relativní specifická aktivita β -ketododekanoylu dekarboxylázy se zvyšuje, když klíčí spóry a znovu když spóry rostou do mycelia. Ale mycelium je více citlivé na toxický efekt mastných kyselin a proto spóry mohou stále hrát velkou roli ve formaci methyl ketonů, v přítomnosti mastných kyselin o koncentraci vyšší než 1mM, což je optimum pro mycelium. Methyl ketony mohou být produkovány mnoha dalšími způsoby, například z β -keto-alkanové kyseliny esterifikované triglyceridem podstupujícím hydrolyze a dekarboxylaci na methyl keton (Sunesen, L. O., Stahnke, L. H., 2003).

3.4.3.2 **2-Butanon**

2-Butanon je v masných výrobcích produkován jiným způsobem, než jsou methyl ketony. Bylo dokázáno, že v Italských plísňových salámech 2-butanon zmizel z množství 50 ng oktan ekvivalentů g^{-1} během 40 dnů zrání. Zatímco se methyl ketony od C_5 do C_9 navýšil z počátečního množství 100 ng na množství kolem 8250 až 4133 ng. Kdy 2-butanon byl přítomen ve fermentovaných salámech v množství 3,2 $\text{ng} \cdot \text{g}^{-1}$, kdežto ve fermentovaných salámech pokrytých plísní *P. aurantiogriseum* nebyl nalezen žádný 2-butanon. Zároveň bylo zjištěno, že u Francouských fermentovaných salámů pokrytých *P. nalgiovense* plísní došlo k nárůstu množství 2-butanonu (Sunesen, L. O., Stahnke, L. H., 2003).

3.4.3.3 **Methyl ketony z 2-pentanonu na 2-tridekanon**

Během 50ti dnů produkce masných výrobků s povrchocou plísní se koncentrace 2-pentanonu zvýšila ze 101 na 267 ng oktan ekvivalentů $\cdot \text{g}^{-1}$, 2-heptanonu z 211

8250 ng oktan ekvivalentů* g^{-1} , 2-oktanonu z 67 na 690 ng oktan ekvivalentů* g^{-1} a 2-nonanonu ze 75 na 4122 ng oktan ekvivalentů* g^{-1} (Sunesen *et al.*, 2001).

Pokud je přítomné velké množství spór nebo mycelia v draslík fosfátovém pufru je 2- heptanon degradován *P. roqueforti*. *P. decumbens* produkuje 119 mg methyl ketonů ze 100 ml 1% medium oleje z palmových jader během prvních 4 dnů kultivace. Poté jsou methyl ketony metabolisované, po 10ti dnech zůstává 16 mg methyl ketonů. *P. camemberti* a *P. caseifulvum* také produkují velké množství methyl ketonů během prvních 10ti dnů růstu. Během dalších 5ti dnů, kdy je vysoká koncentrace mycelia, některé z nich zmizí (Bruna, Hierro *et al.*, 2001).

3.4.3.4 *Alifatické osmi-uhlíkaté sloučeniny*

Těkavé látky produkované plísněmi byly použité jako důležité pomůcky na zařazení hub do taxonomických jednotek, protože každý kmen vyrábí určitou skupinu těkavých látek na dobře definovaných médiích. Změna médií se často odrazí buď v kvantitativních, nebo kvalitativních změnách složení těkavých látek. Plísně často vytvářejí alifatické osmi-uhlíkaté sloučeniny. Mezi ně patří 1-oktan-3-ol, který vzniká z linolové kyseliny (C18:2). Bruna, Hierro *et al.* zjistili, že růst *P. aurantiogriseum* koreluje s vyššími koncentracemi 1-okten-3-olu. Chuť 1-okten-3-olu je charakteristická pro houby, tvoří asi 78 až 82,5 % všech látek k aromatizaci získaných z houby *Agaricus bisporus* a *Boletus edulis*. 1-okten-3-ol je také produkován rodem *Penicillium* zároveň s 2-oktanonem, 3-oktanolem, 1-oktanol a 2-okten-1-ol (Sunesen, L. O., Stahnke, L. H., 2003).

3.4.3.5 *Aromatické sloučeniny vznikající degradací aminokyselin*

P. nalgiovense na extraktech z masa, kukuřice a glukózy produkuje 1-oktanol, 3-oktanon, 2-butanon, 2-methyl-propanol, 3-methyl-butanal, 3-methyl-butanol a 2-methyl-butanol. Poslední čtyři sloučeniny vznikají metabolismem aminokyselin bakteriemi. Na masovém agaru je *P. nalgiovense* schopný zvyšovat koncentraci 2-methyl - propanolu a 2-methyl-propanalu. Bruna, Hierro *et al.* (2001) zjistily, že vysoká koncentrace 2 - methylpropanalu a 2- a 3-methylbutanal byly na povrchu masných výrobků s *P. aurantiogriseum* na povrchu. Autoři pro toto uvedli dva důvody, vyšší koncentraci aminokyselin v důsledku zvýšené proteolýzy u okraje salámu, a aktivitě α -amino oxidázy plísní. Charakteristická popkornová vůně masných výrobků s povrchovou plísní způsobuje 2-acetyl-1-pyrrolin. Nejvyšší koncentrace

této sloučeniny je na okrajích masných výrobků. Plísně jsou zodpovědné za přeměnu prolinu, nacházející se v kolagenu, na 2-acetyl-1-pyrrolin

3.5 Výrobci a sortiment kulturních plísní

3.5.1 Cr. Hansem

Tabulka 1: sortiment kulturních plísní (www.meatsandsausages.com , 2005)

Culture name	Bacteria included	Characteristics
M-EK-72	<i>Penicillium nalgiovense</i>	White mold culture for surface treatment
M-EK-4	<i>Penicillium nalgiovense</i>	
M-EK-6	<i>Penicillium nalgiovense</i>	

M-EK-4 roste lépe při nižší teplotě a vlhkosti vzduchu a dává mramorovaný vzhled. M-EK-6 je hustší a vyvíjí větší načechrané pokrytí. M-EK-72 dává silný růst a vysokým chlupatým pokrytím, je-li k dispozici vysoká vlhkost a teplota.

3.5.2 Lyocarni

Tabulka 2: sortiment kulturních plísní Lyocarni (www.saccosrl.it, 2013)

To control indigenous moulds		Lyocarni culture
Surface treatment	Whitish mould or Natacid	FPN-63

Lyocarni FPN-63 je plísňová kultura používaná na povrchovou úpravu masných výrobků. Obsahuje *Penicillium nalgiovense*, což je velmi konkurenceschopná plíseň, která neprodukuje toxické látky. Dobře roste při nízké vlhkosti a teplotě. Kultura přispívá k časně viditelnému uniformnímu bělavému pokrytí. Plísňivý povrch napomáhá sušení, chrání výrobek před kyslíkem a světlem a pomáhá proti vysoušení povrchu salámu. Aplikace Lyocarni FPN-63 dodává charakteristickou chuť výrobku. Během tradičního procesu zrání rozkládá kyselinu mléčnou, což má za následek lepší chuť, a mírně zvyšuje pH. Tím, že ovládá povrchovou flóru výrobku, zabraňuje růstu

domorodým bakteriím a potenciálně toxickým plísním a kvasinkám (Meat cultures. Clerici Sacco [online]. 2013)

4 PROBIOTICKÉ MIKROORGANISMY

Probiotika jsou životaschopné mikroorganismy, které mají pozitivní účinek na trávení. Jakýkoliv mikroorganismus bez ohledu na místo původu, který je schopný přežít v trávicím traktu hostitele, a který projevuje tento efekt, může být považován za vhodného kandidáta. Většina používaných probiotik patří mezi prokaryoty. Na rozdíl od prokaryot, několik eukaryotických mikroorganismů může také mít dobrý vliv na zdraví zvířat. Eukaryoty jsou už delší dobu používány jako jediný buňkový protein, a jako komponenty do startovacích kultur různých jídel pro lidskou konzumaci. Některé eukaryoty se také mohou používat jako probiotika právě díky jejich schopnosti vydržet v nepříznivém prostředí trávicího traktu, s pozitivním vlivem na zdraví hostitele. Do eukaryotických organismů patří i plísně, které se mohou používat jako kultury pro masné fermentované výrobky. (Liong, 2011; Nayak, S. K., 2011)

V průběhu let byla formulována výběrová kritéria pro probiotika. Aby byl mikroorganismus zařazen do probiotik musí nejen přežít průchod gastrointestinálním traktem (stabilita vůči žaludečním šťávám, solím kyseliny žlučové a trávicím enzymům), ale musí být i prospěšný pro zdraví. Probiotika mohou ovlivnit zdraví třemi způsoby. Interakcí s jinými mikroorganismy v místě působení (soutěžením o živiny, produkcí antimikrobiálních látek, konkurenčním vyloučením). Posílením na slizniční bariéru a působením na imunitní systém hostitele (O'Hara and Shanahan, 2007; Vyust L. D. *et al.*, 2008).

4.1 Vlastnosti probiotik

Eukaryotické mikroorganismy často vykazují potenciálně využitelné fyziologické a metabolické charakteristiky ideální pro probiotika. Některé prvky, které přispívají k úspěchu eukaryotických mikroorganismů jako probiotik, je jejich robustní velikost, morfologická rozmanitost (pučící, pseudomycelial), nutriční flexibilita (možnost využít širokou škálu dusíku, uhlíku a fosforu jako zdroje), tolerance proti stresu (nízké aktivity pH/kyslíku/vody, vysokého osmotického tlaku), množství vylučujících enzymů

(vylučují široké spektrum enzymů, jako jsou lipázy, peptidázy, amylázy, invertázy, fytázy, atd.) antioxidační/protinádorová/antimikrobiální aktivita (účinný proti širokému spektru patogenů), a schopnost produkovat více dalších užitečných metabolitů. Kromě toho, většina z předpokládaných probiotických eukaryot netvoří mykotoxiny, jsou nealergenní, a mají nepatogenní povahu (Liong, 2011).

Všechny tyto vlastnosti přispívají nejen k jejich schopnosti odolávat drsnému prostředí zažívacího traktu hostitele, ale také jsou nezbytné pro jejich příznivé probiotické účinky v hostiteli. (Liong, 2011)

4.1.1 **Odolnost proti stresu**

Probiotika během průmyslového zpracování prochází mnoha stresovými podmínkami, jako jsou sušení, zahřívání, mražení. Proto je velmi důležité, aby byly dostatečně odolné vůči stresu. Schopnost tolerovat vyšší teplotu je jednou z nejdůležitějších vlastností všech probiotik. Eukaryotické probiotika za zvýšené teploty reagují ve dvou fázích. Počáteční fáze reakce je získání termotolerance a akumulace trehalózy následnou produkcí proteinu teplotního šoku, jehož obsah se zvyšuje při zvýšené teplotě. Dále se na tom podílí antioxidantní enzymy a plasmamembrány ATPasy. Trehalóza chrání membrány a proteiny proti stresu. Také vykazují široký rozsah tolerance vůči změně osmotického tlaku. Studie ukazují, že chlorid draselný a sorbitol mají menší inhibiční účinek pro růst probiotik, než NaCl. Zatímco KCl a sorbitol pouze způsobují osmotický stres, NaCl kromě osmotického stresu také přispívá k Na⁺ toxicitě. Glycerol hraje hlavní roli v překonání stresu k vyvážení osmotického tlaku přes buněčnou membránu a přizpůsobení vnějšího tlaku vody (Nayak, S. K., 2011)

Zatímco termo- a osmotolerance probiotik je nepostradatelná kvůli odolnosti při průmyslovém zpracování, jejich schopnost tolerovat nízké teploty je stejně důležitá pro jejich údržnost. Schopnost probiotik odolávat nízkým teplotám, je také velmi důležitá, protože se často snižuje jejich účinnost při dlouhodobém skladování v nízkých teplotách (Liong, 2011)

4.1.2 **Schopnost přežít v trávicím traktu**

Probiotika musejí přežít nevyhnutelné bariéry střeva. Ze studií in vitro vyplývá, že eukaryotické probiotika tolerují simulované podmínky prostředí trávicího traktu. Tato skutečnost je také podporována několika studijemi in vivo, kde eukaryotická probiotika jsou nejen nalézána v přijatelných podmínkách, ale také zde vykazují

pozitivní účinky. Studie in vitro ukazují, že kvasinky patřící do *Saccharomyces*, *Debaryomyces* a *Kluyveromyces* jsou extrémně tolerantní k solím kyseliny žlučové (Chen *et al.*, 2010; Kourelis *et al.*, 2010a; Saarela *et al.*, 2009).

4.1.3 Schopnost udžet se ve trávicím traktu

Adherence probiotik s následnou kolonizací do střeva hostitele pro vyvíjení blahodárných účinků je stále nevyřešená. (Fedorak and Madsen 2004) Ulpívání probiotik ve střevním traktu hostitele je považováno za velmi důležité, aby bylo zajištěno jejich zachování ve střevním traktu po delší dobu. (Nayak, S. K., 2011)

4.2 Eukaryotická probiotika versus prokaryotickým probiotikům

Bakterie jsou přírodní a převládající kolonizátoři (asi 99 %) v zažívacím traktu organismu a tedy většina v současnosti používaných probiotik patří do prokaryot. Proti prokaryotickým organismům, organismy eukaryotické se v zažívacím traktu většinou nevyskytují a proto, až donedávna byly jen velmi omezeně používány do krmiv a pokrmů jako probiotika. Obě skupiny se svými vlastnostmi velmi odlišují. Probiotika mohou vykazovat prospěšné účinky na metabolismus a imunologické efekty v hostiteli. Při manipulaci střevní flóry s probiotikem může docházet k nežádoucím metabolickým imunologickým reakcím (dekarboxylace žlučových solí, transformace vázaných primárních žlučových solí na volné sekundární a degradace vrstev hlenu ve střevech hostitele). Při požití fermentovaných mléčných výrobků obsahujících *Lactobacilla acidophila* a *Bifidobacterium* došlo k transformaci vázaných primárních žlučových solí na toxické volné sekundární soli v tenkém střevě a pacient musel podstoupit ileostomii. Tento efekt nebyl pozorován u eukaryotických probiotik. Také přenos antibiotického rezistentního genu, který je nyní velkým problémem bakteriálních probiotik, nebyl zjištěn u žádných eukaryotických probiotik. Ve střevě hostitele může tento gen přeměnit bakteriální probiotika na patogeny. Charakteristickým znakem probiotických kvasinek je, že mohou být požívány v době léčby antibiotiky, kdežto bakteriální probiotika nemohou (Czerucka *at al.*, 2007; Marteau *et al.*, 1995).

4.3 Eukaryotická probiotika

Eukaryotické mikroorganismy mohou být velmi užitečné pro zdraví člověka i zvířat jako probiotika. Mezi probiotické eukaryoty patří například některé druhy řas

(*Chlorella*, *Spirulin*), některé plísně (*Aspergillus*, *Penicillium*) a kvasinky (*Sacharomyces*, *Candida*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Torulopsis*), které bývají konzumované jak zvířaty, tak i lidmi už několik století. Tyto organismy jsou nejvíce používané jako jednobuněčný protein nebo jako startovací kultury. Nicméně, existují jisté eukaryotické mikroorganismy, které když jsou živé přidány do jídel, vykonávají práci probiotik, jako je zlepšování trávení. Z tohoto důvodu je velmi důležité, aby se našli noví probiotičtí kandidáti mimo prokaryotické mikroorganismy. Většina eukaryotických probiotik patří do plísní a kvasinek, kdy převážnou většinu tvoří kvasinky. V posledních letech se zvýšil zájem o eukaryotická probiotika a ve většině případech byly dokázány jejich užitečné vlastnosti (Liong, 2011).

Kvasinky byly používány k fermentaci již od roku 1550 př. n. l. V dnešní době jsou kvasinky používány jako doplňky stravy, jelikož jsou dokázány jejich prospěšné probiotické účinky. Kvasinky rodu *Saccharomyces* jsou často používanými probiotiky po celém světě (Buchl *et al.*, 2010).

Saccharomyces cerevisiae a *Sacharomyces cerevisiae* var *boulardii* jsou jediné komerčně prodávané kvasinky. Evropská unie prohlásila pět druhů *Saccharomyces cerevisiae* za zdravotně nezávadné pro aplikaci do krmiva. Kromě tohoto rodu se přidávají do krmiv i další probiotika jako jsou *Candida utilis*, *Candidapintolopesii* a *Candida saitoana* ze zástupců kvasinek a *Aspergillus niger* s *Aspergillem oryzae* z plísní. (Nayak, S. K., 2011)

4.4 **Prospěšné účinky eukaryotických probiotik**

Probiotika se v posledních dvaceti letech stávají velmi populárním a důležitým nástrojem v péči o zdraví člověka a zvířat. Některé nutriční a růstové výhody, které jsou popsány hlavně u zvířat, jsou následovné. (Nayak, S. K., 2011)

4.4.1 **Nutriční výhody**

Probiotika mají zásadní vliv na výživu hostitele a mohou mít vliv na různé trávicí procesy, a to zejména rozklad celulózy a syntéza mikrobiálních proteinů a zvýšení vstřebávání živin. *S. cerevisiae* je považováno za jedno z probiotik, které pokud je vstřebáváno prostřednictvím zažívacího traktu, má pozitivní dopad na zdraví hostitele. U různých zvířat, *S. cerevisiae* jako doplněk stravy, často vede ke zvýšení přírůstku tělesné hmotnosti a zvýšení příjmu krmiva. Kromě *S. cerevisiae*, *A. oryzae*, jsou také velmi užitečné pro zvířata, z nutričního hlediska. *A. oryzae* často vylučuje

různé trávicí enzymy (amylolytické a proteolytické enzymy), které jsou nezbytné pro výživu hostitele. *A. oryzae* jako doplněk stravy může výrazně zvýšit přírůstek hmotnosti a stravitelnost sušiny u krav. *A. oryzae* nejen že zlepšuje krmivo a zvyšuje hmotnost, ale také snižuje množství amoniaku a sérového cholesterolu. Podobně, další probiotické druhy patřící do rodu *Aspergillus*, *A. niger* také značně zlepšuje kvalitu krve a snižuje množství cholesterolu a glukózy v krvi (Nayak, S. K., 2011)

Probiotika mohou mít vliv na produkci, jakož i na kvalitu mléka. Kvasinky, buď živé, nebo fermentované byly použity u dojnic před více než 60-ti lety. Eukaryotické probiotika pomáhají zvýšit příjem sušiny, procenta mléčného tuku, tukuprosté sušiny, bílkovin, a úroveň produkce. Stejně tak, i jiná eukaryotická probiotika jako je *A. oryzae* zvyšují produkci mléka. Zapojení probiotik, zejména prokaryotických při zlepšování celkové kvality masa byla zpochybňována kvůli několika protichůdným zjištěním (Liong, 2011).

5 MASNÉ VÝROBKY S PLÍSNÍ NA POVRCHU

5.1 Balení

Základní nevýhodou masných výrobků s plísní na povrchu je jejich balení. Trvanlivé masné výrobky bez plísně na povrchu jsou ideální masné produkty pro balení a zajištění jejich delší údržnosti. Tyto výrobky, tepelně opracované nebo fermentované, mohou být dlouhou dobu skladovány za pokojové teploty buď ve vakuu, nebo v modifikované atmosféře (MA). MA obsahuje směs plynů CO₂ a N₂. Tyto druhy balení nemohou být aplikovány na masné výrobky s pokryvem plísní tak, aby nedošlo ke změně jejich organoleptických vlastností. Dokud se vnitřní vlhkost může vypařovat, tak je vrstva plísně nalepená na povrchu výrobku. Problém nastává tehdy, když je výrobek v balení nepropustném pro vodní páru. Vlhkost vycházející z vnitřních částí výrobku zvlhčuje vrstvu plísně, která se následně odlepí od povrchu. Další nevýhodou je, že v některých případech dochází k růstu kmenů *Kucurie* zároveň s kvasinkami na začátku zrání. Tato vrstva nezmizí, ale jelikož je na ní další vrstva plísní nejde vidět a ani nesmrdí, dokud nedochází k zachycení vypařující se vody nic se neděje. Pokud dojde k odpaření z důvodu špatného balení, objeví se charakteristický zápach vzniklý vlhkou vrstvou těchto mikroorganismů. Častým kompromisem je použití penetrovaného obalu, přes který se přebytečná voda odpaří. Další možností je balení v celofánu, který je také propustný. Nicméně ani jedno z těchto balení neprodlužuje údržnost. Lepší je balit tyto výrobky krájené a oloupané. Může se použít jak balení ve vakuu tak modifikované atmosféře. Ve vakuu je sice údržnost prodloužena, ale kolečka salámu se k sobě často přilepí a jejich oddělování není nejjednodušší. Z toho důvodu je nejčastěji používaná modifikovaná atmosféra (Toldrá, 2010).

5.2 Trvanlivost a skladovatelnost

Na rozdíl od tepelně opracovaných výrobků, fermentované výrobky nemají prakticky žádné limitování mikrobiální povahy. Jelikož jejich nízká hodnota a_w samotná nebo v kombinaci s nízkým pH inhibuje růst patogenických a znehodnocujících mikroorganismů při pokojové teplotě. Trvanlivost (údržnost) fermentovaných masných výrobků je stanovena jako doba dokud nezačnou probíhat organoleptické změny potraviny. Limitní faktory údržnosti jsou tyto:

- Nadměrné sušení
- Tání tuků

- Teplota
- Světlo
- Změna barvy
- Žluklost a
- Ztráta aromatu (Toldrá, 2010).

Vrstva plísní zpomaluje sušení, ale neinhibuje ho. Bouhužel neexistuje žádné balení vyhovující dlouhodobému skladování salámů v celku. Z důvodu nadměrného sušení se výrobky zmenšují a tento tlak rozděluje tekutou část tuku od té krystalické. Tento proces se zrychluje při zvýšené teplotě. Zvýšená teplota kombinovaná s přístupem světla zrychluje změnu barvy a žluklost v přítomnosti s kyslíkem. Vrstva plísní je do určité míry schopna tyto procesy neutralizovat. Tomu napomáhají peroxidy vznikající metabolismem plísní. Příliš nízká teplota při skladování může způsobit nepříznivé organoleptické změny ve formě fosfátových krystalů. Kvůli oxidaci a jiným reakcím během nadměrného sušení způsobuje při dlouhodobém skladování ztrátu aromatu. Nadměrné sušení, barevná změna, žluklost a ztráta aromatu mohou být sledovány pouze u salámů, které jsou skladovány v celku, a které nejsou baleny ve vakuu. U krájených produktů balených v MA se tyto jevy neobjevují pokud, je obsah zbytkového kyslíku na minimu a obalový materiál s CO₂ a O₂ bariérou (Toldrá, 2010; Fidel and Y Hui, 2007).

Pokud je masný výrobek s plísní na povrchu oloupán, nakrájen a zabalen buď ve vakuu, nebo v MA může být dlouhodobá trvanlivost garantována bez limitací nebo jen s malými limitacemi. Datum spotřeby informuje o trvanlivosti, a mělo by být zjištěno testováním. Předem balené krájené plísňové salámy mohou být skladovány několik měsíců (Toldrá, 2010).

Předpoklady vysoké senzorické kvality na konci data spotřeby jsou:

- Vysoce kvalitní produkt
- Obalový materiál vysokou bariérou CO₂
- Dobře těsnící balení
- Nízká rezidua kyslíku (< 0,1 %)
- Skladovací teplota maximálně 18°C a
- Minimální vystavování světlu (Toldrá, 2010).

5.3 Produkce trvalých fermentovaných masných výrobků v Evropě

5.3.1 Maďarsko

5.3.1.1 *Uherský salám*

Dílo připravené v kутru se naráží so celulózových střev, bez použití startovacích kultur a okyselujících aditiv. Intenzivně se udí při teplotě 10-12°C 10-12 dní. Tímto získávají charakteristické senzoričké vlastnosti. U tradičních maďarských salamů (výrobce: Pick a Herz), které zrají 90-100 dní, dochází k vývinu plísni na povrchu (Kameník, Josef a Jan Budig 2010).



Obrázek 8: Uherský salám (fresh.iprima.cz., 2014)

5.3.2 Itálie

Salámy s plísni na povrchu jsou takzvaného Milánského typu (Kameník, Josef a Jan Budig 2010).

5.3.2.1 *Bergamasco, cremonese, mantovano salame*

Salámy produkované v Lombardii v severoitalské oblasti (Kameník, Josef a Jan Budig 2010).



Obrázek 9: Bergamasco (F.lli rizzi, 2014)

5.3.2.2 *Varzi, Brianza, Piacentino salame*

Tradiční produkty, které získaly tzv. chráněné označení původu (Protected Designation of Origin). Jsou vyráběny v severní Itálii z vepřového masa, doba zrání je 60 dní. Narážejí se do přírodních vepřových střev (KAMENÍK, Josef a Jan BUDIG, 2010).



Obrázek 10: Varzi (Terra di delizie, 2013)

5.3.2.3 *Sopressata*

Fermentovaný masný výrobek bez startovacích kultur (Kameník, Josef a Jan Budig 2010).



Obrázek 11: Sopressata (Food Shed, 2009)

5.3.3 Španělsko

5.3.3.1 *Chorizo*

Vyrábí se ve více variacích. Chorizo je uzeno studeným kouřem a poté sušeno podle typu výrobku. Aktivitu vody mohou mít až pod hodnotu 0,89.



Obrázek 12: Chorizo (Food, Music, God, 2011)

5.3.3.2 *Fuet*

Fuet je katalánský výrobek tenkého průměru. Před narážením se dílo nechává odležet při teplotě 1°C po 24 hodin.



Obrázek 13: Fuet (VegaJardin, 2014)

6 POŽADAVKY LEGISLATIVY PŘI VÝROBĚ FERMENTOVANÝCH MASNÝCH VÝROBKŮ

Z důvodu vstupu České Republiky do Evropské Unie musí veškeré výrobky dosahovat zdravotní nezávadnosti a vysoké kvality, aby byla tato kvalita srovnatelná s dalšími státy EU. Byl zřízen příslušný kontrolní systém rovnocenný kontrolním systémům EU. Zdravotní nezávadnost potravin je základní podmínkou pro Evropský trh a jeho správné fungování. Proto byl zřízen Evropský úřad pro bezpečnost potravin (European Food Safety Agency, EFSA). Základem evropské potravinářské legislativy je ochrana zdraví a ekonomických zájmů občanů. Vysoký důraz je kladen jak na nezávadnost, tak na kvalitu potravin. V tzv. Bílé knize o zdravotní nezávadnosti potravin je definován pojem “bezpečnost potravin”. Pojem “food safety” se podle Nařízení parlamentu a Rady ES č. 178/2002 dá vysvětlit jako zdravotní a hygienická nezávadnost potravin”. V ČR jsou požadavky na zdravotní nezávadnost dány zákonem č. 110 ze dne 24. Dubna roku 1997 o potravinách a tabákových výrobcích ve znění pozdějších předpisů. Potom zákonem č. 456 ze dne 5. srpna roku 2004 v plném znění.

V těchto zákonech je definice zdravotně nezávadných potravin, což jsou ty “které splňují chemické, fyzikální a mikrobiologické požadavky na zdravotní nezávadnost stanovené tímto zákonem, vyhláškou nebo které jsou uváděny do oběhu se souhlasem Ministerstva zdravotnictví podle § 11 odst. 2 písm. B”. Na bezpečnost a nezávadnost potravin je kladen stále větší význam. Proto jsou na výrobce všech potravin kladeny vysoké nároky. Dosažení těchto nároků mohou výrobci buď velmi vysokou hygienou provozu, nebo použitím nových technologických postupů. Jednou z možností výroby nezávadných potravin je využití principů kontrované fermentace aplikací startovacích kultur. Tyto kultury ovlivňují pozitivně technologické a senzorické parametry zároveň i nezávadnost výrobku. Prokazatelné zlepšení bezpečnosti výrobku i snížení rizika onemocnění může být provedeno aplikací ochranné kultury (Polák, 2006)

V České republice fermentované masné výrobky upravuje Zákon č. 110/1997 Sb o potravinách a tabákových výrobcích a vyhláška č. 326/2001 o potravinách a tabákových výrobcích a o změně a doplnění některých souvisejících zákonů, ve znění předpisů, pro maso, masné výrobky, ryby, ostatní vodní živočichy a výrobky z nich, vejce a výrobky z nich. Zde jsou fermentované trvanlivé masné výrobky

definovány jako výrobky tepelně nepracované určené k přímé spotřebě, u kterých v průběhu fermentace, zrání, sušení, popřípadě uzení za definovaných podmínek dochází ke snížení vodní aktivity s hodnotou $a_w(\text{max.}) = 0,93$ a k prodloužení minimální doby trvanlivosti na 21 dní při teplotě skladování plus 20°C (Dostupné z: <http://www.szpi.gov.cz/>, 2014).

6.1 Chemická a mikrobiologická kritéria

Hodnocení chemických a mikrobiologických kritérií se stanovuje podle různých požadavků

6.1.1 Podle veterinárního zákona

- Zákon č. 166/1999 Sb. o veterinární péči a o změně některých souvisejících zákonů (veterinární zákon).

- Vyhláška č. 202/2003 Sb., o veterinárních požadavcích na čerstvé maso, mleté maso, masné polotovary a masné výrobky, ve znění vyhlášky č. 375/2003 Sb

6.1.2 Podle zákona o potravinách

- Zákon č. 110/1997 Sb. O potravinách a tabákových výrobcích v platném znění

- Vyhláška č. 132/2004 Sb. o mikrobiologických požadavcích na potraviny, způsobu jejich kontroly a hodnocení (Brychta, 2005)

7 ZÁVĚR

Fermentované masné výrobky s plísní na povrchu patří do sortimentu masných fermentovaných výrobků. Na jejich výrobu se používají plísně rodu *Penicillia*. Plísně na povrchu dodávají těmto výrobkům vyšší údržnost, lepší texturní vlastnosti a hlavně specifické aroma a chuť. Na výrobu těchto výrobků se používají kulturní plísně, které mohou být aplikované mnoha způsoby například ponořením nebo postřikáním. Plísně na masný výrobek působí svými proteolytickými a lipolytickými enzymy, díky kterým mění aroma výrobků.

Při použití plísní na povrchovou úpravu masných výrobků může dojít k produkci jejich sekundárních metabolitů, proto je nutno používat kulturní plísně a dodržovat legislativní požadavky při jejich výrobě, skladování a distribuci. Hlavně se musejí dodržovat řetězce nízkých teplot.

Při distribuci těchto výrobků je důležité zvolit správný obalový materiál. Nejlepší je použít penetrovaný materiál nebo celofán, aby mohlo dojít k odpaření vody z vnitřích částí výrobků. Pokud vzniklá vodní pára kondenzuje na povrchu výrobku, zhoršují se senzorické vlastnosti fermentovaných masných výrobků.

Na výrobu těchto výrobků je možné použít i probiotické kulturní plísně. Probiotické mikroorganismy jsou takové mikroorganismy, které mají kladný vliv na trávení. Aby bylo probiotikum probiotikem, musí mít určité vlastnosti, mezi které patří hlavně odolnost proti stresu a průchod trávicím traktem bez porušení. Jako probiotika se používají většinou prokaryotické mikroorganismy, ale mohou se používat i mikroorganismy eukaryotické. Mezi tyto mikroorganismy patří právě plísně. Eukaryotické mikroorganismy mají některé charakteristiky ideální pro probiotika. Těmi jsou jejich robustní velikost, morfologická rozmanitost, nutriční flexibilita, tolerance proti stresu, množství vylučujících enzymů, antioxidační/protinádorová/antimikrobiální aktivita, a schopnost produkovat více dalších užitečných metabolitů. Kromě toho, většina z předpokládaných probiotických eukaryot netvoří mykotoxiny, jsou nealergenní, a mají nepatogenní povahu. Nicméně nebylo zjištěno, jestli si tyto mikroorganismy v masných výrobcích uchovávají probiotický účinek.

Fermentované masné výrobky s plísní na povrchu nejsou v České republice nijak zvlášť časté. Hlavními producenty těchto výrobků v Evropě jsou Itálie, Španělsko a Maďasko.

8 LITERATURA

BATT, Carl A a Mary Lou TORTORELLO. *Encyclopedia of food microbiology*. Second edition. Amsterdam: Academic Press, 2014, 3 vol. ISBN 00809938263.

BENITO, María J., Félix NÚÑEZ, María G. CÓRDOBA, Alberto MARTÍN a Juan J. CÓRDOBA. Generation of non-protein nitrogen and volatile compounds by *Penicillium chrysogenum* Pg222 activity on pork myofibrillar proteins. *Food Microbiology*. 2005, roč. 6, č. 22, s. 513-519. ISSN 0740-0020

BERNALDEZ, V., J. J. CORDOBA, M. RODRIGUEZ, M. CORDERO., L. POLO a A. RODRIGUEZ,. Effect of *Penicillium nalgiovense* as protective culture in processing of dry-fermented sausage "salchichon". *Food Control*. 2013, roč. 2, č. 25, s. 69-76.

BIBEK RAY, ARUN BHUNIA. *Fundamental food microbiology*. Fifth edition. Boca Raton: CRC Press, 2014, 607 p. ISBN 14-665-6443-1.

BRUNO, J. M., HIERRO, E. M., de la HOZ, L., MOTTRAM, D. S., FERNÁNDEZ, M., and ORDONEZ, J. A. The contribution of *Penicillium aurantiogriseum* to the volatiles composition and sensory quality of dry fermented sausages. *Meat Science*. 2001. č. 59, s. 97-107.

BRYCHTA, Josef. Mikrobiologická kontaminace v souvislosti s výrobou fermentovaných, tepelně opracovaných a jiných výrobků. 7. *Seminář o údržnosti masa, masných výrobků a lahůdek*, Skalský dvůr 13. – 14. Zář 2005, č. 7, s. 15 – 17

BÜCHL, M. HUTZLER, H. MIETKE-HOFMANN, M. WENNING a S. SCHERER. Differentiation of probiotic and environmental *Saccharomyces cerevisiae* strains in animal feed. *Journal of Applied Microbiology*. 2010, roč. 3, č. 109, s. 783-791

CASABURIA, Annalisa, Rossella DI MONACOA, Silvana CAVELLAA, Fidel TOLDRÁC, Danilo ERCOLINIB a Francesco VILLANI. Proteolytic and lipolytic starter cultures and their effect on traditional fermented sausages ripening and sensory traits. *Food Microbiology*. 2008, roč. 2, č. 32, s. 335-347.

COMI, G. a L. LACUMIN. Ecology of moulds during the pre-ripening and ripening of San Daniele dry cured ham. *Food Reaserch International*. 2013, roč. 1, č. 54, s. 1113-1119.

CZERUCKA, D., T. PICHE a P. RAMPAL. Review article: yeast as probiotics *Saccharomyces boulardii*. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*. 2007, roč. 6, č. 26, s. 767-778.

DASHTI, Basma, Sarah AL-HAMLI, Husam ALOMIRAH, Sameer AL-ZENKI, Ali Bu ABBAS a Wajih SAWAYA. Levels of aflatoxin M1 in milk, cheese consumed in Kuwait and occurrence of total aflatoxin in local and imported animal feed. *Food Control*. 2009, roč. 3, č. 20, s. 686-690.

DIAZ, D. E. *The mycotoxin blue book*. Reprinted. Nottingham: Nottingham Univ. Press, 2005, s. 187-224. ISBN 1904761194

DREJE, Asefa T., Gjerde O. RAGNHILD, Sidhu S. MAAN, Solveig LANGSRUD, Cathrine F. KURE, Truls NESBAKKEN a Ida SKAAR. Moulds contaminants on Norweigan dry-cured meat products. *International Journal of Food Microbiology*. 2009, roč. 3, č. 128, s. 435-439. ISSN 0168-1605.

FARNWORTH, Edward R. *Handbook of fermented functional foods*. Boca Raton, FL: CRC Press, 2003, 390 p. Functional foods. ISBN 08-493-1372-4.

FEDORAK, R. N. a K. M. MADSEN. Probiotics and prebiotics in gastrointestinal disorders. *Current Opinion in Gastroenterology*. 2004, č. 20, s. 146-155. ISSN 1007-9327.

F.lirizzi [online]. [cit. 2014-10-30]. Dostupné z: <http://www.fratellirizzi.it/it/prodotti/insaccati-stagionati/insaccati-stagionati.asp>

Food, Music, God [online]. 2011 [cit. 2014-10-30]. Dostupné z: <https://foodmusicgod.wordpress.com/2011/07/10/chorizo/>

Food Shed [online]. 2009 [cit. 2014-10-30]. Dostupné z: <http://www.ourfoodshed.com/producers/31-olympic-provisions/products/140-salami-sopressata>

.Fresh.iprima.cz [online]. 2014 [cit. 2014-10-30]. Dostupné z: <http://fresh.iprima.cz/suroviny/uhersky-salam>

GÖRNER, Fridrich a Ľubomír VALÍK. *Aplikovaná mikrobiológia požívatin: princípy mikrobiológie požívatin, potravinársky významné mikroorganizmy a ich skupiny, mikrobiológia potravinárskych výrob, ochorenia mikrobiálneho povodu, ktorých zárodky sú prenášané požívatinami*. 1. vyd. Bratislava: Malé centrum, 2004, 528 s. ISBN 80-967-0649-7.

GQALENI, N., J. E. SMITH, J. LACEY a G. GETTINBY. Effects of Temperature, Water Activity, and Incubation Time on Production of Aflatoxins and Cyclopiazonic Acid by an Isolate of *Aspergillus flavus* in Surface Agar Culture. *Applied and Environmental Microbiology*. 1997, roč. 3, č. 63, s. 1048-1053. ISSN 1098-5336.

CHEN, L. S., Y. MA, J. L. MAUBOIS, L. J. CHEN, Q. H. LIU a J. P. GUO. Identification of yeasts from raw milk and selection for some specific antioxidant properties. *International Journal of Dairy Technology*. 2010, roč. 1, č. 63, s. 47-54.

KAMENÍK, Josef a Jan BUDIG. Produkce trvanlivých fermentovaných salámů v Evropě. *Potravinářská Revue*. 2010, č. 4, s. 9-15.

KOURELIS, A., C. KOTZAMANIDIS, E. LITOUPOULOU-TZANETAKI, Z. G. SCOURAS, N. TZANETAKIS a M. YIANGOU. Preliminary probiotic selection of dairy and human yeast strains. *Journal of Biological Research*. 2010, č. 13, s. 93-104.

LEISTNER, L. Mould-fermented foods: Recent developments. *Food Biotechnology*. 1990, roč. 4, č. 1, s. 433-441.

LEROY, Frédéric, Jurgen VERLUYTEN a Luc De VUYST. Functional meat starter cultures for improved sausage fermentation. *International Journal of Food Microbiology*. 2006, roč. 3, č. 106, s. 270-285.

LIONG, Min-Tze. *Probiotics: biology, genetics, and health aspects*. New York: Springer, 2011, s. 29-55. ISBN 364220838.

LORI, D., M. GRISENTI, G. PAROLARI a S. BARMUTI. Microbiology of dry-cured raw ham. *Industria Conserve*. 2005, č. 80, s. 23-32.

LUDEMANN, V., G. POSE, M. L. POLLIO a J. SEGURA. Determination of growth characteristics and lipolytic and proteolytic activities of *Penicillium* strains isolated from Argentinean salami. *International Journal of Food Microbiology*. 2004, roč. 1, č. 96, s. 13-18.

MARTEAU, M. F. GERHARDT, A. MYARA, E. BOUVIER, F. TRIVIN a J. C. RAMBAUD. Metabolism of bile salts by alimentary bacteria during transit in human small bowel. *Microbial Ecology in Health and Disease*. 1995, č. 8, s. 151-157.

MARTIN, A., J. J. CORDOBA, F. NUNEZ, a M. A. ASENSIO. Contribution of a selected fungal population to proteolysis on dry cured ham. *International Journal of Food Microbiology*. 2004, roč. 1, č. 94, s. 55-56.

MARTÍN, Alberto, Juan J. CORDOBA, Emilio ARANDA, M. Guía CORDOBA a Miguel A. ASENSIO. Contribution of a selected fungal population to the volatile compounds on dry-cured ham. *Journal of Food Microbiology*. 2006, roč. 1, č. 110, s. 8-18.

MARTINS, F. S., I. M. CASTRO, C.A. ROSA, J. R. NICOLI a M. J. NEVES. Effect of the trehalose levels on the screening of yeast as probiotic by in vivo and in vitro assays. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2008, č. 39, s. 50-55.

MCFARLAND, L. V. Systematic review and meta-analysis of *Saccharomyces boulardii* in adult patients. *World Journal of Gastroenterology*. 2010, roč. 18, č. 16, s. 2202-2222.

Meat cultures. Clerici Sacco [online]. 2013 [cit. 2014-10-26]. Dostupné z: <http://www.saccosrl.it/en/prodotti/culture-per-la-carne/>

Miniatlas mikroorganismů [online]. 2006 [cit. 2014-11-06]. Dostupné z: <http://is.muni.cz/do/rect/el/estud/prif/ps06/mikroorg/web/alt.htm>

Miniatlas mikroorganismů [online]. 2006 [cit. 2014-11-06]. Dostupné z: <http://is.muni.cz/do/rect/el/estud/prif/ps06/mikroorg/web/asp-ni.htm>

Miniatlas mikroorganismů [online]. 2006 [cit. 2014-11-06]. Dostupné z:[http:// http://is.muni.cz/do/rect/el/estud/prif/ps06/mikroorg/web/cla.htm](http://is.muni.cz/do/rect/el/estud/prif/ps06/mikroorg/web/cla.htm)

Miniatlas mikroorganismů [online]. 2006 [cit. 2014-11-06]. Dostupné z:[http:// http://is.muni.cz/do/rect/el/estud/prif/ps06/mikroorg/web/fus.htm](http://is.muni.cz/do/rect/el/estud/prif/ps06/mikroorg/web/fus.htm)

Miniatlas mikroorganismů [online]. 2006 [cit. 2014-11-06]. Dostupné z:[http:// http://is.muni.cz/do/rect/el/estud/prif/ps06/mikroorg/web/muc.htm](http://is.muni.cz/do/rect/el/estud/prif/ps06/mikroorg/web/muc.htm)

Miniatlas mikroorganismů [online]. 2006 [cit. 2014-11-06]. Dostupné z:[http:// http://is.muni.cz/do/rect/el/estud/prif/ps06/mikroorg/web/pen-chr.htm](http://is.muni.cz/do/rect/el/estud/prif/ps06/mikroorg/web/pen-chr.htm)

MIŽÁKOVÁ, A., M. PIPOVÁ a P. TUREK. The Occurrence of Moulds in Fermented Raw Meat Products. *Czech Journal of Food Science*. 2002, roč. 20, č. 3, s. 89-94.

NAYAK, Sukanta Kumar. Biology of Eukaryotic Probiotics. *Microbiology Monographs*. 2011, č. 21, s. 29-55.

O'HARA a F. SHANAHAN. Mechanisms of action of probiotics in intestinal diseases. *The Scientific World Journal*., 2007, č. 7, s. 31-46.

PAPAGIANNI, M., AMBROSIADIS a G. FILIOUSIS. Mould growth on traditional greek sausages and penicillin production by *Penicillium* isolates. *Meat Science*. 2007, roč. 4, č. 76, s. 653-657.

POLÁK, Petr, LONE Andersen. Zdravotní nezávadnost a bezpečnost masných výrobků a význam ochranných kultur. 8. Seminář o údržnosti masa, masných výrobků a lahůdek, Skalský Dvůr 5-6. Září 2006, č. 8, s. 24-25.

PITT, J.I. Mycotoxins: Ochratoxin A. *Encyclopedia of Food Safety*. Elsevier, 2014, č. 2, s. 304

PITTB, J. I. Mycotoxins: Patulin. *Encyclopedia of Food Safety*. Elsevier, 2014, č. 2, s. 310-312.

SARELA, M. H., H. L. ALAKOMI, A. PUHAKKA a J. MATTO. Effect of the fermentation pH on the storage stability of *Lactobacillus rhamnosus* preparations and suitability of in vitro analyses of cell physiological functions to predict it. *Journal of Applied Microbiology*. 2009, č. 106, s. 1204-1212.

SIMONCINI, N., D. ROTELLI, R. VIRGILI a S. QUINTAVALLA. Dynamic and characterization of yeasts during ripening of typical Italian dry-cured ham. *Food Microbiology*. 2007, roč. 6, č. 24, s. 577-584.

SINGH, Dheeraj K., Erdene-Ochir GANBOLD, Eun-Min CHO, Kwang-Hwi CHO, Doseok KIM, Jaebum CHOO, Sehun KIM, Cheol Min LEE, Sung Ik YANG a Sang-Woo JOO. Detection of the mycotoxin citrinin using silver substrates and Raman spectroscopy. *Journal of Hazardous Materials*. 2014, č. 265, s. 89-95.

Státní zemědělská a potravinářská inspekce [online]. 2014 [cit. 2014-11-06]. Dostupné z: <http://www.szpi.gov.cz/>

SUNESSEN, L. O., DORIGONI, V., ZANARDI, E., and STAHNKE, L. H. Volatile compounds released during ripening in Italian dried sausage. *Meat Science*. 2001, č. 58, s. 93-97.

SUNESSEN, L. O. a L. H. STAHNKE. Mould starter cultures for dry sausages —selection, application and effects. *Meat Science*. 2003, roč. 65, č. 3, s. 935-948.

ŠILHÁNKOVÁ, Ludmila. *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnologii*. Vyd. 3. [i. e. 4.], opr. a dopl., v nakl. Academia 1. vyd. [i. e. 2. vyd.]. Praha: Academia, 2008, 363 s. ISBN 978-802-0017-031.

TABUC, C., J. D. BAILLY, S. BAILLY, A. QUERIN a P. GUERRE. Toxigenic potential of fungal mycoflora isolated from dry cured meat products: preliminary study. *Revue de medecine veterinaire*. 2004, roč. 5, č. 155, s. 287-291.

Terra di delizie [online]. 2013 [cit. 2014-10-30]. Dostupné z: <http://www.terradidelizie.it/en/products/salame-di-varzi-dop>

TIRMENSTEIN, M.A. a R. MANGIPUDY. Aflatoxin. *Encyclopedia of Toxicology*. Elsevier, 2014, č. 3, s. 104.

TOLDRÁ, Fidel, Editor. *Meat biotechnology*. New York: Springer, 2008. ISBN 978-038-7793-825.

TOLDRÁ, Fidel. *Handbook of meat processing*. Ames, Iowa: Wiley-Blackwell, 2010, 566 p. ISBN 978-081-3821-825

TOLDRÁ, Fidel a Y HUI. *Handbook of fermented meat and poultry*. 1st ed. Ames, Iowa: Blackwell Pub., 2007, s. 171-177. ISBN 0813814774.

VegaJardin [online]. 1999-2014 [cit. 2014-10-30]. Dostupné z: <http://www.vegajardin.com/cured-meat/extra-fuet-149.html>).

VOTAVA, Miroslav. *Lékařská mikrobiologie speciální*. Brno: Neptun, 2003, 495 s. ISBN 80-902-8966-5.

VUYST, Luc De, Gwen FALONY a Frédéric LEROY. Probiotics in fermented sausages. *Meat Science*. 2008, roč. 80, č. 1, s. 75-78.

Wedliny Domowe. [Www.meatsandsausages.com](http://www.meatsandsausages.com) [online]. 2005 [cit. 2014-10-24]. Dostupné z: <http://www.meatsandsausages.com/sausage-types/fermented-sausage/cultures>

9 SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Nákres <i>Alternaria alternata</i> (is. muni, 2006)	9
Obrázek 2: Nákres <i>Aspergillus niger</i> (is. muni, 2006).....	10
Obrázek 3:nákres <i>Penicillium Chrysogenum</i> (is. muni, 2006).....	11
Obrázek 4: Nákres <i>Cladosporium herbarum</i> (is.muni, 2006)	12
Obrázek 5: Nákres <i>Fusarium culmorum</i> (is.muni, 2006).....	13
Obrázek 6: Nákres <i>Mucor plembeus</i> (is.muni,2006).....	14
Obrázek 7: Schematický přehled o mechanismu tvorby chuťových látek během fermentace (Farnworth, 2003).	23
Obrázek 10: Uherský salám (Fresh.iprima.cz., 2014).....	36
Obrázek 11: Bergamasco (F.lli rizzi, 2014).....	37
Obrázek 12: Varzi (Terra di delizie, 2013)	37
Obrázek 13: Sopressata (Food Shed, 2009)	38
Obrázek 14: Chorizo (Food, Music, God, 2011).....	38
Obrázek 15: Fuet (VegaJardín, 2014)[.....	39

10 SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: sortiment kulturních plísní (Wedliny Domowe, 2005)	28
Tabulka 2: sortiment kulturních plísní Lyocarni (Meat cultures, 2013)	28